

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

HELLOANA AZEVEDO BARBOSA

**SÍNTESE E ESTUDOS DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E DOS
MECANISMOS DE AÇÃO DE ARIL-SULFONAMIDAS DERIVADAS DE
FENILPROPANOIDES FRENTE ÀS LINHAGENS PROVENIENTES DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA HUMANA**

Alfenas/MG

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

HELLOANA AZEVEDO BARBOSA

**SÍNTESE E ESTUDOS DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E DOS
MECANISMOS DE AÇÃO DE ARIL-SULFONAMIDAS DERIVADAS DE
FENILPROPANOIDES FRENTE ÀS LINHAGENS PROVENIENTES DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.
Orientador: Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho.
Coorientadora: Profa. Dra. Marisa Ionta
Colaboradores: Ms. Guilherme Álvaro Ferreira da Silva e Bianca Pereira do Vale.

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Barbosa, Helloana Azevedo
B238s Síntese e estudos da relação estrutura-atividade e dos mecanismos de ação de aril-sulfonamidas derivadas de fenilpropanoides frente às linhagens provenientes de adenocarcinoma de mama humana / Helloana Azevedo Barbosa – Alfenas, MG, 2021.

150 f.: il. –

Orientador: Diogo Teixeira Carvalho.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Fenilpropanoides. 2. Sulfonamidas. 3. Hibridação molecular. 4. Atividade antiproliferativa. 5. Câncer de mama. I. Carvalho, Diogo Teixeira. II. Título.

CDD- 615

HELLOANA AZEVEDO BARBOSA

SÍNTESE E ESTUDOS DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE ARILSULFONAMIDAS DERIVADAS DE FENILPROPANOIDES FRENTE ÀS LINHAGENS PROVENIENTES DE ADENOCARCINOMA DE MAMA HUMANA.

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2021.

Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Daniel Henriques Soares Leal
Instituição: Universidade Federal de Itajubá

Profa. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcos Vinícios Salles Dias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Rudy Bonfilio
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Henriques Soares Leal, Usuário Externo**, em 26/02/2021, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diogo Teixeira Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 26/02/2021, às 15:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Vinícios Salles Dias, Professor do Magistério Superior**, em 26/02/2021, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lílian Sibelle Campos Bernardes, Usuário Externo**, em 26/02/2021, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rudy Bonfilio, Professor do Magistério Superior**, em 01/03/2021, às 07:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0471602** e o código CRC **71A89412**.

Dedico esta Tese:

Aos meus amados pais, Paulo e Lázara,

Ao meu grande amor, Guilherme,

**E ao meu filho Bernardo, minha razão de
viver e luz na minha vida.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se mostrar presente em todos os momentos, principalmente aqueles de maiores dificuldades e medos, por preencher meu coração com alegria e gratidão, por me proporcionar compartilhar deste momento com pessoas que foram parte fundamental dessa conquista. A frase “Entregue o seu caminho ao Senhor; confie nele, e ele agirá” condiz com todo caminho que trilhei, percebendo que Deus é bom o tempo todo!

Ao meu pequeno, porém grande amor, meu filho Bernardo, por ser a minha fonte de paz, pela alegria que você trouxe para nossas vidas e pelo carinho e doçura que o seu olhar nos proporciona. Somos abençoados pelo menino amável que você se tornou. Que a felicidade seja sempre seu destino. Te amo daqui até a Lua, ida e volta!

Ao meu companheiro de vida e meu grande amor, Guilherme, por toda a cumplicidade, carinho, respeito e amor, por ser um exemplo de filho, irmão, pai, marido, amigo e profissional. Sem seu apoio, nada disso seria possível. Obrigada por tanto que você fez por mim nesses últimos anos. Te amo muito!

Aos meus pais, Paulo e Lázara, por todo amor e carinho, por serem exemplos de união e pela fé que depositaram em mim, permitindo que eu chegasse nesse momento com toda a certeza que cada passo que eu dei na minha vida teve o amparo de vocês. Obrigada pelo zelo que vocês têm pelas filhas e netos, e que mesmo apesar da distância que nos separam vocês sempre estão presentes em nossas vidas. Amo muito vocês!

Às minhas irmãs, Hellen e Hérica, aos meus cunhados, Ricardo e Cláudio, e aos meus sobrinhos, Isabela, Marina, Miguel e Maria Luíza, por todo carinho e apoio e pelos momentos de alegria e descontração.

A toda minha família, em especial a minha tia Regina, que tanto se orgulha das minhas conquistas.

Aos meus sogros, Sandra e Anélio, e aos meus cunhados, Maria Fernanda e Gustavo, agradeço imensamente pelas orações, pelas palavras certas ditas nos momentos que mais necessitamos ouvir, por todo amor e carinho.

Aos compadres, Renato e Camila, e a querida Guiomar, pelo afeto que vocês têm com a minha família, pelos vários momentos de boas risadas que compartilhamos e por serem nossos grandes amigos em Alfenas, e agora, em Areado.

Às amigas de graduação, Ana Rita, Laura, Mariana e Thamires, que apesar da distância e do tempo, quando nos falamos parece que nem se passaram tantos anos assim desde nossa formatura.

Aos colegas do LQFar, em especial Bianca, Dalila, Daniela e José pelos ótimos momentos que passamos juntos trabalhando e compartilhando aprendizado.

Aos TAEs, Leandro e Gabriel, pelo auxílio na realização das análises de RMN, e ao professor Rudy e ao Ms. Thiago dos Santos pela contribuição nas análises de IV e EM, respectivamente.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da UNIFAL-MG por todo o profissionalismo e conhecimento que me foi passado nesses 11 anos de estudo na instituição, desde a graduação, mestrado e doutorado.

À Universidade Federal de Alfenas pelo espaço concedido na realização da pesquisa e pelos esforços diários em prol da ciência e do crescimento institucional acadêmico.

À coorientadora, Marisa Ionta, pelo profissionalismo e dedicação em gerar frutos desse trabalho e pela disponibilidade em me conduzir tanto no mestrado quanto no doutorado.

E ao orientador Diogo, pela dedicação em retribuir todo o conhecimento que lhe foi passado, pela compreensão nos momentos em que me ausentei devido à maternidade, pela amizade que esses 10 anos nos proporcionou e que pretendo levar para a vida. Obrigada por ter me apresentado o encanto da Química Farmacêutica e por ensiná-la com tanto brilho nos olhos.

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

*Ninguém ignora tudo.
Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre.*

(Paulo Freire, 1989)

RESUMO

Estudo recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que derivados aril-sulfonamídicos inéditos, obtidos pela técnica de hibridação molecular a partir do eugenol e di-hidroeuogenol, apresentam promissora atividade antiproliferativa sobre células derivadas de adenocarcinoma de mama (MCF-7). O derivado **4b** alterou a dinâmica de progressão do ciclo celular e induziu bloqueio na transição G1/S. Esse efeito foi correlacionado à redução dos níveis proteicos das ciclinas D1 e E. Além disso, foi demonstrado que **4b** tem atividade pró-apoptótica sobre células MCF-7. Assim sendo, com o intuito de compreender a relação estrutura-atividade (REA) que modula a atividade antiproliferativa de **4b** sobre células tumorais, foi proposta a síntese de nove análogos estruturais (**HAB 1 a 9**). Deste modo, além da investigação dos mecanismos de ação associados à atividade antiproliferativa de **4b** sobre células MCF-7, objetivou-se: a) Sintetizar os análogos estruturais inéditos **HAB 1 a 9**; b) Avaliar a citotoxicidade de **HAB 1 a 9** sobre células MCF-7, MDA-MB 231, Hs 578T e HepG2; e c) Estabelecer estudos de REA entre **4b** e os análogos estruturais propostos com a atividade biológica *in vitro* observada. **HAB 1 a 9** foram obtidos com sucesso e suas estruturas químicas confirmadas por análises de espectrometria de IV, RMN e EM. Os resultados mostraram que frente às linhagens MCF-7 e MDA-MB 231, **HAB 1, 2 e 4** reduziram eficientemente a viabilidade das culturas tratadas, ao passo que, na linhagem HepG2 os derivados **HAB 2 e 9** foram os mais efetivos. Visto que a redução da viabilidade de culturas de MDA-MB 231 tratadas com **HAB 2 e 4**, nos estudos preliminares, foi maior que 50 %, essas duas substâncias foram selecionadas para caracterização do perfil antiproliferativo e/ou citotóxico, onde observou-se que **HAB 2** foi o derivado mais promissor da série. **HAB 2** promoveu alterações morfológicas e sobre a dinâmica de progressão do ciclo celular de culturas MDA-MB 231, induzindo bloqueio na transição G1/S. Tomados em conjunto, os resultados demonstram que o híbrido fenilpropanoide-sulfonamida **4b** e seu análogo estrutural **HAB 2** apresentam estruturas químicas inovadoras e exibiram um perfil de atividade antiproliferativa promissora frente às culturas MCF-7 e MDA-MB 231, respectivamente. **4b** e seu análogo **HAB 2** podem ser considerados para compor estudos *in vivo*, em busca de validar o potencial antitumoral frente ao câncer de mama positivo para receptor de estrogênio e triplo negativo, respectivamente.

Palavras-chave: Fenilpropanoides; Aril-sulfonamidas; Hibridação molecular; Atividade antiproliferativa; Câncer de mama.

ABSTRACT

A study recently published by our research group showed that novel aryl-sulfonamide derivatives, obtained by the molecular hybridization from eugenol and dihydroeugenol, had promising antiproliferative activity on cells derived from breast adenocarcinoma (MCF-7). Derivative **4b** altered the dynamics of cell cycle progression and induced arrest in the G1/S transition. This effect was correlated with a reduction in the protein levels of cyclins D1 and E. Furthermore, **4b** demonstrated pro-apoptotic activity on MCF-7 cells. Therefore, to understand the structure-activity relationship (SAR) that modulates the antiproliferative activity of **4b** on tumor cells, the synthesis of nine structural analogues (**HAB 1 to 9**) was proposed. Thus, in addition to investigating the mechanisms of action associated with the antiproliferative activity of **4b** on MCF-7 cells, the present study aimed to: a) Synthesize the structural analogues **HAB 1 to 9**; b) Evaluate the cytotoxicity of **HAB 1 to 9** on MCF-7, MDA-MB 231, Hs 578T and HepG2 cells; and c) Establish SAR studies between **4b** and the proposed structural analogues with the observed in vitro biological activity. **HAB 1 to 9** were successfully obtained, and their structures confirmed by IR, NMR and MS analyses. The results showed that against MCF-7 and MDA-MB 231 cell lines, **HAB 1, 2 and 4** efficiently reduced the viability of the treated cultures, whereas in HepG2 cell line **HAB 2 and 9** were the most effective. Since the reduction in viability of MDA-MB 231 cultures treated with **HAB 2 and 4** in preliminary studies was higher than 50 %, these two substances were selected for characterization of the antiproliferative and/or cytotoxic profile, where it was observed that **HAB 2** was the most promising derivative of the series. **HAB 2** promoted morphological changes and on the dynamics of cell cycle progression of MDA-MB 231 cultures, inducing arrest in the G1/S transition. Taken together, the results demonstrated that phenylpropanoid-sulfonamide hybrid **4b** and its structural analog **HAB 2** present new chemical structures and exhibited a promising antiproliferative activity profile against MCF-7 and MDA-MB 231 cultures, respectively. **4b** and its analogue **HAB 2** can be considered to compose in vivo studies, in search of validating the antitumor potential against estrogen receptor positive and triple negative breast cancer, respectively.

Keywords: Phenylpropanoids; Aryl-sulfonamides; Molecular hybridization; Antiproliferative activity; Breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estruturas químicas do di-hidroeuugenol e do derivado aril-sulfonamídico 4b . Este derivado foi obtido a partir da técnica de hibridação molecular envolvendo o di-hidroeuugenol (em azul) e a subunidade aril-sulfonamídica (em vermelho).....	24
Figura 2 –	Estruturas químicas de 4b e dos análogos estruturais HAB 1 a 9 obtidos neste trabalho de doutorado. Os grupos destacados em vermelho relacionam-se com o propósito deste trabalho e diferem-se em relação à substância protótipo 4b	25
Figura 3 –	Estrutura química do eugenol ou 4-alil-2-metoxifenol.....	26
Figura 4 –	Estruturas químicas de fármacos que contêm o grupo aril-sulfonamida ou outro diretamente relacionado.....	28
Figura 5 –	Estruturas químicas dos derivados aril-sulfonamídicos E7010 e E7070.	29
Figura 6 –	Estrutura química de 3e.	30
Figura 7 –	Estruturas químicas de 16 e 17.	30
Figura 8 –	Estrutura química de 5b.	31
Figura 9 –	Estrutura química de 8k.	32
Figura 10 –	Estrutura química de 11.	32
Figura 11 –	Estrutura química de 4n.	33
Figura 12 –	Estrutura química de 7d.	34
Figura 13 –	Esquema sintético global para a obtenção de 4b e de seus análogos estruturais HAB 1 a 9 . Os grupos funcionais destacados em vermelho referem-se aos análogos estruturais finais e diferem-se da substância protótipo 4b . Os rendimentos obtidos ao final de cada etapa reacional e/ou de purificação encontram-se entre parênteses.	38
Figura 14 –	Esquema de nitração do di-hidroeuugenol (1).	39
Figura 15 –	Esquema de nitro-redução do intermediário nitrado 2.....	40
Figura 16 –	Esquema de obtenção de 4b e dos análogos HAB 1, HAB 2, HAB 4 a partir do intermediário amínico 5.	41
Figura 17 –	Esquema de obtenção do análogo estrutural HAB 3 a partir do intermediário amínico 5.....	45
Figura 18 –	Esquema de obtenção do análogo HAB 9 a partir do intermediário amínico 5.....	47

Figura 19 –	Esquema de obtenção do análogo estrutural HAB 6 a partir da substância protótipo 4b	49
Figura 20 –	Esquema de <i>O</i> -desmetilação do intermediário nitrado 2	50
Figura 21 –	Esquema de nitro-redução do intermediário nitrado di-hidroxilado 3	52
Figura 22 –	Esquema de obtenção do análogo HAB 5 a partir do intermediário amínico di-hidroxilado 4	53
Figura 23 –	Esquema de obtenção do análogo HAB 8 a partir da anilina (8).....	54
Figura 24 –	Esquema de nitro-redução do intermediário nitrado 6	55
Figura 25 –	Esquema de obtenção do análogo HAB 7 a partir do intermediário amínico 7	56
Figura 26 –	Estruturas químicas dos derivados aril-sulfonamídicos inéditos, obtidos em estudo preliminar a partir do eugenol (4a , 4a' , 5a e 5a') e di-hidroeugenol (4b , 4b' , 5b e 5b').....	59
Figura 27 –	Estruturas químicas da substância protótipo 4b e dos análogos estruturais HAB 1 a 9 obtidos neste trabalho de doutorado. Os grupos destacados em vermelho relacionam-se com o propósito deste trabalho e diferem-se com relação à substância protótipo 4b	65
Figura 28 –	Mecanismo proposto para a reação de nitração aromática do di-hidroeugenol (1).....	67
Figura 29 –	Mecanismo proposto para a redução de compostos nitro-aromáticos utilizando hidrazina.....	69
Figura 30 –	Mecanismo proposto para a reação de obtenção de 4b e dos análogos estruturais HAB 1 , HAB 2 e HAB 4 a partir do intermediário amínico 5	71
Figura 31 –	Mecanismo proposto para a reação de obtenção de HAB 3 a partir do intermediário amínico 5	72
Figura 32 –	Mecanismo de reação de <i>N</i> -metilação proposto para a obtenção de HAB 6 a partir do derivado aril-sulfonamídico 4b	76
Figura 33 –	Mecanismo proposto para a reação do intermediário 5 com o cloreto de 4-nitrobenzoíla para obtenção do intermediário amídico.....	78
Figura 34 –	Mecanismo de reação proposto para a obtenção de HAB 9 a partir do intermediário amínico.	79
Figura 35 –	Mecanismo proposto da reação de <i>O</i> -desmetilação para a obtenção do intermediário 3	81

Figura 36 – Mecanismo proposto para a reação de obtenção de HAB 5 a partir do intermediário amínico di-hidroxilado 4.	82
Figura 37 – Mecanismo proposto para a reação de obtenção de HAB 7 e HAB 8 a partir dos intermediários amínicos 7 ou 8, respectivamente.	84
Figura 38 – Viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico Resazurina após 48 h de tratamento com os derivados aril-sulfonamídicos do eugenol (4a , 4a' , 5a e 5a') e di-hidroeugenol (4b , 4b' , 5b e 5b').	87
Figura 39 – Efeitos do tratamento com 4b sobre o comportamento proliferativo de culturas de MCF-7.	90
Figura 40 – O tratamento com 4b alterou a cinética de progressão do ciclo celular em culturas de MCF-7.	92
Figura 41 – O tratamento com 4b exibiu potencial pró-apoptótico frente às culturas de MCF-7.	94
Figura 42 – Viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico (MTS) após 48 h de tratamento com os análogos estruturais de 4b (HAB 1 a 9) na concentração de 50,0 μM	96
Figura 43 – Viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico em linhagens tumorais de mama (MDA-MB 231 e MCF-7) e em linhagem normal (CCD-1059Sk), após 48 h de tratamento com as substâncias HAB 2 , HAB 4 e 4b	98
Figura 44 – População de células viáveis e inviáveis obtidas por meio do ensaio de exclusão com azul de <i>Trypan</i> na linhagem MDA-MB 231 após 24 e 48 h de tratamento com HAB 2 e HAB 4 na concentração de 50,0 μM	99
Figura 45 – Imagens representativas obtidas por microscopia de contraste de fase após 24 h de tratamento com HAB 2 nas concentrações de 50,0 e 25,0 μM	100
Figura 46 – Efeitos do tratamento com HAB 2 sobre a cinética de progressão do ciclo celular de culturas de MDA-MB 231 após 24 h nas concentrações de 25,0 e 50,0 μM	101
Figura 47 – Espectro de absorção na região do IV da substância HAB 1 (cm^{-1}).	117
Figura 48 – Espectro de absorção na região do IV da substância HAB 4 (cm^{-1}).	117
Figura 49 – Espectro de absorção na região do IV da substância HAB 2 (cm^{-1}).	117
Figura 50 – Espectro de absorção na região do IV da substância HAB 9 (cm^{-1}).	118
Figura 51 – Espectro de absorção na região do IV da substância 4b (cm^{-1}).	118
Figura 52 – Espectro de absorção na região do IV da substância HAB 6 (cm^{-1}).	118
Figura 53 – Espectro de absorção na região do IV da substância HAB 7 (cm^{-1}).	119

Figura 54 –	Espectro de absorção na região do IV da substância HAB 8 (cm ⁻¹).....	119
Figura 55 –	Espectro de RMN de ¹ H da substância 2 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	120
Figura 56 –	Espectro de RMN de ¹³ C da substância 2 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	120
Figura 57 –	Subespectro DEPT-135 da substância 2 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	121
Figura 58 –	Espectro de RMN de ¹ H da substância 5 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	121
Figura 59 –	Espectro de RMN de ¹³ C da substância 5 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	122
Figura 60 –	Subespectro DEPT-135 da substância 5 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	122
Figura 61 –	Espectro de RMN de ¹ H da substância HAB 1 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	123
Figura 62 –	Espectro de RMN de ¹ H da substância HAB 4 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	123
Figura 63 –	Espectro de RMN de ¹ H da substância HAB 2 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	124
Figura 64 –	Espectro de RMN de ¹ H da substância HAB 3 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	124
Figura 65 –	Espectro de RMN de ¹ H da substância 4b (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).....	125
Figura 66 –	Espectro de RMN de ¹³ C da substância HAB 1 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	125
Figura 67 –	Espectro de RMN de ¹³ C da substância HAB 4 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	126
Figura 68 –	Espectro de RMN de ¹³ C da substância HAB 2 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	126
Figura 69 –	Espectro de RMN de ¹³ C da substância HAB 3 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	127
Figura 70 –	Espectro de RMN de ¹³ C da substância 4b (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz).....	127
Figura 71 –	Subespectro DEPT-135 da substância HAB 1 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	128
Figura 72 –	Subespectro DEPT-135 da substância HAB 4 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	128
Figura 73 –	Subespectro DEPT-135 da substância HAB 2 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	129
Figura 74 –	Subespectro DEPT-135 da substância HAB 3 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	129
Figura 75 –	Subespectro DEPT-135 da substância 4b (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz).....	130
Figura 76 –	Espectro de RMN de ¹ H da substância HAB 6 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	130
Figura 77 –	Espectro de RMN de ¹³ C da substância HAB 6 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	131
Figura 78 –	Subespectro DEPT-135 da substância HAB 6 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	131
Figura 79 –	Espectro de RMN de ¹ H da substância HAB 9 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).	132
Figura 80 –	Espectro de RMN de ¹³ C da substância HAB 9 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz).	132
Figura 81 –	Subespectro DEPT-135 da substância HAB 9 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz).	133
Figura 82 –	Espectro de RMN de ¹ H da substância 3 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	133
Figura 83 –	Espectro de RMN de ¹³ C da substância 3 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	134
Figura 84 –	Subespectro DEPT-135 da substância 3 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	134
Figura 85 –	Espectro de RMN de ¹ H da substância HAB 5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).	135
Figura 86 –	Espectro de RMN de ¹³ C da substância HAB 5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz).	135
Figura 87 –	Subespectro DEPT-135 da substância HAB 5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz).	136

Figura 88 –	Espectro de RMN de ^1H da substância HAB 7 (DMSO- d_6 , 300 MHz).	136
Figura 89 –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância HAB 7 (DMSO- d_6 , 75 MHz).	137
Figura 90 –	Subespectro DEPT-135 da substância HAB 7 (DMSO- d_6 , 75 MHz).	137
Figura 91 –	Espectro de RMN de ^1H da substância HAB 8 (DMSO- d_6 , 300 MHz).	138
Figura 92 –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância HAB 8 (DMSO- d_6 , 75 MHz).	138
Figura 93 –	Subespectro DEPT-135 da substância HAB 8 (DMSO- d_6 , 75 MHz).	139
Figura 94 –	Espectro de Massas da substância HAB 1	140
Figura 95 –	Espectro de Massas da substância HAB 4	141
Figura 96 –	Espectro de Massas da substância HAB 2	142
Figura 97 –	Espectro de Massas da substância HAB 9	143
Figura 98 –	Espectro de Massas da substância HAB 3	144
Figura 99 –	Espectro de Massas da substância 4b	145
Figura 100 –	Espectro de Massas da substância HAB 5	146
Figura 101 –	Espectro de Massas da substância HAB 6	147
Figura 102 –	Espectro de Massas da substância HAB 7	148
Figura 103 –	Espectro de Massas da substância HAB 8	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Quantidades dos reagentes e tempo de reação necessário para a obtenção das substâncias HAB 1 , HAB 2 , HAB 4 e 4b	42
Tabela 2 –	Valores de CI_{50} (μM) determinados após tratamento por 48 h com os derivados aril-sulfonamídicos 4b , 4b' e 5a e com seus precursores (eugenol, di-hidroeugenol e sulfanilamida).	88
Tabela 3 –	Valores de CI_{50} (μM) determinados após tratamento por 48 h com as substâncias HAB 2 e HAB 4 e com a substância protótipo 4b	97
Tabela 4 –	Valores de Índice de Seletividade (IS) determinados nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento por 48 h com as substâncias HAB 2 e HAB 4 e com a substância protótipo 4b	97

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
A549	Adenocarcinoma de pulmão humano
Akt	Quinase B
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X Protein</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
Caki-1	Linhagem de carcinoma renal humano
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Caspase	<i>Cysteine-aspartic acid protease</i>
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50 % das células
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCD-1059Sk	Linhagem de fibroblastos de pele normal humana
CCS	Cromatografia em coluna de sílica
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CDK	Cinases dependentes de ciclinas (<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>)
Cip/Kip	<i>CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein</i>
CI ₅₀	Concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular
C _{inibitória}	Concentração inibitória
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
DEPT	Intensificação sem distorção via transferência de polarização (<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
DHAA	Derivados do ácido desidroabiético
DMAB	<i>p</i> -dimetilaminobenzaldeído
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
E2F1	<i>E2F Transcription Factor 1</i>

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imun absorção ligado à enzima (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
EM	Espectrometria de Massas
eq.	Equivalente
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ESI	Ionização por electrospray (<i>Electrospray ionization</i>)
EtOH	Etanol
F.F.	Faixa de fusão
F.M.	Fórmula molecular
g	Giros
G0	<i>Gap 0</i> (intervalo celular 0)
G1	<i>Gap 1</i> (intervalo celular 1)
G2	<i>Gap 2</i> (intervalo celular 2)
hCA	Anidrase carbônica humana
HCT-116	Linhagem de carcinoma de cólon humano
HDAC	Histona desacetilase
HepG2	Linhagem de hepatocarcinoma humano
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HL-7702	Linhagem normal de fígado humano
Hs 578T	Linhagem de carcinoma de mama humana
HT-144	Linhagem de melanoma humano
HT-29	Linhagem de carcinoma de cólon humano
Hz	Hertz
IAP	Inibidor de proteínas da apoptose
IL-6	Interleucina-6
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de Seletividade
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
K562	Linhagem eritroleucêmica humana
Ki-67	Marcador de proliferação celular
LABAInt	Laboratório de Biologia Animal Integrativa
Lit.	Literatura

LQFAR	Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica
M	Mitose
m	Multiplete
<i>m</i>	<i>meta</i>
M.M.	Massa molar
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
M21	Linhagem de melanoma humano
MCF-10A	Linhagem epitelial normal de mama humana
MCF-7	Linhagem de adenocarcinoma de mama humana
MDA-MB 231	Linhagem de adenocarcinoma de mama humana
MHz	MegaHertz
MMP	Metaloproteinase de matriz
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
NCI-H460	Linhagem de carcinoma pulmonar humano
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NF-Y	Fator nuclear Y
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno (<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>)
MeOH	Metanol
<i>o</i>	<i>orto</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
p21	Proteína inibidora de CDK
p53	Proteína supressora de tumor
pág.	Página
PBSA	Tampão salina fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PC-3	Linhagem de carcinoma de próstata humano
Pd/C	Paládio suportado em carvão ativado
PE	Ficoeritrina
ppm	Partes por milhão
pRb	Proteína retinoblastoma (<i>Retinoblastoma Protein</i>)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
Q-TOF	Quadrupolo-Tempo de voo (<i>Quadropole-Time of Flight</i>)

RE	Receptor de estrógeno
REA	Relação estrutura-atividade
Rf	Fator de retenção
RIPA	Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuclease
RP	Receptor de progesterona
rpm	Rotações por minuto
S	Fase celular de síntese de DNA
s	Simpleto
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEAr	Substituição Eletrofílica Aromática
sex	Sexteto
SFB	Soro fetal bovino
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SK-Hep-1	Hepatocarcinoma humano
SKOV-3	Linhagem de adenocarcinoma de ovário humano
sl	Simpleto largo
S _N 2	Substituição nucleofílica bimolecular
SNU-638	Linhagem de carcinoma de estômago humano
STAT3	Fator de transcrição 3 ativado por tirosina quinase
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
td	tripleto duplo
THF	Tetraidrofurano
TP53	Gene supressor de tumor
TTBS	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i>
v/v	Volume por volume
δ	Deslocamento químico (em ppm)

μL	Microlitros
μM	Micromolar
ν	Estiramento ou deformação axial
$\bar{\nu}$	Número de onda (em cm^{-1})

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1	EUGENOL E SEU POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO	26
2.2	ARIL-SULFONAMIDA E SEUS DERIVADOS	28
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3.2.1	Relativos à substância protótipo 4b	35
3.2.2	Relativos aos análogos estruturais de 4b	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	PARTE QUÍMICA.....	37
4.1.1	Procedimentos gerais	37
4.1.2	Procedimentos de síntese e dados de caracterização	38
4.1.2.1	Obtenção do intermediário nitrado derivado do di-hidroeugenol (ZOLFIGOL; GHAEMI; MADRAKIAN, 2001).	39
4.1.2.1.1	<i>Dados de caracterização de 2-metoxi-6-nitro-4-propilfenol (2)</i>	39
4.1.2.2	Obtenção do intermediário amínico derivado do di-hidroeugenol nitrado (COMESAÑA-GÁNDARA <i>et al.</i> , 2014)	40
4.1.2.2.1	<i>Dados de caracterização de 2-amino-6-metoxi-4-propilfenol (5)</i>	40
4.1.2.3	Obtenção de 4b e dos análogos estruturais HAB 1 , HAB 2 , HAB 3 e HAB 4 a partir do intermediário amínico 5 , derivado do di-hidroeugenol (adaptado de SILVA <i>et al.</i> , 2015).....	41
4.1.2.3.1	<i>Dados de caracterização de N-(4-(N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)sulfamoil)fenil)acetamida (4b)</i>	42
4.1.2.3.2	<i>Dados de caracterização de N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)benzenossulfonamida (HAB 1)</i>	43
4.1.2.3.3	<i>Dados de caracterização de N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-4-nitrobenzenossulfonamida (HAB 2)</i>	44
4.1.2.3.4	<i>Dados de caracterização de N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-4-metilbenzenossulfonamida (HAB 4)</i>	44

4.1.2.3.5	<i>Dados de caracterização de 2-metoxi-6-(4-metilfenilssulfonamida)-4-propilfenil 4-metilbenzenossulfonato (HAB 3)</i>	46
4.1.2.4	Obtenção do análogo estrutural HAB 9 a partir do intermediário amínico 5 (SENER <i>et al.</i> , 2000)	47
4.1.2.4.1	<i>Dados de caracterização de 4-acetamido-N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)benzamida (HAB 9)</i>	48
4.1.2.5	Obtenção do análogo estrutural HAB 6 a partir da substância protótipo 4b (adaptado de COOLEN; MEEUWIS; van LEEUWEN, 1995)	49
4.1.2.5.1	<i>Dados de caracterização de N-(4-(N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-N-metilsulfamoil)fenil)acetamida (HAB 6)</i>	49
4.1.2.6	Obtenção do intermediário nitrado di-hidroxilado 3 a partir do intermediário 2 (adaptado de KOSAK <i>et al.</i> , 2015).....	50
4.1.2.6.1	<i>Dados de caracterização de 3-nitro-5-propilbenzeno-1,2-diol (3)</i>	51
4.1.2.7	Obtenção do intermediário amínico di-hidroxilado 4 a partir do intermediário 3 (COMESAÑA-GÁNDARA <i>et al.</i> , 2014)	52
4.1.2.7.1	<i>Dados de caracterização de 3-amino-5-propilbenzeno-1,2-diol (4)</i>	52
4.1.2.8	Obtenção do análogo estrutural HAB 5 a partir do intermediário amínico di-hidroxilado 4 (SILVA <i>et al.</i> , 2015).....	53
4.1.2.8.1	<i>Dados de caracterização de N-(4-(N-(2,3-dihidroxi-5-propilfenil)sulfamoil)fenil)acetamida (HAB 5)</i>	53
4.1.2.9	Obtenção do análogo estrutural HAB 8 a partir da anilina comercial (adaptado de SILVA <i>et al.</i> , 2015).....	54
4.1.2.9.1	<i>Dados de caracterização de N-(4-(N-fenilsulfamoil)fenil)acetamida (HAB 8)</i>	55
4.1.2.10	Obtenção do intermediário amínico 7 (COMESAÑA-GÁNDARA <i>et al.</i> , 2014)	55
4.1.2.10.1	<i>Dados de caracterização de 2-aminofenol (7)</i>	56
4.1.2.11	Obtenção do análogo estrutural HAB 7 a partir do intermediário amínico 7 (adaptado de SILVA <i>et al.</i> , 2015).....	56
4.1.2.11.1	<i>Dados de caracterização de N-(4-(N-(2-hidroxifenil)sulfamoil)fenil)acetamida (HAB 7)</i>	57
4.2	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO .	57
4.2.1	Linhagens celulares e condições de cultivo	57
4.2.2	Viabilidade celular	58

4.2.2.1	Ensaio colorimétrico	58
4.2.2.2	Ensaio de exclusão com azul de <i>Trypan</i>	59
4.2.3	Aspectos Morfológicos	60
4.2.4	Ensaio de capacidade clonogênica	60
4.2.5	Análise da progressão do ciclo celular por quantificação de DNA em citometria de fluxo	60
4.2.6	Determinação do índice mitótico a partir de preparações citológicas fluorescentes	61
4.2.7	Ensaio de <i>Immunoblot</i>	61
4.2.8	Ensaio de Anexina V/7-AAD	62
4.2.9	Análise da integridade mitocondrial	62
4.2.10	Análise estatística	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE 4b E DE SEUS ANÁLOGOS ESTRUTURAIS (HAB 1 A 9)	66
5.1.1	Obtenção do intermediário nitrado 2, derivado do di-hidroeuogenol	66
5.1.2	Obtenção do intermediário amínico 5	68
5.1.3	Obtenção de 4b e dos seus análogos estruturais HAB 1 a 4	70
5.1.4	Obtenção do análogo estrutural HAB 6	75
5.1.5	Obtenção do análogo estrutural HAB 9	77
5.1.6	Obtenção do intermediário di-hidroxilado 3	80
5.1.6.1	Obtenção do intermediário amínico di-hidroxilado 4	81
5.1.6.2	Obtenção do análogo estrutural HAB 5	82
5.1.7	Obtenção dos análogos estruturais HAB 7 e HAB 8	83
5.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO <i>IN VITRO</i>	85
5.2.1	Efeitos do tratamento com os derivados aril-sulfonamídicos frente à viabilidade de linhagens celulares tumorais humanas.	85
5.2.1.1	Efeitos do tratamento com 4b sobre o comportamento proliferativo de culturas de células MCF-7	89
5.2.1.2	O tratamento com 4b alterou a cinética de progressão do ciclo celular em culturas de células MCF-7	91
5.2.1.2	O tratamento com 4b exibiu potencial pró-apoptótico frente culturas de MCF-7	92

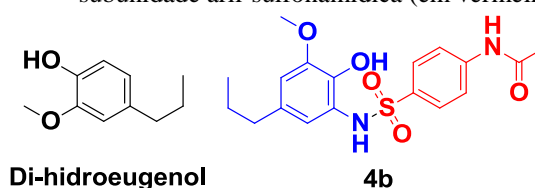
5.2.2	Efeitos dos análogos estruturais de 4b sobre o comportamento proliferativo de linhagens celulares provenientes de carcinoma de mama	95
5.3	ANÁLISES DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE 4B E DE SEUS ANÁLOGOS ESTRUTURAIS HAB 1 A 9	104
6	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS	108
	APÊNDICE	117

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais bioativos representam moléculas potenciais no tratamento de diversas doenças com altos índices de mortalidade como, por exemplo, os cânceres (MISHRA; TIWARI, 2011). Alguns fenilpropanoides, como o eugenol, presente nos óleos essenciais de muitas espécies vegetais, apresentam relevada atividade antimicrobiana (XU *et al.*, 2016), bem como inibem a proliferação de diferentes linhagens tumorais (AL-SHARIF; REMMAL; ABOUSSEKHRA, 2013; JÚNIOR *et al.*, 2016). Por conseguinte, aril-sulfonamidas apresentam efeitos biológicos importantes, como agentes antibacteriano, antifúngico, antiparasitário e antitumoral (KHAN *et al.*, 2018).

Estudo recente conduzido pelo nosso grupo de pesquisa (LQFar) (AZEVEDO-BARBOSA *et al.*, 2019) explorou o potencial antiproliferativo de derivados sulfonamídicos inéditos, obtidos pela técnica de hibridação molecular a partir do eugenol e di-hidroeuogenol. Neste estudo, o híbrido **4b** (FIGURA 1) apresentou atividade antiproliferativa promissora frente à linhagem MCF-7, proveniente de adenocarcinoma de mama humana, quando comparado às substâncias precursoras (eugenol, di-hidroeuogenol e sulfanilamida). No estudo foi demonstrado que **4b** inibe a proliferação de células MCF-7 devido, pelo menos, em parte a sua capacidade de inibir a progressão do ciclo celular na transição G1/S. Este evento foi correlacionado à redução dos níveis proteicos das ciclinas D1 e E, importantes reguladores da transição G1/S.

Figura 1 – Estruturas químicas do di-hidroeuogenol e do derivado aril-sulfonamídico **4b**. Este derivado foi obtido a partir da técnica de hibridação molecular envolvendo o di-hidroeuogenol (em azul) e a subunidade aril-sulfonamídica (em vermelho).

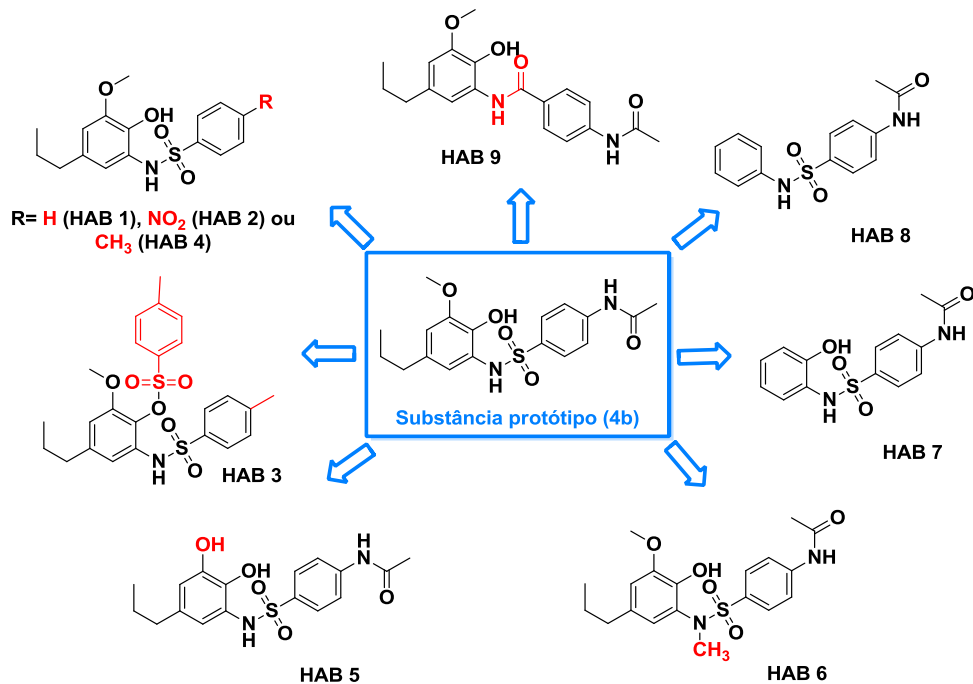


Fonte: Da autora.

Portanto, com o intuito de compreender as exigências estruturais que modulam essa atividade biológica dessas substâncias, foi proposta a síntese de nove análogos estruturais inéditos de **4b** para compor estudos de relação estrutura-atividade (REA). Desta forma, foram sintetizados e caracterizados, pelos métodos espectroscópicos convencionais, a substância

protótipo **4b** e os análogos **HAB 1** a **9**, além das substâncias intermediárias. As estruturas químicas de **4b** e dos análogos **HAB 1** a **9** estão ilustrados na Figura 2.

Figura 2 – Estruturas químicas de **4b** e dos análogos estruturais **HAB 1** a **9** obtidos neste trabalho de doutorado. Os grupos destacados em vermelho relacionam-se com o propósito deste trabalho e diferem-se em relação à substância protótipo **4b**.



Fonte: Da autora.

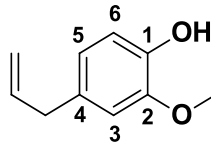
As substâncias foram testadas frente às linhagens celulares derivadas de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB 231 e Hs 578T) e de carcinoma hepatocelular (HepG2). Na análise preliminar, os análogos **HAB 2** e **HAB 4**, que se diferem de **4b** pelo grupo acetamida, foram os mais ativos frente à linhagem MDA-MB 231. A substância **HAB 2** inibiu a progressão do ciclo celular na linhagem triplo negativa e metastática MDA-MB 231, a exemplo do que foi observado em relação ao protótipo **4b** quando testado sobre a linhagem MCF-7, derivada de câncer de mama positivo para receptor de estrogênio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EUGENOL E SEU POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO

A maioria dos fármacos atualmente em uso terapêutico tem origem nos produtos naturais ou foram planejados quimicamente a partir destes (NEWMAN; CRAGG, 2020). O território brasileiro contém uma ampla biodiversidade que representa fonte importante para a identificação de substâncias bioativas (BARREIRO, 2009). Os óleos essenciais presentes em diversas espécies de plantas são exemplos de substâncias bioativas, sendo amplamente estudados devido ao enorme potencial biológico que apresentam (HEMAISWARYA; DOBLE, 2009). O eugenol (4-alil-2-metoxifenol; FIGURA 3) é o principal constituinte do óleo essencial da espécie *Eugenia caryophyllata*, popularmente conhecida como cravo-da-índia. Pertencente à classe dos fenilpropanoides, o eugenol também se encontra presente nos óleos essenciais de canela, louro, manjeriço e noz-moscada (PARODI *et al.*, 2012).

Figura 3 – Estrutura química do eugenol ou 4-alil-2-metoxifenol.



Fonte: Adaptado de BAKKALI *et al.*, 2008.

Na literatura foram relatadas diversas atividades biológicas para o eugenol, incluindo propriedades antibacteriana (XU *et al.*, 2016), antifúngica (AHMAD *et al.*, 2010), antiparasitária (MACHADO *et al.*, 2011), anti-inflamatória (DANIEL *et al.*, 2009), anti-hiperglicemiante (JEONG *et al.*, 2014), antiviral (BENENCIA; COURRGES, 2000), antioxidante (GÜLÇIN, 2011), antitumoral (JÚNIOR *et al.*, 2016; AL-SHARIF; REMMAL; ABOUSSEKHRA, 2013), anestésica (RENAULT *et al.*, 2011) e neuroprotetora (KABUTO; TADA; KOHNO, 2007).

Estudos demonstraram atividade antiproliferativa e pró-apoptótica do eugenol em diferentes linhagens tumorais, incluindo carcinoma de mama (AL-SHARIF; REMMAL; ABOUSSEKHRA, 2013), leucemia (YOO *et al.*, 2005), melanoma (GHOSH *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2006; PISANO *et al.*, 2007), osteossarcoma (SHIN; PARK; KIM, 2007), carcinoma gástrico (MANIKANDAN *et al.*, 2011) e de próstata (GHOSH *et al.*, 2009).

O câncer de mama é uma doença complexa com diferentes subtipos, os quais são classificados de acordo com o perfil histológico, a presença de receptores de estrogênio/progesterona e HER2 em ensaios de imuno-histoquímica e de acordo com o perfil de expressão gênica, considerando a análise molecular (MALHOTRA *et al.*, 2010; MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010; ROSS *et al.*, 2008; LI; URIBE; DALING, 2005; SORLIE *et al.*, 2003). Corresponde ao primeiro tipo de câncer mais incidente no mundo, representando 11,7 % do total de casos, sendo o mais frequente e a principal causa de morte em mulheres. Dados de 2020 apontaram 2,3 milhões de novos casos no mundo, decorrentes em grande parte das mudanças nos hábitos de vida e no perfil epidemiológico da população (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) foram estimados, para o ano de 2020, 66.280 casos novos de câncer de mama, com uma incidência de 29,7 % de todas as neoplasias (BRASIL, 2020).

Al-Sharif, Remmal e Aboussekhra (2013) relataram que o efeito antiproliferativo deste fenilpropanoide sobre as linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7 e MDA-MB 231) parecem estar envolvidos com a redução da expressão do fator de transcrição E2F1, responsável pela regulação de genes importantes para a transição de G1 para S.

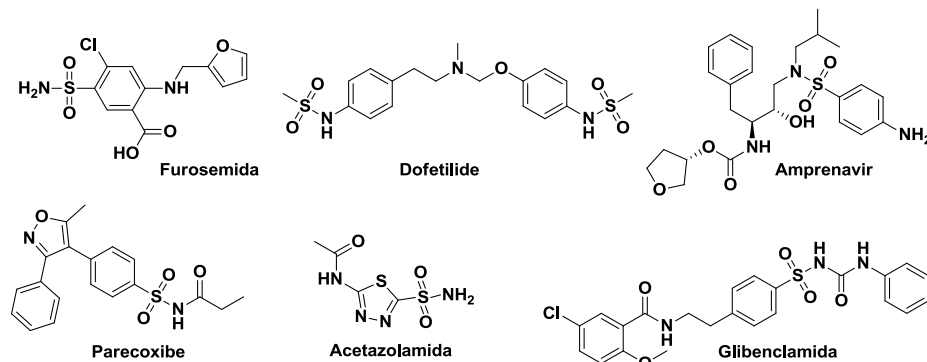
Os efeitos pró-apoptóticos do eugenol sobre as linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB 231 também foram estudados por Junior *et al.* (2016). Os autores observaram que o tratamento com eugenol induziu o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) o que ocasionou o bloqueio do ciclo celular em G2/M e, posteriormente, apoptose. O eugenol promoveu o aumento da expressão do gene pró-apoptótico *BAX*, o que alterou a permeabilidade mitocondrial e a consequente liberação de citocromo c do espaço intermembranar. Esse processo desencadeia a ativação da via intrínseca da apoptose, mediada pela ativação do apoptossoma e das caspases efetoras (caspase-3 e -7) (BRETNALL *et al.*, 2013). Abdullah *et al.* (2018) também demonstraram que o eugenol parece interferir sobre a via intrínseca da apoptose em células MDA-MB 231, por meio do aumento da clivagem das pró-caspases-3, -7 e -9, em virtude do aumento dos níveis de EROs.

Por conseguinte, pode-se observar que a elucidação dos prováveis mecanismos de ação envolvidos com a atividade antiproliferativa e pró-apoptótica do eugenol despertou o interesse de vários pesquisadores nos últimos anos.

2.2 ARIL-SULFONAMIDA E SEUS DERIVADOS

Além dos clássicos antibacterianos aril-sulfonamídicos, outros fármacos também contemplam, em sua estrutura química, o grupo funcional aril-sulfonamida ou outro diretamente relacionado, como sulfonilureia, incluindo os diuréticos acetazolamida e furosemida, o hipoglicemiante glibenclamida, o antiviral amprenavir, o inibidor seletivo de COX-2 parecoxibe e o antiarrítmico dofetilide (FIGURA 4) (SCOZZAFAVA *et al.*, 2003; RAKESH *et al.*, 2018).

Figura 4 – Estruturas químicas de fármacos que contêm o grupo aril-sulfonamida ou outro diretamente relacionado.



Fonte: Adaptado de SCOZZAFAVA *et al.* (2003) e RAKESH *et al.* (2018).

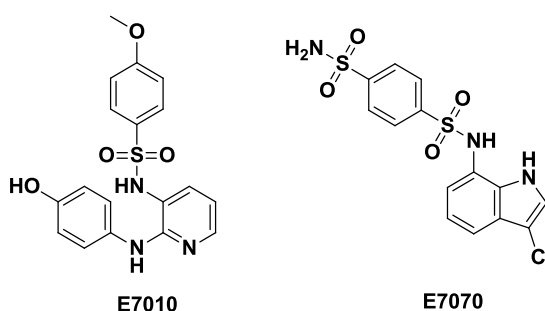
Os derivados aril-sulfonamídicos têm sido estudados, através de diferentes abordagens sintéticas, devido ao potencial biológico apresentado por essas substâncias (SCOZZAFAVA *et al.*, 2003). Entre as atividades biológicas atribuídas ao grupo sulfonamida estão as atividades antibacteriana (BOUFAS *et al.*, 2014), antifúngica (WANG; WAN; ZHOU, 2010), antitumoral (KWON *et al.*, 2015), anti-inflamatória (CHEN; RAO; KNAUS, 2005), antiangiogênica (FUNAHASHI *et al.*, 2002), antiglaucoma (AGRAWAL *et al.*, 2004), antiviral (SUPURAN *et al.*, 2004), antimalárica (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2005), diurética (NEFF; NAWARSKAS, 2010), hipoglicemiante (BOYD, 1988), anti-hipertensiva (KANDA *et al.*, 2001), anticonvulsivante (PARKER *et al.*, 2009), antiprotozoária (CHIBALE *et al.*, 2001), dentre outras.

Tendo como foco o potencial antiproliferativo atribuído ao grupo sulfonamida, foram descritos na literatura diversos estudos envolvendo diferentes mecanismos de ação, como a inibição de anidrases carbônicas (GITTO *et al.*, 2010), de metaloproteinases de matriz (CHENG *et al.*, 2008) e de histonas desacetilases (BOUCHAIN *et al.*, 2003), a indução do bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 (KAMAL *et al.*, 2011), G1/S (AZEVEDO-BARBOSA *et al.*, 2019) e G2/M (FORTIN *et al.*, 2011), a desorganização do citoesqueleto (LIU *et al.*, 2012), a inibição

da migração e invasão por modulação da via p38 MAPK (KWON *et al.*, 2015) e a supressão do fator de transcrição nuclear NF- κ B (TANAKA *et al.*, 2003).

As aril-sulfonamidas E7010 e E7070 (FIGURA 5) foram consideradas fortes candidatas a fármacos antineoplásicos diante dos excelentes resultados observados nos estudos clínicos de fase I e II (LIU *et al.*, 2012). O mecanismo de ação de E7010 relaciona-se com o bloqueio da progressão celular para a fase M, por meio da inibição da polimerização dos microtúbulos em células derivadas de leucemia (YOSHIMATSU *et al.*, 1997), enquanto E7070 parece promover o bloqueio da transição G1/S do ciclo celular e a indução de apoptose em células provenientes de carcinoma de pulmão (YAMADA *et al.*, 2005).

Figura 5 – Estruturas químicas dos derivados aril-sulfonamídicos **E7010** e **E7070**.



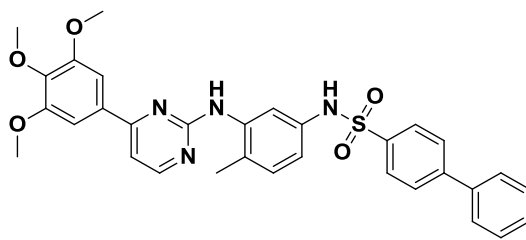
Fonte: **E7010**: adaptado de YOSHIMATSU *et al.*, 1997; **E7070**: adaptado de YAMADA *et al.*, 2005.

Somente no período de 2017 a 2019 foram relatados mais de 300 estudos envolvendo derivados aril-sulfonamídicos e seu potencial antiproliferativo em bases de dados, como PubMed, Science Direct, Scopus, SciFinder e Google Scholar (KHAN *et al.*, 2018). Vale ressaltar que no ano de 2020 nosso grupo de pesquisa (LQFar) publicou uma revisão que aborda os aspectos químicos e medicinais do grupo sulfonamida, relatando, em especial, descobertas relacionadas com a promissora atividade antiproliferativa de alguns derivados aril-sulfonamídicos (AZEVEDO-BARBOSA *et al.*, 2020), cujos detalhes serão mencionados a seguir.

A importância da presença do grupo aril-sulfonamida na estrutura química de agentes com atividade citotóxica frente às linhagens tumorais foi relatada por Kamal *et al.* (2011), que encontraram valores de CI_{50} para derivados aril-sulfonamídicos entre 5,60 e 12,3 μ M nas linhagens MCF-7 e MDA-MB 231 (adenocarcinoma de mama humana) e K562 (leucemia mielóide crônica). Os autores destacaram o efeito do derivado **3e** (FIGURA 6) que induziu bloqueio do ciclo celular na transição G1/S devido a sua habilidade de reduzir os níveis

proteicos da ciclina D1 e induzir apoptose em células derivadas de leucemia mielóide crônica. A formação de complexos cinases dependentes de ciclinas (CDK) 4 e 6 em associação com ciclina D é essencial para a progressão em G1, enquanto a transição de G1 para S depende da ativação dos complexos CDK2-ciclina E. Sendo assim, a redução dos níveis proteicos da ciclina D1 inibe o ciclo em G1, de modo que as células se tornam quiescentes e entram em G0 (SHERR; BEACH; SHAPIRO, 2016).

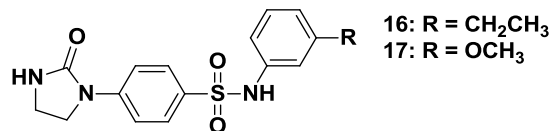
Figura 6 – Estrutura química de **3e**.



Fonte: Adaptado de KAMAL *et al.* (2011).

Fortin *et al.* (2011) investigaram a ação antimitótica e antiangiogênica de derivados oxoimidazolidínicos contendo o grupo aril-sulfonamida. Os derivados apresentaram excelente atividade antiproliferativa com CI_{50} na faixa de 13 a 21 nM frente três linhagens tumorais (MCF-7, HT-29: carcinona de cólon humano e M21: melanoma humano), sendo que os derivados **16** e **17** foram os mais promissores da série estudada (FIGURA 7). Os derivados promoveram o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, com consequente desorganização do citoesqueleto e indução de apoptose em células provenientes de melanoma humano (M21).

Figura 7 – Estruturas químicas de **16** e **17**.

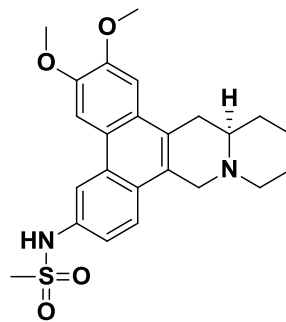


Fonte: Adaptado de FORTIN *et al.* (2011).

No trabalho conduzido por Kwon *et al.* (2015), estudou-se a atividade antiproliferativa de análogos sulfonamídicos da antofina e criptopleurina, substâncias naturais da classe dos alcaloides. Os autores concluíram que o análogo metanossulfonamida de criptopleurina (**5b**, FIGURA 8) foi cerca de três vezes mais ativo que seu precursor, com CI_{50} menor que 0,8 nM frente todas as linhagens tumorais avaliadas (A549: carcinoma de pulmão humano, HCT-116,

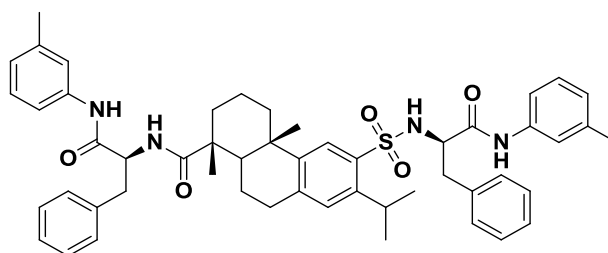
SNU-638: carcinoma de estômago humano, MDA-MB 231, SK-Hep-1: hepatocarcinoma humano, PC-3: carcinoma de próstata humano, Caki-1: carcinoma renal humano). **5b** apresentou melhorias nas propriedades farmacocinéticas, como maior biodisponibilidade oral quando comparado com criptopleurina e induziu bloqueio da transição G1/S do ciclo celular na linhagem de carcinoma renal humano (Caki-1).

Figura 8 – Estrutura química de **5b**.



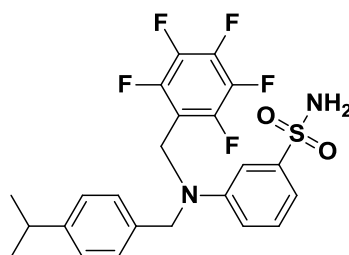
Fonte: Adaptado de KWON *et al.* (2015).

Derivados do ácido desidroabiético (DHAA) contendo uma subunidade aril-sulfonamídica foram avaliados *in vitro* frente ao potencial de inibição das metaloproteinasas de matriz (MMP-3, -8 e -9), bem como seus efeitos sobre a migração celular (HUANG *et al.*, 2017). Avaliou-se também o potencial antiproliferativo *in vitro* frente às linhagens tumorais NCI-H460 (carcinoma pulmonar), HepG2 (hepatocarcinoma), SKOV-3 (adenocarcinoma ovariano) e MCF-7, e frente à linhagem normal de fígado humano (HL-7702). Os autores relataram que os derivados DHAA inibiram efetivamente as MMPs com valores de CI_{50} na ordem de micromolar, sendo o derivado sulfonamídico **8k** o mais potente, com valores de 0,4, 6,6 e 8,8 μM contra MMP-3, -8 e -9, respectivamente (FIGURA 9). Os derivados contendo o grupo sulfonamida foram mais ativos que aqueles contendo o ácido sulfônico. **8k** foi menos citotóxico frente à linhagem normal do que o fármaco doxorrubicina e promoveu o bloqueio do ciclo celular na transição G1/S e a indução de apoptose em células HepG2. Estudos de docagem molecular com **8k** indicaram que o grupo sulfonamida estabelece importantes ligações no sítio ativo de MMP-3. As MMPs apresentam importante papel na progressão tumoral por meio da degradação de componentes estruturais da matriz extracelular e consequente invasão celular. Sendo assim, o aumento dos níveis proteicos das MMPs parece relacionar-se de certa forma com a formação de metástases (CHEN; PARKS, 2009).

Figura 9 – Estrutura química de **8k**.

Fonte: Adaptado de HUANG *et al.* (2017).

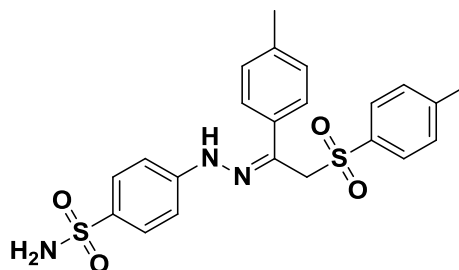
Guo *et al.* (2018) relataram a atividade de derivados aril-sulfonamídicos como inibidores *in vitro* de STAT3. Os derivados foram avaliados *in vitro* e *in vivo* frente à linhagem de carcinoma de cólon humano (HCT-116). O estudo de docagem molecular sugeriu que a posição em *meta* do grupo sulfonamida, assim como o mesmo sendo *N*-monossustituído favoreceu as ligações no domínio SH2 de STAT3. Grupos fortemente retiradores de elétrons aumentaram a atividade inibitória de STAT3, sendo o derivado **11** o mais ativo da série ($CI_{50} = 6,65 \mu M$; FIGURA 10). Neste caso, os autores sugeriram que a aril-sulfonamida *N*-monossustituída é o grupo farmacofórico responsável pela atividade antiproliferativa. **11** inibiu os níveis proteicos da STAT3, mesmo quando induzida por interleucina-6 (IL-6), bem como inibiu a ligação de STAT3 ao DNA em células HCT-116 e promoveu a indução de EROs e a apoptose nessas células. Além disso, **11** inibiu a formação de colônias em células HCT-116 por períodos prolongados e o crescimento de tumores de xenoinxerto de sarcoma humano *in vivo*. A fosforilação e consequente ativação de STAT3 resulta na expressão de genes que controlam eventos críticos nas células, incluindo proliferação, sobrevivência, diferenciação, invasão e migração celular. Desse modo, a redução dos níveis proteicos da STAT3 parece contribuir com a redução da progressão tumoral (KAMRAN; PATIL; GUDE, 2013; BOWMAN *et al.*, 2000).

Figura 10 – Estrutura química de **11**.

Fonte: Adaptado de GUO *et al.* (2018).

Derivados benzenossulfonamida-aryl-sulfona-hidrazona foram planejados por Ibrahim *et al.* (2018) e avaliados como inibidores de diferentes isoformas de anidrases carbônicas humanas (hCA I, II, IV e IX). Nos ensaios de citotoxicidade frente às linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama MCF-7 e MDA-MB 231, observou-se que os derivados não substituídos na porção aril-sulfona inibiram seletivamente as isoformas hCA II ($C_{inibitória} = 9,5-172,0$ nM) e IX ($C_{inibitória} = 7,5-131,5$ nM), enquanto os derivados metil-arylssulfona foram mais seletivos à isoforma hCA IX. O composto **4n** foi o mais promissor da série, sendo mais citotóxico frente às células MCF-7 e MDA-MB 231, com valores de CI_{50} de 2,33 e 5,14 μ M, respectivamente (FIGURA 11). Os derivados sulfonamídicos foram desenvolvidos com a finalidade de aumentar as interações nas camadas externas das porções hidrofóbicas e hidrofílicas do sítio ativo das isoformas de hCA. A inibição da hCA IX, altamente expressa em diversos tipos de câncer, parece alterar o pH do microambiente tumoral afetando, desta forma, processos críticos para a progressão do câncer (NERI; SUPURAN, 2011).

Figura 11 – Estrutura química de **4n**.

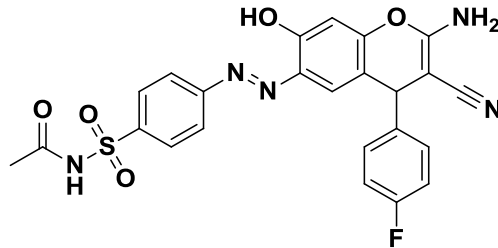


Fonte: Adaptado de IBRAHIM *et al.* (2018).

Um estudo mais recente, derivados *4H*-cromeno-azossulfonamidas desenvolvidos por Okasha *et al.* (2019) foram avaliados *in vitro* frente três linhagens tumorais humanas (HCT-116; HepG2 e MCF-7). Avaliou-se também a atividade inibitória *in vitro* contra as histonas desacetilases (HDAC) 1, 2 e 8, e a percentagem de inibição de polimerização de tubulina em células HCT-116. Os resultados mostraram que os derivados *4H*-cromeno-azossulfonamidas foram mais ativos que seus precursores, sendo **7d** o mais promissor (FIGURA 12). Valores de CI_{50} de 5,4, 5,7 e 5,3 μ M foram encontrados para **7d** contra as linhagens HCT-116, HepG2 e MCF-7, respectivamente. A atividade inibitória de **7d** contra HDAC 1, 2 e 8 apresentou valores de CI_{50} de 1,94, 2,53 e 9,5 μ M, respectivamente. Já a inibição da polimerização de tubulina apresentou valor de CI_{50} de 8,84 μ M, representando 87 % de inibição. Os derivados foram planejados a partir de inibidores naturais de HDAC, como o vorinostate e a tricostatina A. A

inserção da sulfonamida como um grupo ligante ao zinco, presente no sítio ativo de HDAC, e a presença da porção cromeno resultou em seletiva atividade inibitória frente HDAC.

Figura 12 – Estrutura química de **7d**.



Fonte: Adaptado de OKASHA *et al.* (2019).

Frente ao exposto, percebe-se que a subunidade aril-sulfonamídica é um importante grupo funcional utilizado no planejamento, na pesquisa e síntese de novos fármacos, com destaque especial ao seu potencial antiproliferativo amplamente descrito na literatura.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer a relação estrutura-atividade responsável pela atividade antiproliferativa de **4b** frente à linhagem MCF-7, proveniente de adenocarcinoma de mama humana, por meio da síntese de análogos estruturais e a investigação dos mecanismos de ação da substância protótipo **4b**.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Relativos à substância protótipo **4b**

- a) Sintetizar e caracterizar através dos métodos espectroscópicos de IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM a substância protótipo inédita **4b**;
- b) Avaliar os efeitos de **4b** sobre a viabilidade de culturas de A549, HepG2, HT-144 e MCF-7;
- c) Avaliar os efeitos citotóxicos de **4b** frente à linhagem celular normal de fibroblastos de pele humana – CCD-1059Sk e de mama humana – MCF 10A;
- d) Avaliar os efeitos de **4b** sobre a dinâmica da progressão do ciclo celular na linhagem celular MCF-7;
- e) Investigar possível influência de **4b** no perfil de expressão proteica de ciclinas D1 e E, as quais estão envolvidas com a progressão de G1 e transição G1/S do ciclo celular, respectivamente;
- f) Estabelecer relações preliminares entre a estrutura química de **4b** e da série de derivados sulfonamídicos obtidos a partir do eugenol e di-hidroeuogenol com a atividade biológica *in vitro* observada.

3.2.2 Relativos aos análogos estruturais de **4b**

- a) Sintetizar e caracterizar através dos métodos espectroscópicos de IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM os análogos estruturais inéditos de **4b** (**HAB 1 a 9**);
- b) Avaliar os efeitos dos análogos estruturais sobre a viabilidade celular das linhagens MCF-7, MDA-MB 231, Hs 578T, HepG2 e CCD-1059Sk;

- c) Avaliar os efeitos dos análogos estruturais mais promissores sobre o comportamento proliferativo da linhagem celular mais responsiva;
- d) Estabelecer estudos de relação estrutura-atividade entre **4b** e os análogos estruturais propostos com a atividade biológica *in vitro* observada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de síntese e os dados de caracterização obtidos pelos métodos espectroscópicos de **4b** e dos análogos estruturais **HAB 1 a 9** são descritos a seguir.

4.1 PARTE QUÍMICA

A substância protótipo **4b** e seus análogos estruturais (**HAB 1 a 9**) foram obtidos por síntese química no Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da UNIFAL-MG. Essas substâncias tiveram suas identidades estruturais confirmadas por meio de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas (EM).

4.1.1 Procedimentos gerais

As determinações das faixas de fusão foram realizadas no LQFar da UNIFAL-MG, obtidas em aparelho Bücher 535 (0 – 300 °C), calibrado com vanilina P.A. Merck® (F.F.: 80 – 81 °C, LAYEK *et al.*, 2011).

As análises de espectroscopia de absorção na região do IV foram realizadas no Núcleo de Controle de Qualidade ou no Laboratório de Análise Química de Fármacos, ambos da UNIFAL-MG, obtidas em espectrômetros Shimadzu-Affinity-1 ou Thermo Scientific Nicolet-iS50 e os valores descritos em número de onda (KBr ou ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1} , sendo ν = estiramento ou deformação axial e δ = deformação angular).

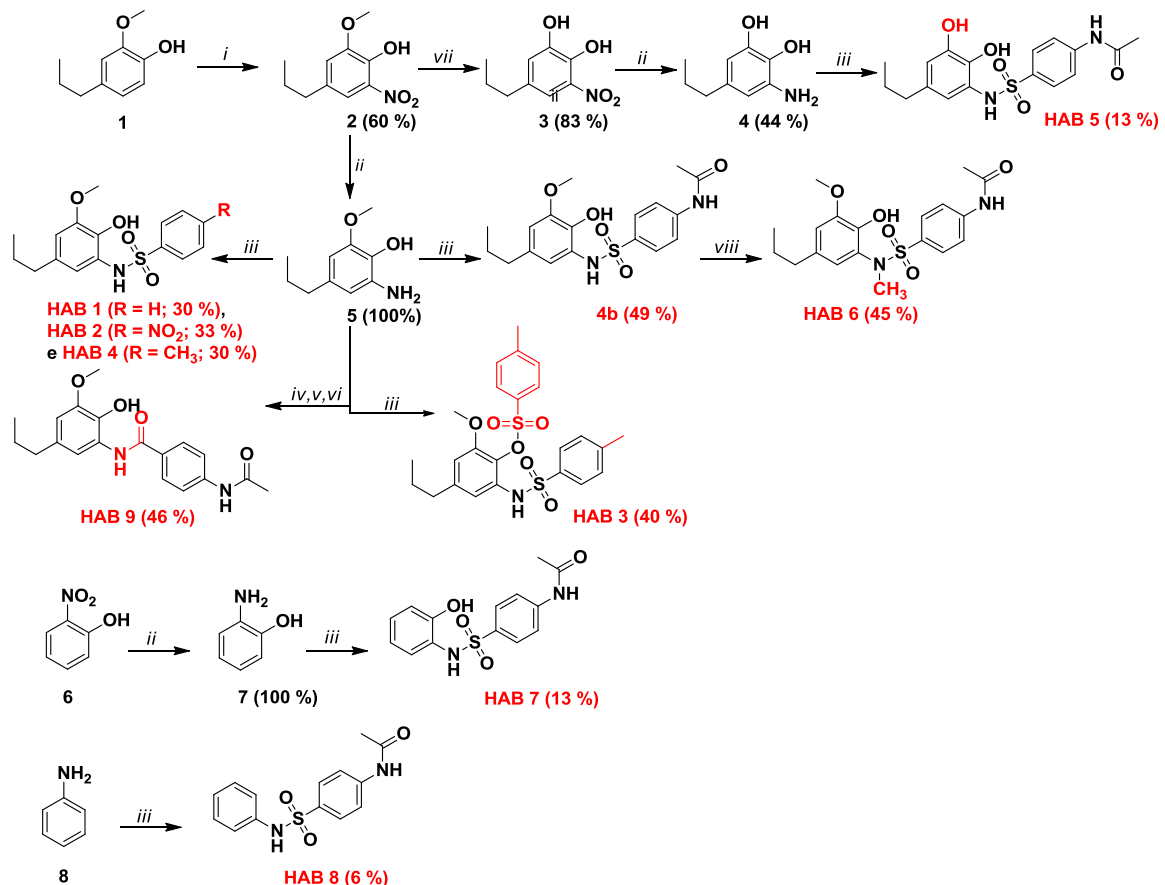
As análises de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UNIFAL-MG, obtidas em espectrômetro Bruker AC-300. Foi empregado como padrão interno o tetrametilsilano (TMS), como solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) e os valores descritos em deslocamento químico (δ , ppm).

As análises de espectroscopia de massas (EM) foram realizadas na Universidade de São Paulo, obtidas em espectrômetro Bruker Daltonics microTOF QII/ESI-TOF (modo positivo), com a colaboração do Ms. Thiago dos Santos.

4.1.2 Procedimentos de síntese e dados de caracterização

As etapas sintéticas foram executadas segundo técnicas clássicas de química orgânica ou por adaptação destas. A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel em suporte de alumínio com detector de fluorescência (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra Sil G/UV₂₅₄). As purificações por cromatografia em coluna de sílica (CCS) foram realizadas em sílica gel 60, 70-230 mesh (Sorblin). Os eluentes empregados estão descritos em cada procedimento. Na Figura 13 encontra-se esquematizado de forma simplificada o roteiro sintético seguido.

Figura 13 – Esquema sintético global para a obtenção de **4b** e de seus análogos estruturais **HAB 1** a **9**. Os grupos funcionais destacados em vermelho referem-se aos análogos estruturais finais e diferem-se da substância protótipo **4b**. Os rendimentos obtidos ao final de cada etapa reacional e/ou de purificação encontram-se entre parênteses.

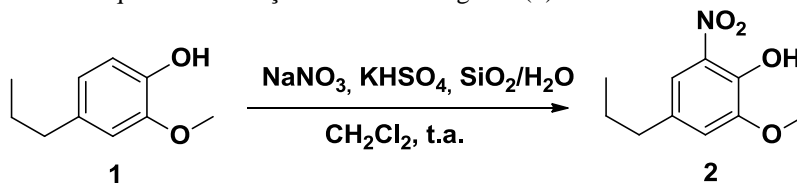


Fonte: Da autora.

Notas: *i*) NaNO₃, KHSO₄, SiO₂/H₂O (1:1), CH₂Cl₂, t.a.; *ii*) H₂N-NH₂.H₂O, Pd/C, MeOH, refluxo; *iii*) cloreto de benzenossulfonila correspondente, trietilamina ou piridina, CH₂Cl₂, 0 °C ou t.a.; *iv*) NaHCO₃, cloreto de 4-nitrobenzoíla, CH₂Cl₂, H₂O, 0 °C – t.a.; *v*) H₂, Pd/C, THF, t.a.; *vi*) Anidrido acético, t.a.; *vii*) BBr₃.S(CH₃)₂, CH₂Cl₂ anidro, 0 °C – t.a.; *viii*) CH₃I, K₂CO₃, DMF anidro, t.a.

4.1.2.1 Obtenção do intermediário nitrado derivado do di-hidroeuugenol (ZOLFIGOL; GHAEMI; MADRAKIAN, 2001).

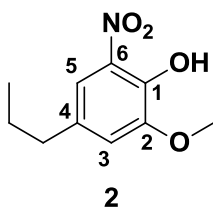
Figura 14 – Esquema de nitração do di-hidroeuugenol (1).



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo cerca de 50 mL de diclorometano foi adicionado o di-hidroeuugenol comercial (1; 5 mL, 31,26 mmol, marca Sigma-Aldrich®) e quantidades equimolares de nitrato de sódio (2,65 g, 31,26 mmol) e bissulfato de potássio (4,26 g, 31,26 mmol), além de 3,3 eq. de sílica gel previamente hidratada com água destilada (6,2 g de SiO₂ em 6,2 mL de H₂O). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética vigorosa, à temperatura ambiente (25 ± 3°C), por cerca de 24 a 48 h. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente clorofórmio e metanol, 9,5/0,5, v/v. Após o término, a mistura reacional foi filtrada por gravidade em papel de filtro e o filtrado foi seco com sulfato de sódio anidro. Em seguida, o sal foi separado por filtração simples e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por CCS (hexano/acetato de etila, 9/1, v/v).

4.1.2.1.1 Dados de caracterização de 2-metoxi-6-nitro-4-propilfenol (2)



2-metoxi-6-nitro-4-propilfenol

Óleo amarelo

Massa obtida: 3,72 g (17,61 mmol, 60 %)

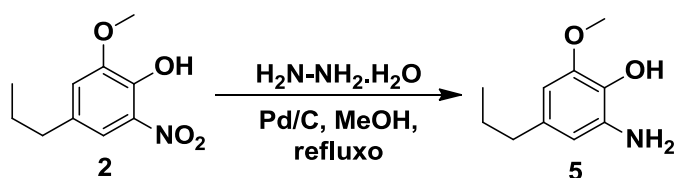
F.M.: C₁₀H₁₃NO₄ **M.M.:** 211,2145 g.mol⁻¹

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 300 MHz): 10,62 (s; 1H; OH), 7,49 (d; 1H; J = 1,8 Hz; H₅), 6,96 (d; 1H; J = 1,8 Hz; H₃), 3,93 (s; 3H; OCH₃), 2,56 (t; 2H; J = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 1,64 (sex; 2H; J = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 0,95 (t; 3H; J = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 75 MHz): 149,7 (C₆), 144,5 (C₁), 133,8 (C₄), 133,6 (C₂), 118,7 (C₅), 114,8 (C₃), 56,7 (OCH₃), 37,3 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,1 (CH₃-CH₂-CH₂), 13,5 (CH₃-CH₂-CH₂).

4.1.2.2 Obtenção do intermediário amínico derivado do di-hidroeugenol nitrado (COMESAÑA-GÁNDARA *et al.*, 2014)

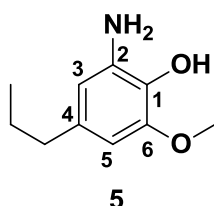
Figura 15 – Esquema de nitro-redução do intermediário nitrado 2.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL adicionou-se a substância **2** (0,209 g, 0,99 mmol), solubilizada em cerca de 10 mL de metanol, seguidos da adição do catalisador paládio suportado em carvão ativado (10 % p/p) e do hidrato de hidrazina (14 eq.). A mistura reacional foi mantida sob agitação vigorosa, em refluxo, por cerca de 2 h. O progresso da reação foi acompanhado por CCD, usando como eluente hexano e acetato de etila (1/1, v/v) e como revelador para grupo amino o reagente DMAB. Após o término da reação, a mistura reagente foi filtrada, o filtrado concentrado em evaporador rotatório e o produto purificado por CCS, usando como eluente hexano e acetato de etila, 7,5/2,5, v/v.

4.1.2.2.1 Dados de caracterização de 2-amino-6-metoxi-4-propilfenol (**5**)



2-amino-6-metoxi-4-propilfenol

Sólido bege claro

F.F.: 63 – 66 °C

Massa obtida: 0,250 g (1,4 mmol, quantitativo)

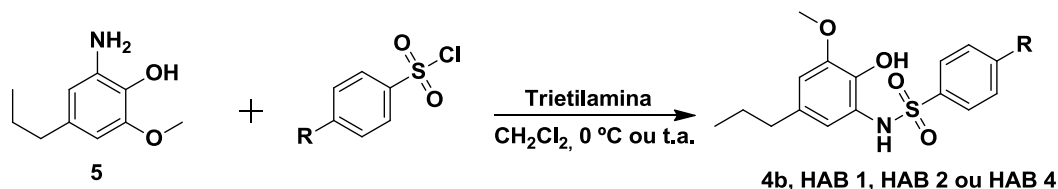
F.M.: C₁₀H₁₅NO₂ **M.M.:** 181,2316

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 300 MHz): 6,24 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H₅); 6,19 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H₃), 3,85 (s; 3H; OCH₃), 2,45 (t; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 1,59 (sex; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 0,93 (t; 3H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 75 MHz): 146,5 (C₆), 134,4 (C₂), 133,8 (C₄), 130,9 (C₁), 109,3 (C₅), 101,8 (C₃), 55,9 (OCH₃), 38,0 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,7 (CH₃-CH₂-CH₂), 13,8 (CH₃-CH₂-CH₂).

4.1.2.3 Obtenção de **4b** e dos análogos estruturais **HAB 1**, **HAB 2**, **HAB 3** e **HAB 4** a partir do intermediário amínico **5**, derivado do di-hidroeuqenol (adaptado de SILVA *et al.*, 2015).

Figura 16 – Esquema de obtenção de **4b** e dos análogos **HAB 1**, **HAB 2**, **HAB 4** a partir do intermediário amínico **5**.



Fonte: Da autora.

Notas: **4b**: R = NHCOCH₃; **HAB 1**: R = H; **HAB 2**: R = NO₂; **HAB 4**: R = CH₃.

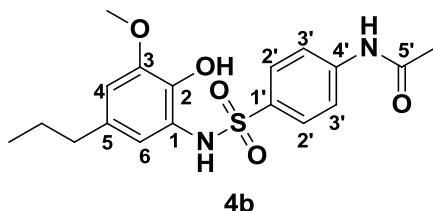
Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 2 mL de trietilamina (14,4 mmol), foi adicionada a substância **5**, solubilizada em cerca de 10 mL de diclorometano, e os respectivos cloretos de benzenossulfonila comerciais (TABELA 1). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética vigorosa a temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), com exceção da reação para a obtenção do análogo estrutural **HAB 4**, a qual foi mantida sob banho de água e gelo. As reações foram acompanhadas por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila, 8/2, v/v. Após o término, verteu-se a mistura reacional em béquer contendo água destilada e gelo. O pH da mistura reacional foi acidificado com ácido clorídrico concentrado. Após a acidificação do meio, a mistura reacional foi extraída com acetato de etila (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o sal separado por filtração simples. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório, obtendo-se os produtos que foram purificados por CCS (hexano/acetato de etila, 6/4, v/v) ou por CCD preparativa (hexano/acetato de etila, 7/3, v/v), no caso do análogo estrutural **HAB 4**.

Tabela 1 – Quantidades dos reagentes e tempo de reação necessário para a obtenção das substâncias **HAB 1**, **HAB 2**, **HAB 4** e **4b**.

Material de partida (substância 5)	Cloretos de benzenossulfonila	Tempo (horas)
0,182 g (1 mmol)	R = H; 0,39 mL (3 mmol)	24 h
0,182 g (1 mmol)	R = NO ₂ ; 0,444 g (2 mmol)	24 h
0,182 g (1 mmol)	R = CH ₃ ; 0,190 g (1 mmol)	16 h
0,182 g (1 mmol)	R = NHCOCH ₃ ; 0,384 g (1,5 mmol)	18 h

Fonte: Da autora.

4.1.2.3.1 Dados de caracterização de *N*-(4-(*N*-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)sulfamoil)fenil)acetamida (**4b**)



N-(4-(*N*-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)sulfamoil)fenil)acetamida

Sólido bege

Rf: 0,54 (hexano e acetato de etila, 4/6, v/v)

F.F.: 176 – 180 °C

Massa obtida: 0,200 g (0,53 mmol, 49 %)

F.M.: C₁₈H₂₂N₂O₅S **M.M.:** 378,4427 g.mol⁻¹

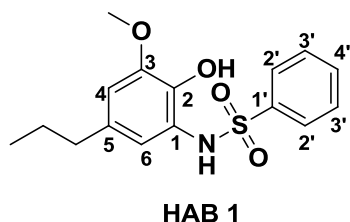
IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3537, 3364 (ν N-H), 3154 (ν O-H), 2923 (ν C-H *sp*³), 1687 (ν C=O), 1589, 1512 (ν C=C), 1312, 1158 (ν S=O), 1256 (ν C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-*d*₆; 300 MHz): 10,26 (s; 1H; OH), 8,95 (s; 1H; NHSO₂), 8,56 (s; 1H; NHCOCH₃), 7,65 (s; 4H; H_{2'}, H_{3'}), 6,58 (d; 1H; *J* = 1,9 Hz; H₄), 6,53 (d; 1H; *J* = 1,9 Hz; H₆), 3,69 (s; 3H; OCH₃), 2,36 (t; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 2,06 (s; 3H; NHCOCH₃), 1,46 (sex; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 0,80 (t; 3H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-*d*₆; 75 MHz): 169,0 (C_{5'}), 147,6 (C₃), 142,9 (C_{4'}), 137,1 (C_{1'}), 134,0 (C₅), 132,0 (C₁), 128,0 (C_{2'}), 124,2 (C₂), 118,2 (C_{3'}), 115,8 (C₄), 109,1 (C₆), 55,8 (OCH₃), 37,0 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,1 (NHCOCH₃), 24,1 (CH₃-CH₂-CH₂), 13,4 (CH₃-CH₂-CH₂).

EM-IES (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{18}H_{23}N_2O_5S$ 379,1328; encontrado: 379,1315.

4.1.2.3.2 Dados de caracterização de *N*-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)benzenossulfonamida (**HAB 1**)



N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)benzenossulfonamida
Sólido bege

Rf: 0,59 (hexano e acetato de etila, 6/4, v/v)

F.F.: 120 – 125 °C

Massa obtida: 0,092 g (0,29 mmol, 30 %)

F.M.: $C_{16}H_{19}NO_4S$ **M.M.:** 321,3914 g.mol⁻¹

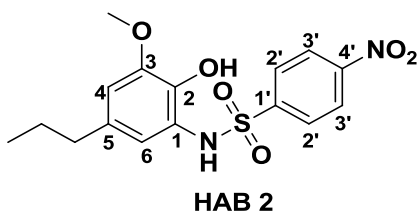
IV (KBr, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3441 (ν N-H), 3275 (ν O-H), 2953-2847 (ν C-H sp^3), 1616, 1512 (ν C=C), 1330, 1168 (ν S=O), 1311 (ν C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 7,80-7,76 (m; 2H; H2'), 7,51-7,46 (m; 1H; H4'), 7,41-7,35 (m; 2H; H3'), 6,95 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H4), 6,94 (s; 1H; OH), 6,42 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H6), 5,49 (s; 1H; NH₂SO₂), 3,78 (s; 3H; OCH₃), 2,46 (t; 2H; $J = 7,4$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 1,56 (sex; 2H; $J = 7,4$ Hz CH₃-CH₂-CH₂), 0,87 (t; 3H; $J = 7,4$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 146,1 (C3), 139,0 (C1'), 134,5 (C1), 134,1 (C5), 132,8 (C4'), 128,7 (C2'), 127,2 (C3'), 123,4 (C2), 113,8 (C4), 107,8 (C6), 56,0 (OCH₃), 37,8 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,6 (CH₃-CH₂-CH₂), 13,5 (CH₃-CH₂-CH₂).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): $[M+Na]^+$ calculado para $C_{16}H_{19}NNaO_4S$ 344,0927; encontrado 344,0925.

4.1.2.3.3 Dados de caracterização de *N*-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-4-nitrobenzenossulfonamida (**HAB 2**)



N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-4-nitrobenzenossulfonamida

Sólido amarelo

Rf: 0,67 (hexano e acetato de etila, 6/4, v/v)

F.F.: 176 – 180 °C

Massa obtida: 0,120 g (0,33 mmol, 33 %)

F.M.: C₁₆H₁₈N₂O₆S **M.M.:** 366,3889 g.mol⁻¹

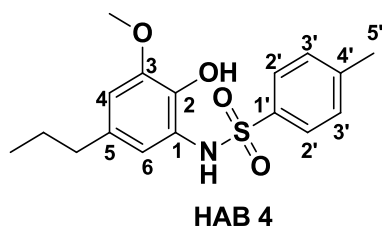
IV (KBr, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3485 (*v* N-H), 3240 (*v* O-H), 2958-2859 (*v* C-H *sp*³), 1613, 1528 (*v* C=C), 1514, 1350 (*v* NO₂), 1350, 1225 (*v* S=O), 1225, 1089 (*v* C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 8,23-8,19 (td; 2H; H3'), 7,95-7,90 (td; 2H; H2'), 6,98 (d; 1H; *J* = 1,7 Hz; H4), 6,95 (s; 1H; OH), 6,48 (d; 1H; *J* = 1,7 Hz; H6), 5,40 (s; 1H; NH₂SO₂), 3,79 (s; 3H; OCH₃), 2,49 (t; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 1,59 (sex; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 0,90 (t; 3H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 150,1 (C4'), 146,2 (C3), 144,8 (C1'), 134,9 (C1), 134,7 (C5), 128,5 (C3'), 123,9 (C2'), 122,1 (C2), 114,7 (C4), 107,8 (C6), 56,0 (OCH₃), 37,7 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,6 (CH₃-CH₂-CH₂), 13,6 (CH₃-CH₂-CH₂).

EM-ESI/Q-TOF (*m/z*): [M+K]⁺ calculado para C₁₆H₁₈KN₂O₆S 405,0517; encontrado 405,0518.

4.1.2.3.4 Dados de caracterização de *N*-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-4-metilbenzenossulfonamida (**HAB 4**)



N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-4-metilbenzenossulfonamida

Óleo amarronzado

Rf: 0,63 (hexano e acetato de etila, 6/4, v/v)

Massa obtida: 0,040 g (0,12 mmol, 30 %)

F.M.: C₁₇H₂₁NO₄S **M.M.:** 335,4179 g.mol⁻¹

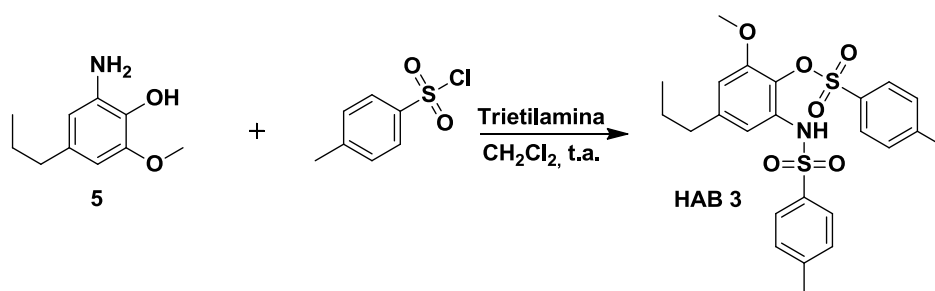
IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 3334 (ν N-H), 3272 (ν O-H), 2956-2869 (ν C-H sp^3), 1613, 1514 (ν C=C), 1398 (δ CH₃), 1324, 1157 (ν S=O), 1306, 1087 (ν C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 7,66 (d; 2H; H2'), 7,17 (d; 2H; H3'), 6,94 (d; 1H; $J = 1,6$ Hz; H4), 6,91 (sl; 1H; OH), 6,41 (d; 1H; $J = 1,6$ Hz; H6), 5,29 (s; 1H; NH₂SO₂), 3,78 (s; 3H; OCH₃), 2,46 (t; 2H; $J = 7,4$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 1,55 (sex; 2H; $J = 7,4$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 0,87 (t; 3H; $J = 7,4$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 146,1 (C3), 143,6 (C1'), 136,1 (C1), 134,5 (C5), 134,0 (C4'), 129,4 (C2'), 127,3 (C3'), 123,5 (C2), 113,6 (C4), 107,6 (C6), 56,0 (OCH₃), 37,8 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,6 (CH₃-CH₂-CH₂), 21,5 (C5'), 13,6 (CH₃-CH₂-CH₂).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+Na]⁺ calculado para C₁₇H₂₁NNaO₄S 358,1084; encontrado 358,1078.

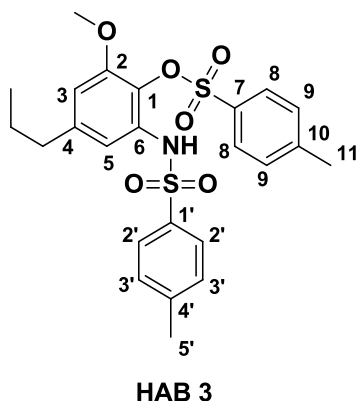
Figura 17 – Esquema de obtenção do análogo estrutural **HAB 3** a partir do intermediário amínico **5**.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 2 mL de trietilamina (14,4 mmol), foi adicionada a substância **5** (0,182 g), solubilizada em cerca de 10 mL de diclorometano e o cloreto de 4-metilbenzenossulfonila comercial (0,380 g, 2 eq.). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética vigorosa a temperatura ambiente (25 ± 3 °C), por aproximadamente uma hora. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila, 8/2, v/v. Após o término, verteu-se a mistura reacional em béquer contendo água destilada e gelo. O pH da mistura reacional foi acidificado com ácido clorídrico concentrado. Após a acidificação do meio, a mistura reacional foi extraída com acetato de etila (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o sal separado por filtração simples. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório, obtendo-se o produto que foi purificado por CCS (hexano/acetato de etila, 6/4, v/v).

4.1.2.3.5 Dados de caracterização de 2-metoxi-6-(4-metilfenilssulfonamida)-4-propilfenil 4-metilbenzenossulfonato (**HAB 3**)



2-metoxi-6-(4-metilfenilssulfonamida)-4-propilfenil-4-metilbenzenossulfonato

Sólido castanho claro

Rf: 0,70 (hexano e acetato de etila, 6/4, v/v)

F.F.: 70 – 73 °C

Massa obtida: 0,134 g (0,27 mmol, 40 %)

F.M.: C₂₄H₂₇NO₆S₂ **M.M.:** 489,6043 g.mol⁻¹

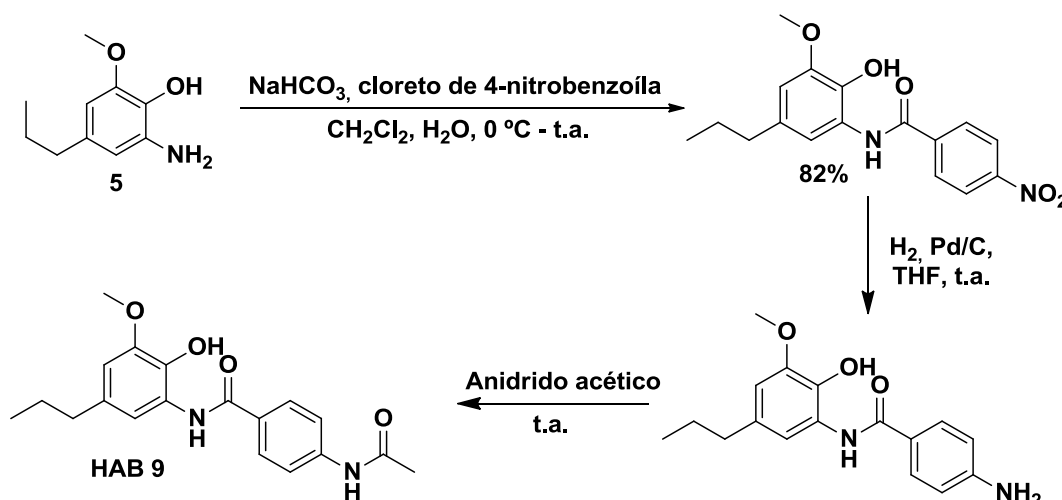
RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 300 MHz): 7,76-7,68 (td; 4H; H8 e H9), 7,49 (s; 1H; NH₂SO₂), 7,32-7,16 (dd; 4H; H2' e H3'), 7,06 (d; 1H; J = 1,8 Hz; H3), 6,34 (d; 1H; J = 1,8 Hz; H5), 3,43 (s; 3H; OCH₃), 2,49 (t; 2H; J = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 2,44 (s; 3H; CH₃), 2,33 (s; 3H; CH₃), 1,57 (sex; 2H; J = 7,4 Hz CH₃-CH₂-CH₂), 0,88 (t; 3H; J = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 75 MHz): 151,9 (C1), 145,7 (C2), 143,8 (C7), 143,0 (C1'), 136,1 (C4), 132,3 (C4' e C10), 131,2 (C6), 129,4 (C8 e C9), 128,6 (C2'), 127,4 (C3'), 114,2 (C3), 108,8 (C5), 55,4 (OCH₃), 38,1 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,1 (CH₃-CH₂-CH₂), 21,7 (C11), 21,5 (C5'), 13,6 (CH₃-CH₂-CH₂).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₄H₂₈NO₆S₂ 490,1349; encontrado 490,1353.

4.1.2.4 Obtenção do análogo estrutural **HAB 9** a partir do intermediário amínico **5** (SENER *et al.*, 2000)

Figura 18 – Esquema de obtenção do análogo **HAB 9** a partir do intermediário amínico **5**.



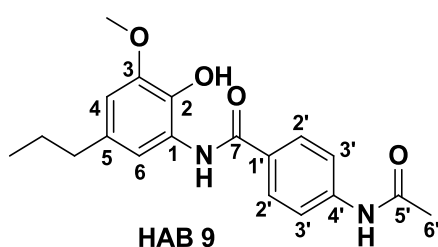
Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, foram adicionados a substância **5** (0,2 g, 1,11 mmol), NaHCO_3 (0,183 g, 2 eq.), 5 mL de diclorometano e 5 mL de água destilada. Essa mistura reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa, em banho de água e gelo. Solução do cloreto de 4-nitrobenzoíla (0,204 g, 1 eq.) em 5 mL de diclorometano foi adicionada gota a gota, durante meia hora, à mistura reacional. Após adição de toda a solução do cloreto de ácido, a mistura reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa, à temperatura ambiente ($25 \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$), por cerca de 2 h. O progresso da reação foi acompanhado por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila, 7/3, v/v. Ao final da reação, a mistura reacional foi extraída com diclorometano (3 x 25 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o sal separado por filtração simples. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório, obtendo-se o intermediário nitrado com elevado rendimento (82 %, sólido amarelo intenso) e excelente grau de pureza.

Este intermediário nitrado foi, em seguida, submetido à reação de nitro-redução e *N*-acetilação. Desse modo, em um balão bitubulado de fundo redondo de 25 mL, foi adicionado o catalisador paládio suportado em carvão ativado (Pd/C , 0,010 g, 0,094 mmol) e 10 mL de tetraidrofurano (THF). Realizou-se a ambientação do meio reacional com gás hidrogênio (H_2) por cerca de 20 min. Após esse tempo, foi adicionado, com o auxílio de seringa e agulha, o intermediário nitrado (0,140 g, 0,43 mmol) solubilizado em cerca de 5 mL de THF. A reação

foi mantida sob agitação magnética vigorosa, à temperatura ambiente ($25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$), e sob atmosfera de H_2 por aproximadamente 24 h. O progresso da reação foi acompanhado por meio de CCD, utilizando como eluente clorofórmio e metanol (9/1, v/v) e como revelador o reagente *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB). Em seguida, realizou-se a adição, ao meio reacional, de anidrido acético (0,05 mL) e manteve-se a reação sob agitação magnética vigorosa, à temperatura ambiente ($25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$), por mais 24 h. O término da reação foi verificado por meio de CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila, 1/1, v/v. A mistura reacional foi filtrada por filtração simples e o filtrado concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por CCS, utilizando como eluente clorofórmio e metanol, 9,5/0,5, v/v.

4.1.2.4.1 Dados de caracterização de 4-acetamido-*N*-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)benzamida (**HAB 9**)



4-acetamido-*N*-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)benzamida

Sólido branco brilhante

Rf: 0,43 (hexano e acetato de etila, 4/6, v/v)

F.F.: 230 – 235 $^\circ\text{C}$

Massa obtida: 0,040 g (0,12 mmol, 46 %)

F.M.: $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$ **M.M.:** 342,3890 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 3375, 3248 (ν N-H), 2959 – 2839 (ν C-H sp^3), 1679, 1637 (ν C=O), 1614, 1599, 1534 (ν C=C), 1323 (ν C-N), 1257, 1023 (ν C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 10,26 (s; 1H; OH), 9,47 (s; 1H; NHCO); 8,88 (s; 1H; NHCOCH₃), 7,92-7,69 (dd; 4H; H2', H3'), 7,10 (d; 1H; $J = 1,9$ Hz; H4), 6,53 (d; 1H; $J = 1,9$ Hz; H6), 3,77 (s; 3H; OCH₃), 2,47 (t; 2H; $J = 7,4$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 2,08 (s; 3H; CH₃), 1,56 (sex; 2H; $J = 7,4$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 0,89 (t; 3H; $J = 7,4$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 174,1 (C7), 169,9 (C5'), 153,4 (C3), 147,6 (C1), 141,7 (C1'), 137,6 (C4'), 133,7 (C2'), 131,3 (C5), 123,4 (C3'), 121,0 (C4), 114,1 (C6), 61,0 (OCH₃), 42,4 (CH₃-CH₂-CH₂), 29,5 (CH₃-CH₂-CH₂), 29,4 (C6'), 18,9 (CH₃-CH₂-CH₂).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4$ 343,1652; encontrado 343,1652.

4.1.2.5 Obtenção do análogo estrutural **HAB 6** a partir da substância protótipo **4b** (adaptado de COOLEN; MEEUWIS; van LEEUWEN, 1995)

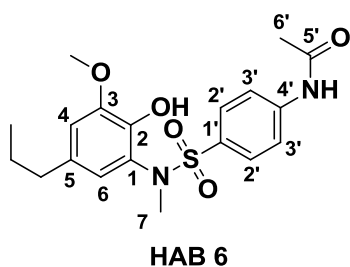
Figura 19 – Esquema de obtenção do análogo estrutural **HAB 6** a partir da substância protótipo **4b**.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL adicionou-se a substância **4b** (0,060 g, 0,16 mmol), solubilizada em cerca de 2 mL de dimetilformamida anidro (DMF) e o carbonato de potássio (1,5 eq.). Deixou-se sob agitação magnética vigorosa, à temperatura ambiente (25 ± 3 °C), por 30 min. Após esse período de tempo, adicionou-se iodometano (10 eq.), gota a gota, e a mistura reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) por cerca de 12 h. A reação foi acompanhada por CCD, usando como eluente acetato de etila e hexano, 6/4, v/v. Ao término da reação, a mistura reacional foi filtrada para separação e descarte do material inorgânico e o DMF foi evaporado sob corrente de ar. O resíduo obtido foi solubilizado em diclorometano e lavado com solução de NaOH 0,5 M. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o sal removido por filtração simples e o produto concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por CCS, usando como eluente clorofórmio e metanol, 9,9/0,1, v/v.

4.1.2.5.1 Dados de caracterização de *N*-(4-(*N*-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-*N*-metilsulfamoil)fenil)acetamida (**HAB 6**)



N-(4-(*N*-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-*N*-metilsulfamoil)fenil)acetamida

Óleo alaranjado escuro

Rf: 0,50 (hexano e acetato de etila, 4/6, v/v)

Massa obtida: 0,030 g (0,08 mmol, 45 %)

F.M.: C₁₉H₂₄N₂O₅S **M.M.:** 392,4693 g.mol⁻¹

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 3514 (ν N-H), 3427 (ν O-H), 2966-2863 (ν C-H sp^3), 1676 (ν C=O), 1612, 1589 (ν C=C), 1400 (ν C-N), 1346, 1161 (ν S=O), 1211, 1109 (ν C-O-C).

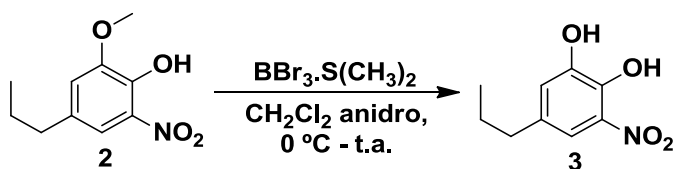
RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 7,80 (sl; 1H; OH), 7,61 (s; 4H; H2', H3'), 6,61 (d; 1H; $J = 0,3$ Hz; H4), 6,22 (d; 1H; $J = 0,3$ Hz; H6), 6,00 (sl; 1H; NH), 3,85 (s; 3H; OCH₃), 3,15 (s; 3H; NCH₃), 2,38 (t; 2H; $J = 7,4$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 2,19 (s; 3H; NHCOCH₃), 1,47 (sex; 2H; $J = 7,4$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 0,85 (t; 3H; $J = 7,3$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 168,8 (C5'), 147,6 (C3), 142,2 (C4'), 141,2 (C1), 134,0 (C1'), 131,9 (C5), 129,3 (C2'), 127,1 (C2), 119,8 (C4), 118,9 (C3'), 111,4 (C6), 56,1 (OCH₃), 38,4 (C7), 37,5 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,7 (NHCOCH₃), 24,6 (CH₃-CH₂-CH₂), 13,7 (CH₃-CH₂-CH₂).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaO}_5\text{S}$ 415,1298; encontrado 415,1285.

4.1.2.6 Obtenção do intermediário nitrado di-hidroxilado **3** a partir do intermediário **2** (adaptado de KOSAK *et al.*, 2015)

Figura 20 – Esquema de *O*-desmetilação do intermediário nitrado **2**.

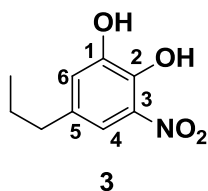


Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL adicionou-se a substância **2** (0,226 g, 1,08 mmol), solubilizada em cerca de 5 mL de diclorometano anidro. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa, à temperatura ambiente (25 ± 3 °C), e sob atmosfera de gás argônio, por cerca de 20 min. Após esse tempo, adicionou-se com auxílio de seringa e agulha e sob banho de água e gelo, a solução de dimetilssulfeto de tribrometo de boro (2,5 eq.) solubilizado em cerca de 10 mL de diclorometano anidro. A adição ocorreu lentamente e depois de finalizada, a mistura reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa, à temperatura ambiente (25 ± 3 °C), e sob atmosfera de gás argônio, por 24 h. O progresso da reação foi acompanhado por CCD, usando como eluente hexano e acetato de etila, 7,5/2,5, v/v. Ao término da reação, a mistura reacional foi resfriada sob banho de água e gelo, sendo adicionados em seguida 10 mL de água destilada. Após alguns minutos, a mistura reacional foi extraída em

diclorometano (3 x 20 mL), a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o sal removido por filtração simples e o produto concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por CCS, usando como eluente hexano e acetato de etila, 8/2, v/v.

4.1.2.6.1 *Dados de caracterização de 3-nitro-5-propilbenzeno-1,2-diol (3)*



3-nitro-5-propilbenzeno-1,2-diol

Sólido alaranjado escuro

Massa obtida: 0,190 g (0,93 mmol, 83 %)

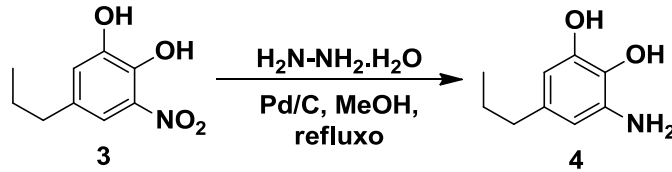
F.M.: C₉H₁₁NO₄ **M.M.:** 197,1879 g.mol⁻¹

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 300 MHz): 10,48 (s; 1H; OH), 7,44 (d; 1H; *J* = 2,0 Hz; H4), 6,08 (d; 1H; *J* = 2,0 Hz; H6), 5,87 (sl; 1H; OH), 2,53 (t; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 1,61 (sex; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 0,93 (t; 3H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 75 MHz): 146,1 (C3), 141,0 (C2), 134,7 (C1), 133,3 (C5), 122,3 (C4), 114,8 (C6), 37,0 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,1 (CH₃-CH₂-CH₂), 13,5 (CH₃-CH₂-CH₂).

4.1.2.7 Obtenção do intermediário amínico di-hidroxilado **4** a partir do intermediário **3** (COMESAÑA-GÁNDARA *et al.*, 2014)

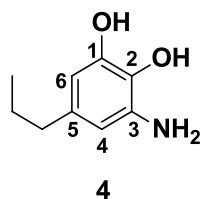
Figura 21 – Esquema de nitro-redução do intermediário nitrado di-hidroxilado **3**.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL adicionou-se a substância **3** (0,190 g, 0,93 mmol), solubilizada em cerca de 10 mL de metanol, seguidos da adição do catalisador paládio suportado em carvão ativado (10 % p/p) e do hidrato de hidrazina (14 eq.). A mistura reacional foi mantida sob agitação vigorosa, em refluxo, por 48 h. O progresso da reação foi acompanhado por CCD, usando como eluente hexano e acetato de etila (1/1, v/v) e como revelador para grupo amino o reagente DMAB. Após o término da reação, a mistura reagentes foi filtrada, o filtrado concentrado em evaporador rotatório e o produto purificado por CCS, usando como eluente hexano e acetato de etila, 7,5/2,5, v/v.

4.1.2.7.1 Dados de caracterização de 3-amino-5-propilbenzeno-1,2-diol (**4**)



3-amino-5-propilbenzeno-1,2-diol

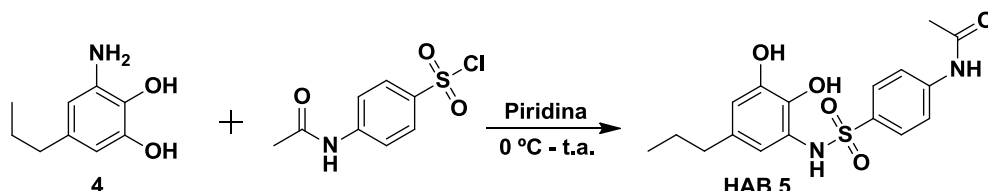
Sólido marrom

Massa obtida: 0,070 g (0,42 mmol, 44 %)

F.M.: C₉H₁₃NO₂ **M.M.:** 167,2050 g.mol⁻¹

4.1.2.8 Obtenção do análogo estrutural **HAB 5** a partir do intermediário amínico di-hidroxilado **4** (SILVA *et al.*, 2015)

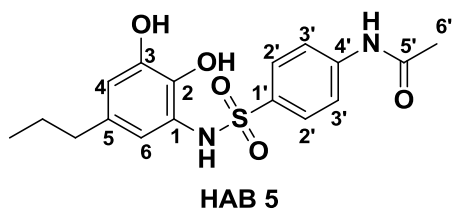
Figura 22 – Esquema de obtenção do análogo **HAB 5** a partir do intermediário amínico di-hidroxilado **4**.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL contendo 2 mL de piridina (24,83 mmol), foi adicionada a substância **4** (0,070 g, 0,42 mmol) e o cloreto de 4-acetamidobenzenossulfonila comercial (1 eq., marca Sigma-Aldrich®), sob banho de água e gelo. Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética vigorosa a temperatura ambiente (25 ± 3 °C), por aproximadamente uma hora. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila, 6/4, v/v. Após o término, verteu-se a mistura reacional em béquer contendo água destilada e gelo. O pH da mistura reacional foi acidificado com ácido clorídrico concentrado. Após a acidificação do meio, a mistura reacional foi extraída com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o sal separado por filtração simples. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório, obtendo-se o produto que foi purificado por CCS, usando como eluente hexano e acetato de etila, 4/6, v/v.

4.1.2.8.1 Dados de caracterização de *N*-(4-(*N*-(2,3-dihidroxi-5-propilfenil)sulfamoil)fenil)acetamida (**HAB 5**)



N-(4-(*N*-(2,3-dihidroxi-5-propilfenil)sulfamoil)fenil)acetamida

Sólido bege escuro

Rf: 0,56 (hexano e acetato de etila, 4/6, v/v)

Massa obtida: 0,020 g (0,055 mmol, 13 %)

F.M.: C₁₇H₂₀N₂O₅S **M.M.:** 364,4161 g.mol⁻¹

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3441, 3362 (ν N-H), 3264 (ν O-H), 2953-2850 (ν C-H *sp*³), 1664 (ν C=O), 1590, 1529 (ν C=C), 1401, 1370 (ν C-N), 1308, 1157 (ν S=O), 1261, 1220 (ν C-O-H).

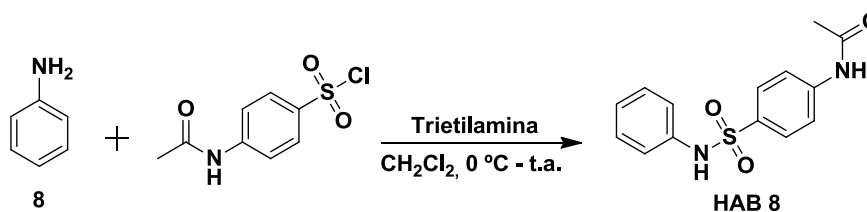
RMN de ^1H (δ ; DMSO-*d*₆; 300 MHz): 10,27 (s; 1H; OH), 9,11 (s; 1H; OH), 8,85 (s; 1H; NHSO₂), 8,29 (s; 1H; NHCOCH₃), 7,65 (s; 4H; H2', H3'), 6,39 (d; 1H; *J* = 0,2 Hz; H4), 6,35 (d; 1H; *J* = 0,2 Hz; H6), 2,27 (t; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 2,06 (s; 3H; NHCOCH₃), 1,40 (sex; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 0,78 (t; 3H; *J* = 7,4 Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO-*d*₆; 75 MHz): 169,5 (C5'), 145,7 (C3), 143,4 (C4'), 136,7 (C1'), 134,3 (C1), 132,5 (C5), 128,5 (C2'), 124,0 (C2), 118,6 (C3'), 114,8 (C4), 113,1 (C6), 37,1 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,6 (C6'), 24,5 (CH₃-CH₂-CH₂), 13,9 (CH₃-CH₂-CH₂).

EM-ESI/Q-TOF (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₇H₂₁N₂O₅S 365,1166; encontrado 365,1158.

4.1.2.9 Obtenção do análogo estrutural **HAB 8** a partir da anilina comercial (adaptado de SILVA *et al.*, 2015)

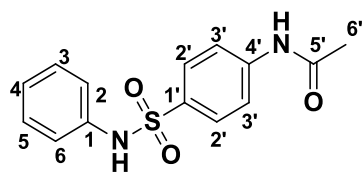
Figura 23 – Esquema de obtenção do análogo **HAB 8** a partir da anilina (**8**).



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 2 mL de trietilamina (14,4 mmol), foi adicionada 2 mL de anilina comercial destilada (substância **8**; 21,7 mmol, marca Vetec[®]), solubilizada em cerca de 10 mL de diclorometano. A adição do cloreto de *p*-acetilamidobenzenossulfonila comercial (1 eq., marca Sigma-Aldrich[®]) foi realizada em pequenas porções, sob banho de água e gelo. Deixou-se a mistura reacional, sob agitação magnética vigorosa e em banho de água e gelo, por cerca de 2 h, sendo posteriormente mantida à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) por aproximadamente 12 h. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila, 6/4, v/v. Após o término, verteu-se a mistura reacional em béquer contendo água destilada e gelo. O pH da mistura reacional foi acidificado com ácido clorídrico concentrado. Após a acidificação do meio, a mistura reacional foi filtrada sob pressão reduzida para separação do sólido formado em grande quantidade. O sólido formado foi seco sob corrente de ar e purificado por CCS, usando como eluente hexano e acetato de etila 6/4, v/v.

4.1.2.9.1 Dados de caracterização de *N*-(4-(*N*-fenilsulfamoil)fenil)acetamida (**HAB 8**)



HAB 8

N-(4-(*N*-fenilsulfamoil)fenil)acetamida

Sólido amarelo claro brilhante

Rf: 0,54 (hexano e acetato de etila, 4/6, v/v)

F.F.: 215 – 219 °C

Massa obtida: 0,384 g (1,32 mmol, 6 %)

F.M.: C₁₄H₁₄N₂O₃S **M.M.:** 290,3376 g.mol⁻¹

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3236 (ν N-H), 3113-3053 (ν C-H *sp*²), 1670 (ν C=O), 1604, 1589 (ν C=C), 1402, 1392 (ν C-N), 1331, 1162 (ν S=O).

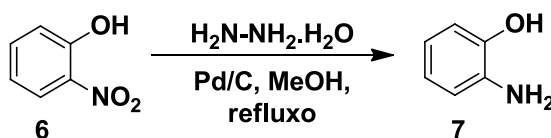
RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 10,30 (s; 1H; NHCOCH₃), 10,18 (s; 1H; NH₂SO₂), 7,68 (s; 4H; H_{2'} e H_{3'}), 7,24-7,18 (m; 2H; H₃ e H₅), 7,08-7,05 (m; 2H; H₂ e H₆), 7,02-6,97 (m; 1H; H₄), 2,05 (s; 3H; -CH₃).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 169,6 (C_{5'}), 143,6 (C_{4'}), 138,4 (C_{1'}), 133,5 (C₁), 129,6 (C_{2'}), 128,5 (C₃ e C₅), 124,4 (C₄), 120,5 (C_{3'}), 119,0 (C₂ e C₆), 24,6 (C_{6'}).

EM-ESI/Q-TOF (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₁₄H₁₄N₂NaO₃S 313,0617; encontrado 313,0615.

4.1.2.10 Obtenção do intermediário amínico **7** (COMESAÑA-GÁNDARA *et al.*, 2014)

Figura 24 – Esquema de nitro-redução do intermediário nitrado **6**.

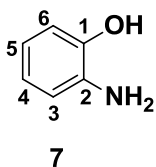


Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL adicionou-se a substância **6** de origem comercial (0,220 g, 1,58 mmol, marca Sigma-Aldrich®) solubilizada em cerca de 10 mL de metanol, seguidos da adição do catalisador paládio suportado em carvão ativado (0,048 eq.) e do hidrato de hidrazina (14 eq.). A mistura reacional foi mantida sob agitação vigorosa, em refluxo, por uma hora. O progresso da reação foi acompanhado por CCD, usando como eluente hexano e acetato de etila, 8/2, v/v, e como revelador para grupo amino o reagente DMAB. Após o término, a mistura reacional foi filtrada, o filtrado concentrado em evaporador rotatório e o

produto, quando necessário, foi purificado por filtração em CCS, usando como eluente hexano e acetato de etila, 8/2, v/v.

4.1.2.10.1 Dados de caracterização de 2-aminofenol (7)



2-aminofenol

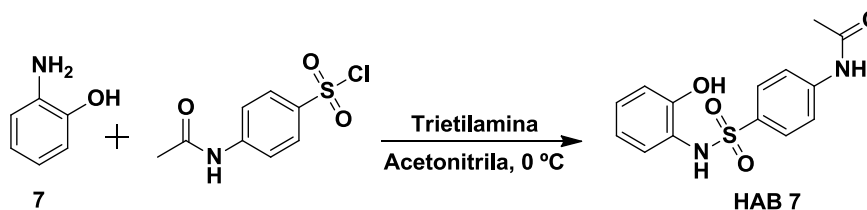
Sólido amarelo brilhante

Massa obtida: 0,260 g (2,39 mmol, quantitativo)

F.M.: C₇H₇NO **M.M.:** 109,1259 g.mol⁻¹

4.1.2.11 Obtenção do análogo estrutural **HAB 7** a partir do intermediário amínico **7** (adaptado de SILVA *et al.*, 2015)

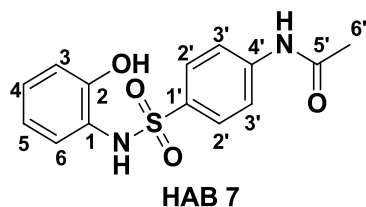
Figura 25 – Esquema de obtenção do análogo **HAB 7** a partir do intermediário amínico **7**.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 2 mL de trietilamina (14,4 mmol), foi adicionado a substância **7** (0,165 g, 1,51 mmol), solubilizada em cerca de 10 mL de acetonitrila. A adição do cloreto de *p*-acetilamidobenzenossulfonila comercial (1 eq., marca Sigma-Aldrich®) foi realizada em pequenas porções, sob banho de água e gelo. Deixou-se a mistura reacional, sob agitação magnética vigorosa e em banho de água e gelo, por cerca de uma hora. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila, 4/6, v/v. Após o término, verteu-se a mistura reacional em béquer contendo água destilada e gelo. O pH da mistura reacional foi acidificado com ácido clorídrico concentrado. Após a acidificação do meio, foi realizada uma extração líquido-líquido em acetato de etila (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o sal separado por filtração simples e o produto concentrado em evaporador rotatório. A purificação foi realizada por meio de uma CCD preparativa, usando como eluente hexano e acetato de etila, 3/7, v/v.

4.1.2.11.1 Dados de caracterização de *N*-(4-(*N*-(2-hidroxifenil)sulfamoil)fenil)acetamida (**HAB 7**)



N-(4-(*N*-(2-hidroxifenil)sulfamoil)fenil)acetamida

Sólido amarelo claro brilhante

Rf: 0,46 (hexano e acetato de etila, 4/6, v/v)

F.F.: 135 – 140 °C

Massa obtida: 0,060 g (0,20 mmol, 13 %)

F.M.: C₁₄H₁₄N₂O₄S **M.M.:** 306,3370 g.mol⁻¹

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3490, 3394 (ν N-H), 3300 (ν O-H), 3111-3048 (ν C-H *sp*²), 1672 (ν C=O), 1619, 1589 (ν C=C), 1404 (ν C-N), 1357, 1178 (ν S=O), 1263 (ν C-O-H).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 10,48 (s; 1H, OH), 7,84-7,80 (m; 2H; H2'), 7,79-7,75 (m; 2H; H3'), 6,93-6,92 (td; 1H; *J* = 1,6 Hz; H4), 6,87-6,84 (dd; 1H; *J* = 8,2 Hz; H6), 6,66-6,63 (dd; 1H; *J* = 8,1 Hz; H3), 6,48-6,45 (td; 1H; *J* = 7,3 Hz; H5), 4,96 (s; 1H; NHSO₂), 2,09 (s; 3H; -CH₃).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 174,9 (C5'), 150,3 (C4'), 146,5 (C2), 140,9 (C1'), 133,4 (C1), 135,4 (C2'), 133,2 (C5), 127,7 (C6), 123,9 (C3'), 121,8 (C4), 121,2 (C3), 29,8 (C6').

EM-ESI/Q-TOF (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₄H₁₅N₂O₄S 307,0747; encontrado 307,0746.

4.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO

O potencial antiproliferativo *in vitro* da substância protótipo **4b** e de seus análogos estruturais (**HAB 1 a 9**) foi avaliado no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG, com a supervisão da coorientadora Profa. Dra. Marisa Ionta e do Ms. Guilherme Álvaro Ferreira da Silva.

4.2.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Para compor este estudo, na primeira fase foram utilizadas as linhagens A549, MCF-7, HT-144 e HepG2, derivadas de adenocarcinoma de pulmão, adenocarcinoma de mama, melanoma e carcinoma hepatocelular, respectivamente. Na segunda fase foram utilizadas as linhagens provenientes de carcinoma de mama MCF-7, MDA-MB-231 e Hs 578T. Para avaliação do perfil de citotoxicidade frente células normais foi utilizada a linhagem CCD-

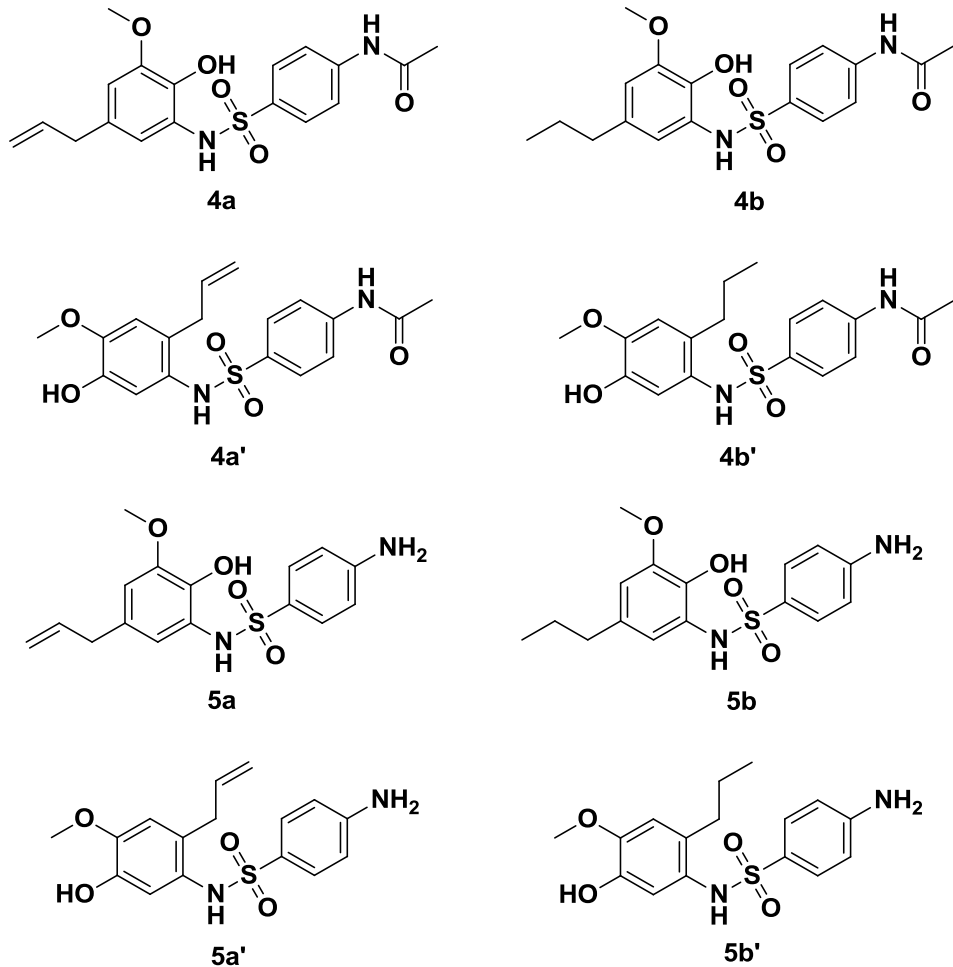
1059Sk derivada de fibroblastos de pele normal e MCF10A derivada de células epiteliais normais de mama. As referidas linhagens foram obtidas por meio do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino, mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera controlada (95 % de ar e 5 % de CO₂).

4.2.2 Viabilidade celular

4.2.2.1 Ensaio colorimétrico

Em estudo preliminar, o ensaio colorimétrico Resazurina foi utilizado como parâmetro inicial para avaliar o efeito dos derivados **4a**, **4a'**, **4b**, **4b'**, **5a**, **5a'**, **5b** e **5b'** (FIGURA 26), bem como de seus precursores (eugenol, di-hidroeugenol e sulfanilamida) sobre a viabilidade celular das linhagens citadas A549, HT-144, HepG2 e MCF-7. Posteriormente, os efeitos dos análogos estruturais de **4b** frente à viabilidade celular das linhagens MCF-7, MDA-MB 231 e Hs 578T foram avaliados por MTS. Em ambos os casos, as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço. As substâncias foram testadas em diferentes concentrações por 48 h. Decorrido o tempo de tratamento foi adicionado 10 µL de reagente colorimétrico por poço e a placa foi incubada por 4 h a 37 °C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (570 e 490 nm para Resazurina e MTS, respectivamente). Após as análises das curvas de viabilidade (% de células viáveis em relação ao controle não tratado), os valores de CI₅₀ (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento) foram determinados usando o programa GraphPadPrism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). O Índice de Seletividade (IS) foi determinado por meio da razão entre o valor de CI₅₀ determinado para a célula normal e tumoral.

Figura 26 – Estruturas químicas dos derivados aril-sulfonamídicos inéditos, obtidos em estudo preliminar a partir do eugenol (**4a**, **4a'**, **5a** e **5a'**) e di-hidroeuugenol (**4b**, **4b'**, **5b** e **5b'**).



Fonte: Adaptado de AZEVEDO-BARBOSA *et al.*, 2019.

4.2.2.2 Ensaio de exclusão com azul de *Trypan*

Para o ensaio de exclusão com azul de *Trypan* foram realizadas duas abordagens experimentais em que as células foram semeadas em placas de 12 poços com densidade de 1×10^5 células/placa. Na primeira abordagem experimental as culturas de MCF-7 foram tratadas com o protótipo **4b** nas concentrações de 50 e 100 μM por 24, 48 ou 72 h. Posteriormente, culturas de MDA-MB 231 foram tratadas com os análogos **HAB 2** e **HAB 4** nas concentrações de 25 e 50 μM por 24 e 48 h. Em ambos os casos, decorrido o tempo de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (tripsina/EDTA) e a solução de azul de *Trypan* (0,4 %) foi adicionada à suspensão celular (1:1). As células foram quantificadas em hemocítmetro. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas em azul) a partir de três experimentos independentes apresentados como média \pm DP.

4.2.3 Aspectos Morfológicos

As imagens ilustrativas das culturas que evidenciam os aspectos morfológicos das culturas após o tratamento com **4b** e análogo **HAB 2** foram obtidas no momento anterior à fixação de células para a realização do ensaio de ciclo celular. Assim sendo, as células foram semeadas em placas de 35 mm com densidade de 1×10^5 células/placa. Após aderência as células foram tratadas. Decorrido o tempo de tratamento as imagens das culturas foram obtidas através de um sistema de captura de imagens acoplado ao microscópio invertido de contraste de fase (Carl Zeiss®).

4.2.4 Ensaio de capacidade clonogênica

O ensaio de capacidade clonogênica foi realizado de acordo Franken *et al.* (2006) com modificações que neste estudo foi utilizado como parâmetro adicional para caracterizar o potencial antiproliferativo de **4b** frente à linhagem MCF-7. As células foram semeadas em placas de 35 mm com inóculo de 200 células/poço. Após aderência (24 h) as culturas foram tratadas com o protótipo nas concentrações de 50, 100 e 200 μM por 48 h. Decorrido o tempo de tratamento, as culturas foram lavadas (duas vezes) com PBSA e mantidas em meio fresco por mais 10 dias em estufa com atmosfera controlada. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBSA, fixadas por 30 min com metanol, deixadas até completa secagem e coradas com solução de Cristal Violeta, por 5 min. A contagem do número de colônias foi realizada com auxílio de lupa. Foram consideradas colônias com 50 células ou mais.

4.2.5 Análise da progressão do ciclo celular por quantificação de DNA em citometria de fluxo

O ensaio de ciclo celular foi realizado de acordo com Ferreira-Silva *et al.* (2017). Esta abordagem experimental foi utilizada para avaliar o potencial antiproliferativo de **4b** e seu análogo **HAB 2** frente às linhagens MCF-7 e MDA-MB 231, respectivamente. As células foram semeadas em placas de 35 mm com inóculo de 2×10^5 células/poço. Após aderência as células foram tratadas com o protótipo **4b** nas concentrações de 50 e 100 μM por 48 h, por conseguinte, o análogo **HAB 2** foi utilizado nas concentrações de 25 e 50 μM por 24 h. Nas duas abordagens, após o término do tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática com solução

de tripsina-EDTA e transferidas para tubos Falcon. Após centrifugação (5 min a 1000 rpm) o precipitado de células foi homogeneizado em tampão salina fosfato e as células fixadas em etanol gelado (75 %) por 30 min. As células foram tratadas com solução contendo: PBSA, RNase (1,5 mg/mL) e Iodeto de Propídio (90 µg/mL) por 30 min e analisadas em citômetro de fluxo utilizando o software GuavaSoft 2.7.

4.2.6 Determinação do índice mitótico a partir de preparações citológicas fluorescentes

O índice mitótico e a quantificação de células nas diferentes fases da mitose foram determinados após tratamento com o protótipo **4b** nas concentrações de 50 e 100 µM em culturas de MCF-7. Assim sendo, as células foram semeadas sobre lamínula em placas de 35 mm com densidade de 2×10^5 células/placa. Após 48 h de tratamento, as culturas foram fixadas com formaldeído a 3,7 % por 30 min. Para a imunomarcagem as células foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,5 %) por 10 min. Após o bloqueio com BSA a 1 %, o anticorpo anti-tubulina (1:100, clone DM1A, Sigma-Aldrich®) foi incubado por 12 h a 8 °C. Após esse período as culturas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado à FITC (1:100, Sigma-Aldrich®) por 2 h a 27 °C. Após sucessivas lavagens as culturas foram incubadas com DAPI para contracoloração dos núcleos. Para montagem das lâminas utilizou-se o meio crioprotetor Vecta-Shield (Vector Laboratories®). Foram quantificadas 1000 células por lâmina utilizando-se o microscópio de fluorescência (Nikon®). Os resultados foram apresentados como a média \pm DP de três experimentos independentes.

4.2.7 Ensaio de *Immunoblot*

A quantificação do perfil proteico por *Immunoblot* foi executado de acordo com Ferreira-Silva *et al.* (2017). Esta abordagem experimental foi utilizada para verificar os níveis proteicos das ciclinas D1 e E. As células foram semeadas em placas de 100 mm com inóculo de 2×10^6 células/placa. Após aderência (24 h), as culturas foram tratadas por 48 h com **4b** nas concentrações de 50 e 100 µM. Após tratamento, as células foram coletadas em tampão RIPA contendo inibidor de proteases a 2 % e centrifugadas a 12000 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e alíquotas foram separadas para quantificação pelo método BCA. A leitura da absorbância foi realizada por ELISA a 562 nm. As amostras foram diluídas em tampão de amostra 4 x e fervidas por 5 min (100 °C). O fracionamento das proteínas foi realizado em minigel de poliacrilamida 12 % com SDS (2,5 h a 100 V). Em cada poço foi colocado 30 µg de

proteínas totais. A transferência para membrana de PVDF foi realizado por 2 h a 200 mA em tampão. Após a transferência das proteínas, a membrana foi corada em solução de Ponceau 0,5 % por 3 min para verificar a eficiência da transferência. Em seguida, foram lavadas três vezes em TBS a 0,02 M. O bloqueio foi realizado com TBS a 0,02 M contendo 5 % de leite desnatado em pó e 0,05 % de tween 20 por uma hora à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) e sob agitação. Os anticorpos primários, ciclina D1 (Sigma-Aldrich® 1:200), ciclina E (Santa-Cruz® 1:200) e α -tubulina (Sigma-Aldrich® 1:1000) foram diluídos em solução de bloqueio e a membrana foi incubada com os diferentes anticorpos, por 12 h a 4 °C sob agitação. Após sucessivas lavagens com TBS e TTBS, a membrana foi incubada com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (1:1000), lavada novamente e revelada por quimioluminescência. Os resultados foram registrados em filme Hyperfilm Amershan e a quantificação das bandas foi realizada por meio do software ImageJ.

4.2.8 Ensaio de Anexina V/7-AAD

O ensaio de anexina V foi utilizado para avaliar o potencial citotóxico do tratamento com o protótipo **4b** frente à linhagem MCF-7. Assim sendo, foi utilizado o *Kit Guava Nexin Reagent* (Merck/Millipore®) de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com **4b** nas concentrações de 50 e 100 μ M por 48 h. Após o tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (*Trypsin-EDTA solution*/Sigma Aldrich®, Brasil), centrifugadas a 1000 rpm por 5 min, lavadas em PBSA gelado e homogeneizadas em solução contendo Anexina V conjugada a PE e 7-AAD (7-aminoactinomicina D). As amostras foram incubadas por 20 min, protegidas da luz em temperatura ambiente (25 ± 3 °C) e a análise feita por citometria de fluxo (Guava Mini Easy Cyte, 8HT) por meio do software GuavaSoft 2.7.

4.2.9 Análise de integridade mitocondrial

A integridade das mitocôndrias foi examinada por meio da sonda *MitoTracker Fluorescent Red* (Invitrogen, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific®) de acordo com as instruções do fabricante. As culturas de MCF-7 foram tratadas por 48 h com **4b** à 50 e 100 μ M. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (Trypsin/EDTA), centrifugadas (1000 rpm, 5 min e 4 °C), lavadas com PBS gelado e incubadas com solução contendo MitoTracker (500 nM) em temperatura ambiente por 45 min ao abrigo

da luz. A análise foi realizada por citometria de fluxo utilizando Software GuavaSoft 2.7. Os experimentos foram realizados em triplicadas.

4.2.10 Análise estatística

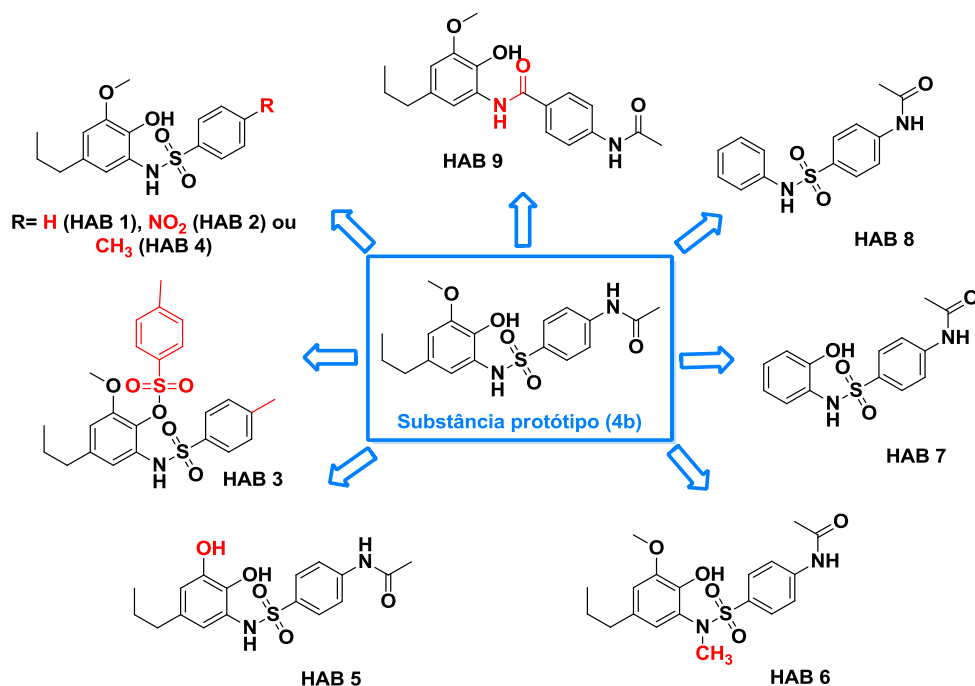
Os dados quantitativos foram apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. Diferenças estatísticas foram determinadas de acordo com a análise de variância one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey usando o software GraphPad Prism[®].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudo preliminar foi observado que **4b** apresentou atividade antiproliferativa promissora frente culturas de células MCF-7, quando comparado com as substâncias que a originaram, como di-hidroeugenol e sulfanilamida. Dessa forma, esses resultados evidenciaram que **4b** constitui um protótipo interessante para investigações químico-medicinais mais avançadas. Neste sentido, duas vertentes de estudo, que se complementam, foram prioritárias neste trabalho de doutorado, como elucidar a relação estrutura-atividade que norteia o efeito biológico observado em **4b**, bem como investigar os mecanismos de ação associados à atividade antiproliferativa desta substância frente culturas de células MCF-7. Para tanto, como de praxe em Química Medicinal, uma série de análogos estruturais de **4b** foi sintetizada e os derivados, denominados de **HAB 1 a 9**, foram obtidos. O perfil de citotoxicidade dos análogos sintetizados foi avaliado frente às linhagens tumorais MCF-7, MDA-MB 231, Hs 578T e a linhagem normal CCD-1059Sk.

Do ponto de vista estrutural, procurou-se modificar grupos presentes em **4b**, visando comumente à variação de parâmetros estéricos, hidrofóbicos e eletrônicos, e avaliou-se o impacto dessas alterações por meio dos resultados biológicos *in vitro*. Sendo assim, buscou-se a ausência do grupo acetamida (**HAB 1**) ou a substituição do mesmo por grupos retiradores de densidade eletrônica, como o grupo nitro (**HAB 2**) e por grupos com moderada doação de densidade eletrônica, como o grupo metila (**HAB 4**). A hidroxila fenólica foi passível de substituição por um grupo volumoso, como 4-metilbenzenossulfonato (**HAB 3**). A *O*-desmetilação permitiu avaliar o impacto da ausência do grupo metila, de caráter hidrofóbico, pela inserção de uma segunda hidroxila (**HAB 5**). Já o grupo sulfonamida *N*-monossubstituído de **4b** tornou-se *N*-dissubstituído (**HAB 6**) e foi alvo de troca isostérica por uma amida (**HAB 9**), a fim de se verificar a real importância deste grupo. A ausência da cadeia lateral propílica também permitiu avaliar a importância de grupos com característica hidrofóbica no padrão estrutural de **4b**, bem como a ausência da metoxila como um grupo aceptor de ligação de hidrogênio. Para isso, foram incluídos os análogos **HAB 7 e HAB 8**, sendo este último a única substância não inédita deste trabalho. As estruturas químicas dos nove análogos estruturais de **4b** obtidos encontram-se ilustrados na Figura 27.

Figura 27 – Estruturas químicas da substância protótipo **4b** e dos análogos estruturais **HAB 1** a **9** obtidos neste trabalho de doutorado. Os grupos destacados em vermelho relacionam-se com o propósito deste trabalho e diferem-se com relação à substância protótipo **4b**.



Fonte: Da autora.

Notas: Com exceção de **HAB 8**, a substância protótipo **4b** e os demais análogos estruturais trata-se de derivados com padrão estrutural inédito.

Os mecanismos de reação para a obtenção dos intermediários e substâncias finais propostas são apresentadas a seguir, em conjunto com a análise estrutural realizada com base nos espectros de IV, RMN de ¹H e ¹³C e EM, podendo estes serem consultados na seção Apêndice. Os rendimentos obtidos ao final de cada etapa reacional da síntese de **4b** e dos análogos **HAB 1** a **9** foram relativamente inferiores ao esperado. Contudo, foram satisfatórios com o propósito do trabalho, já que este não objetivou, no momento, a otimização das condições reacionais de síntese.

A seguir também serão apresentados os resultados referentes à avaliação da atividade antiproliferativa da substância protótipo **4b** frente à linhagem proveniente de adenocarcinoma de mama humana (MCF-7), os quais foram publicados em 2019 no periódico *Toxicology in Vitro* (AZEVEDO-BARBOSA *et al.*, 2019). Além disso, também serão descritos os resultados do ensaio de viabilidade celular envolvendo os nove análogos estruturais de **4b** (**HAB 1** a **9**) frente diferentes linhagens provenientes de carcinoma de mama (MCF-7, MDA-MB 231 e Hs 578T), bem como de hepatocarcinoma celular (HepG2) e o perfil de citotoxicidade frente fibroblastos de pele normal humana (CCD-1059Sk).

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE **4b** E DE SEUS ANÁLOGOS ESTRUTURAIS (HAB 1 a 9)

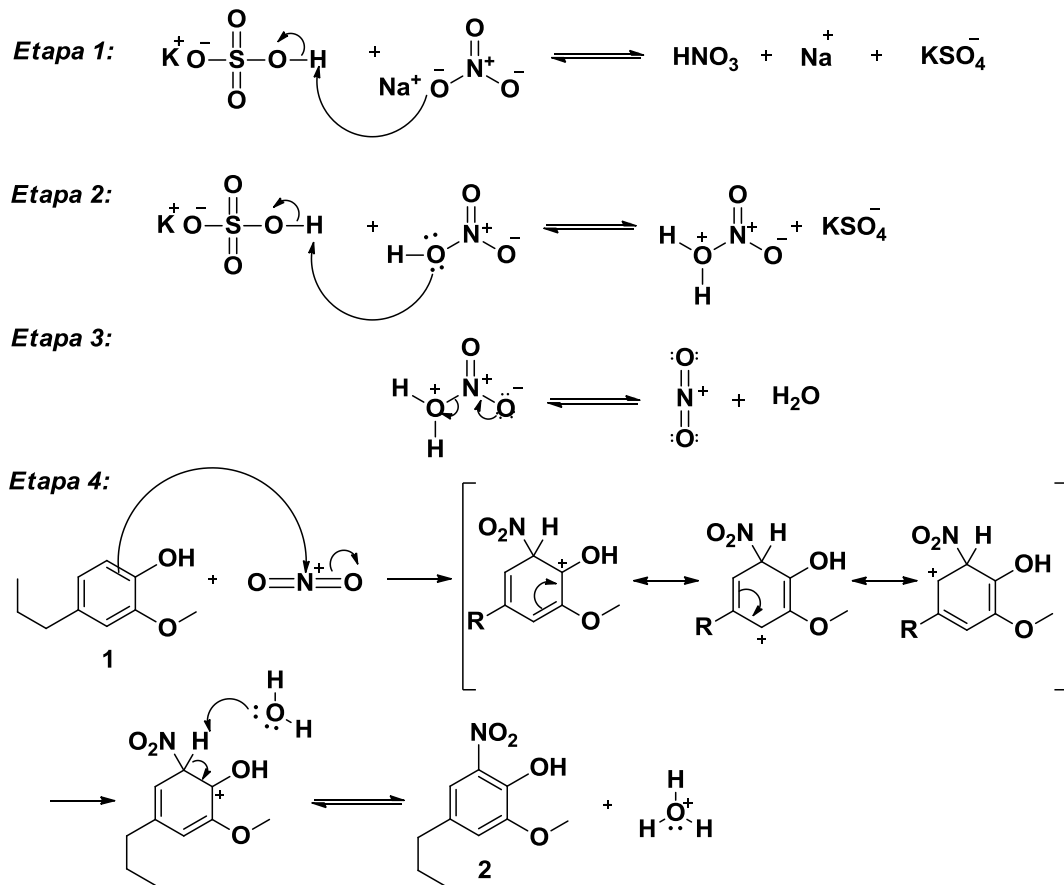
5.1.1 Obtenção do intermediário nitrado **2**, derivado do di-hidroeuçenol

A reação de nitração aromática para a obtenção do intermediário nitrado **2** procedeu-se conforme descrito no trabalho de Zolfigol, Ghaemi e Madrakian (2001). Esta metodologia foi escolhida por apresentar especificidade para a introdução de grupos nitro (NO₂) na posição *orto* em relação à hidroxila fenólica, e por a mesma ser realizada em condições mais brandas, ao contrário da clássica reação de nitração aromática que envolve o uso de uma mistura de ácidos concentrados, como o ácido sulfúrico e o ácido nítrico. O rendimento obtido para esta reação foi relativamente inferior ao que é descrito na literatura, porém foi satisfatório para a continuidade do trabalho.

Trata-se de uma reação de Substituição Eletrofílica Aromática (SEAr), sendo que para a inserção do grupo NO₂ ao anel aromático, primeiramente, é necessário a formação de uma espécie eletrófila. Esta espécie, que neste caso trata-se do íon nitrônio, será formada a partir da reação do bissulfato de potássio com o nitrato de sódio. Desta interação haverá a formação de ácido nítrico que, após reagir com outra molécula de bissulfato de potássio, dissocia-se gerando a espécie eletrófila. Como este íon é altamente reativo, o mesmo sofre o ataque da ligação π C=C do anel aromático do di-hidroeuçenol (**1**), formando o íon arênio que é estabilizado por ressonância. A etapa de formação deste íon é lenta, devido à conversão a um produto de menor estabilidade. Em seguida, uma base de Lewis presente no meio, provavelmente a água formada durante a dissociação do ácido nítrico, capta um próton do íon arênio, restaurando a aromaticidade do anel. Esta última etapa ocorre rapidamente, pois leva à formação de produtos mais estáveis, que neste caso trata-se do derivado nitrado **2**, obtido a partir do di-hidroeuçenol (HUGHES; INGOLD; REED, 1950; ZOLFIGOL; GHAEMI; MADRAKIAN, 2001; SUDARMA *et al.*, 2014). O mecanismo proposto para esta reação de nitração aromática encontra-se ilustrado na Figura 28.

Segundo Zolfigol, Ghaemi e Madrakian (2001), a presença de sílica hidratada no meio reacional promove uma área superficial heterogênea para a geração *in situ* de ácido nítrico em baixas concentrações, além de diminuir o tempo de reação.

Figura 28 – Mecanismo proposto para a reação de nitração aromática do di-hidroeuogenol (1).



Fonte: Da autora.

Notas: R = CH₃-CH₂-CH₂-.

Devido à hidroxila fenólica ser um grupo fortemente ativante e orientador *orto* e *para* nas reações de SEAr a nitração do di-hidroeuogenol (1) em posição *orto* à hidroxila fenólica é favorecida, já que a posição *para* em relação ao grupo OH encontra-se substituído pela cadeia lateral propílica. A metoxila também é um grupo ativante e orientador *orto* e *para*, contudo, com menor força em relação à hidroxila fenólica, já que esta última contribui melhor na estabilização da carga positiva do íon arênio (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

No espectro de RMN de ¹H da substância 2 (FIGURA 55), observa-se os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia propílica do di-hidroeuogenol que aparecem como tripletos a aproximadamente δ 2,57 (CH₃-CH₂-CH₂-) e a δ 0,96 (CH₃-CH₂-CH₂-), e como um sexteto centrado em δ 1,64 (CH₃-CH₂-CH₂-). Em δ 6,96 e 7,49 notam-se os dois dupletos referentes aos dois hidrogênios aromáticos, sendo que o hidrogênio com maior δ é o que está mais próximo do grupo NO₂ (H5), decorrente do efeito retirador de elétrons exercido por este grupo. Já os simpletos correspondentes aos hidrogênios dos grupos OCH₃ e OH encontram-se a δ 3,93 e a δ 10,62, respectivamente.

No espectro de ^{13}C da substância **2** (FIGURA 56) é possível notar os sinais referentes aos carbonos da cadeia propílica a aproximadamente δ 37,3 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), δ 24,1 ($\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2$ -) e a δ 13,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ -), assim como o sinal correspondente ao carbono da metoxila ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$) a δ 56,7. Os sinais relativos aos carbonos aromáticos hidrogenados são visualizados a aproximadamente δ 118,8 e 115,0, sendo o de maior δ correspondente ao carbono mais próximo ao grupo retirador de elétrons (NO_2) (C5). Em δ 149,7, 144,5, 133,8 e 133,6 encontram-se os sinais referentes aos carbonos conectados aos grupos NO_2 , OH, OCH_3 e a cadeia propílica, respectivamente. No subspectro DEPT-135 de **2** (FIGURA 57), destaca-se os sinais dos carbonos metilênicos a δ 37,3 e a δ 24,2.

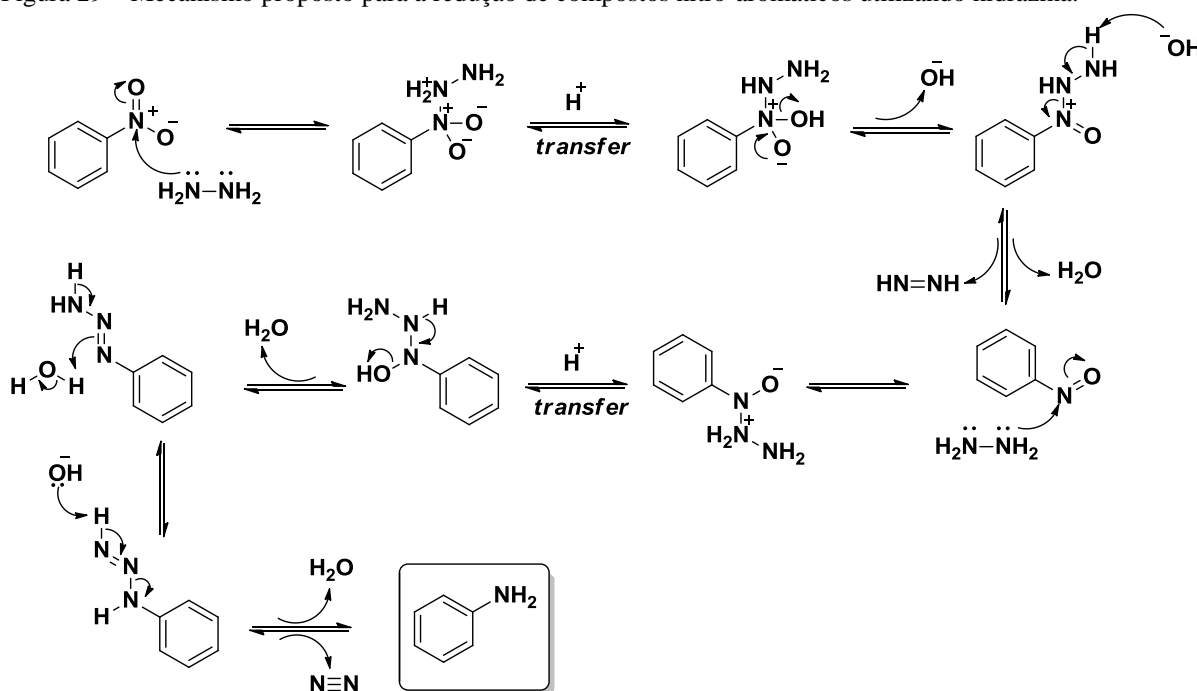
5.1.2 Obtenção do intermediário amínico **5**

O intermediário nitrado **2** foi, em seguida, submetido à reação de nitro-redução, levando ao intermediário amínico **5**. A reação de nitro-redução procedeu-se conforme descrito no trabalho de Comesaña-Gándara *et al.* (2014), utilizando hidrato de hidrazina como fonte de hidrogênio e paládio suportado em carvão ativado (Pd/C) como catalisador.

A hidrazina é uma fonte indireta de átomos de hidrogênio que se mostrou efetiva na redução de derivados nitro-aromáticos (LI; FRETT; LI, 2014). Chen *et al.* (2018) relataram altos rendimentos das reações de redução de diferentes derivados nitro-aromáticos com hidrato de hidrazina e Pd/C, principalmente quando grupos fortemente doadores de densidade eletrônica, como a hidroxila fenólica, estão concomitantemente presentes, como no caso do di-hidroeugenol nitrado. Os rendimentos obtidos durante a nitro-redução do intermediário **2** foram quantitativos, fato muito importante pois o intermediário amínico **5** constituiu-se o material de partida de diversas reações deste trabalho.

Diez-Cecilia, Kelly e Rozas (2011) propuseram um mecanismo para a reação de redução de derivados nitrobenzeno utilizando hidrazina, conforme ilustrado na Figura 29. Segundo os autores, a primeira etapa reacional envolve o ataque nucleofílico da hidrazina ao átomo de nitrogênio do grupo nitro, formando o intermediário 1-hidroxi-1-aryltriazeno-1-óxido. O ataque nucleofílico do ânion hidroxila a este intermediário resulta na formação do intermediário nitroso e consequente perda de água e diazeno. A hidrazina, em excesso na reação, promove o ataque nucleofílico ao intermediário nitroso que é convertido, após sucessivas reações, ao intermediário aril-amina primária com liberação de água e nitrogênio.

Figura 29 – Mecanismo proposto para a redução de compostos nitro-aromáticos utilizando hidrazina.



Fonte: Adaptado de DIEZ-CECILIA; KELLY; ROZAS, 2011.

Durante o monitoramento da reação de nitro-redução do intermediário **2** observou-se por meio de CCDs que na presença do catalisador Pd/C a reação prossegue rapidamente, ocorrendo instantaneamente a mudança de coloração da reação e a formação do intermediário amínico **5**. Contudo, na ausência do catalisador Pd/C a reação não prossegue de imediato, demandando mais tempo para ocorrer. Portanto, o uso do catalisador Pd/C tornou-se indispensável nesta reação e, de certa forma, estudos demonstraram que na presença do Pd/C, o hidrato de hidrazina se decompõe em hidrogênio e nitrogênio. Portanto, a geração *in situ* de gás hidrogênio na superfície do metal facilita a reação de nitro-redução (KADAMA; TILVEA, 2013). Além da verificação de mudança de Rf, a redução do intermediário nitrobenzeno **2** à respectiva aril-amina primária **5** também foi confirmada pelo aparecimento de manchas com coloração amarelo intenso após revelação da CCD com o reagente *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB). O aparecimento da mancha amarelada na CCD é decorrente da reação entre o intermediário amínico com o reagente DMAB, levando à formação do derivado imínico com característica cromogênica (YE *et al.*, 2018).

No espectro de RMN de ^1H da substância **5** (FIGURA 58), nota-se os sinais correspondentes aos hidrogênios da cadeia propílica do di-hidroeugenol, além do sinal da metoxila. É importante destacar os sinais relativos aos dois hidrogênios aromáticos do derivado amínico **5**, que aparecem como dois dupletos a aproximadamente δ 6,20 e a δ 6,25. Estes valores

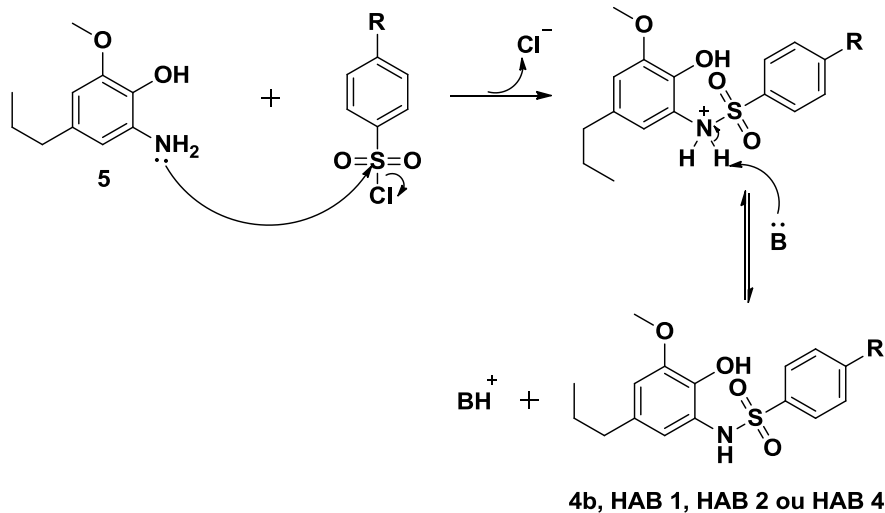
de δ são menores em relação aos espectros de RMN de ^1H do derivado nitrado **2**, devido ao efeito doador de elétrons exercido pelo grupo NH_2 , que ativa o anel aromático e, conseqüentemente, aumenta a densidade eletrônica dos prótons próximos a ele (PAVIA *et al.*, 2010). Sendo assim, o hidrogênio aromático que apresenta maior δ é o que está mais distante deste grupo, portanto aquele em posição *para* (H5) em relação ao grupo NH_2 . O hidrogênio aromático em posição *orto* absorve uma menor quantidade de radiação, devido à blindagem promovida pelo grupo doador de elétrons (NH_2).

No espectro de RMN de ^{13}C da substância **5** (FIGURA 59), pode-se observar o sinal relativo ao carbono da metoxila, bem como os sinais referentes aos carbonos da cadeia propílica. Os sinais correspondentes aos carbonos aromáticos hidrogenados são notados a aproximadamente δ 109,3 e 101,8. Tais valores de δ também são menores em comparação aos valores obtidos a partir do espectro de ^{13}C da substância nitrada **2** pelo efeito doador de elétrons exercido pelo grupo NH_2 . Dentre os carbonos aromáticos hidrogenados aquele com maior δ corresponde ao carbono mais distante do grupo NH_2 , portanto ao carbono em posição *para* (C5) em relação ao grupo ativante. Também é possível visualizar os sinais dos carbonos aromáticos conectados aos grupos OCH_3 (δ 147,0), NH_2 (δ 134,0), cadeia propílica (δ 133,8) e OH (δ 131,0). Pelos subspectros DEPT-135 do derivado amínico **5** (FIGURA 60), pode-se confirmar parte das atribuições feitas no espectro de ^{13}C desta substância.

5.1.3 Obtenção de **4b** e dos seus análogos estruturais **HAB 1 a 4**

As reações de obtenção de **4b** e dos seus análogos estruturais **HAB 1 a 4** foram conduzidas a partir da metodologia utilizada por Silva *et al.* (2015), com adaptações. O mecanismo envolve a reação de adição nucleofílica do derivado amínico **5** ao átomo de enxofre do cloreto de benzenossulfonila correspondente, seguido de eliminação do grupo abandonador, na forma de íons cloreto. A base de Lewis presente no meio, que neste caso trata-se da piridina ou trietilamina, capta um próton do nitrogênio carregado positivamente, sendo formado **4b** e os análogos estruturais **HAB 1**, **HAB 2** e **HAB 4**, ambos derivados aril-sulfonamídicos do di-hidroeuugenol (FIGURA 30).

Figura 30 – Mecanismo proposto para a reação de obtenção de **4b** e dos análogos estruturais **HAB 1**, **HAB 2** e **HAB 4** a partir do intermediário amínico **5**.

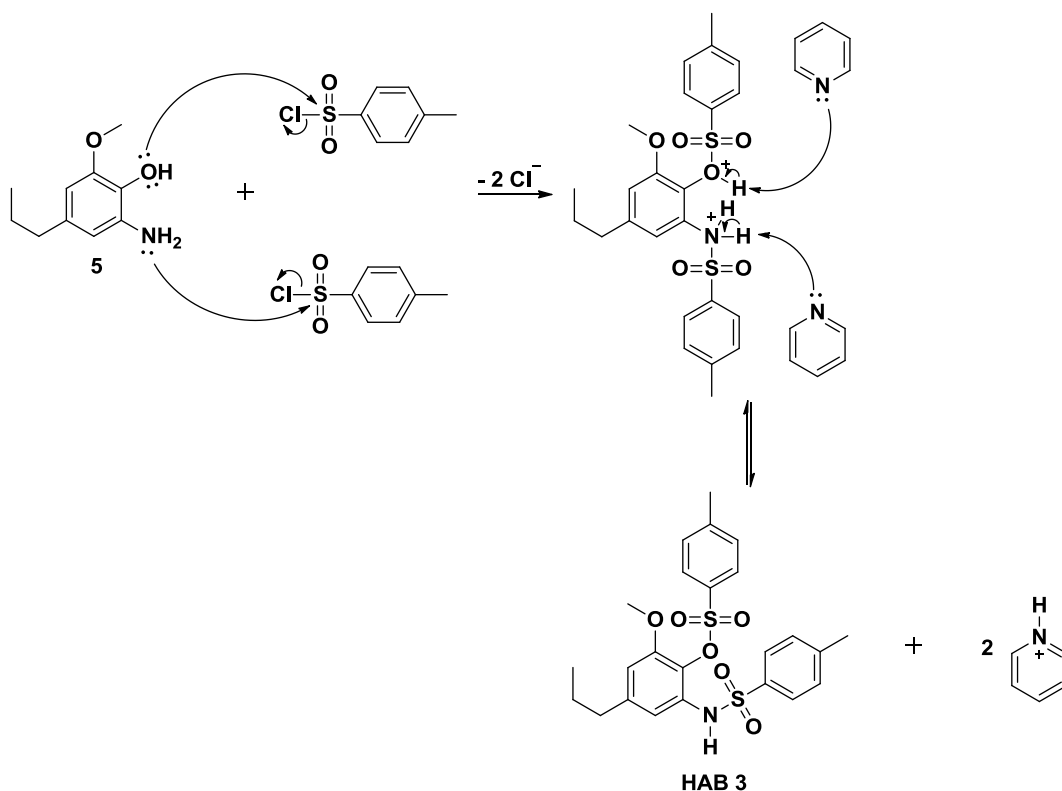


Fonte: Da autora.

Notas: **4b**: R = NHCOCH₃; **HAB 1**: R = H; **HAB 2**: R = NO₂; **HAB 4**: R = CH₃.

No caso da formação do análogo estrutural **HAB 3** houve ainda a adição de um dos pares de elétrons não ligante do oxigênio do grupo OH do derivado amínico **5** ao átomo de enxofre do cloreto de 4-metilbenzenossulfonila, em excesso na reação (FIGURA 31).

Figura 31 – Mecanismo proposto para a reação de obtenção de **HAB 3** a partir do intermediário amínico **5**.



Fonte: Da autora.

Após o término da reação tornou-se necessário a acidificação do meio reacional com ácido clorídrico concentrado, a fim de que a piridina ou trietilamina torne-se protonada e apresente afinidade pela fase aquosa durante a extração líquido-líquido, enquanto as substâncias **4b** e **HAB 1 a 4** permaneçam na fase orgânica, sendo obtidas após essa etapa. Observou-se por meio de CCDs, após a etapa de extração líquido-líquido, que houve a formação de subprodutos durante a reação, os quais não foram isolados para posterior identificação. Desse modo, os rendimentos obtidos após a etapa de purificação dessas substâncias foram inferiores aos descritos na literatura, porém foram satisfatórios com o propósito do trabalho. Tanto a substância protótipo **4b** quanto os análogos **HAB 1 a 4** tiveram suas identidades estruturais confirmadas por meio da análise de espectroscopia de absorção na região do IV, por RMN de ^1H e ^{13}C e por EM, conforme discutido a seguir.

Dos dados fornecidos pela análise de espectroscopia de absorção na região do IV de **HAB 1** (FIGURA 47), **HAB 2** (FIGURA 49), **HAB 4** (FIGURA 48) e **4b** (FIGURA 51) destacam-se as bandas correspondentes aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação S=O do grupo sulfonamida entre 1350-1313 cm^{-1} e 1170-1152 cm^{-1} , respectivamente. Observam-se também as bandas características do di-hidroeugenol, como uma banda entre 3280 e 3143 cm^{-1} (ν O-H), bandas entre 2960 e 2830 cm^{-1} (ν C-H sp^3), outras bandas a

aproximadamente 1616 e 1590 cm^{-1} (ν C=C do anel aromático) e a 1313 e 1256 cm^{-1} (ν C-O-C do grupo metoxila).

No espectro de absorção na região do IV de **HAB 2**, em 1514 e 1340 cm^{-1} , destacam-se as bandas correspondentes aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo NO_2 . Já no espectro de absorção na região do IV de **4b**, entre 3537 e 3307 cm^{-1} , nota-se a banda referente ao estiramento da ligação N-H de amida secundária, que se refere ao grupo acetamida. A banda correspondente ao estiramento da ligação C=O do grupo acetamida aparece entre 1687 e 1682 cm^{-1} .

Nos espectros de RMN de ^1H de **HAB 1** (FIGURA 61), **HAB 2** (FIGURA 63), **HAB 3** (FIGURA 64), **HAB 4** (FIGURA 62) e **4b** (FIGURA 65), notam-se os sinais dos hidrogênios da cadeia propílica. O simpleto correspondente aos hidrogênios do grupo OCH_3 aparece entre δ 3,79 e 3,44. Em aproximadamente δ 6,94, δ 6,95, δ 6,90 e δ 10,26, tem-se o simpleto referente ao hidrogênio do grupo OH de **HAB 1**, **HAB 2**, **HAB 4** e **4b**, respectivamente. Já o simpleto correspondente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo sulfonamida ($-\text{NH}\text{SO}_2$) de **HAB 1**, **HAB 2**, **HAB 3**, **HAB 4** e **4b** aparece em aproximadamente δ 5,49, δ 5,40, δ 7,50, δ 5,29 e δ 8,95, respectivamente. Este hidrogênio encontra-se na região de maior δ devido ao efeito indutivo retirador de elétrons da ligação π S=O, tornando-o mais desblindado, o que faz com que o mesmo absorva maior quantidade da radiação incidente. Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos derivados do di-hidroeugenol são observados como dois dupletos no intervalo entre δ 7,10-6,30, sendo o de menor δ correspondente ao hidrogênio mais próximo do grupo sulfonamida (H6 para **HAB 1**, **HAB 2**, **HAB 4** e **4b** e H5 para **HAB 3**). Tal fato deve-se ao efeito doador de elétrons exercido pelo grupo sulfonamida ($-\text{NH}\text{SO}_2$), pois o nitrogênio sulfonamídico encontra-se ligado ao carbono aromático (C1 para **HAB 1**, **HAB 2**, **HAB 4** e **4b** e C6 para **HAB 3**) do anel aromático derivado do di-hidroeugenol. Sendo assim, a densidade eletrônica dos prótons vizinhos a este grupo aumenta e, conseqüentemente, a capacidade destes de absorverem a radiação incidida sobre eles é reduzida, apresentando valores de deslocamento químico menores.

No espectro de RMN de ^1H de **HAB 1**, os quatro hidrogênios aromáticos das posições 2' e 3' aparecem como dois multipletos entre δ 7,80-7,76 e δ 7,41-7,35, respectivamente. Em δ 7,51-7,46 tem-se o multipletto correspondente ao hidrogênio da posição 4'. Os quatro hidrogênios aromáticos 2' e 3' de **HAB 4** são observados como dois dupletos em δ 7,66 e δ 7,17, respectivamente. Os hidrogênios aromáticos das posições 2' encontram-se na região de maior δ devido ao efeito indutivo retirador de elétrons da ligação π S=O. Neste mesmo espectro

é importante destacar o simpleto em δ 2,35, relativo aos hidrogênios do grupo metila da posição 5'.

Para **HAB 2**, os quatro hidrogênios aromáticos das posições 2' e 3' são observados como dois tripletos duplos entre δ 7,95-7,90 e δ 8,23-8,19, respectivamente. A proximidade dos hidrogênios aromáticos das posições 3' ao grupo NO₂, faz com que estes apresentem valores de δ maiores, pelo pronunciado efeito retirador de elétrons deste grupo. No espectro de RMN de ¹H de **4b**, notam-se os quatro hidrogênios aromáticos 2' e 3' como um simpleto a aproximadamente δ 7,64. Destaca-se, também neste mesmo espectro, em aproximadamente δ 2,05 o simpleto relativo aos hidrogênios do grupo metila da acetamida (-NHCOCH₃).

No espectro de RMN de ¹H de **HAB 3**, os quatro hidrogênios aromáticos das posições 8 e 9 são observados como dois tripletos duplos entre δ 7,76-7,68. Já os quatro hidrogênios aromáticos das posições 2' e 3' podem ser notados como dois dupletos duplos em δ 7,32-7,29 e δ 7,19-7,16, respectivamente. Neste caso, o grupo metila em C4' exerce efeito doador de elétrons, aumentando a densidade eletrônica dos prótons vizinhos (H3'), os quais são observados em valores de δ menores. Neste espectro também é possível destacar um simpleto em δ 2,44 e outro em δ 2,33, referente aos hidrogênios dos grupos metila (-CH₃) em C11 e C5', respectivamente.

Nos espectros de RMN de ¹³C de **HAB 1** (FIGURA 66), **HAB 2** (FIGURA 68), **HAB 3** (FIGURA 69), **HAB 4** (FIGURA 67) e **4b** (FIGURA 70), pode-se observar o sinal relativo ao carbono da metoxila, bem como os sinais referentes aos carbonos da cadeia propílica. Os sinais relativos aos carbonos aromáticos hidrogenados derivados do di-hidroeugenol são visualizados entre δ 107,0-116,0, sendo o de maior δ referente ao carbono em posição *para* (C4 para **HAB 1**, **HAB 2**, **HAB 4** e **4b** e C3 para **HAB 3**) e o de menor δ em posição *orto* (C6 para **HAB 1**, **HAB 2**, **HAB 4** e **4b** e C5 para **HAB 3**) em relação ao grupo sulfonamida. Já os sinais dos quatro carbonos aromáticos hidrogenados das posições 2' e 3' são notados a δ 128,7 e δ 127,2 (**HAB 1**), δ 123,9 e δ 128,5 (**HAB 2**), δ 128,6 e δ 127,4 (**HAB 3**), δ 129,4 e δ 127,5 (**HAB 4**), δ 127,9 e δ 118,2 (**4b**), respectivamente.

Em ambos os espectros de RMN de ¹³C também são visualizados os sinais relativos aos carbonos aromáticos conectados aos grupos OCH₃ (δ 146,1 para **HAB 1**, δ 146,2 para **HAB 2**, δ 145,7 para **HAB 3**, δ 146,1 para **HAB 4** e δ 147,8 para **4b**), sulfonamida (C1': δ 139,0 para **HAB 1**, δ 144,8 para **HAB 2**, δ 143,0 para **HAB 3**, δ 143,6 para **HAB 4** e δ 138,0 para **4b**; C1: δ 134,5 para **HAB 1**, δ 134,9 para **HAB 2**, δ 136,0 para **HAB 4**, δ 130,0 para **4b**; C6: δ 131,2 para **HAB 3**), cadeia propílica (δ 134,1 para **HAB 1**, δ 134,7 para **HAB 2**, δ 136,1 para **HAB**

3, δ 134,5 para **HAB 4** e δ 134,0 para **4b**) e OH (δ 123,4 para **HAB 1**, δ 122,1 para **HAB 2**, δ 123,5 para **HAB 4** e δ 124,2 para **4b**).

Nos espectros de RMN de ^{13}C de **HAB 1**, **HAB 2**, **HAB 4** e **4b**, destacam-se o sinal do carbono aromático da posição 4' a δ 132,8 (hidrogenado), δ 134,0 (conectado ao grupo metila), δ 150,1 (conectado ao grupo NO_2) e δ 143,0 (conectado ao grupo acetamida), respectivamente. Para **HAB 4** é importante destacar também o sinal do carbono metila da posição 5' em δ 21,6. Destaca-se ainda, nos espectros de RMN de ^{13}C de **4b**, em δ 169,5 o sinal referente ao carbono carbonílico e em δ 24,2 o sinal correspondente ao carbono do grupo metila da acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$). Já no espectro de RMN de ^{13}C de **HAB 3**, pode-se observar em δ 151,9 e δ 143,8 o sinal correspondente aos carbonos aromáticos conectados ao grupo sulfonato (C1 e C7), respectivamente. Neste espectro ainda é possível notar a δ 21,7 e a δ 21,5, o sinal referente aos carbonos do grupo metila das posições C11 e C5', respectivamente.

As atribuições feitas em ambos os espectros de ^{13}C dos análogos **HAB 1 a 4** e **4b** foram confirmadas por meio da análise dos subespectros DEPT-135 destas substâncias. Da mesma forma, os espectros obtidos a partir das análises de EM de **HAB 1** (FIGURA 94), **HAB 2** (FIGURA 96), **HAB 3** (FIGURA 98), **HAB 4** (FIGURA 95) e **4b** (FIGURA 99) forneceram diretamente as massas moleculares dessas substâncias.

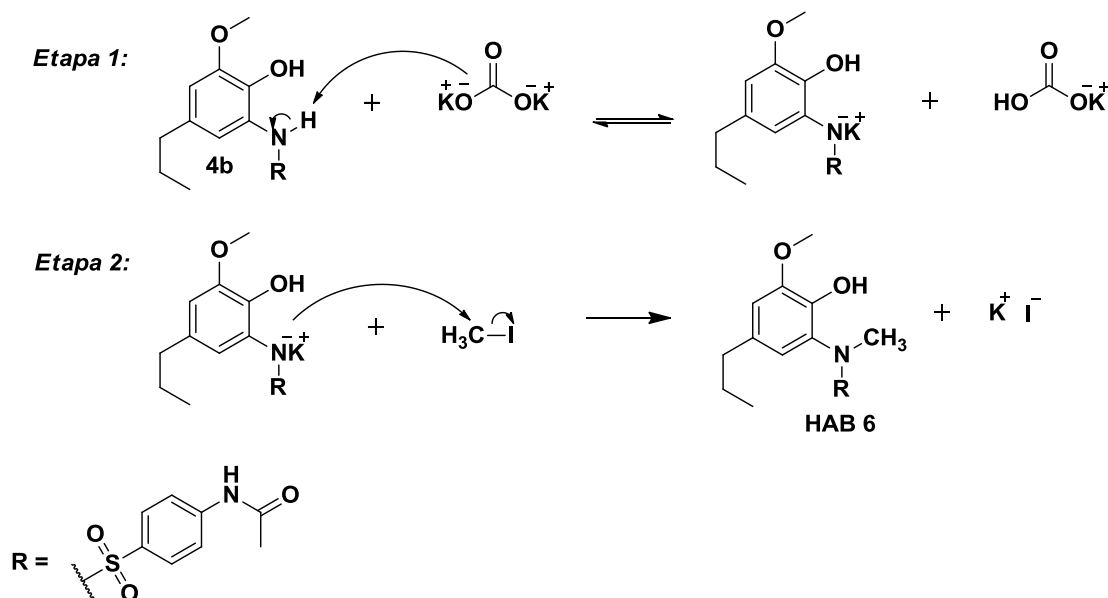
5.1.4 Obtenção do análogo estrutural **HAB 6**

Inicialmente pretendia-se, com a reação de *O*-metilação, a obtenção do análogo estrutural di-metoxilado. Contudo, ao final da reação de acoplamento entre o intermediário amínico di-metoxilado com o cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila comercial observou-se por meio de CCD vários subprodutos, indicando possivelmente degradação do intermediário amínico ao longo da reação, já que esta demandava grande tempo para ocorrer. Diante destas limitações, decidiu-se proceder a reação de metilação a partir de **4b**, todavia, a metilação ocorreu no nitrogênio sulfonamídico ao invés da hidroxila fenólica, obtendo-se **HAB 6**. O rendimento obtido foi inferior ao esperado, porém foi satisfatório e permitiu a continuidade do trabalho.

A metodologia empregada foi descrita por Coolen, Meeuwis e van Leeuwen (1995), sendo uma forma clássica para obtenção de derivados metilados. Trata-se de uma reação de Substituição Nucleofílica Bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$), pois primeiramente ocorre a desprotonação do nitrogênio do grupo sulfonamida pela base presente no meio, o carbonato de potássio, auxiliado pelo solvente polar aprótico presente. O ânion formado promove um ataque nucleofílico ao

iodeto de metila, seguido de heterólise da ligação entre carbono e iodo, liberando iodeto, um bom grupo abandonador (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012). Na Figura 32 encontra-se ilustrado o mecanismo proposto para esta reação.

Figura 32 – Mecanismo de reação de *N*-metilação proposto para a obtenção de **HAB 6** a partir do derivado aril-sulfonamídico **4b**.



Fonte: Da autora.

Dos dados fornecidos pela análise de espectroscopia de absorção na região do IV da substância **HAB 6** (FIGURA 52) destacam-se as bandas correspondentes aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação S=O do grupo sulfonamida entre 1346 e 1161 cm^{-1} , respectivamente. Observam-se também as bandas características da substância precursora, como uma banda em 3427 cm^{-1} (ν O-H), bandas entre 2966 e 2863 cm^{-1} (ν C-H sp^3) e bandas a aproximadamente 1589 cm^{-1} (ν C=C do anel aromático). Em 3514 cm^{-1} tem-se a banda referente ao estiramento da ligação N-H de amida secundária, referente ao grupo acetamida. A banda correspondente ao estiramento da ligação C=O do grupo acetamida aparece em aproximadamente 1676 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^1H de **HAB 6** (FIGURA 76) nota-se os sinais correspondentes aos hidrogênios da cadeia propílica, assim como o da metoxila. É possível observar também dois dupletos em δ 6,61 e 6,22, referentes aos hidrogênios aromáticos das posições 6 e 4, respectivamente. Em δ 7,61 tem-se um simpleto relativo aos quatro hidrogênios aromáticos das posições 2' e 3', e em δ 7,80 e aproximadamente δ 6,00, os simpletos alargados correspondentes aos hidrogênios do grupo OH e ao conectado ao nitrogênio do grupo acetamida (-NHCOCH₃).

É importante destacar também a δ 2,19 e a δ 3,15, os sinais dos simpletos correspondentes aos hidrogênios dos grupos metila da acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) e da sulfonamida ($-\text{NCH}_2\text{SO}_2-$).

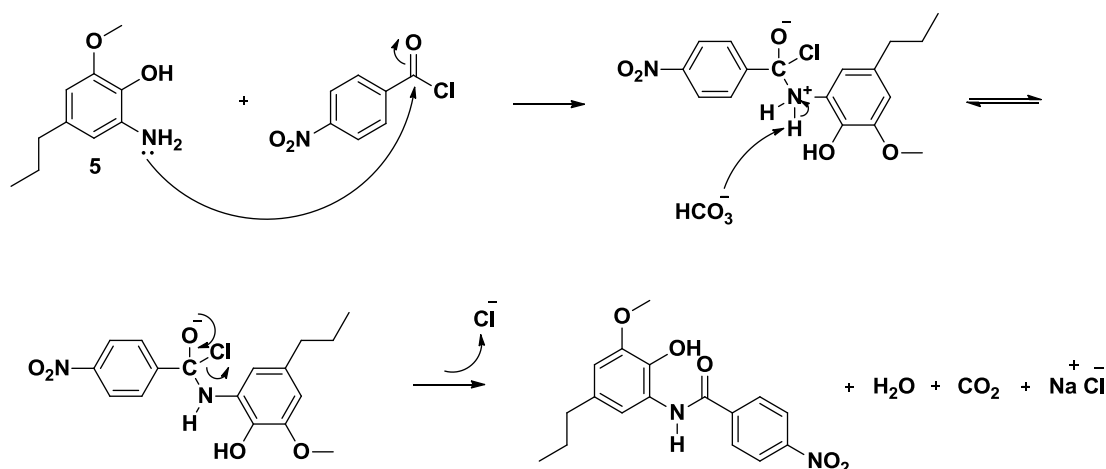
No espectro de RMN de ^{13}C de **HAB 6** (FIGURA 77) destaca-se o sinal da metila do grupo sulfonamida em δ 38,4. Assim como, é importante destacar também o sinal da carbonila do grupo acetamida em δ 168,8 e da metila do grupo acetamida em δ 24,6. Os valores de deslocamento químico para estes últimos grupos são equivalentes aos encontrados para a substância precursora **4b**, confirmando que a reação de *N*-metilação ocorreu no nitrogênio sulfonamídico ao invés do nitrogênio do grupo acetamida. No subespectro DEPT-135, notam-se os sinais dos carbonos hidrogenados provenientes da substância precursora **4b**. Já o espectro obtido a partir da análise de EM forneceu diretamente a massa molecular de **HAB 6** (FIGURA 101).

5.1.5 Obtenção do análogo estrutural HAB 9

O análogo estrutural **HAB 9** foi obtido em três etapas. A primeira envolveu a obtenção da amida a partir da reação entre o intermediário amínico **5** com o cloreto de 4-nitrobenzoíla comercial, na presença de bicarbonato de sódio (SENER *et al.*, 2000). As reações de acilação empregando cloretos de acila ocorrem à temperatura ambiente ou em baixas temperaturas, apresentando altos rendimentos. Isto se deve ao fato de que os cloretos de acila são mais reativos que os anidridos de ácidos, ésteres ou ácidos carboxílicos, pois o átomo de cloro exerce efeito retirador de elétrons, o que aumenta a eletrofilicidade do carbono carbonílico, permitindo que este reaja facilmente mesmo na presença de fracos nucleófilos (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

As aminas reagem com os cloretos de acila por meio da reação de Adição-Eliminação Nucleofílica em Carbono Carbonílico. Durante a reação, o par de elétrons não ligante do nitrogênio do grupo NH_2 (nucleófilo) é adicionado ao carbono carbonílico do cloreto de 4-nitrobenzoíla (eletrófilo); a ligação π $\text{C}=\text{O}$ é deslocada para o átomo de oxigênio como um par de elétrons, sendo formado o intermediário tetraédrico. Em seguida, há a abstração, pelo ânion bicarbonato, de um dos átomos de hidrogênio ligados ao átomo de nitrogênio; o par de elétrons não ligante do oxigênio retorna como uma ligação π $\text{C}=\text{O}$ e, então, há a eliminação do grupo abandonador na forma de íon cloreto. Dessa forma, o ânion bicarbonato atua como base de Lewis e neutraliza o HCl liberado durante a reação (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012). Na Figura 33 encontra-se ilustrado o mecanismo proposto para a obtenção do intermediário amídico. Os rendimentos obtidos para esta reação foram superiores a 80 %.

Figura 33 – Mecanismo proposto para a reação do intermediário **5** com o cloreto de 4-nitrobenzoíla para obtenção do intermediário amídico.

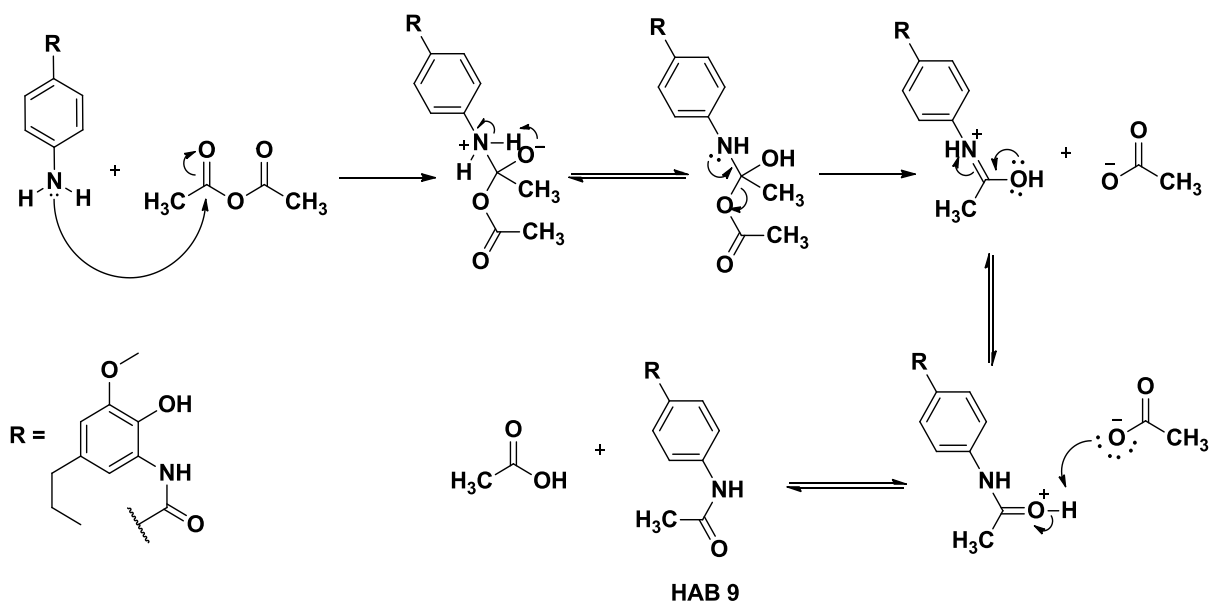


Fonte: Da autora.

As duas próximas etapas incluem a redução do grupo NO_2 a NH_2 , e posterior acetilação deste. A Hidrogenação Catalítica foi escolhida para a reação de nitro-redução, devido sua simplicidade e altos rendimentos. O primeiro passo nesta reação é a absorção química de hidrogênio na superfície do metal, neste caso o paládio suportado em carvão ativado, resultando na quebra da ligação H-H e liberação de átomos de hidrogênio que então reagem com o grupo nitro, reduzindo-o a amina primária (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Em seguida, a aril-amina primária foi convertida a acetamida pela reação de Adição-Eliminação Nucleofílica em Carbono Carbonílico. Durante a reação, o par de elétrons não ligante do nitrogênio do grupo NH_2 (nucleófilo) é adicionado a um dos carbonos carbonílicos do anidrido acético (eletrófilo); a ligação $\pi \text{C}=\text{O}$ é deslocada para o átomo de oxigênio como um par de elétrons, sendo formado o intermediário tetraédrico. Em seguida, há a abstração, pelo par de elétrons do oxigênio carregado negativamente, de um dos átomos de hidrogênio ligados ao átomo de nitrogênio; o par de elétrons não ligante do nitrogênio retorna como uma ligação $\pi \text{C}=\text{N}$ e, então, há a eliminação do grupo abandonador como íon acetato. Ocorre um rearranjo intramolecular e a acepção de um átomo de hidrogênio pelo íon acetato, formando ácido acético e, finalmente, **HAB 9** (GREENE; WUTS, 2007; NAIK *et al.*, 2004; SMITH; EL-HITI, 2004). O mecanismo proposto para esta reação encontra-se ilustrado na Figura 34.

Figura 34 – Mecanismo de reação proposto para a obtenção de **HAB 9** a partir do intermediário amínico.



Fonte: Da autora.

Dos dados fornecidos pela análise de espectroscopia de absorção na região do IV de **HAB 9** (FIGURA 50), destacam-se as bandas correspondentes aos estiramentos da ligação N-H de amidas entre $3375\text{-}3248\text{ cm}^{-1}$ e da ligação C=O em 1679 e 1637 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^1H de **HAB 9** (FIGURA 79), observa-se os sinais correspondentes aos hidrogênios da cadeia propílica e da metoxila. Os hidrogênios aromáticos das posições 6 e 4 são visualizados como dupletos em $\delta 6,65$ e $\delta 7,10$, respectivamente. Tal fato deve-se ao efeito doador de elétrons do nitrogênio amídico que se encontra conectado diretamente ao anel aromático derivado do di-hidroeugenol, fazendo com que a densidade eletrônica dos prótons vizinhos a este grupo aumente e, conseqüentemente, diminua a capacidade destes de absorverem a radiação incidida, apresentando valores de deslocamento químico menores. Já os quatro hidrogênios aromáticos das posições 2' e 3' aparecem como duplos dupletos entre $\delta 7,92$ e $7,69$. Em $\delta 10,26$, $\delta 9,47$ e $\delta 8,88$ encontram-se os simpletos referentes aos hidrogênios conectados ao fenol (OH), amida (NHCO) e acetamida (NHCOCH₃), respectivamente. Em $\delta 2,08$ tem-se o simpleto relativo aos hidrogênios do grupo metila da acetamida (NHCOCH₃).

No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 80), destacam-se os sinais dos carbonos carbonílicos dos grupos amida e acetamida em $\delta 174,1$ e $\delta 169,9$, respectivamente. Em $\delta 153,4$, $\delta 147,6$, $\delta 141,7$, $\delta 137,6$, $\delta 133,5$ e $\delta 131,3$ são visualizados os sinais dos carbonos conectados aos grupos metoxila (C3), amida (C1), acetamida (C4'), fenol (C2), carbonila da amida (C1') e a cadeia propílica (C5). Os sinais dos carbonos aromáticos hidrogenados derivados do di-

hidroeugenol encontram-se em δ 121,0 (C4) e δ 114,1 (C6), e os sinais dos quatro carbonos aromáticos hidrogenados das posições 2' e 3' situam-se em δ 133,7 e δ 123,4, respectivamente. Notam-se em δ 61,0 o sinal do carbono da metoxila e em δ 29,5 o sinal do carbono metila da acetamida.

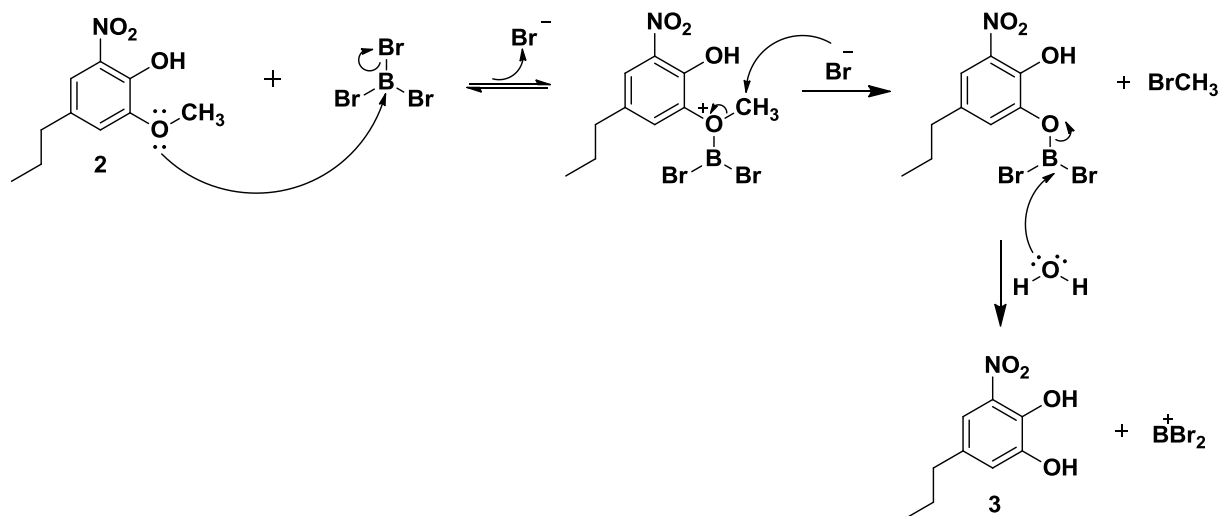
Pelo subspectro DEPT-135 desta substância pode-se confirmar parte das atribuições feitas no espectro de RMN de ^{13}C , destacando-se os sinais dos carbonos metilênicos e metila da cadeia propílica em δ 42,3 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), δ 29,4 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$) e δ 18,9 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), respectivamente. Assim como, o espectro obtido a partir da análise de EM forneceu diretamente a massa molecular de **HAB 9** (FIGURA 97).

5.1.6 Obtenção do intermediário di-hidroxilado 3

O intermediário nitrado di-hidroxilado **3** foi obtido por meio da reação de *O*-desmetilação do intermediário nitrado **2**, utilizando o reagente dimetilssulfeto de tribrometo de boro ($\text{BBr}_3 \cdot \text{S}(\text{CH}_3)_2$) em diclorometano anidro. O átomo de boro presente no centro de sua estrutura química confere alta reatividade como um ácido de Lewis. Portanto, o BBr_3 é um reagente bastante versátil e de primeira escolha para reações envolvendo a clivagem de éteres, principalmente aril-etil-éteres (KOSAK *et al.*, 2015).

A reação de *O*-desmetilação inicia-se pelo ataque nucleofílico do par de elétrons não ligante do oxigênio da metoxila ao átomo de boro, seguido pela formação de um intermediário catiônico e a eliminação de um íon brometo. O brometo livre promove o ataque nucleofílico ao carbono metila do intermediário catiônico, clivando a ligação C-O. Este novo produto formado sofrerá hidrólise, após a adição de água ao meio reacional, clivando a ligação entre o átomo de boro e oxigênio, levando ao produto **3** de interesse (SOUSA; SILVA, 2013). O mecanismo de reação de *O*-desmetilação proposto para a obtenção do intermediário **3** encontra-se ilustrado na Figura 35.

Figura 35 – Mecanismo proposto da reação de *O*-desmetilação para a obtenção do intermediário **3**.



Fonte: Da autora.

No espectro de RMN de ^1H da substância **3** (FIGURA 81), destaca-se os simplesos referentes aos hidrogênios dos grupos OH em δ 10,48 e δ 5,87. São observados também os sinais correspondentes aos dois hidrogênios aromáticos e aos hidrogênios da cadeia propílica. É importante enfatizar a ausência do simpleto relativo aos hidrogênios da metoxila, que apareceria em aproximadamente δ 3,90, confirmando o sucesso da reação de *O*-desmetilação.

No espectro de RMN de ^{13}C desta substância (FIGURA 82), notam-se os sinais dos carbonos hidrogenados aromáticos e dos carbonos alquílicos da cadeia propílica. Em δ 141,0 e δ 134,7 tem-se os sinais dos carbonos conectados aos grupos OH. Destaca-se também a ausência do sinal do carbono da metoxila que apareceria em aproximadamente δ 56,7. Pelo subespectro DEPT-135 pode-se confirmar parte das atribuições feitas no espectro de RMN de ^{13}C .

5.1.6.1 Obtenção do intermediário amínico di-hidroxilado **4**

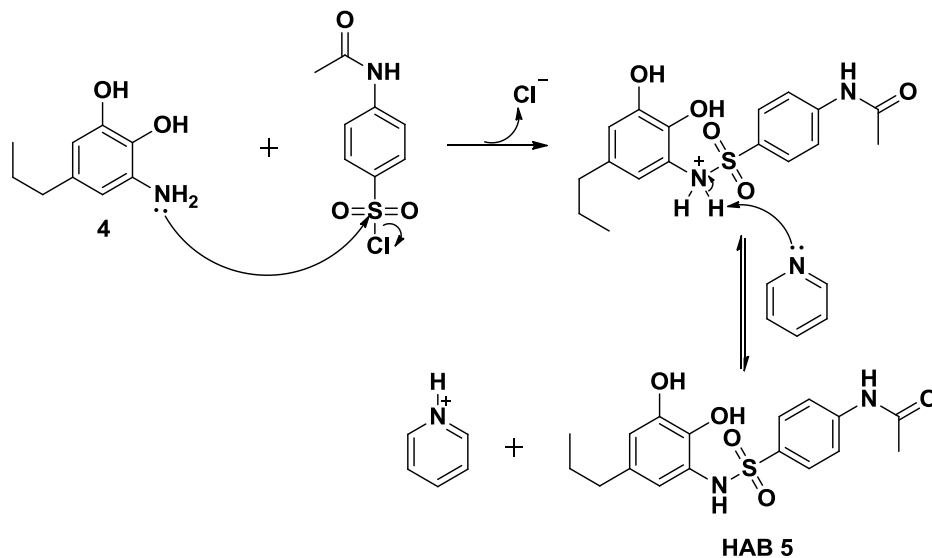
O intermediário nitrado di-hidroxilado **3** foi, em seguida, submetido à reação de nitro-redução utilizando hidrato de hidrazina como fonte de hidrogênio e paládio suportado em carvão ativado (Pd/C) como catalisador, levando ao intermediário amínico di-hidroxilado **4** (COMESAÑA-GÁNDARA *et al.*, 2014), conforme mecanismo de reação discutido anteriormente para a redução do intermediário **2**. Neste caso, notou-se que a reação de nitro-redução de **3** demandou mais tempo para ocorrer e foi observado por meio de CCD que parte do material de partida não reagia ao longo da reação, ocasionado baixo rendimento reacional.

Devido a instabilidade desta substância em temperatura ambiente, a formação do intermediário amínico **4** foi confirmada por meio da mudança de R_f vista em CCD associada com revelação química com o reagente DMAB, no qual a mancha correspondente ao intermediário amínico **4** tornou-se amarelada.

5.1.6.2 Obtenção do análogo estrutural **HAB 5**

O análogo estrutural **HAB 5** foi obtido a partir da reação entre o intermediário amínico di-hidroxilado **4** e o cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila em piridina (SILVA *et al.*, 2015). A obtenção de **HAB 5** ocorre por meio de uma reação de adição nucleofílica do derivado amínico di-hidroxilado **4** ao átomo de enxofre do cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila, seguido de eliminação do grupo abandonador, na forma de íons cloreto. A base de Lewis presente no meio, que neste caso trata-se da piridina, capta um próton do nitrogênio carregado positivamente, sendo formado o produto de interesse (FIGURA 36).

Figura 36 – Mecanismo proposto para a reação de obtenção de **HAB 5** a partir do intermediário amínico di-hidroxilado **4**.



Fonte: Da autora.

Após o término da reação tornou-se necessário a acidificação do meio reacional com ácido clorídrico concentrado, a fim de que a piridina se torne protonada e apresente afinidade pela fase aquosa durante a extração líquido-líquido, enquanto a substância **HAB 5** permaneça na fase orgânica, sendo obtida após a etapa de extração. Observou-se por meio de CCD, após a etapa de extração líquido-líquido, que houve a formação de subprodutos durante a reação, os

quais não foram isolados para posterior identificação. Desse modo, o rendimento obtido após a etapa de purificação foi inferior ao que é descrito na literatura, porém foi satisfatório com o propósito do trabalho. **HAB 5** teve sua identidade estrutural confirmada por meio da análise de espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e por EM, conforme discutido a seguir.

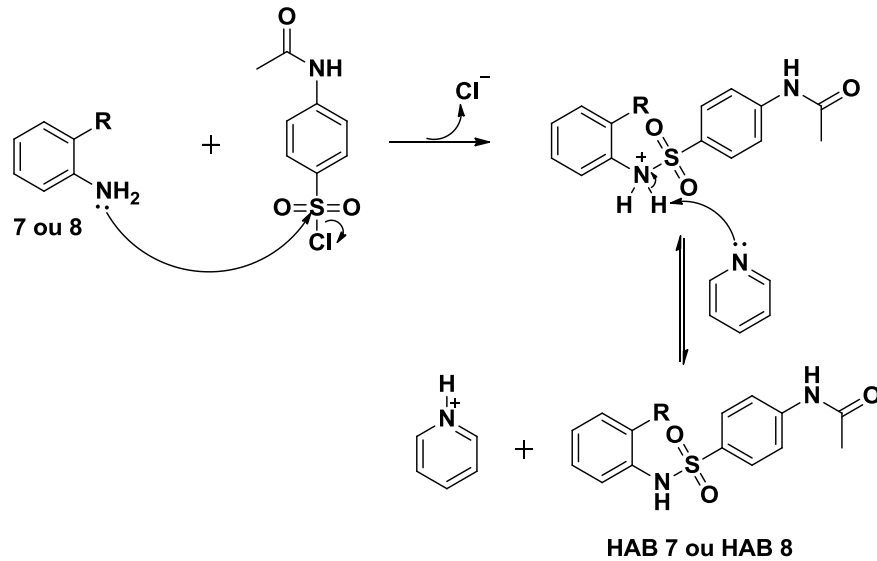
No espectro de RMN de ^1H de **HAB 5** (FIGURA 83), destaca-se os simpletos relativos aos hidrogênios dos grupos OH em δ 10,27 e δ 9,11, bem como dos grupos sulfonamida em δ 8,85 ($\text{NH}\underline{\text{S}}\text{O}_2$) e acetamida em δ 8,29 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$). Notam-se também os dupletos referentes aos hidrogênios aromáticos das posições 4 e 6 em δ 6,39 e δ 6,35, respectivamente. Já os quatro hidrogênios aromáticos das posições 2' e 3' são visualizados como um simpleto em δ 7,65, assim como os hidrogênios da metila da acetamida em δ 2,06 ($\text{NH}\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$). Podem-se observar também os sinais relativos aos hidrogênios da cadeia propílica.

No espectro de RMN de ^{13}C dessa substância (FIGURA 84), destacam-se os sinais do carbono carbonílico em δ 169,5 e dos carbonos conectados aos grupos OH em δ 145,7 (C3) e δ 124,0 (C2), bem como dos carbonos conectados aos grupos sulfonamida e acetamida em δ 134,3 (C1), 136,7 (C1') e 143,4 (C4'), respectivamente. São visualizados também os sinais dos carbonos aromáticos hidrogenados e dos carbonos alquílicos da cadeia propílica. A δ 24,6 tem-se o sinal do carbono metila da acetamida (C6'). Pelo supespectro DEPT-135 pode-se confirmar parte das atribuições feitas no espectro de ^{13}C , destacando-se os sinais dos carbonos metilênicos em δ 37,1 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -) e δ 24,5 ($\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2$). Assim como, o espectro obtido a partir da análise de EM forneceu diretamente a massa molecular de **HAB 5** (FIGURA 100).

5.1.7 Obtenção dos análogos estruturais **HAB 7** e **HAB 8**

A reação de obtenção dos análogos estruturais **HAB 7** e **HAB 8** também ocorre por meio de uma reação de adição nucleofílica do intermediário amínico **7** ou da anilina (**8**) ao átomo de enxofre do cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila, seguido de eliminação do grupo abandonador, na forma de íons cloreto. A base de Lewis presente no meio, que neste caso trata-se da piridina ou trietilamina, capta um próton do nitrogênio carregado positivamente, sendo formados os análogos **HAB 7** e **HAB 8** (FIGURA 37).

Figura 37 – Mecanismo proposto para a reação de obtenção de **HAB 7** e **HAB 8** a partir dos intermediários amínicos **7** ou **8**, respectivamente.



Fonte: Da autora.

Notas: **7** e **HAB 7**: R = OH; **8** e **HAB 8**: R = H.

Após o término da reação tornou-se necessário a acidificação do meio reacional com ácido clorídrico concentrado, a fim de que a piridina se torne protonada e apresente afinidade pela fase aquosa durante a extração líquido-líquido, enquanto as substâncias **HAB 7** e **HAB 8** permaneçam na fase orgânica, sendo obtidas após a etapa de extração. Observou-se por meio de CCDs, após a etapa de extração líquido-líquido, que houve a formação de subprodutos durante a reação, os quais não foram isolados para posterior identificação. Desse modo, os rendimentos obtidos após a etapa de purificação dessas substâncias foram inferiores aos descritos na literatura, porém foram satisfatórios com o propósito do trabalho. **HAB 7** e **HAB 8** tiveram suas identidades estruturais confirmadas por meio da análise de espectroscopia de absorção na região do IV, por RMN de ^1H e ^{13}C e por EM, conforme discutido a seguir.

Dos dados fornecidos pela análise de espectroscopia de absorção na região do IV das substâncias **HAB 7** (FIGURA 51) e **HAB 8** (FIGURA 52) destacam-se as bandas correspondentes aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação S=O do grupo sulfonamida entre $1357\text{-}1331\text{ cm}^{-1}$ e $1178\text{-}1162\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Observam-se também as bandas características das substâncias precursoras, como uma banda entre 3300 cm^{-1} (ν O-H), bandas entre 3113 e 3048 cm^{-1} (ν C-H sp^2), outras bandas a aproximadamente 1620 e 1590 cm^{-1} (ν C=C do anel aromático). Entre 3490 e 3236 cm^{-1} tem-se a banda referente ao estiramento da ligação N-H de amida secundária, referente ao grupo acetamida. A banda correspondente ao estiramento da ligação C=O do grupo acetamida aparece em aproximadamente 1670 cm^{-1} .

Nos espectros de RMN de ^1H destes dois análogos estruturais (FIGURAS 86 e 89) é possível observar os sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos derivados do cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila entre δ 7,84-7,68 e dos hidrogênios aromáticos derivados dos intermediários amínicos entre δ 6,93-6,45. Em aproximadamente δ 2,06 tem-se o simpleto relativo aos hidrogênios do grupo metila da acetamida.

Nos espectros de RMN de ^{13}C destas substâncias (FIGURAS 87 e 90) destacam-se o sinal do carbono carbonílico entre δ 174,9-169,6 e dos carbonos aromáticos conectados aos grupos acetamida e sulfonamida entre δ 150,3-143,6 (C4') e δ 140,9-138,4 (C1'), respectivamente. O sinal do carbono metila do grupo acetamida encontra-se entre δ 29,8-24,6. Pelos subspectros DEPT-135 destas substâncias foi possível confirmar parte das atribuições feitas nas análises dos espectros de ^{13}C . Assim como, os espectros obtidos a partir das análises de EM forneceram diretamente as massas moleculares de **HAB 7** (FIGURA 102) e **HAB 8** (FIGURA 103).

5.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO *IN VITRO*

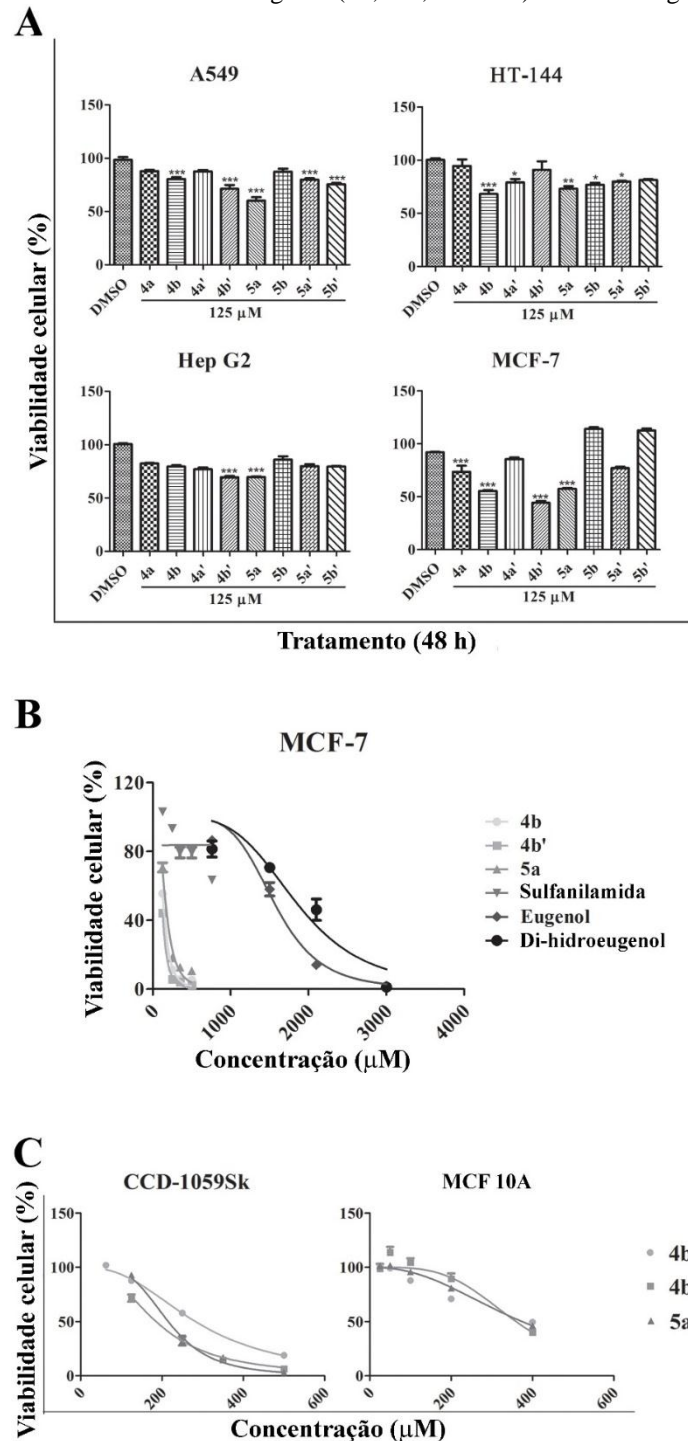
Culturas de A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), HT-144 (melanoma metastático humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) foram tratadas com a série inédita de oito derivados sulfonamídicos do eugenol e di-hidroeugenol obtidos por meio da técnica de hibridação molecular, conforme estruturas químicas ilustradas na Figura 26, página 58 (AZEVEDO-BARBOSA *et al.*, 2019). Em um estudo piloto os híbridos fenilpropanoide-sulfonamida **4b**, **4b'** e **5a** apresentaram efeito promissor frente à redução das taxas de viabilidade de culturas de MCF-7 quando utilizados na concentração de 125,0 μM por 48 h.

5.2.1 Efeitos do tratamento com os derivados aril-sulfonamídicos frente à viabilidade de linhagens celulares tumorais humanas.

Os derivados **4b**, **4b'** e **5a** foram os mais efetivos em reduzir a viabilidade das culturas de MCF-7 no estudo prévio (Figura 38A). Os valores de CI_{50} foram determinados por ensaio colorimétrico após tratamento por 48 h com os derivados e seus precursores (TABELA 2 e FIGURA 38B) e por meio da comparação dos valores obtidos foi possível observar que o efeito dos derivados **4b**, **4b'** e **5a** sobre a redução da viabilidade de culturas de MCF-7 mostrou-se,

em média, 10 vezes mais promissor que de seus precursores isolados (eugenol, di-hidroeuogenol e sulfanilamida).

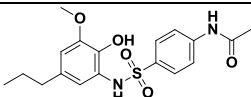
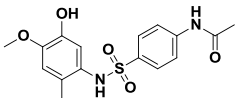
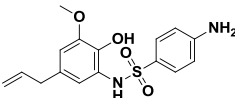
Figura 38 – Viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico Resazurina após 48 h de tratamento com os derivados aril-sulfonamídicos do eugenol (**4a**, **4a'**, **5a** e **5a'**) e di-hidroeuogenol (**4b**, **4b'**, **5b** e **5b'**).



Fonte: Da autora.

Notas: Viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico Resazurina após 48 h de tratamento com os derivados sulfonamídicos do eugenol e di-hidroeuogenol. (A) Inicialmente foi realizado o *screening* das substâncias utilizadas na concentração de 125 μM frente às linhagens A549, HT-144, HepG2 e MCF-7. (B) Culturas de MCF-7 foram tratadas com os derivados mais promissores **4b**, **4b'** e **5a** e seus precursores (eugenol, di-hidroeuogenol e sulfanilamida) nas concentrações de 31,25; 62,50; 125; 250 e 500 μM . (C) O perfil de citotoxicidade dos derivados foi investigado frente às linhagens normais CCD-1059Sk e MCF 10A. Foi realizada análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey onde *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ equivalem às diferenças em relação ao grupo controle.

Tabela 2 – Valores de CI_{50} (μM) determinados após tratamento por 48 h com os derivados aril-sulfonamídicos **4b**, **4b'** e **5a** e com seus precursores (eugenol, di-hidroeuogenol e sulfanilamida).

Substâncias	$CI_{50} \pm$ Desvio Padrão (μM)			IS
	MCF-7	CCD-1059Sk	MCF 10A	
 4b	133,80 \pm 2,36	282,80 \pm 5,11	> 300,00	2,11
 4b'	116,60 \pm 1,83	185,90 \pm 5,04	> 300,00	1,59
 5a	164,90 \pm 6,13	215,80 \pm 6,79	> 300,00	1,31
Eugenol	> 1500,00	-	-	-
Di-hidroeuogenol	> 1500,00	-	-	-
Sulfanilamida	> 1000,00	-	-	-

Fonte: Da autora.

Notas: Índice de Seletividade (IS): dado pela razão entre $CI_{50}CCD-1059Sk/CI_{50}MCF-7$.

Diante dos resultados apresentados pode-se observar que os efeitos dos derivados **4b**, **4b'** e **5a** frente à redução da viabilidade celular de culturas de MCF-7 parecem relacionar-se com a presença da cadeia lateral propílica e com o grupo acetamida, pois os derivados **4b** e **4b'** foram mais ativos que os análogos derivados do eugenol (**4a** e **4a'**) que apresentam a cadeia lateral alílica, bem como os derivados **5b** e **5b'** que apresentam o grupo aril-amina primária. A posição *orto* do grupo sulfonamida em relação à hidroxila fenólica também contribuiu com a atividade biológica observada, pois os análogos que apresentam o grupo sulfonamida em posição *meta* em relação à hidroxila fenólica, como **4a'**, **4b'**, **5a'** e **5b'** foram menos ativos.

Posteriormente o perfil de citotoxicidade dos derivados **4b**, **4b'** e **5a** frente células normais foi avaliado. Nesta fase do estudo foram utilizadas as linhagens CCD-1059Sk (fibroblastos de pele humana) e MCF 10A (células epiteliais de mama humana). Os resultados mostraram que os análogos **4b**, **4b'** e **5a** apresentaram maior seletividade para a célula tumoral quando comparados à célula normal. O tratamento com **4b** mostrou-se menos citotóxico com índice de seletividade (IS) de 2,11 (TABELA 2 e FIGURA 38C). Vale ressaltar que o IS constitui um bom indicativo do potencial uso das substâncias testadas em ensaios *in vivo*. Índices maiores que dois indicam boa seletividade (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). Diante destes resultados, **4b** foi selecionada para ensaios subsequentes que visaram caracterizar o

potencial antiproliferativo e/ou citotóxico do tratamento com esta substância frente culturas de células MCF-7.

5.2.1.1 Efeitos do tratamento com **4b** sobre o comportamento proliferativo de culturas de células MCF-7

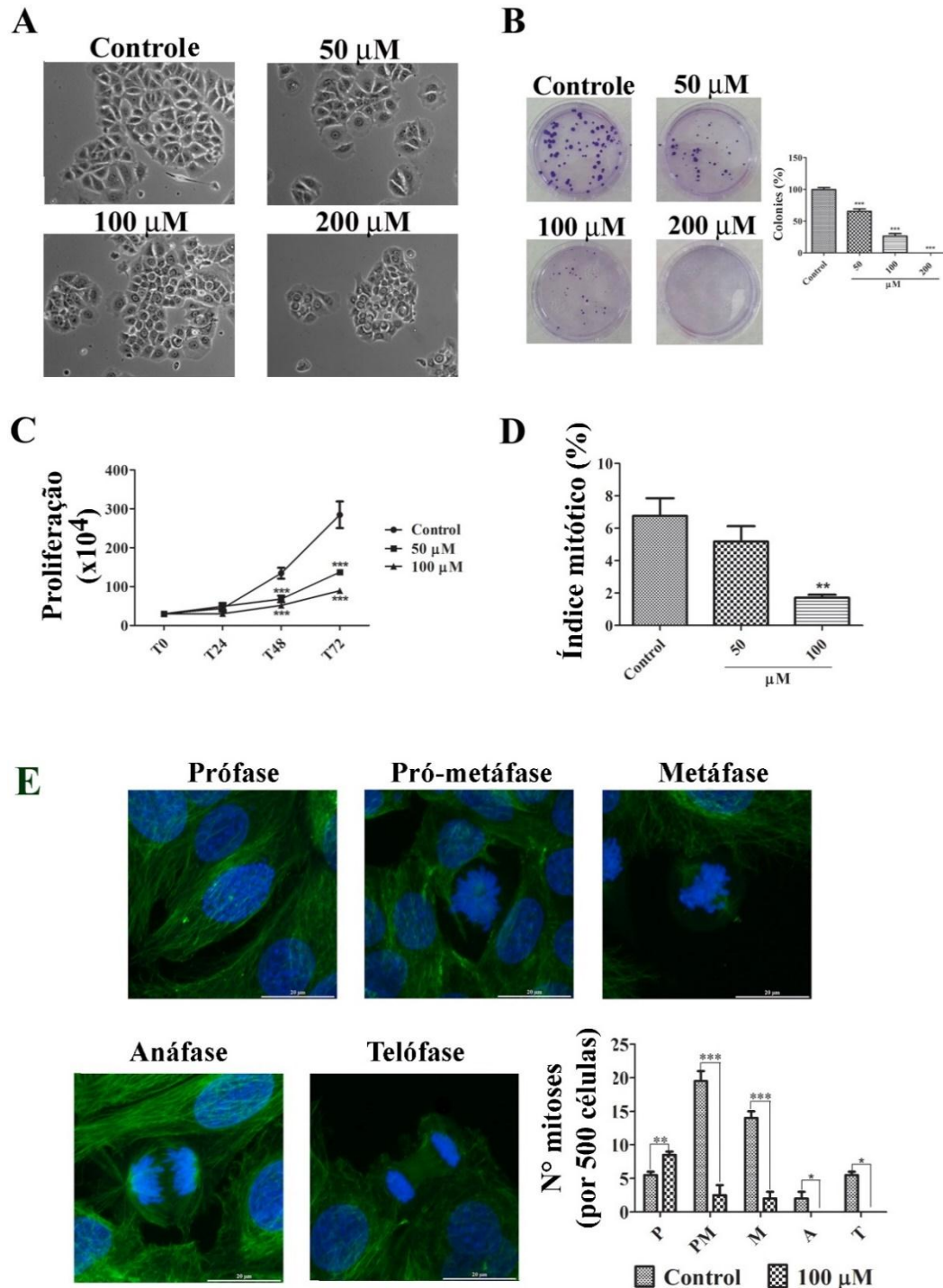
Culturas de MCF-7 foram tratadas com **4b** nas concentrações de 50, 100 e 200 μM e alterações na morfologia foram observadas em culturas de MCF-7 tratadas com **4b** por 48 h. Nas culturas tratadas com **4b** à 50 μM , as células parecem maiores e possuem grande quantidade de grânulos no citoplasma. Nas culturas tratadas com **4b** à 100 e 200 μM foi observado aumento da frequência de células pequenas e arredondadas, indicando efeito citotóxico e perda de adesão ao substrato, eventos característicos de células em processo de morte celular. Além disso, foi possível observar redução da densidade celular em todas as amostras tratadas em comparação às culturas controles (FIGURA 39A).

Com intuito de investigar o efeito de **4b** sobre a proliferação de células MCF-7 por períodos prolongados, as culturas foram tratadas com 50, 100 e 200 μM e submetidas ao ensaio de capacidade clonogênica. Os resultados mostraram que o tratamento com **4b** reduziu a capacidade de formação de colônias em 34 e 74 % quando as culturas foram tratadas com 50 e 100 μM , respectivamente. O tratamento com **4b** à 200 μM foi ainda mais tóxico e inibiu a capacidade clonogênica de células MCF-7, considerando que não foi observado o crescimento de colônias com mais de 50 células (FIGURA 39B).

Por meio do ensaio de exclusão com azul de *Trypan* foi possível observar redução das taxas de proliferação após 48 e 72 h das culturas de MCF-7 tratadas com **4b** à 50 e 100 μM em comparação ao controle não tratado (FIGURA 39C).

No presente estudo também foi realizada a quantificação das diferentes fases da mitose em culturas de MCF-7 após tratamento com **4b**. Os resultados mostraram menor frequência de células em todas as fases da mitose, com exceção da prófase, em culturas tratadas com **4b** à 100 μM (FIGURAS 39D e 39E). Tomados em conjunto, os dados apresentados reforçam a hipótese de que o tratamento com **4b** inibiu a proliferação de células MCF-7.

Figura 39 – Efeitos do tratamento com **4b** sobre o comportamento proliferativo de culturas de MCF-7.



Fonte: Da autora.

Notas: (A) Imagens representativas obtidas por microscopia de contraste de fase após 48 h de tratamento com **4b** em diferentes concentrações. É possível observar alteração do aspecto morfológico das culturas. (B) Ensaio de capacidade clonogênica. Culturas foram tratadas com **4b** por 48 h. (C) Curva de proliferação da linhagem MCF-7 após 24, 48 e 72 h de exposição à **4b** obtidas pelo ensaio de exclusão com azul de *Trypan*. (D) e (E) Índice mitótico determinado por preparações citológicas com DAPI e anti- α -tubulina. Foi realizada análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey onde *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ equivalem às diferenças em relação ao grupo controle.

5.2.1.2 O tratamento com **4b** alterou a cinética de progressão do ciclo celular em culturas de células MCF-7

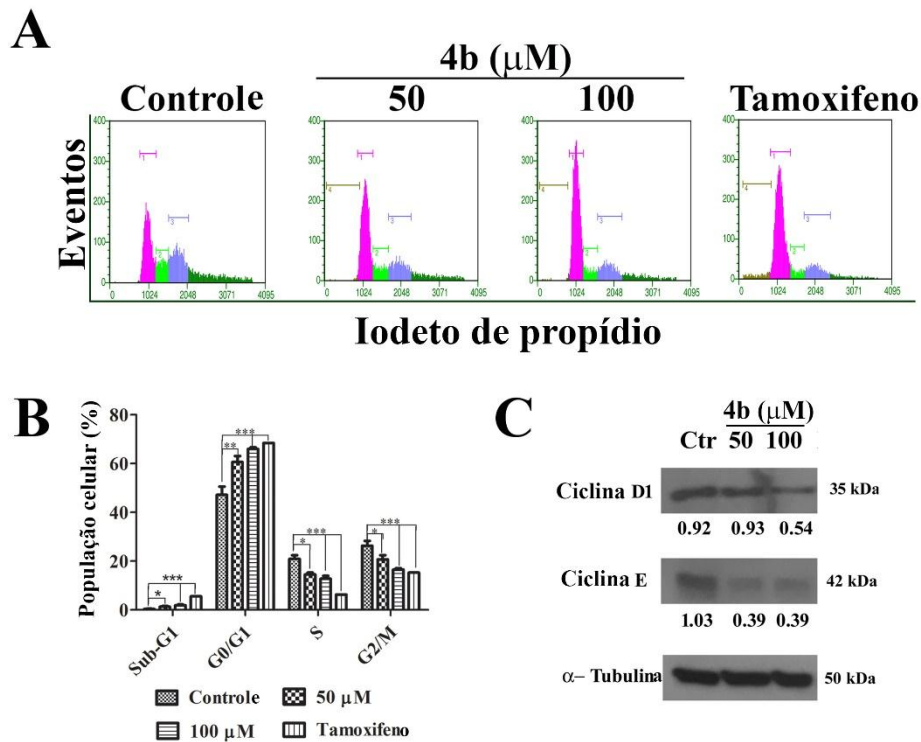
Para avaliação da cinética de progressão pelo ciclo celular, as culturas de MCF-7 foram expostas ao tratamento com **4b** por 48 h e os resultados, obtidos por quantificação de DNA em citometria de fluxo, mostraram que quando as culturas foram tratadas com **4b** à 50 μM houve aumento da frequência de células em G0/G1 e redução das populações S e G2/M. O mesmo perfil de distribuição celular foi observado quando as culturas foram tratadas com **4b** à 100 μM (FIGURA 40A e 40B). Tamoxifeno foi utilizado como controle positivo para fins de validação da abordagem experimental empregada. Os resultados indicaram efeito antiproliferativo do tratamento com **4b** frente culturas de MCF-7, que parece induzir bloqueio na transição de G1 para S. Considerando que os cânceres humanos geralmente apresentam descontrole da regulação em diferentes fases do ciclo celular (KUMARI *et al.*, 2016), os dados obtidos neste estudo são promissores.

A substância **4b** apresenta uma estrutura química inovadora, fato que limitou a comparação dos resultados encontrados com dados da literatura, no entanto, Kalmes e Blömeke (2012) descreveram que o eugenol e o isoeugenol modularam os níveis proteicos de importantes reguladores do ciclo celular na transição G1/S, incluindo a proteína RB (proteína de retinoblastoma), CDK6 (cinase 6 dependente de ciclina) e p27 (KIP1) em queratinócitos normais. Além disso, os derivados sulfonamídicos sintetizados por Kamal *et al.* (2011) induziram o bloqueio do ciclo celular na transição G1/S na linhagem K562, derivada de leucemia mieloide crônica.

A regulação do ciclo celular durante a progressão por G1 e transição de G1 para S envolve a ativação de proteínas do complexo ciclina D-CDK4/6 e ciclina E-CDK2 (MATSUURA *et al.*, 2004). Esses complexos são responsáveis pela fosforilação de RB, uma proteína supressora tumoral. A RB hiperfosforilada se dissocia do fator de transcrição E2F que promove a transcrição de genes importantes para a fase S (FOSTER *et al.*, 2010). Para estudar o mecanismo antiproliferativo de **4b** associado ao bloqueio da transição de G1 para S em culturas de MCF-7, os níveis proteicos das ciclinas D1 e E, reguladores críticos da progressão de G1 para S, foram quantificados por ensaio de *Immunoblot*. Os resultados apresentados na Figura 40C mostraram redução das bandas imunorreativas para ciclina D1 em culturas tratadas com **4b** a 100 μM . Já a redução das bandas imunorreativas para ciclina E foi observada após tratamento com **4b** à 50 e 100 μM . Desta forma, o tratamento com **4b** parece induzir bloqueio

do ciclo celular na transição G1/S, pelo menos em parte, por reduzir os níveis proteicos das ciclinas D1 e E. Os dados aqui apresentados são promissores, visto que as ciclinas D e E são geralmente superexpressas no câncer de mama e relacionadas com a progressão tumoral (DAVIS *et al.*, 2014; KIM; DIEHL, 2009).

Figura 40 – O tratamento com **4b** alterou a cinética de progressão do ciclo celular em culturas de MCF-7.



Fonte: Da autora.

Notas: (A) Histogramas obtidos por citometria de fluxo evidenciando as populações celulares distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular após 48 h de tratamento com **4b**. Tamoxifeno foi usado como controle positivo à 25 μM. Os picos de coloração marrom, rosa, verde e azul representam, respectivamente, as fases Sub-G1, G0/G1, S e G2/M. (B) Análise quantitativa do ciclo celular (C) Bandas imunorreativas obtidas por ensaio de *Immunoblot* evidenciando os níveis proteicos das ciclina D1 e ciclina E após tratamento com **4b** nas concentrações de 50 e 100 μM após 48 h. Abaixo encontra-se inserido a quantificação de cada banda realizada no *software ImageJ*. α-tubulina foi utilizada como controle de carregamento. Foi realizada análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey onde *** p < 0,001, ** p < 0,01 e * p < 0,05 equivalem às diferenças em relação ao grupo controle.

5.2.1.2 O tratamento com **4b** exibiu potencial pró-apoptótico frente culturas de MCF-7

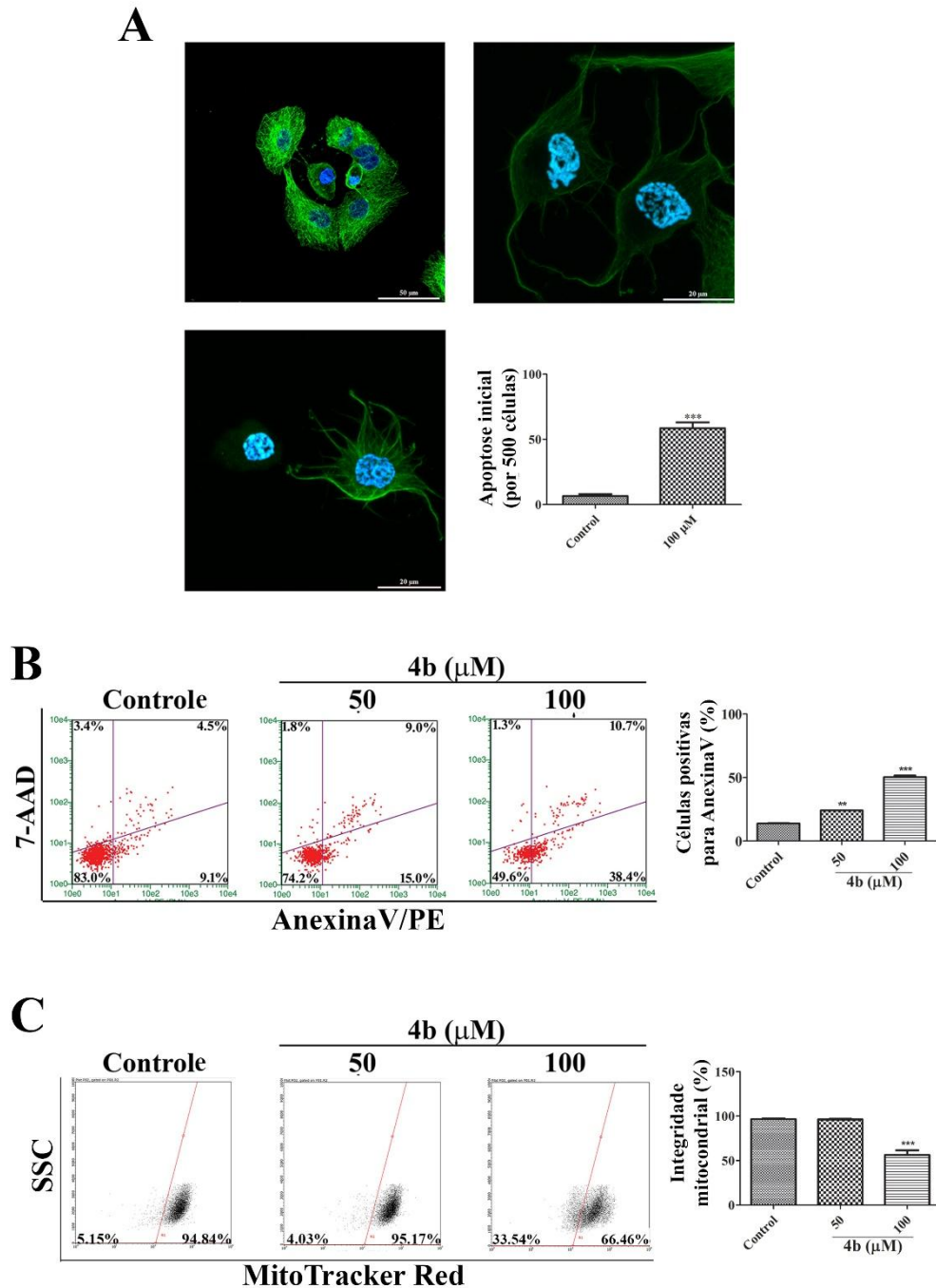
As análises de progressão do ciclo celular também evidenciaram aumento da frequência de células em Sub-G1 após tratamento com **4b** nas concentrações de 50 e 100 μM (FIGURA 40B). Considerando o indicativo de citotoxicidade, o ensaio de Anexina V foi utilizado para avaliar se o tratamento com **4b** induziria apoptose nas culturas de MCF-7. Os resultados, obtidos por citometria de fluxo, mostraram aumento de células positivas para Anexina V após

48 h de tratamento com **4b**. Quando as culturas foram tratadas com 50 e 100 μM , cerca de 24 e 50 % de células apresentaram marcação positiva para Anexina V, respectivamente. Em contrapartida, o grupo controle apresentou 13,6 % de células positivas para Anexina V (FIGURA 41B).

Imagens obtidas por meio de microscopia confocal evidenciaram eventos iniciais de apoptose, como núcleos picnóticos ou fragmentados em culturas de células tratadas com **4b** à 100 μM (FIGURA 41A). As análises obtidas por citometria de fluxo após a utilização da sonda *MitoTracker Red Fluorescence* evidenciaram redução da integridade mitocondrial em culturas de MCF-7 tratadas com **4b** à 100 μM , sugerindo que a ativação da via intrínseca da apoptose pode estar envolvida com a atividade citotóxica do tratamento com **4b** frente culturas de MCF-7 (FIGURA 41C). A resistência a apoptose é uma característica das células malignas e a evasão da apoptose contribui drasticamente para a resistência aos tratamentos do câncer e à progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em conjunto, os dados apresentados indicam promissora atividade antiproliferativa e citotóxica da substância protótipo **4b** e comprom que os estudos de otimização estrutural por meio da síntese de análogos estruturais, propostos para este trabalho de doutorado, com a finalidade de melhorar o potencial antitumoral de **4b** frente modelos de estudo *in vitro* e *in vivo* do câncer de mama positivo para receptor de estrógeno são relevantes.

Figura 41 – O tratamento com **4b** exibiu potencial pró-apoptótico frente às culturas de MCF-7.



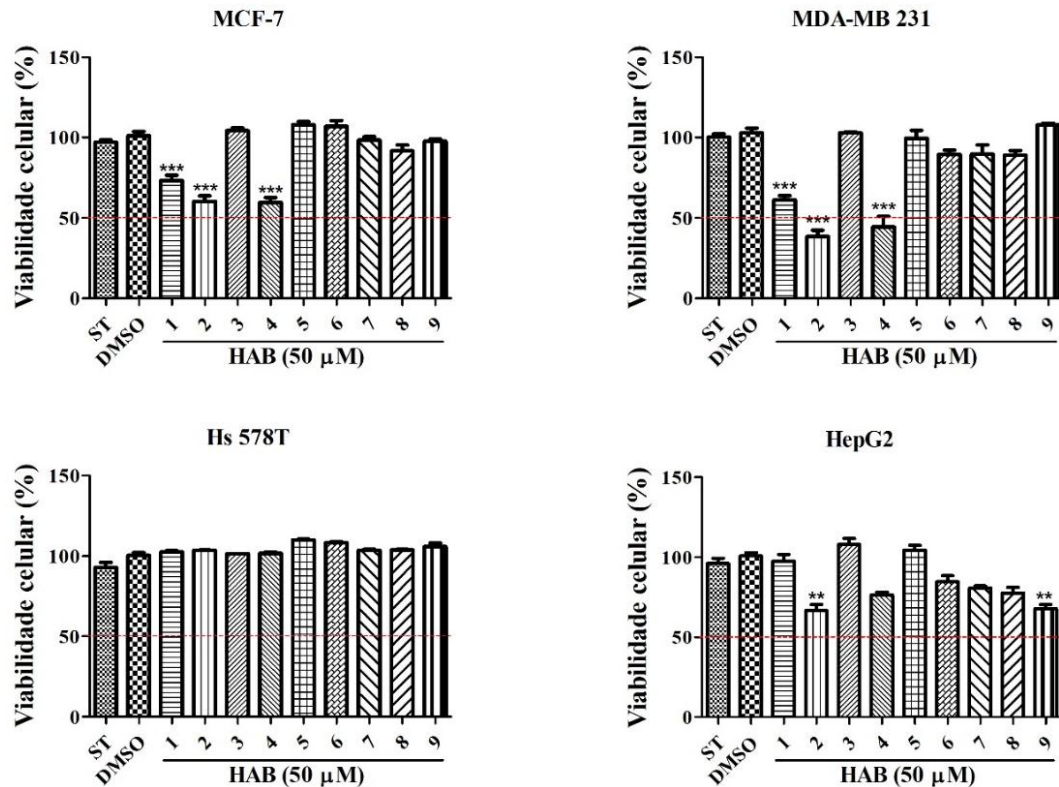
Fonte: Da autora.

Notas: (A) Imagens fluorescentes das culturas de MCF-7 tratadas com **4b** à 100 μM evidenciando células com núcleos picnóticos ou fragmentados, alteração do citoesqueleto e encolhimento celular (verde: microtúbulos e azul: núcleos). (B) Ensaio de Anexina V-PE/7-AAD por citometria de fluxo. Células viáveis: quadrante inferior esquerdo; células em apoptose inicial: quadrante inferior direito; células em apoptose tardia: quadrante superior direito; células em necrose: quadrante superior esquerdo. (C) Ensaio de integridade mitocondrial evidenciada pela sonda MitoTracker Red por citometria de fluxo. SSC- parâmetro Side Scatter (granularidade). Foi realizada análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey onde *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ equivalem às diferenças em relação ao grupo controle.

5.2.2 Efeitos dos análogos estruturais de **4b** sobre o comportamento proliferativo de linhagens celulares provenientes de carcinoma de mama

Culturas de MCF-7, MDA-MB 231 e Hs 578T (provenientes de carcinoma de mama) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) foram tratadas com os análogos estruturais de **4b** (**HAB 1** a **9**) na concentração de 50,0 μM por 48 h. Os efeitos de **HAB 1** a **9** frente à viabilidade das linhagens estudadas foram inicialmente avaliados em tais condições considerando que no estudo do protótipo **4b** foi observada redução da proliferação e capacidade clonogênica quando culturas de MCF-7 foram tratadas por 48 h com a **4b** na concentração de 50,0 μM . Os resultados obtidos por ensaio colorimétrico mostraram que frente às linhagens MCF-7 e MDA-MB 231, os derivados **HAB 1**, **2** e **4** reduziram eficientemente a viabilidade das culturas tratadas, ao passo que na linhagem HepG2 os derivados **HAB 2** e **9** foram os mais efetivos. Todavia, não houve redução significativa da viabilidade em culturas Hs 578T tratadas com os derivados **HAB 1** a **9** nas condições experimentais utilizadas (FIGURA 42). Visto que a redução da viabilidade em culturas de MDA-MB 231 tratadas com os derivados **HAB 2** e **4**, nos estudos preliminares, foi ao redor de 50 %, as substâncias **HAB 2** e **HAB 4** foram selecionadas para caracterização do perfil antiproliferativo e/ou citotóxico destes análogos.

Figura 42 – Viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico (MTS) após 48 h de tratamento com os análogos estruturais de **4b** (**HAB 1 a 9**) na concentração de 50,0 μM .



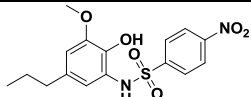
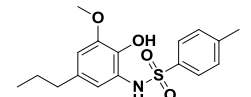
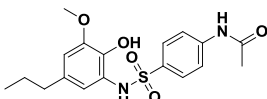
Fonte: Da autora.

Notas: Foi realizada análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey onde *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ equivalem às diferenças em relação ao grupo controle.

Os valores de CI_{50} obtidos para a linhagem MDA-MB 231 foram $60,82 \pm 5,88 \mu\text{M}$ e $41,00 \pm 3,38 \mu\text{M}$ após tratamento por 48 h com **HAB 2** e **HAB 4**, respectivamente. Para a linhagem MCF-7 os valores de CI_{50} encontrados foram 1,88 e 3,63 vezes maiores que aqueles encontrados para a linhagem MDA-MB 231 (CI_{50} de $113,4 \pm 7,47 \mu\text{M}$ para **HAB 2** e $149,8 \pm 8,45 \mu\text{M}$ para **HAB 4**). Assim sendo, a linhagem MDA-MB 231 apresentou-se mais responsiva ao tratamento com as substâncias **HAB 2** e **4** quando comparada à linhagem MCF-7.

Posteriormente, as substâncias **HAB 2** e **HAB 4** foram testadas em culturas de CCD-1059Sk, uma linhagem de fibroblasto derivada de pele normal humana. Os valores de CI_{50} obtidos para CCD-1059Sk (CI_{50} de $165,70 \pm 2,58 \mu\text{M}$ para **HAB 2** e $154,50 \pm 3,81 \mu\text{M}$ para **HAB 4**) foram superiores aqueles encontrados para MDA-MB 231 indicando menor citotoxicidade para linhagem normal em comparação à linhagem tumoral (TABELA 3 e FIGURA 43).

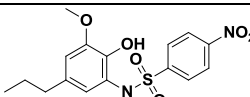
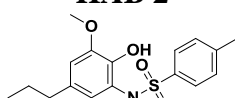
Tabela 3 – Valores de CI_{50} (μM) determinados após tratamento por 48 h com as substâncias **HAB 2** e **HAB 4** e com a substância protótipo **4b**.

Substância	$CI_{50} \pm$ Desvio Padrão (μM)		
	MDA-MB 231	MCF-7	CCD-1059Sk
 HAB 2	60,82 \pm 5,88	113,4 \pm 7,47	165,70 \pm 2,58
 HAB 4	41,00 \pm 3,38	149,8 \pm 8,45	154,50 \pm 3,81
 4b	> 300,00	133,80 \pm 2,36	282,80 \pm 5,11

Fonte: Da autora.

Os valores de índice de seletividade, determinados por meio da razão entre o CI_{50} obtido para a linhagem normal e o CI_{50} para linhagem tumoral, que foram de 2,72 e 3,77 para **HAB 2** e **HAB 4**, respectivamente, indicam boa seletividade dos análogos para a linhagem MDA-MB 231 (TABELA 4).

Tabela 4 – Valores de Índice de Seletividade (IS) determinados nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 após tratamento por 48 h com as substâncias **HAB 2** e **HAB 4** e com a substância protótipo **4b**.

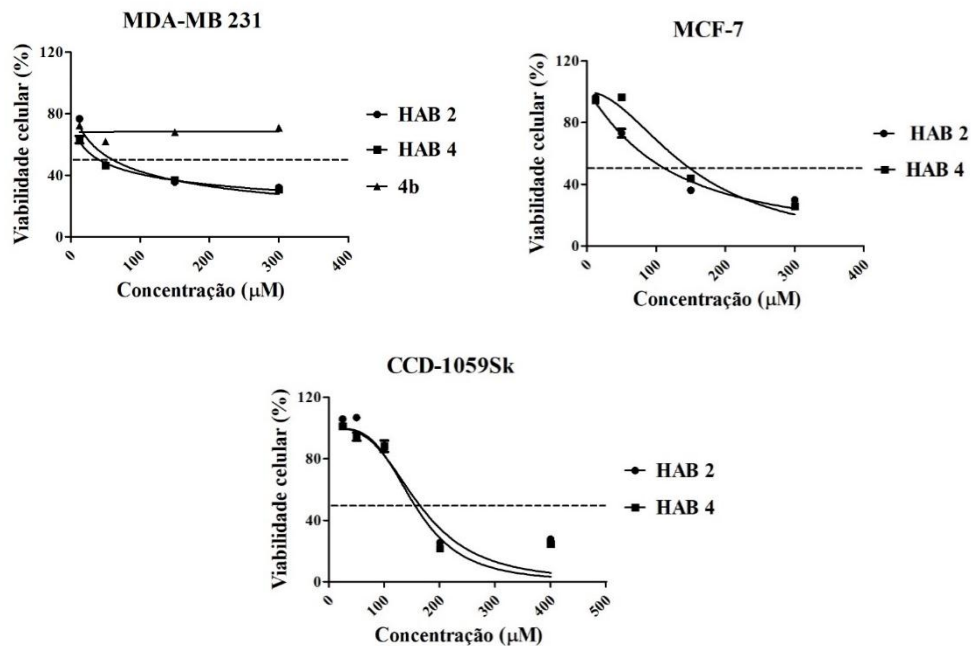
Substância	IS ₁	IS ₂
 HAB 2	2,72	1,46
 HAB 4	3,77	1,03

Fonte: Da autora.

Notas: IS₁: Índice de Seletividade (IS): dado pela razão entre $CI_{50}CCD-1059Sk/CI_{50}MDA-MB 231$.

IS₂: Índice de Seletividade (IS): dado pela razão entre $CI_{50}CCD-1059Sk/CI_{50}MCF-7$.

Figura 43 – Viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico em linhagens tumorais de mama (MDA-MB 231 e MCF-7) e em linhagem normal (CCD-1059Sk), após 48 h de tratamento com as substâncias **HAB 2**, **HAB 4** e **4b**.

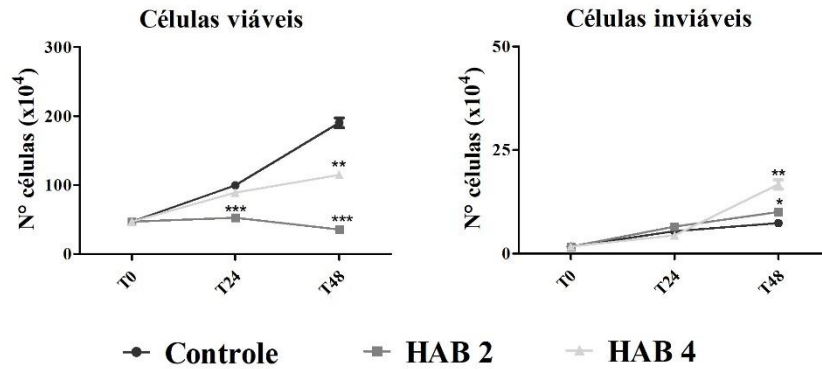


Fonte: Da autora.

O ensaio de exclusão com azul de *Trypan* foi utilizado como parâmetro adicional para avaliar os efeitos dos análogos **HAB 2** e **HAB 4** frente à viabilidade da linhagem MDA-MB 231. Este ensaio permite a distinção de células viáveis e inviáveis, já que o corante azul de *Trypan* penetra nas células inviáveis que perderam a integridade de membrana e tornam-se azul-arroxeadas. Nesta abordagem experimental as culturas de MDA-MB 231 foram tratadas com **HAB 2** e **HAB 4** na concentração de 50,0 µM e as populações de células viáveis e inviáveis foram quantificadas após 24 e 48 h (FIGURA 44).

Quando culturas de MDA-MB 231 foram tratadas com **HAB 2** houve redução de 46,50 e 81,79 % do número de células viáveis após 24 e 48 h de tratamento, respectivamente. Aumento pouco expressivo do número de células inviáveis foi observado em culturas tratadas com **HAB 2** após 48 h, indicando que o tratamento com este análogo, preferencialmente, exerceu efeito antiproliferativo frente culturas de MDA-MB 231, nas condições experimentais avaliadas. O tratamento com **HAB 4** na concentração de 50,0 µM promoveu redução de 44 % do número de células viáveis após 48 h e o número de células inviáveis foi 2,23 vezes maior em relação às amostras controle.

Figura 44 – População de células viáveis e inviáveis obtidas por meio do ensaio de exclusão com azul de *Trypan* na linhagem MDA-MB 231 após 24 e 48 h de tratamento com **HAB 2** e **HAB 4** na concentração de 50,0 μM .

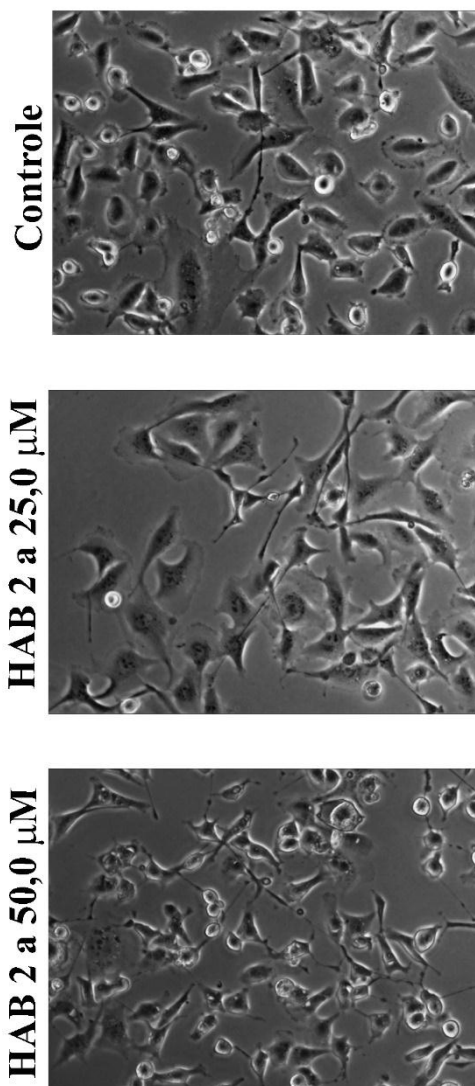


Fonte: Da autora.

Notas: Foi realizada análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey onde *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ equivalem às diferenças em relação ao grupo controle.

A Figura 45 demonstra de forma ilustrativa o padrão morfológico das culturas de MDA-MB 231 tratadas por 24 h com **HAB 2**. As alterações morfológicas são mais evidentes em culturas de MDA-MB 231 tratadas com **HAB 2** a 50,0 μM . Estas culturas apresentam células com aspecto alongado que se diferenciam das células presentes nas amostras controle, além da maior frequência de células arredondadas. Também é possível observar menor densidade celular nas culturas tratadas em relação às amostras controle.

Figura 45 – Imagens representativas obtidas por microscopia de contraste de fase após 24 h de tratamento com **HAB 2** nas concentrações de 50,0 e 25,0 μM .



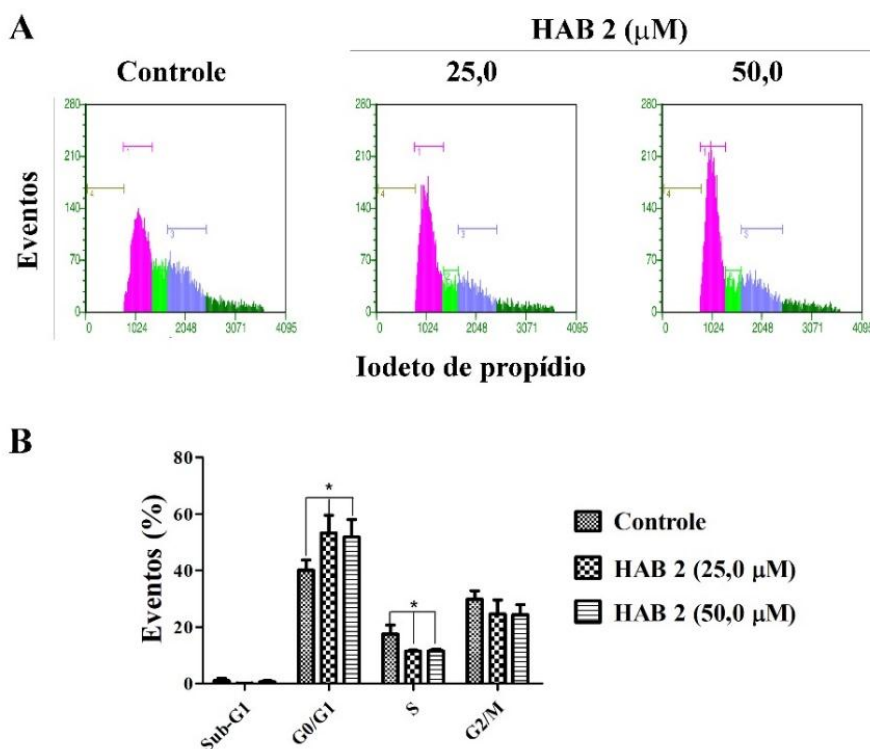
Fonte: Da autora.

O ensaio de ciclo celular foi utilizado para determinação da frequência de células nas diferentes fases do ciclo. Para esta abordagem as culturas de MDA-MB 231 foram tratadas por 24 h com **HAB 2** nas concentrações de 25,0 e 50,0 μM . A escolha das condições experimentais (tempo de tratamento e concentração das substâncias) foi baseada nos resultados obtidos previamente pelo ensaio de exclusão com azul de *Trypan*, o qual evidenciou alteração do comportamento proliferativo da linhagem MDA-MB 231 após 24 h de tratamento com **HAB 2**.

Os resultados apresentados na Figura 46 mostraram que o derivado **HAB 2** interferiu na dinâmica de progressão do ciclo celular em culturas de MDA-MB 231 após 24 h de tratamento. Quando as culturas foram tratadas com **HAB 2** a 25,0 μM houve aumento do número de células em G0/G1 e redução da população de células na fase S. O mesmo perfil de distribuição das

populações celulares foi evidenciado após tratamento das culturas com **HAB 2** a 50,0 μM . Vale mencionar que o tratamento com o protótipo **4b** também provocou aumento da população G0/G1 em culturas de MCF-7 e o bloqueio do ciclo nesta fase específica parece estar envolvido com a redução dos níveis proteicos das ciclinas D1 e E, importantes reguladores da transição de G1 para S. Quando as culturas de MDA-MB 231 foram expostas à **HAB 2** nas concentrações de 25,0 e 50,0 μM não houve aumento da população em Sub-G1, a qual é constituída por células com DNA fragmentado e, portanto, por células mortas. Estes dados corroboraram aqueles obtidos anteriormente onde não foram observadas alterações morfológicas que indicassem morte celular, bem como aumento expressivo de células inviáveis em culturas tratadas com **HAB 2**, o que reforça a hipótese de que o tratamento com este análogo, preferencialmente, inibiu a proliferação de células MDA-MB-231.

Figura 46 – Efeitos do tratamento com **HAB 2** sobre a cinética de progressão do ciclo celular de culturas de MDA-MB 231 após 24 h nas concentrações de 25,0 e 50,0 μM .



Fonte: Da autora.

Notas: Análise da progressão do ciclo celular. (A) Histogramas obtidos por citometria de fluxo. Marrom – Sub-G1; Rosa – G0/G1; Verde – S; Azul – G2/M. A população de células hiper tetraploides não foi analisada. (B) Quantificação da população de células nas diferentes fases do ciclo. Os resultados referem-se à média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Foi realizada análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey onde * $p < 0,05$ equivale às diferenças em relação ao grupo controle.

Este estudo teve como objetivo principal sintetizar e caracterizar uma série inédita de derivados sulfonamídicos, obtidos a partir da técnica de hibridação molecular entre fenilpropanoides, como eugenol e seu análogo di-hidroeuugenol e o grupo farmacofórico aril-

sulfonamida, relacionado com atividades antibacteriana e antiproliferativa (AZEVEDO-BARBOSA *et al.*, 2020). Em estudo prévio, o híbrido **4b** mostrou-se efetivo frente à redução da proliferação de culturas de MCF-7 e foi considerado para estudos subsequentes com o objetivo de investigar os mecanismos envolvidos com as atividades antiproliferativa e citotóxica previamente observadas, bem como propor estudos de relação estrutura-atividade.

Posteriormente, **4b** foi utilizada como substância protótipo para a síntese de novos análogos estruturais (**HAB 1 a 9**) e os efeitos dessas substâncias foram avaliados sobre o comportamento proliferativo das linhagens celulares derivadas de câncer de mama MCF-7, MDA-MB 231 e Hs 578t, que apresentam diferentes perfis genéticos para melhor explorar os efeitos de **4b** e seus análogos frente à heterogeneidade do câncer de mama. A linhagem MCF-7 é caracterizada como positiva para receptor de estrógeno e progesterona, enquanto as linhagens MDA-MB 231 e Hs 578t são consideradas triplo-negativas. As linhagens MCF-7 e MDA-MB 231 foram estabelecidas a partir de sítios metastáticos de pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo e de adenocarcinoma mamário, ambas com potencial metastático. No entanto, a linhagem Hs 578t foi extraída de um carcinoma da própria glândula mamária e não representa um modelo metastático (HUGUET *et al.*, 1994; HACKETT *et al.*, 1977; CAILLEAU *et al.*, 1974).

O uso de marcadores específicos no câncer de mama tem um papel crítico na definição do subtipo de tumor e, conseqüentemente, na escolha da melhor proposta terapêutica. Assim sendo, na rotina clínica, os tumores da mama são classificados em 5 principais subtipos que consideram análises de imuno-histoquímica e o perfil de expressão de determinados marcadores, a fim de, direcionar o tratamento e aumentar as chances de sucesso da terapia, sendo: Luminal A/B, onde o subtipo A expressa receptores de estrogênio (RE) e/ou progesterona (RP), com baixo índice de Ki-67, um marcador de proliferação celular, enquanto o subtipo B expressa RE e/ou RP, porém com elevado índice Ki-67; *HER2-enriched*, subtipo que apresenta amplificação e/ou superexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2); *Basal-like*, onde cerca de 70 % são tumores triplo negativos, subtipo este que não expressa nenhum dos três receptores (RE, RP e HER2), mas que apresenta elevada expressão de marcadores da transição epitélio-mesenquimal; *Claudin-low*, subtipo que apresenta baixa expressão das proteínas claudinas 3, 4 e 7 e o subtipo *normal breast like* que apresenta elevação na expressão de genes comuns às células epiteliais normais da mama, às células adiposas e a outras células do estroma (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2003).

Tumores positivos para RE correspondem ao subtipo mais comum (70 %) e são considerados de melhor prognóstico, pois respondem à terapia antiestrogênio (BARDOU *et al.*,

2003). Tumores triplo negativos, por outro lado, estão ligados a um pior prognóstico entre todos os subtipos, pois estão associados com mutações no gene *BRCA1*, responsáveis pelos reparos aos danos ocasionados no DNA, e não apresentam alvo terapêutico definido (PARISE *et al.*, 2009; TURNER; REIS-FILHO, 2006). Esses tumores representam de 15 a 20 % dos subtipos, sendo extremamente agressivos e com alta incidência em mulheres jovens. Além disso, os tumores triplo negativos apresentam reduzida probabilidade de rastreamento por mamografia e elevado risco de desenvolvimento de metástases, o que compromete o tempo de sobrevivência global da paciente (YAO *et al.*, 2017; PAL; CHILDS; PEGRAM, 2011).

Curiosamente, o tratamento com o análogo **HAB 2** exibiu seletividade para a linhagem MDA-MB 231 quando comparado à MCF-7 e ao protótipo **4b**, o que constitui um dado relevante considerando que a linhagem MDA-MB 231 possui mutação no gene supressor de tumor *BRCA1* que atua sobre os sistemas de reparo celular. Fabbro *et al.* (2004) demonstraram, por meio da técnica de silenciamento (siRNA), que as células com redução dos níveis de expressão de *BRCA1* apresentam defeitos no *checkpoint* durante a transição de G1 para S. Danos ao DNA ocasionados, principalmente, por radiação ionizante, provocam ativação da Ataxia-Telangiectasia Mutada (ATM) resultando em fosforilação da BRCA1 que se liga à BARD1. Tais complexos atuam como adaptadores de p53, o que contribui para a fosforilação dos resíduos de serina 15 pela ATM. Conseqüentemente, a p53 ativa atua como fator de transcrição de p21, seu principal alvo, induzindo bloqueio na transição de G1 para S (FABBRO *et al.*, 2014).

A linhagem MCF-7 é selvagem para *TP53* e, portanto, o bloqueio do ciclo celular, ocasionado pelo tratamento com **4b**, pode ter sido decorrente da ativação de p53/p21. No entanto, o tratamento com **HAB 2** induziu bloqueio na transição G1/S na linhagem MDA-MB 231 que apresenta p53 inativa, indicando que o evento observado pode ter sido induzido por vias independentes de p53. Além disso, **HAB 2** apresenta em sua estrutura química o grupo nitro (NO₂), que no contexto celular fica susceptível à redução metabólica, formando intermediários citotóxicos altamente reativos, como o ânion nitro radical (RNO^{•-}), que pode atuar como aceptor de elétrons, promovendo a oxidação do DNA e a ruptura da dupla hélice (de OLIVEIRA; ALVES, 2002). Investigações futuras devem ser realizadas para melhor entender os mecanismos relacionadas à suscetibilidade da linhagem MDA-MB 231 mediante ao tratamento com **HAB 2**.

Neste contexto, os dados aqui apresentados são promissores pois o protótipo **4b** e seu análogo **HAB 2** inibiram eficientemente a proliferação das linhagens derivadas de tumores de mama, MCF-7 e MDA-MB 231, que representam tumores positivos para receptor de estrógeno

e triplo negativo, respectivamente, além de serem linhagens metastáticas. Devido a ausência de alvos terapêuticos, os tumores triplo negativos são de difícil tratamento e as opções são limitadas (BAGLIA *et al.*, 2018).

5.3 ANÁLISES DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE **4b** E DE SEUS ANÁLOGOS ESTRUTURAIIS **HAB 1** a **9**

Diante dos resultados apresentados tornou-se possível coletar informações importantes a respeito dos grupos funcionais que norteiam a atividade antiproliferativa de **4b**. Dentre eles, podemos citar a importância do grupo sulfonamida, pois o análogo **HAB 9** que apresenta o grupo bioisómero amida ao invés da sulfonamida, não foi ativo frente a linhagens provenientes de adenocarcinoma de mama humana (MCF-7 e MDA-MB 231). Todavia, este análogo reduziu a viabilidade de culturas de células de carcinoma hepatocelular (HepG2).

Além disso, o grupo aril-sulfonamida *N*-monossustituído parece contribuir com a atividade biológica observada, pois o análogo **HAB 6** constituído de uma aril-sulfonamida *N*, *N*-dissustituída mostrou-se inativo frente às linhagens tumorais estudadas. Da mesma forma, a presença da hidroxila fenólica também se mostrou importante, já que o análogo **HAB 3**, que apresenta este grupo substituído por um grupo sulfonato, não foi efetivo em reduzir a viabilidade celular das linhagens tumorais. Isso também foi observado com **HAB 5**, onde a presença do grupo metoxila próximo à hidroxila fenólica se mostrou necessário para a atividade biológica, pois este derivado di-hidroxilado também se mostrou inativo.

Os análogos **HAB 7** e **HAB 8** também se mostraram inativos frente às linhagens tumorais avaliadas. Cabe lembrar que apenas **HAB 8** não constitui uma substância inédita, porém foi inserida neste trabalho para contribuir com os estudos de REA. Ambos os derivados não apresentam a cadeia lateral propílica, bem como o grupo metoxila, o que parece indicar a necessidade da presença destes dois grupos concomitantemente no padrão estrutural de **4b**.

A ausência de grupos substituintes no anel aromático conectado ao grupo sulfonamida de **4b**, a exemplo do análogo **HAB 1**, contribuiu para a redução da viabilidade celular de culturas de MCF-7 e MDA-MB 231. Entretanto, a modificação do grupo acetamida de **4b** pelos grupos nitro e metila, conforme o padrão estrutural dos análogos **HAB 2** e **HAB 4**, respectivamente, foram ainda mais efetivos na redução da viabilidade celular em comparação com **HAB 1**.

O ensaio de exclusão com azul de *Trypan* foi determinante para a seleção do derivado mais promissor, no qual foi observada alteração do comportamento proliferativo de culturas de

MDA-MB 231 quando submetidas ao tratamento com **HAB 2** à 50 μM por 24 h. Desta forma, a substituição do grupo acetamida de **4b**, que atua ativando de forma intermediária o anel aromático através da doação de densidade eletrônica, pelo grupo nitro altamente desativador de **HAB 2** favoreceu a atividade biológica observada de forma a contribuir com os estudos de otimização estrutural de **4b**.

Em seu trabalho, Divya *et al.* (2018) relataram que a presença de grupos retiradores de densidade eletrônica, como o grupo nitro quando conectados a anéis aromáticos contribuem para a atividade inibitória sobre CDK4 (cinase 4 dependente de ciclina). Os autores também observaram que átomos eletronegativos, como oxigênio e nitrogênio quando presentes na estrutura química, favorecem as interações com CDK4 já que atuam como aceptores de ligações de hidrogênio. O mesmo potencial inibitório também foi observado na presença de grupos alquílicos.

Lokhande, Nagar e Swamy (2019) observaram que a metoxila presente na estrutura química da substância de seus estudos estabelecem ligações de hidrogênio com importantes aminoácidos que constituem o sítio ativo das ciclinas D1 e E. Ao mesmo tempo, Zhang *et al.* (2018) descreveram que a presença da hidroxila fenólica se mostrou crucial para a elevada afinidade frente ao complexo ciclina D-CDK6.

O aumento da acidez de aril-sulfonamidas em decorrência da presença de grupos retiradores de densidade eletrônica no anel aromático parece influenciar o potencial de inibição de genes antiapoptóticos e contribuir, dessa forma, para a indução de apoptose. Por este motivo, o grupo sulfonamida deve apresentar-se como *N*-monossustituído (TOURÉ *et al.*, 2013). Do mesmo modo, Zhang e Ren (2018) observaram que o grupo sulfonamida contribuiu com a atividade inibitória sobre CDK2 (cinase 2 dependente de ciclina) ao estabelecer importantes ligações de hidrogênio com aminoácidos do sítio ativo de CDK2, sendo alvos promissores na inibição dos complexos ciclina E-CDK2.

Portanto, os dados das pesquisas *in silico* com os complexos ciclina D-CDK4/6 e ciclina E-CDK2 reforçam, de certa forma, os resultados do potencial antiproliferativo obtidos até o momento a partir dos estudos de relação estrutura-atividade de **4b** e de seus análogos estruturais **HAB 1** a **9** propostos neste trabalho.

6 CONCLUSÕES

O híbrido fenilpropanoide-sulfonamida **4b** apresenta uma estrutura química inovadora e exibiu promissora atividade antiproliferativa *in vitro* frente à linhagem proveniente de adenocarcinoma de mama humana (MCF-7). Por meio de diferentes abordagens metodológicas, foi demonstrado que a substância **4b** reduziu os níveis proteicos das ciclinas D1 e E, promovendo o bloqueio do ciclo celular na transição G1/S e, posteriormente, indução de apoptose em culturas de células MCF-7.

Com o propósito de escalarecer as exigências estruturais que modulam a atividade biológica de **4b**, foram planejados e sintetizados nove análogos estruturais denominados de **HAB 1** a **9** para compor os estudos de relação estrutura-atividade. As identidades estruturais de **4b** e dos seus análogos estruturais foram confirmadas por meio de espectroscopia de absorção na região do IV, por RMN de ^1H e ^{13}C e por EM, conforme os dados de caracterização apresentados. Cabe ressaltar que, salvo **HAB 8**, todos os outros análogos trata-se de substâncias com padrão estrutural inédito.

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular com os nove análogos estruturais propostos indicaram que os derivados **HAB 2** e **HAB 4** mostraram-se mais efetivos em reduzir a viabilidade celular de culturas de MDA-MB 231, sendo **HAB 2** o derivado mais promissor da série estudada. Da mesma forma que a substância protótipo **4b**, o análogo **HAB 2** alterou a dinâmica de progressão do ciclo celular ao promover o bloqueio da transição de G1 para S em culturas de células MDA-MB 231, provenientes de adenocarcinoma de mama humana. Esses resultados foram relevantes considerando que a MDA-MB 231 é uma linhagem classificada como triplo negativo e metastática.

A substância protótipo **4b** e seu análogo estrutural **HAB 2** foram planejadas a partir da técnica de hibridação molecular envolvendo o di-hidroeuogenol e uma subunidade aril-sulfonamídica. Essas substâncias diferem-se apenas quanto ao substituinte presente no anel aromático derivado do cloreto de benzenossulfonila correspondente, sendo **4b** constituído por um grupo acetamida e **HAB 2** pelo grupo nitro. Por conseguinte, diante dos resultados apresentados pode-se observar que a substituição do grupo doador de densidade eletrônica de **4b** pelo grupo retirador de densidade eletrônica de **HAB 2** contribuiu favoravelmente a atividade biológica, de forma a colaborar com os estudos de relação estrutura-atividade de **4b** propostos para este trabalho.

Tomados em conjunto, esses resultados demonstram que o híbrido fenilpropanoide-sulfonamida **4b** e seu análogo estrutural **HAB 2** notavelmente exibiram um perfil de atividade

antiproliferativa promissora frente células MCF-7 e MDA-MB 231, respectivamente. **4b** e seu análogo **HAB 2** podem ser considerados para compor estudos *in silico*, que visam compreender o perfil de interação dessas substâncias no sítio ativo de importantes proteínas reguladoras da transição G1/S do ciclo celular, bem como validar o potencial antitumoral por meio de modelos *in vivo* de tumores de mama positivos para receptor de estrógeno e triplo negativo.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M. L. *et al.* Anti-metastatic and anti-proliferative activity of eugenol against triple negative and HER2 positive breast cancer cells. **BMC Complement. Altern. Med.**, London, England, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2018.
- AGRAWAL, V. K. *et al.* QSAR study on carbonic anhydrase inhibitors: aromatic/heterocyclic sulfonamides containing 8-quinoline-sulfonyl moieties, with topical activity as antiglaucoma agents. **Europ. J. Med. Chem.**, Paris, France, v. 39, p. 593–600, 2004.
- AHMAD, A. *et al.* Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. **Microbial Pathog.**, London, England, v. 48, n. 1, p. 35–41, 2010.
- AL-SHARIF, I.; REMMAL, A.; ABOUSSEKHRA, A. Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/survivin down-regulation. **BMC Cancer**, London, England, v. 13, p. 1–10, 2013.
- AZEVEDO-BARBOSA, H. *et al.* Phenylpropanoid-based sulfonamide promotes cyclin D1 and cyclin E down regulation and induces cell cycle arrest at G1/S transition in estrogen positive MCF-7 cell line. **Toxicology in Vitro**, Oxford, England, v. 59, p. 150–160, 2019.
- AZEVEDO-BARBOSA, H. *et al.* From Antibacterial to Antitumour Agents: A Brief Review on The Chemical and Medicinal Aspects of Sulfonamides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, United Arab Emirates, v. 20, p. 2052–2066, 2020.
- BAGLIA, M. L. *et al.* Alcohol, smoking, and risk of her2-overexpressing and triple negative breast cancer relative to estrogen receptor-positive breast cancer. **International Journal of Cancer**, United States of America, 2018.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, United Kingdom, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BARDOU, V. J. *et al.* Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. **Journal of Clinical Oncology**, United States of America, v. 21, n. 10, p. 1973–1979, 2003.
- BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, Brasil, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BENENCIA, F.; COURRGES, M. C. *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol on human herpes virus. **Phytotherapy Research**, United Kingdom, v. 14, p. 495–500, 2000.
- BERTOS, N. R.; PARK, M. Breast cancer - one term, many entities? **The Journal of Clinical Investigation**, United States of America, v. 121, n. 10, p. 3789–3796, 2011.
- BIRGE, R. B. *et al.* Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. **Cell Communication & Signaling**, United Kingdom, v. 10, p. 13–30, 2009.

- BOUCHAIN, G. *et al.* Development of potential antitumor agents. Synthesis and biological evaluation of a new set of sulfonamide derivatives as histone deacetylase inhibitors. **J. Med. Chem.**, United States of America, v. 46, p. 820–830, 2003.
- BOUFAS, W. *et al.* Synthesis and antibacterial activity of sulfonamides. SAR and DFT studies. **J. Molec. Structure**, Netherlands, v. 1074, p. 180–185, 2014.
- BOWMAN, T. *et al.* STATs in oncogenesis. **Oncogene**, London, England, v. 19, 2474 ± 2488, 2000.
- BOYD, A. E. Sulfonylurea receptors, ion channels, and fruit flies. **Diabetes**, China, v. 37, p. 847–850, 1988.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2020. Incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, Brasil, 2020.
- BRENTNALL, M. *et al.* Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biology**, United Kingdom, v. 14, n. 32, 2013.
- CAILLEAU, R. *et al.* Breast tumor cell lines from pleural effusions. **J. Natl. Cancer Inst.**, United States of America, v. 53, p. 661–674, 1974.
- CHEN, Q.-H.; RAO, P. N. P.; KNAUS, E. E. Design, synthesis, and biological evaluation of *N*-acetyl-2-carboxybenzenesulfonamides: a novel class of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, United Kingdom, v. 13, p. 2459–2468, 2005.
- CHEN, P.; PARKS, W. C. Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. **J Cell Biochem.**, United States of America, v. 108, n. 6, p. 1233–1243, 2009.
- CHEN, X. *et al.* Highly efficient reduction of nitro compounds: Recyclable Pd/C-catalyzed transfer hydrogenation with ammonium formate or hydrazine hydrate as hydrogen source. **Synthetic Communications**, United States of America, v. 48, n. 19, p. 2475–2484, 2018.
- CHENG, X. C. *et al.* Role of sulfonamide group in matrix metalloproteinase inhibitors. **Current Med. Chem.**, United Arab Emirates, v. 15, p. 368–373, 2008.
- CHIBALE, K. *et al.* Antiprotozoal and cytotoxicity evaluation of sulfonamide and urea analogues of quinacrine. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, United Kingdom, v. 11, p. 2655–2657, 2001.
- CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. USA: Oxford University Press, ed. 2, 2012.
- COOLEN, H. K. A. C.; MEEUWIS, J. A. M.; van LEEUWEN, P. W. N. M. Substrate Selective Catalysis by Rhodium Metallohosts. **Journal of American Chemical Society**, United States of America, v. 117, p. 11906–11913, 1995.
- COMESAÑA-GÁNDARA, B. *et al.* Thermally rearranged polybenzoxazoles membranes with biphenyl moieties: Monomer isomeric effect. **Journal of Membrane Science**, Netherlands, v. 450, p. 369–379, 2014.

- DANIEL, A. N. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Rev. Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 19, n. 1B, p. 212–217, 2009.
- DAVIS, N. M., *et al.* Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. **Oncotarget**, USA, v. 5, n. 13, p. 4603–4650, 2014.
- De OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, Brasil, v. 25, n. 6, p. 976–984, 2002.
- DIEZ-CECILIA, E.; KELLY, B.; ROZAS, I. One-step double reduction of aryl nitro and carbonyl groups using hydrazine. **Tetrahedron Letters**, United Kingdom, p. 6702–6704, 2011.
- DIVYA, V. *et al.* Computational approach for generating robust models for discovering novel molecules as Cyclin Dependent Kinase 4 inhibitors. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, USA, v. 82, p. 48–58, 2018.
- DOMÍNGUEZ, J. N. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. **II Farmaco**, France, v. 60, p. 307–311, 2005.
- FABBRO, M. *et al.* BRCA1-BARD1 Complexes Are Required for p53Ser-15 Phosphorylation and a G1/S Arrest following Ionizing Radiation-induced DNA Damage. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 279, n. 30, p. 31251–31258, 2004.
- FERREIRA-SILVA, G. A. *et al.* [Ru(pipe)(dppb)(bipy)]PF₆ : A novel ruthenium complex that effectively inhibits ERK activation and cyclin D1 expression in A549 cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, England, v. 44, p. 382–391, 2017.
- FORTIN, S. *et al.* Substituted phenyl 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)benzenesulfonamides as antimetabolites. Antiproliferative, antiangiogenic and antitumoral activity, and quantitative structure-activity relationships. **Europ. J. Med. Chem.**, France, v. 46, p. 5327–5342, 2011.
- FOSTER, D. A. *et al.* Regulation of G1 cell cycle progression: Distinguishing the restriction point from a nutrient-sensing cell growth checkpoint(s). **Genes & Cancer**, USA, v. 1, n. 11, p. 1124–1131, 2010.
- FRANKEN, N. A. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat. Protoc.**, UK, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.
- FUNAHASHI, Y. *et al.* Sulfonamide derivative, E7820, is a unique angiogenesis inhibitor suppressing an expression of integrin $\alpha 2$ subunit on endothelium. **Cancer Res.**, USA, v. 62, p. 6116–6123, 2002.
- GHOSH, R. *et al.* Combination of 2-methoxyestradiol (2-ME2) and eugenol for apoptosis induction synergistically in androgen independent prostate cancer cells. **J Steroid Biochem. Mol. Biol.**, UK, v. 113, p. 25–35, 2009.

- GHOSH, R. *et al.* Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. **J Biol Chem.**, USA, v. 280, p. 5812–5819, 2005.
- GITTO, R. *et al.* Identification of 3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-sulfonamides as potent carbonic anhydrase inhibitors: synthesis, biological evaluation, and enzyme-ligand x-ray studies. **J. Med. Chem.**, USA, v. 53, p. 2401–2408, 2010.
- GREENE, T. W.; HUTS, P. G. M. **Greene's Protective Groups in Organic Synthesis**. 4 ed. John Wiley & Sons, New Jersey, 2007.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of eugenol: a structure-activity relationship study. **J. Med. Food**, USA, v. 14, n. 9, p. 975–985, 2011.
- GUO, J. *et al.* Discovery of new benzensulfonamide derivatives as tripodal STAT3 inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 151, p. 752–764, 2018.
- HACKETT, A. J. *et al.* Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs 578T) and the diploid myoepithelial (Hs 578Bst) cell lines. **J. Natl. Cancer Inst.**, USA, v. 58, p. 1795–1806, 1977.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The next generation. **Cell**, USA, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, Germany, v. 16, p. 997–1005, 2009.
- HUANG, R-Z. *et al.* Discovery of dehydroabiatic acid sulfonamide based derivatives as selective matrix metalloproteinases inactivators that inhibit cell migration and proliferation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 138, p. 979–992, 2017.
- HUGHES, E. D.; INGOLD, C. K.; REED, R. I. Kinetics and Mechanism of Aromatic Nitration. Part II. **J. Chemical Society**, USA, p. 2400–2440, 1950.
- HUGUET, E.L. *et al.* Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. **Cancer Research**, UK, v. 54, p. 2615–2621, 1994.
- JEONG, K. J. *et al.* Effects of eugenol on hepatic glucose production and AMPK signaling pathway in hepatocytes and C57BL/6J mice. **Fitoterapia**, Netherlands, v. 93, p. 150–162, 2014.
- JÚNIOR, P. L. S. *et al.* Apoptotic effect of eugenol involves G2/M phase abrogation accompanied by mitochondrial damage and clastogenic effect on cancer cell *in vitro*. **Phytomedicine**, Germany, v. 23, p. 725–735, 2016.
- KABUTO, H.; TADA, M.; KOHNO, M. Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. **Biolog. Pharmaceut. Bulletin**, Japan, v. 30, p. 423–427, 2007.

- KADAMA, H. K.; TILVEA, S. G. Advancement in methodologies for reduction of Nitroarenes. **J. Name.**, v. 00, p. 1–3, 2013.
- KALMES, M.; BLÖMEKE, B. Impact of eugenol and isoeugenol on AhR translocation, target gene expression, and proliferation in human HaCat keratinocytes. **J Toxicol Environ Health A.**, England, v. 75, n. 8–10, p. 478–491, 2012.
- KAMAL, A. *et al.* Synthesis and apoptosis inducing ability of new anilino substituted pyrimidine sulfonamides as potential anticancer agents. **Europ. J. Med. Chem.**, France, v. 46, p. 5817–5824, 2011.
- KANDA, Y. *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of potent and orally active sulfonamide ET_B selective antagonists. **Bioorg. Med. Chem.**, UK, v. 9, p. 897–907, 2001.
- KAMRAN, M. Z.; PATIL, P.; GUDE, R. P. Role of STAT3 in Cancer Metastasis and Translational Advances. **BioMed Research International**, USA, ID 421821, p. 1–15, 2013.
- KHAN, F. A. *et al.* Sulfonamides as Potential Bioactive Scaffolds. **Current Organic Chemistry**, United Arab Emirates, v. 22, p. 818–830, 2018.
- KIM, G. C. *et al.* Caspases-dependent apoptosis in human melanoma cell by eugenol. **Korean J Anat.**, South Korea, v. 39, p. 245–253, 2006.
- KIM, J. K.; DIEHL, J. A. Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. **J Cell Physiol.**, USA, v. 220, n. 2, p. 292–296, 2009.
- KOSAK, T. M. *et al.* Ether cleavage re-investigated: elucidating the mechanism of BBr₃-facilitated demethylation of aryl methyl ethers. **Eur. J. Org. Chem.**, Germany, p. 7460–7467, 2015.
- KUMARI, S. *et al.* Cyclin D1 and cyclin E2 are differentially expressed in gastric cancer. **Med Oncol.**, USA, v. 33, n. 5, p. 1–10, 2016.
- KWON, Y. *et al.* Design, synthesis, and biological activity of sulfonamide analogues of antofine and cryptopleurine as potent and orally active antitumor agents. **J. Med. Chem.**, USA, v. 58, p. 7749–7762, 2015.
- LAYEK, K. *et al.* Nanocrystalline magnesium oxide stabilized palladium(0): An efficient reusable catalyst for room temperature selective aerobic oxidation of alcohols. **J. Advanced Synthesis & Catalysis**, Germany, v. 353, n. 4, p. 606–616, 2011.
- LI, C. I.; URIBE, D. J.; DALING, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **Br. J. Cancer**, UK, v. 93, p. 1046–1052, 2005.
- LI, F.; FRETT, B.; LI, H. Selective reduction of halogenated nitroarenes with hydrazine hydrate in the presence of Pd/C. **Synlett.**, Germany, v. 25, n. 10, p. 1403–1408, 2014.
- LIU, Z-I. *et al.* A novel sulfonamide agent, MPSP-001, exhibits potent activity against human cancer cells *in vitro* through disruption of microtubule. **Acta Pharmacologica Sinica**, China, v. 33, p. 261–270, 2012.

LOKHANDE, K. B.; NAGAR, S.; SWAMY, K. V. Molecular interaction studies of Deguelin and its derivatives with Cyclin D1 and Cyclin E in cancer cell signaling pathway: The computational approach. **Scientific Reports**, UK, v. 9, n. 1778, p. 1–13, 2019.

MACHADO, M. *et al.* Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. **Experimental Parasitology**, USA, v. 127, n. 4, p. 732–739, 2011.

MALHOTRA, G. K. *et al.* Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biol. Ther.**, USA, v. 10, p. 955–960, 2010.

MANIKANDAN, P. *et al.* Eugenol inhibits cell proliferation via NF- κ B suppression in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. **Invest. New Drugs**, USA, v. 29, p. 110–117, 2011.

MATSUURA, I. *et al.* Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. **Nature**, London, England, v. 430, p. 226–231, 2004.

MAUGHAN, K. L.; LUTTERBIE, M. A.; HAM, P. S. Treatment of breast cancer. **Am. Fam. Physician**, USA, v. 81, p. 1339–1346, 2010.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 46, p. 4769–4807, 2011.

NAIK, S. Mild and eco-friendly chemoselective acylation of amines in aqueous medium. **ARKIVOC**, USA, p. 55–63, 2004.

NEFF, K. M.; NAWARSKAS, J. J. Hydrochlorothiazide *versus* Chlorthalidone in the management of hypertension. **Cardiology in Review**, USA, v. 18, n. 1, p. 51–56, 2010.

NERI, D.; SUPURAN, C. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. **Nat Rev Drug Discov.**, UK, v. 10, p. 767–777, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J. Nat. Prod.**, USA, v. 83, p. 770–803, 2020.

OKASHA, R. M. *et al.* First example of Azo-Sulfa conjugated chromene moieties: Synthesis, characterization, antimicrobial assessment, docking simulation as potent class I histone deacetylase inhibitors and antitumor agents. **Bioorganic Chemistry**, USA, v. 92, p. 1–15, 2019.

PAL, S. K.; CHILDS, B. H.; PEGRAM, M. Triple negative breast cancer: unmet medical needs. **Breast Cancer Res. Treat.**, Netherlands, v. 125, n. 3, p. 627–636, 2011.

PARISE, C. A. *et al.* Breast Cancer Subtypes as Defined by the Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), and the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) among Women with Invasive Breast Cancer in California, 1999–2004. **The Breast Journal**, UK, v. 15, n. 6, p. 593–602, 2009.

- PARKER, M. H. *et al.* Novel, broad-spectrum anticonvulsants containing a sulfamide group: advancement of *N*-((Benzo[*b*]thien-3-yl)methyl)sulfamide (JNJ-26990990) into human clinical studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, USA, v. 52, n. 23, p. 7528–7536, 2009.
- PARODI, T. V. *et al.* The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part C)**, Oxford, England, v. 155, p. 462–468, 2012.
- PAVIA, D. L. *et al.* **Introduction to Spectroscopy**. 4 ed. Cengage Learning, Washington, USA, 2010.
- PEROU, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, London, England, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.
- PISANO, M. *et al.* Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenyls on malignant melanoma cells. **Mol Cancer**, USA, v. 6, p. 8–20, 2007.
- RAKESH, K. P. *et al.* Recent Development of Sulfonyl or Sulfonamide Hybrids as Potential Anticancer Agents: A Key Review. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, Netherlands, v. 18, p. 488–505, 2018.
- RENAULT, S. *et al.* The use of Eugenol and electro-narcosis as anaesthetics: Transcriptional impacts on the European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicol. Environ. Safety**, Amsterdam, Netherlands, v. 74, p. 1573–1577, 2011.
- ROSS, J. S. *et al.* Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. **Oncologist**, USA, v. 13, p. 477–493, 2008.
- SCOZZAFAVA, A. *et al.* Anticancer and Antiviral Sulfonamides. **Current Med. Chem.**, United Arab Emirates, v. 10, p. 925–953, 2003.
- SENER, E. A. *et al.* Synthesis and microbiological activity of some *N*-(*o*-hydroxyphenyl)benzamides and phenylacetamides as the possible metabolites of antimicrobial active benzoxazoles: part II. **II Farmaco**, France, v. 55, p. 469–476, 2000.
- SHERR, C. J.; BEACH, D.; SHAPIRO, G. I. 2016. Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. **Cancer Discovery**, USA, v. 6, n. 4, p. 353–67, 2016.
- SHIN, S. H., PARK, J. H., KIM, G. C. The mechanism of apoptosis induced by eugenol in human osteosarcoma cells. **J Korean Oral Maxillofac. Surg.**, USA, v. 33, p. 20–27, 2007.
- SILVA, C. R. *et al.* Genotoxic, cytotoxic, antigenotoxic, and anticytotoxic effects of sulfonamide chalcone using the Ames Test and the mouse bone marrow micronucleus test. **PLoS ONE**, USA, v. 10, n. 9, 2015.
- SMITH, K.; EL-HITI, G. A. Regioselective Control of Electrophilic Aromatic Substitution Reactions. **Current Organic Synthesis**, United Arab Emirates, v. 1, p. 253–274, 2004.
- SORLIE, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, USA, v. 100, p. 8418–8423, 2003.

- SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European Journal of Cancer**, England, v. 40, n. 18, p. 2667-2675, 2004.
- SOUSA, C.; SILVA, P. J. C. BBr₃-assisted cleavage of most ethers does not follow the commonly assumed mechanism. **Eur. J. Org. Chem.**, Germany, v. 5195, p. 8048–8049, 2013.
- SUDARMA, I. M. *et al.* An efficient method on nitration of eugenol using NH₄NO₃ and KHSO₄. **Asian Journal of Chemistry**, India, v. 26, n. 1, p. 173–175, 2014.
- SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. **Assays related to cancer drug discovery**. In: Hostettmann K, editor. *Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity*. London: Academic Press, p. 71–133, 1990.
- SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J. Clin.**, USA, v. 0, p. 1–41, 2021.
- SUPURAN, C. T. *et al.* Antiviral sulfonamide derivatives. **Mini-Rev. Med. Chem.**, United Arab Emirates, v. 4, p. 189–200, 2004.
- TANAKA, H. *et al.* HMN- 176, an active metabolite of the synthetic antitumor agent HMN-214, restores chemosensitivity to multidrug-resistant cells by targeting the transcription factor NF-Y. **Cancer Res.**, USA, v. 63, p. 6942–6947, 2003.
- TOURÉ, B. B. *et al.* The Role of the Acidity of N-Heteroaryl Sulfonamides as Inhibitors of Bcl-2 Family Protein–Protein Interactions. **ACS Med. Chem. Lett.**, USA, v. 4, p. 186–190, 2013.
- TURNER, N. C.; REIS-FILHO, J. S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. **Oncogene**, London, England, v. 25, n. 43, p. 5846–5853, 2006.
- WANG, X.; WAN, K.; ZHOU, C. Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities. **Europ. J. Med. Chem.**, France, v. 45, p. 4631–4639, 2010.
- XU, J-G. *et al.* Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, Switzerland, v. 21, p. 1194, 2016.
- YAMADA, Y. *et al.* Phase I pharmacokinetic and pharmacogenomic study of E7070 administered once every 21 days. **Cancer Sci.**, Japan, v. 96, n. 10, p. 721–728, 2005.
- YAO, H. *et al.* Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon? **Oncotarget**, USA, v. 8, n. 1, p. 1913–1924, 2017
- YE, X. *et al.* Novel approach for the rapid screening of banned aromatic amines in dyed textiles using a chromogenic method. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Germany, v. 410, p. 2701–2710, 2018.

YOO, C-B. *et al.* Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Cancer Lett.**, Amsterdam, Netherlands, v. 225, n. 1, p. 41–52, 2005.

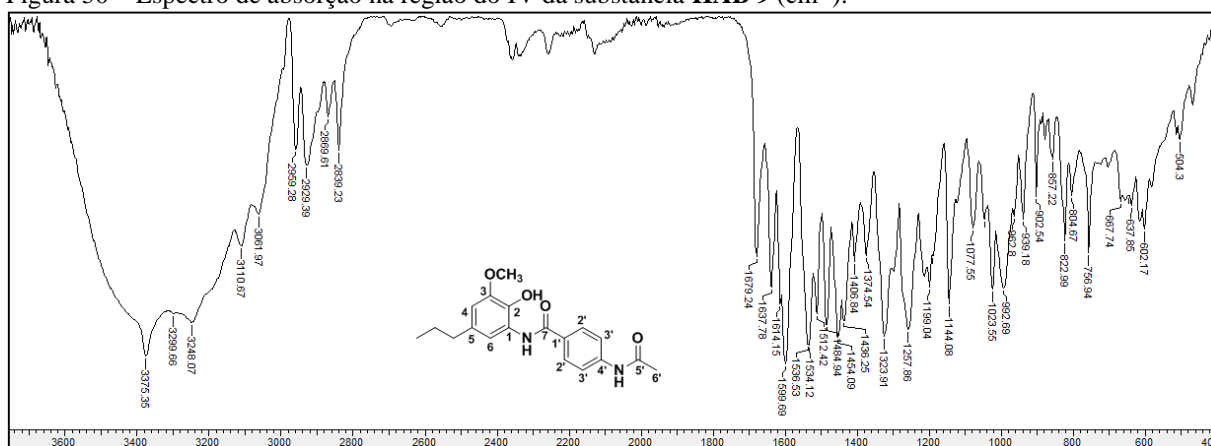
YOSHIMATSU, K. *et al.* Mechanism of Action of E7010, an Orally Active Sulfonamide Antitumor Agent: Inhibition of Mitosis by Binding to the Colchicine Site of Tubulin. **Cancer Research**, USA, v. 57, p. 3208–3213, 1997.

ZHANG, G.; REN, Y. Molecular Modeling and Design Studies of Purine Derivatives as Novel CDK2 Inhibitors. **Molecules**, Switzerland, v. 23, n. 11, p. 2924, 2018.

ZHANG, J. *et al.* Deciphering the binding behavior of flavonoids to the cyclin dependent kinase 6/cyclin D complex. **PLoS ONE**, USA, v. 13, n. 5, p. 1–18, 2018.

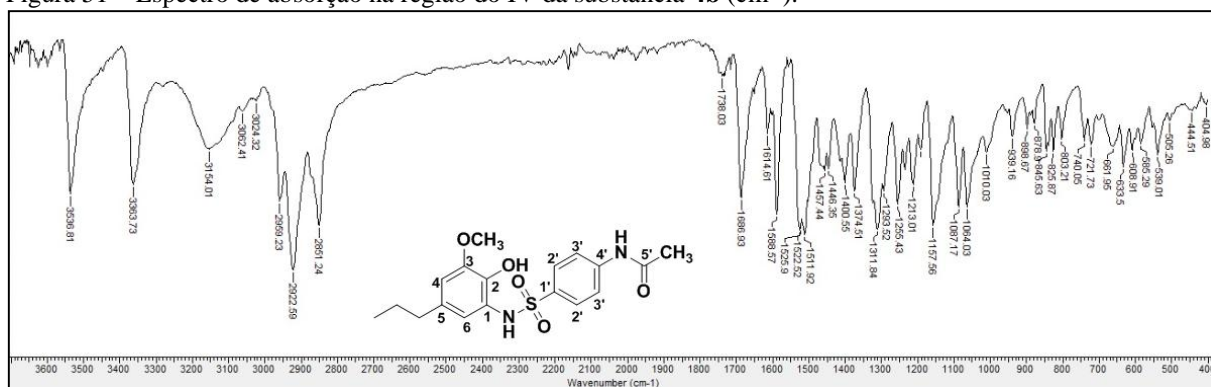
ZOLFIGOL, M. A.; GHAEMI, E.; MADRAKIAN, E. Nitration of phenols under mild and heterogeneous conditions. **Molecules**, Switzerland, v. 6, p. 614–620, 2001.

Figura 50 – Espectro de absorção na região do IV da substância **HAB 9** (cm^{-1}).



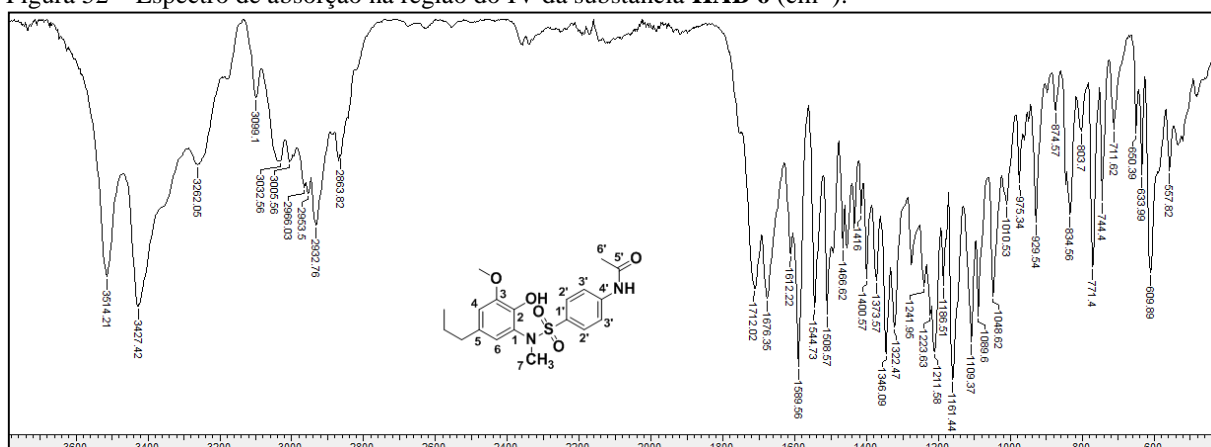
Fonte: Da autora.

Figura 51 – Espectro de absorção na região do IV da substância **4b** (cm^{-1}).



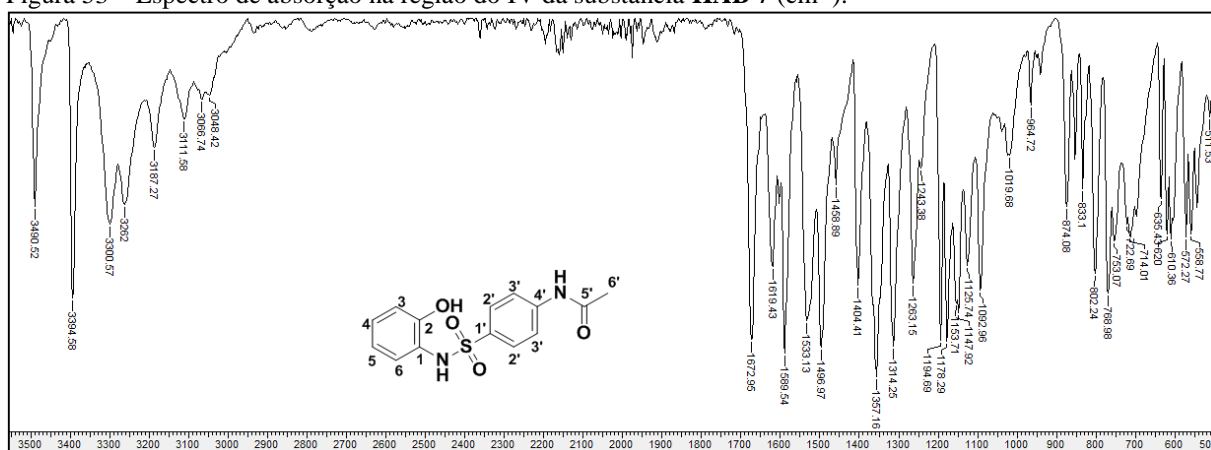
Fonte: Da autora.

Figura 52 – Espectro de absorção na região do IV da substância **HAB 6** (cm^{-1}).



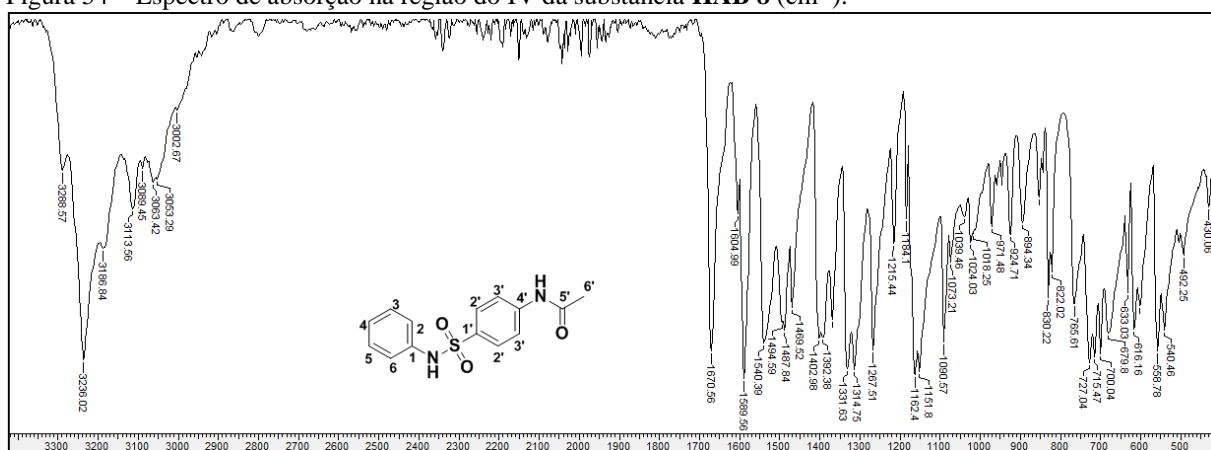
Fonte: Da autora.

Figura 53 – Espectro de absorção na região do IV da substância **HAB 7** (cm^{-1}).



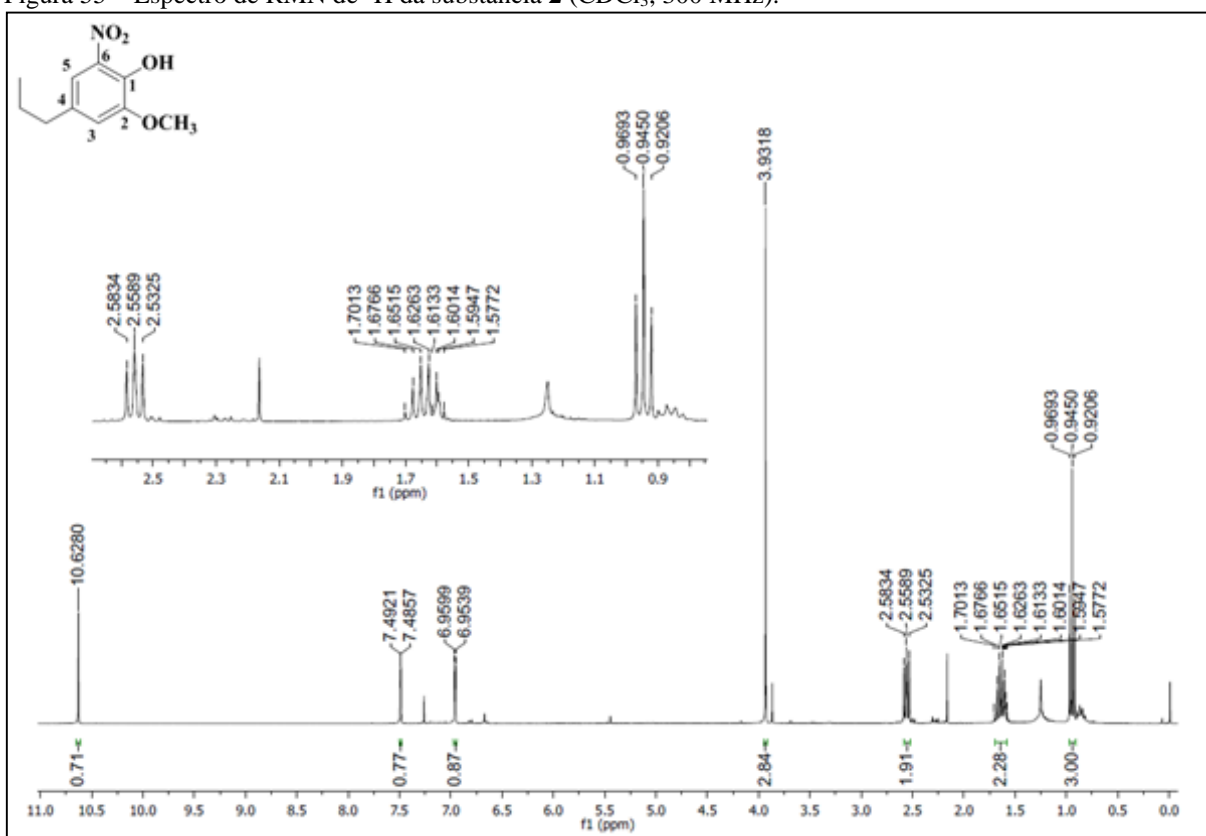
Fonte: Da autora.

Figura 54 – Espectro de absorção na região do IV da substância **HAB 8** (cm^{-1}).



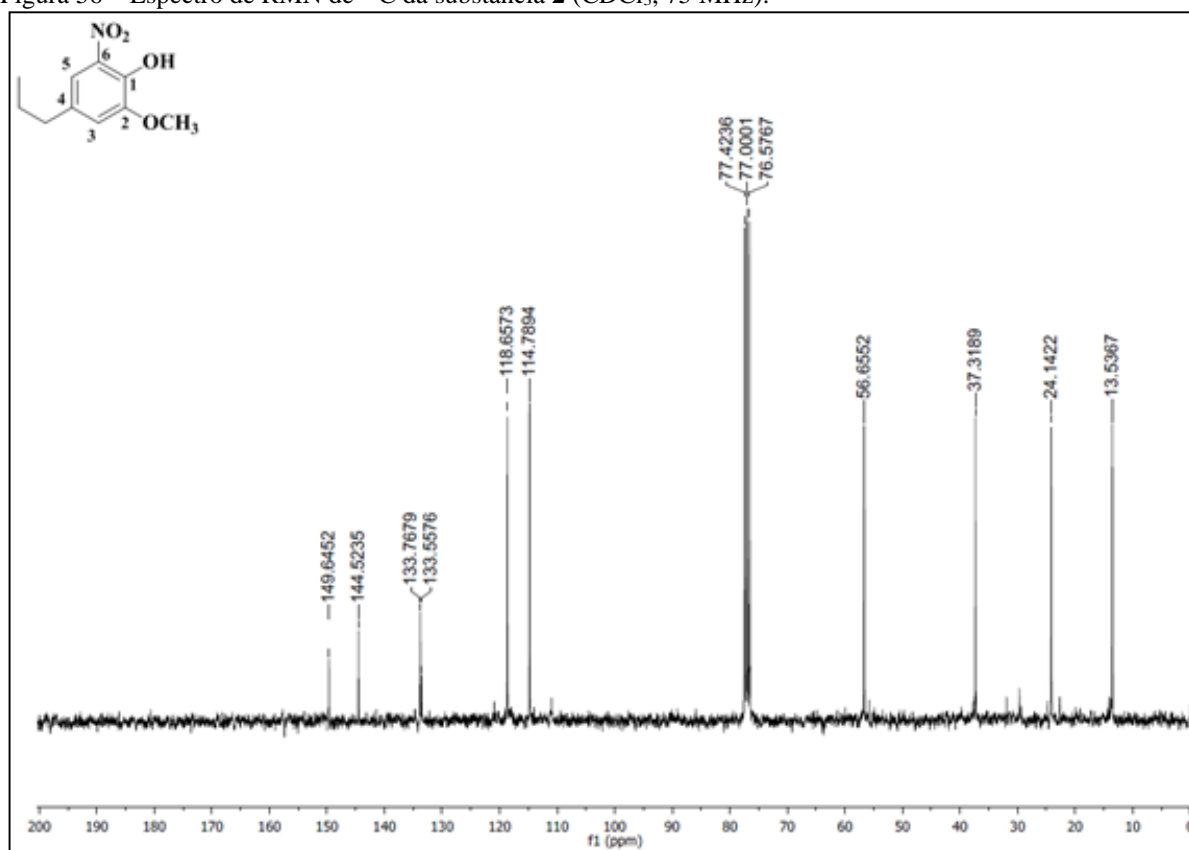
Fonte: Da autora.

Figura 55 – Espectro de RMN de ^1H da substância **2** (CDCl_3 , 300 MHz).



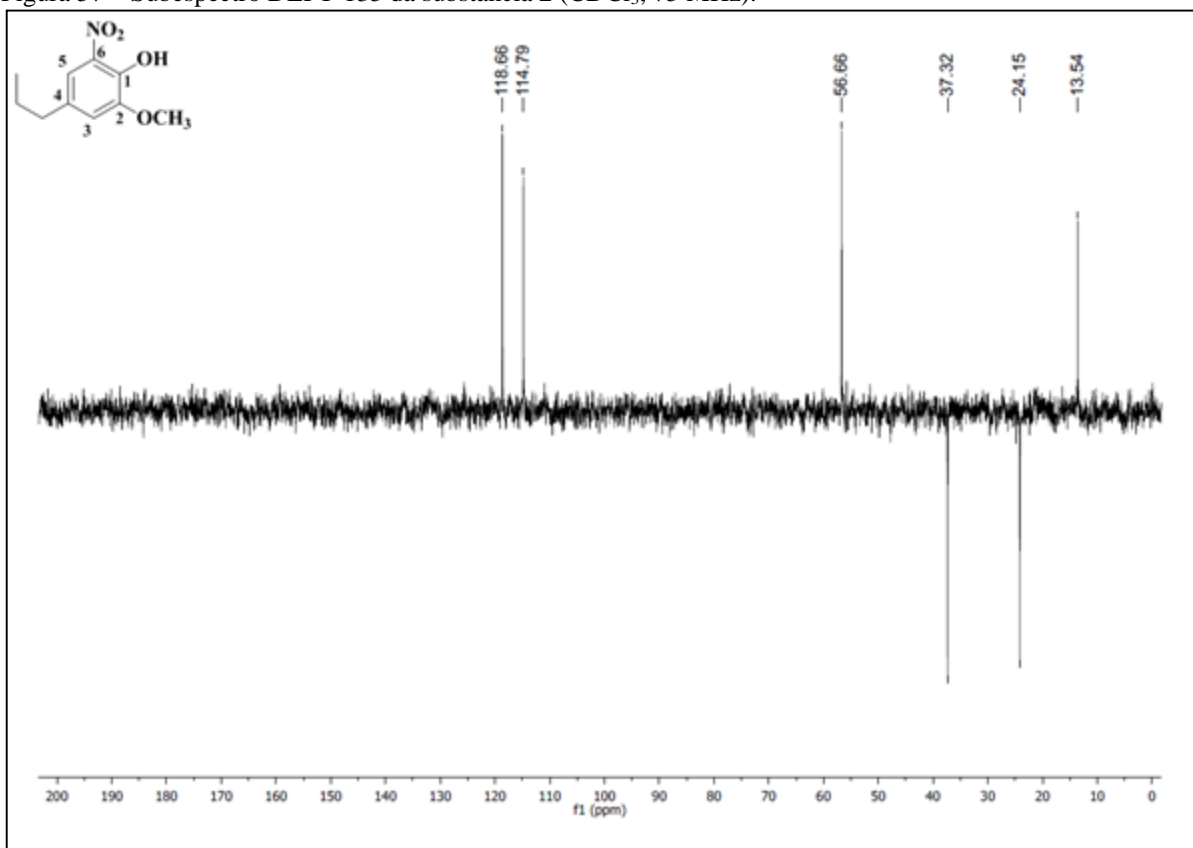
Fonte: Da autora.

Figura 56 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **2** (CDCl_3 , 75 MHz).



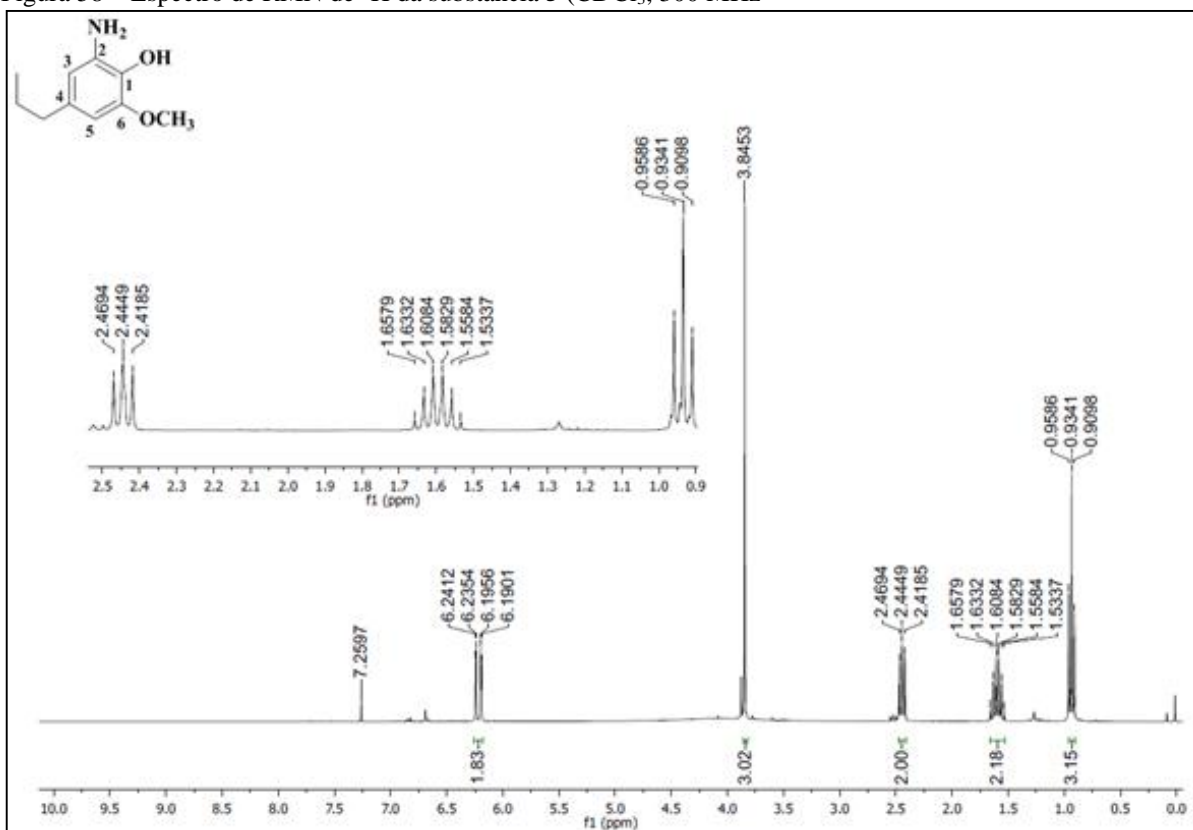
Fonte: Da autora

Figura 57 – Subespectro DEPT-135 da substância **2** (CDCl₃, 75 MHz).



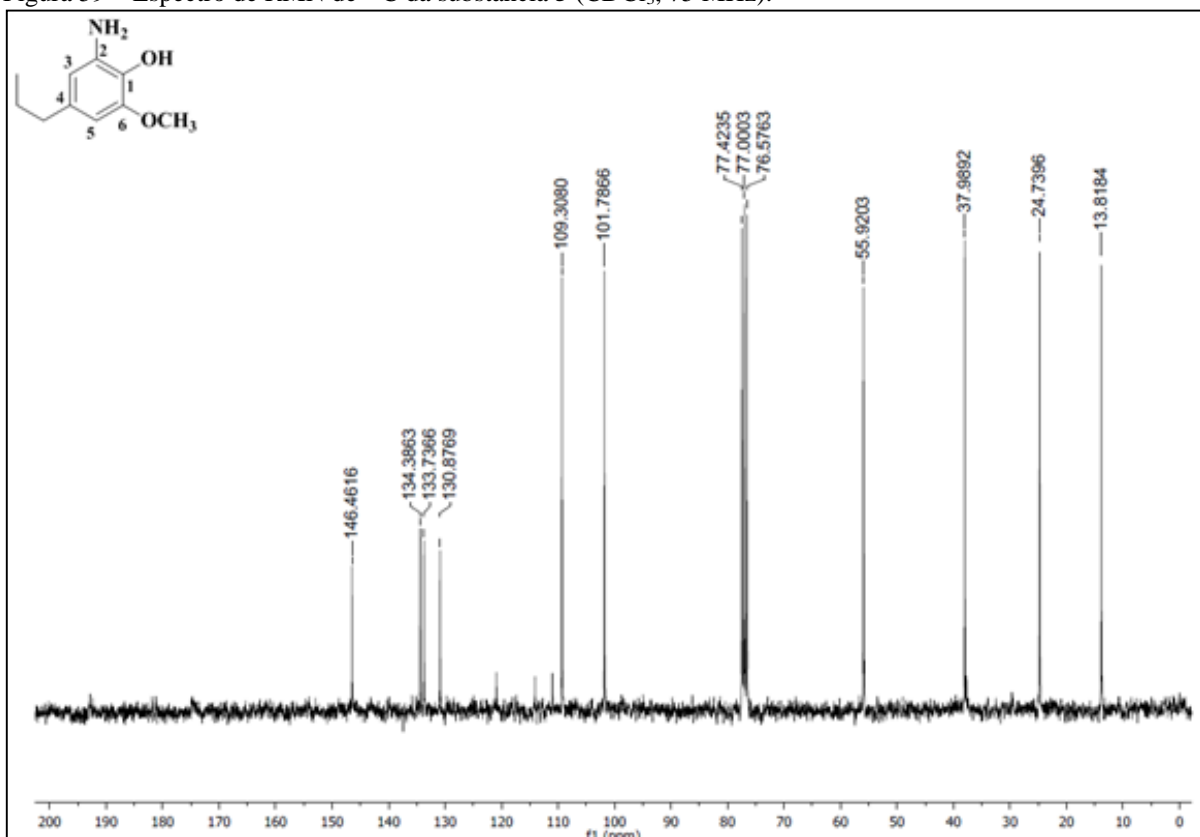
Fonte: Da autora.

Figura 58 – Espectro de RMN de ¹H da substância **5** (CDCl₃, 300 MHz)



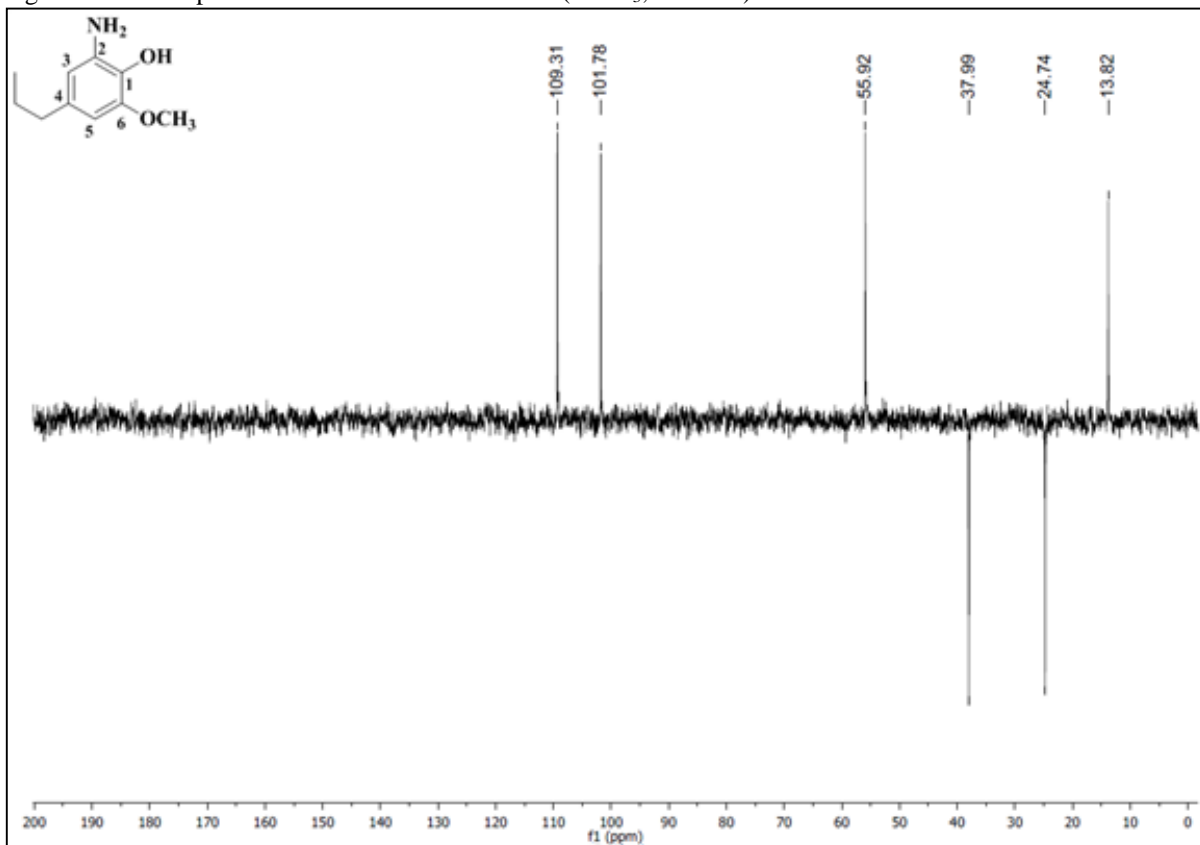
Fonte: Da autora.

Figura 59 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **5** (CDCl_3 , 75 MHz).

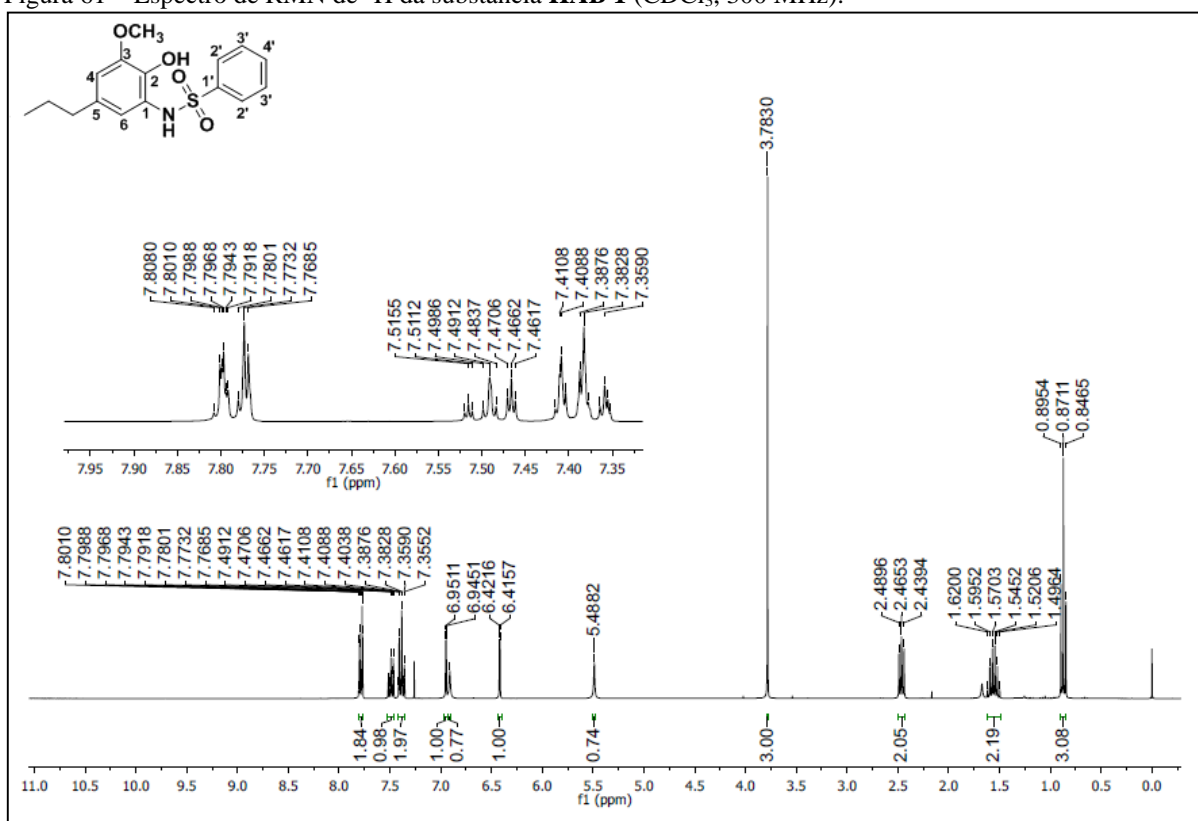


Fonte: Da autora.

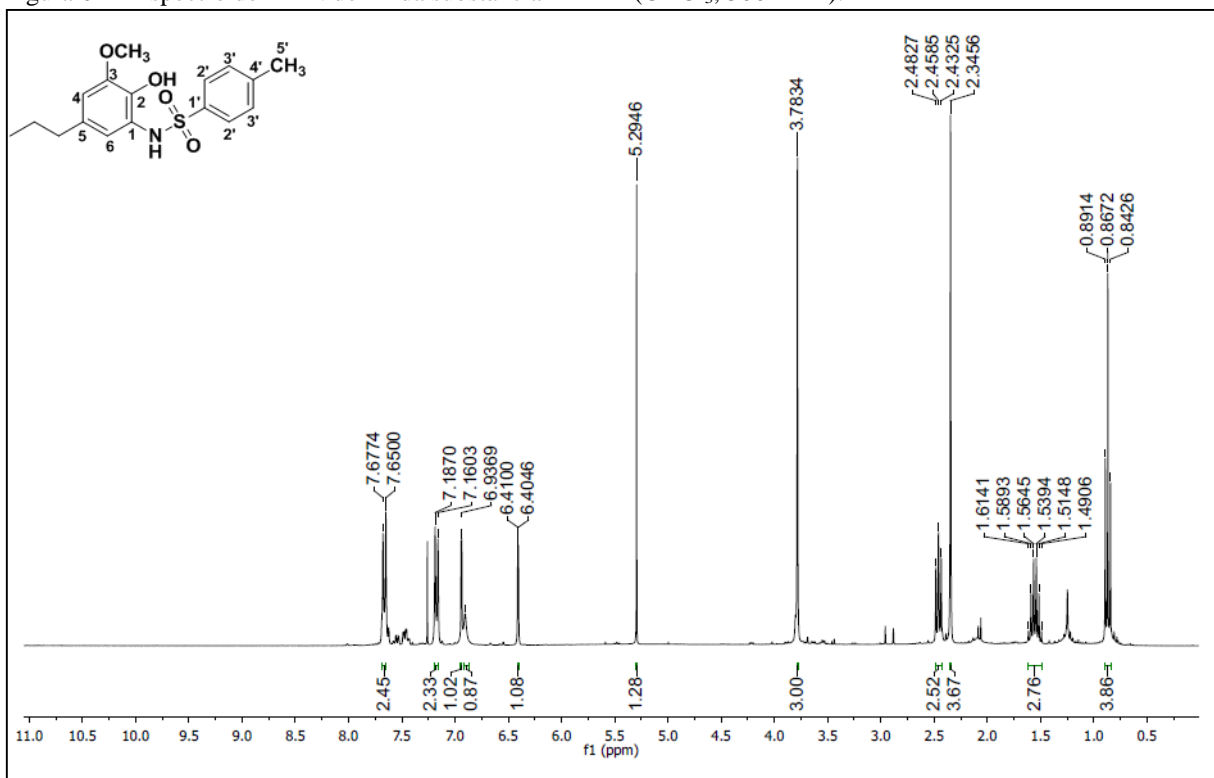
Figura 60 – Subespectro DEPT-135 da substância **5** (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Da autora.

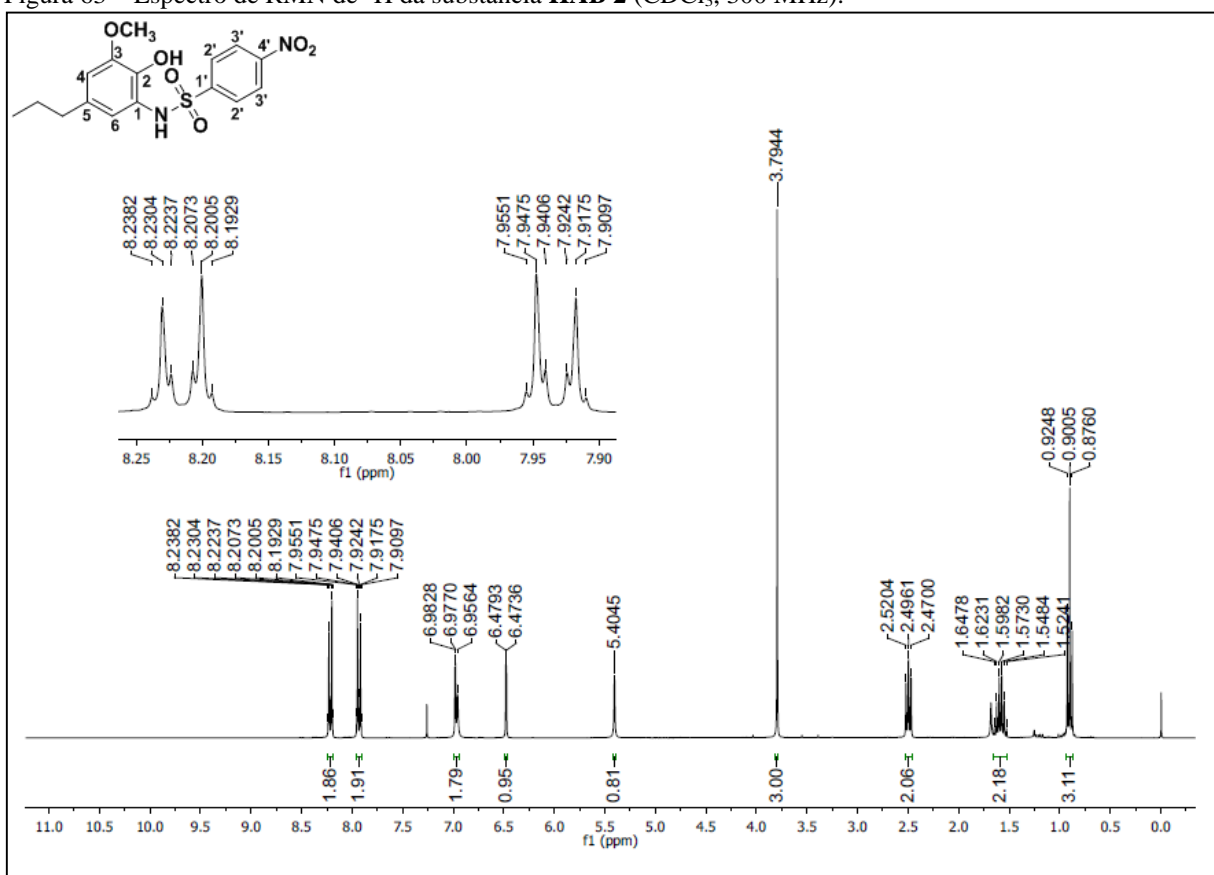
Figura 61 – Espectro de RMN de ^1H da substância **HAB 1** (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 62 – Espectro de RMN de ^1H da substância **HAB 4** (CDCl_3 , 300 MHz).

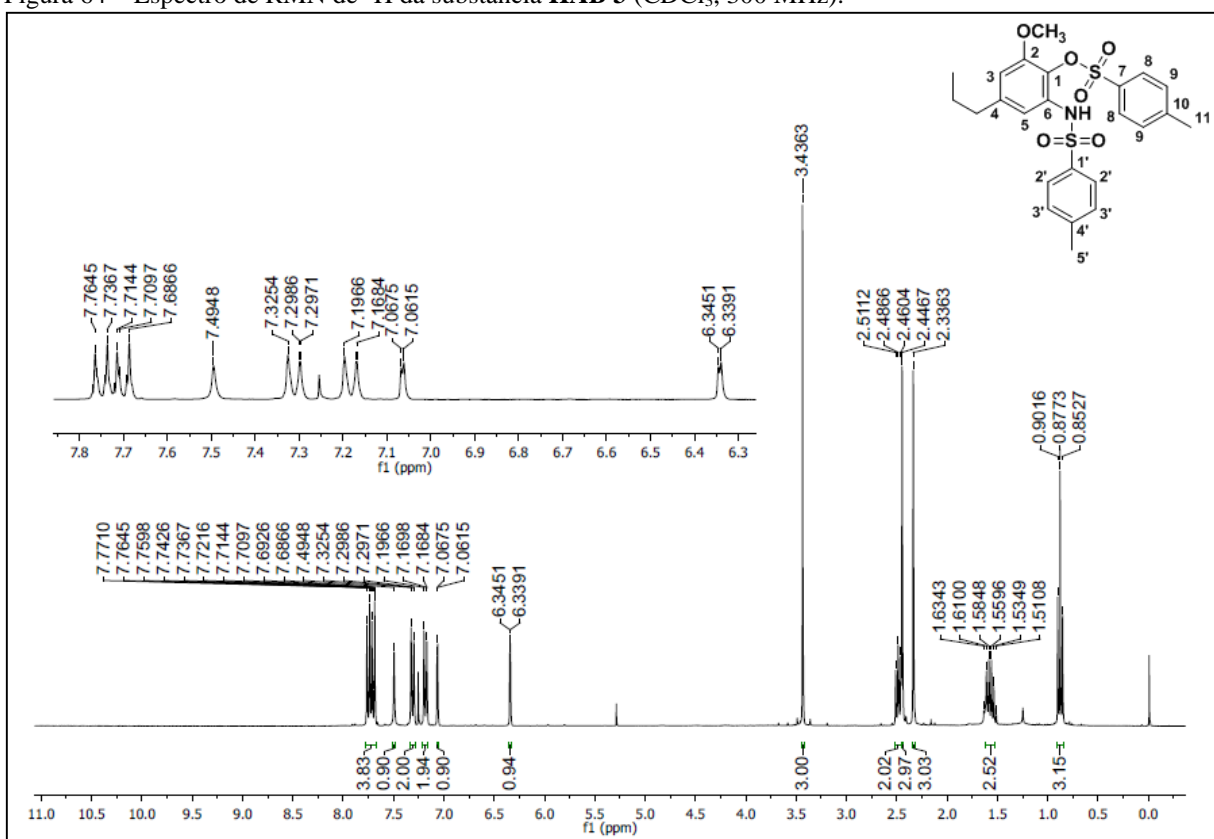
Fonte: Da autora.

Figura 63 – Espectro de RMN de ^1H da substância **HAB 2** (CDCl_3 , 300 MHz).



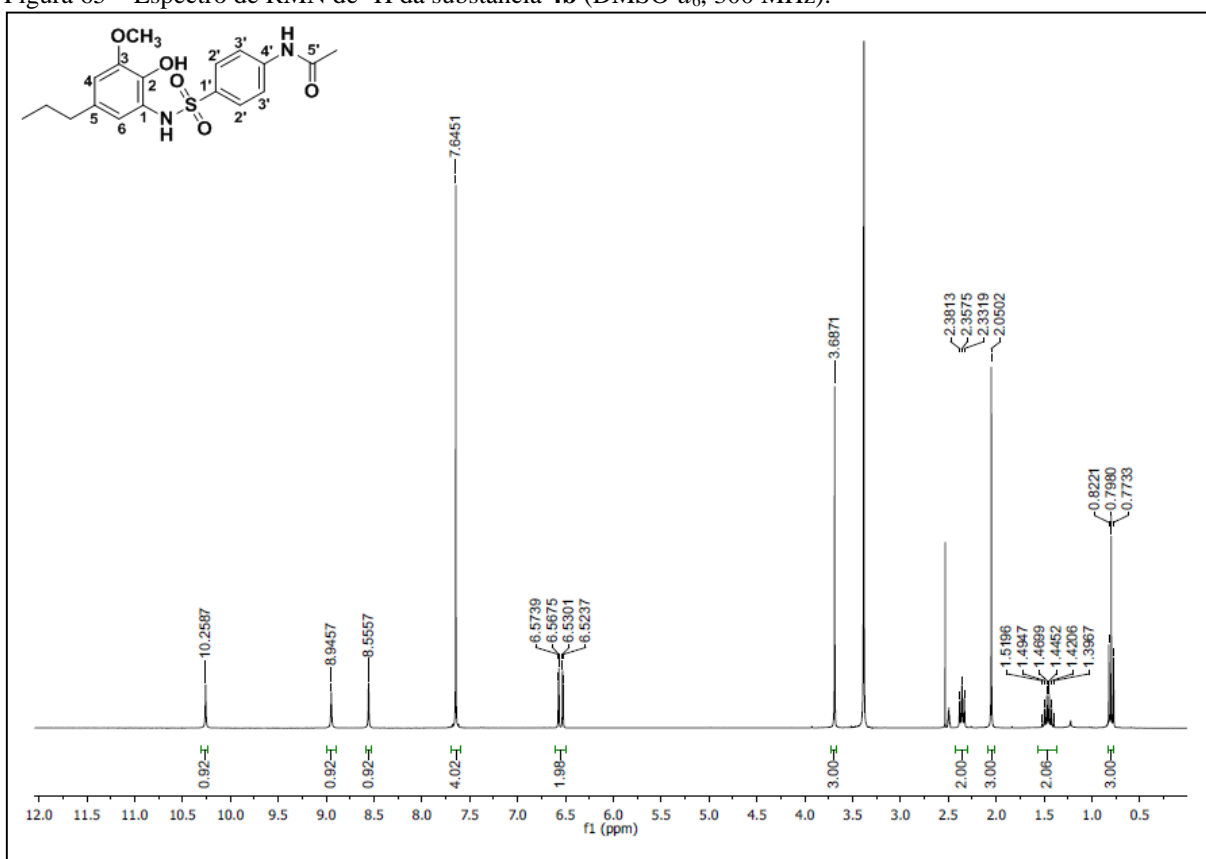
Fonte: Da autora.

Figura 64 – Espectro de RMN de ^1H da substância **HAB 3** (CDCl_3 , 300 MHz).



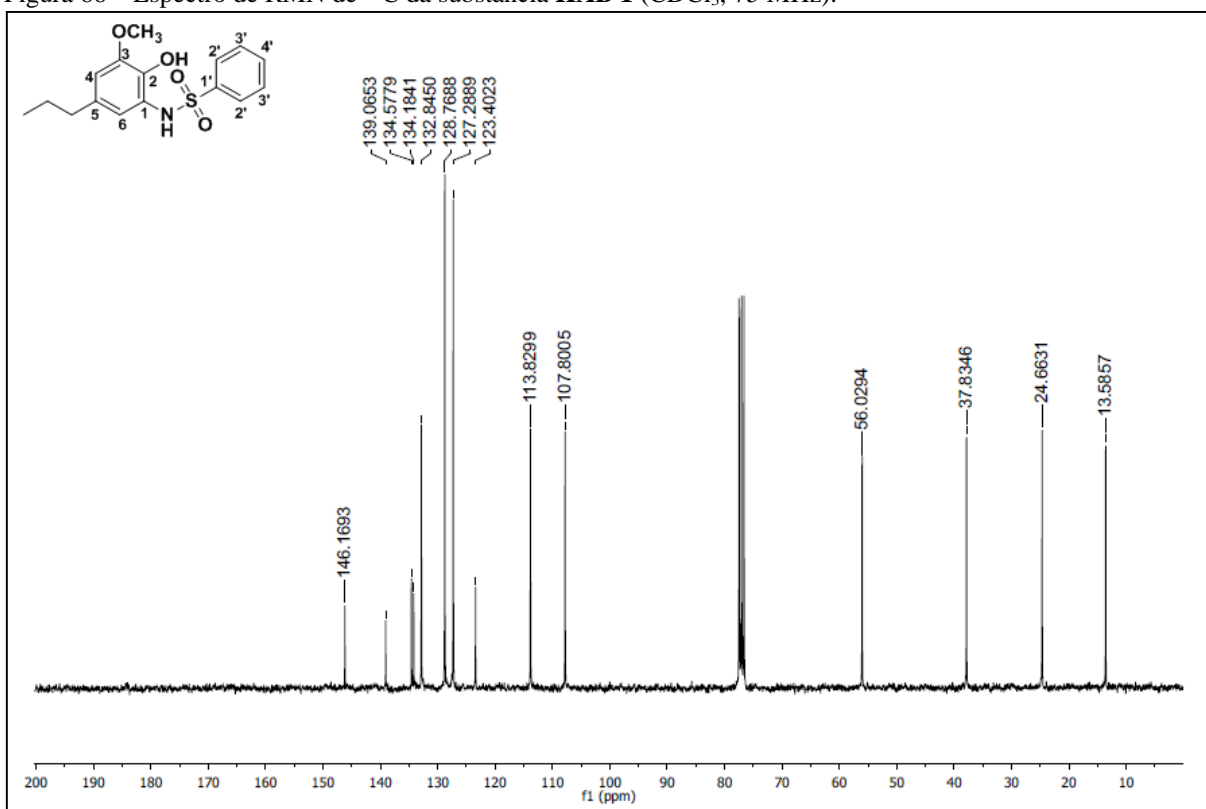
Fonte: Da autora.

Figura 65 – Espectro de RMN de ^1H da substância **4b** ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz).



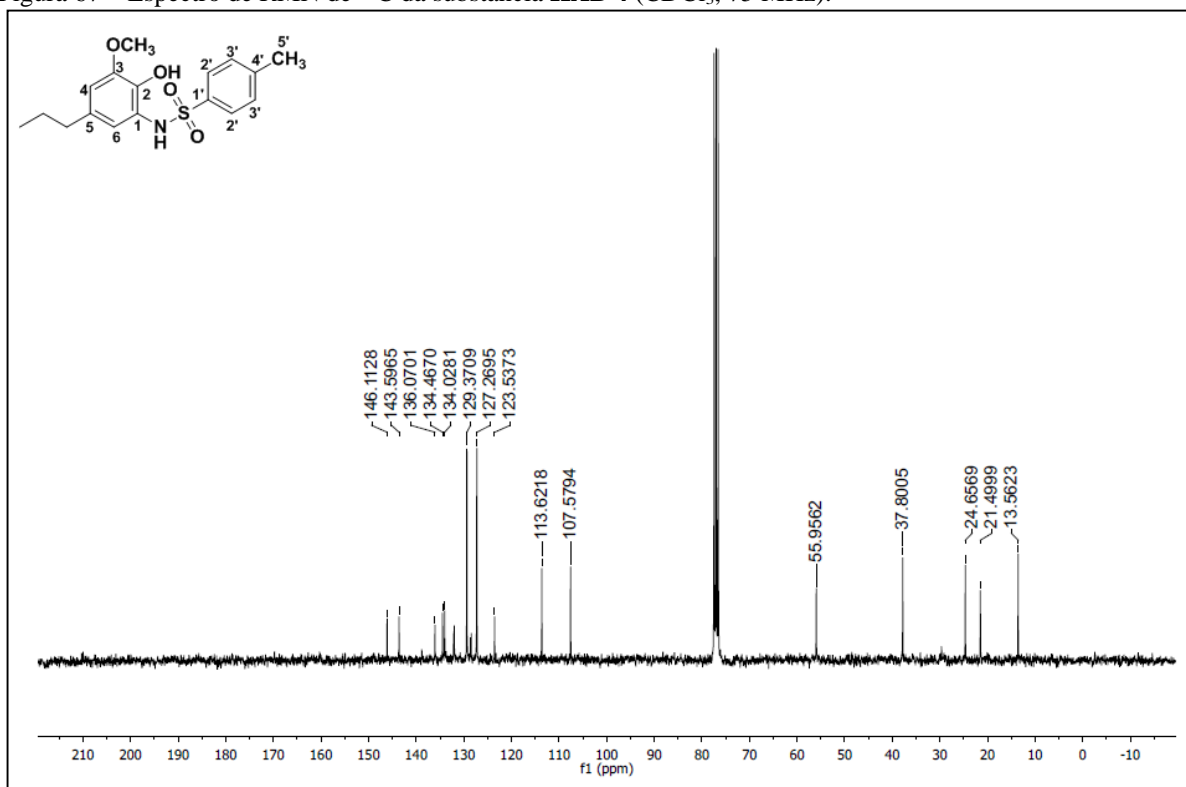
Fonte: Da autora.

Figura 66 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **HAB 1** (CDCl_3 , 75 MHz).



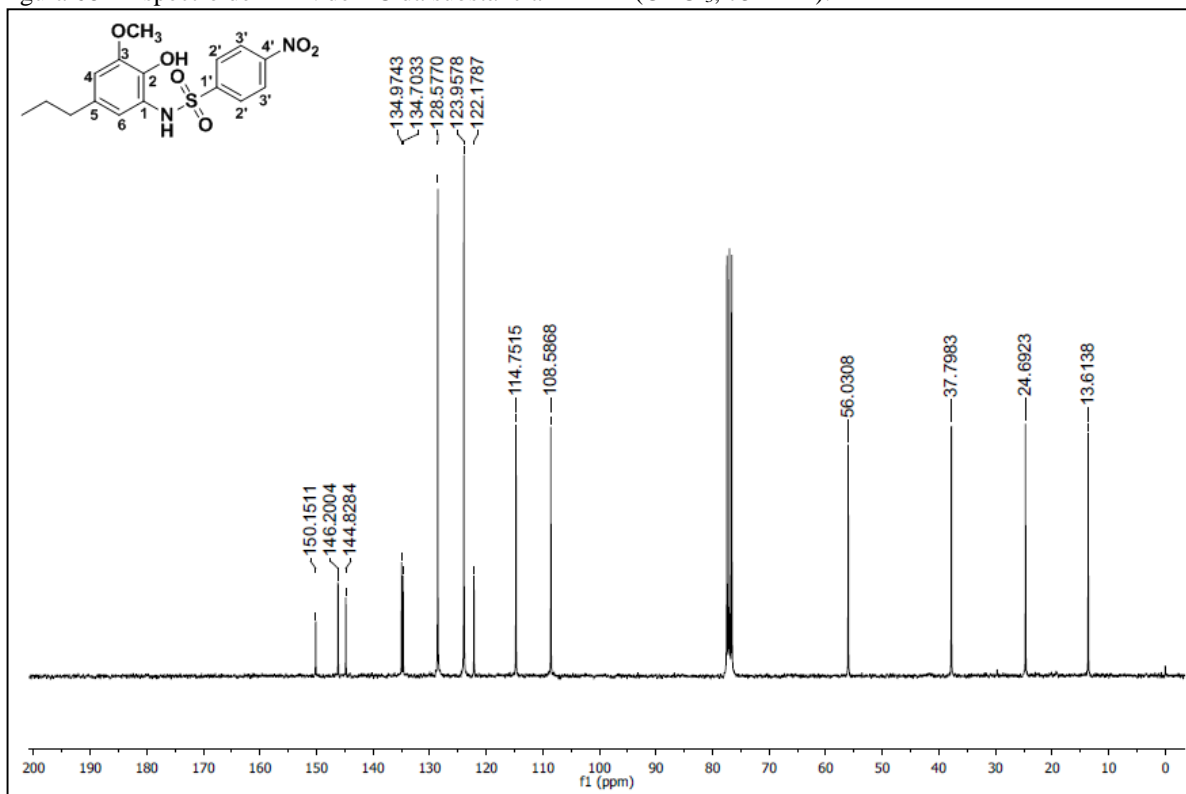
Fonte: Da autora.

Figura 67 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **HAB 4** (CDCl_3 , 75 MHz).



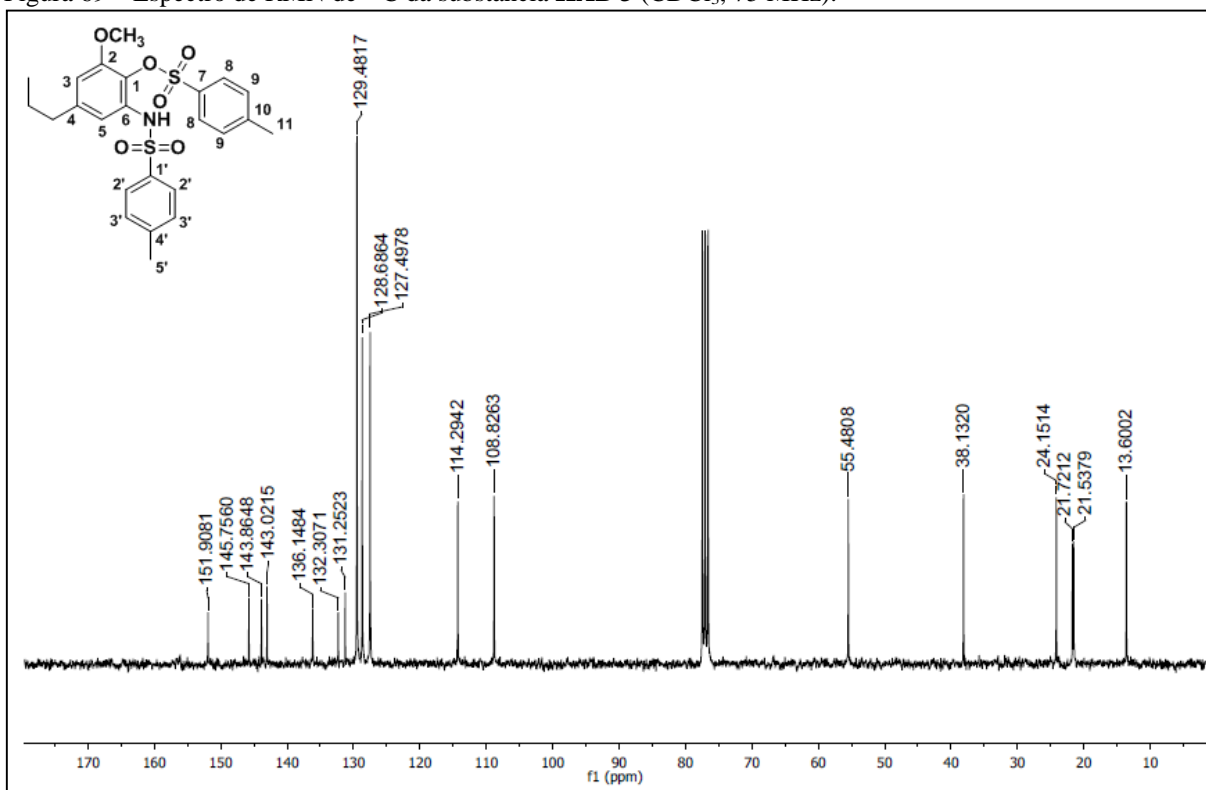
Fonte: Da autora.

Figura 68 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **HAB 2** (CDCl_3 , 75 MHz).



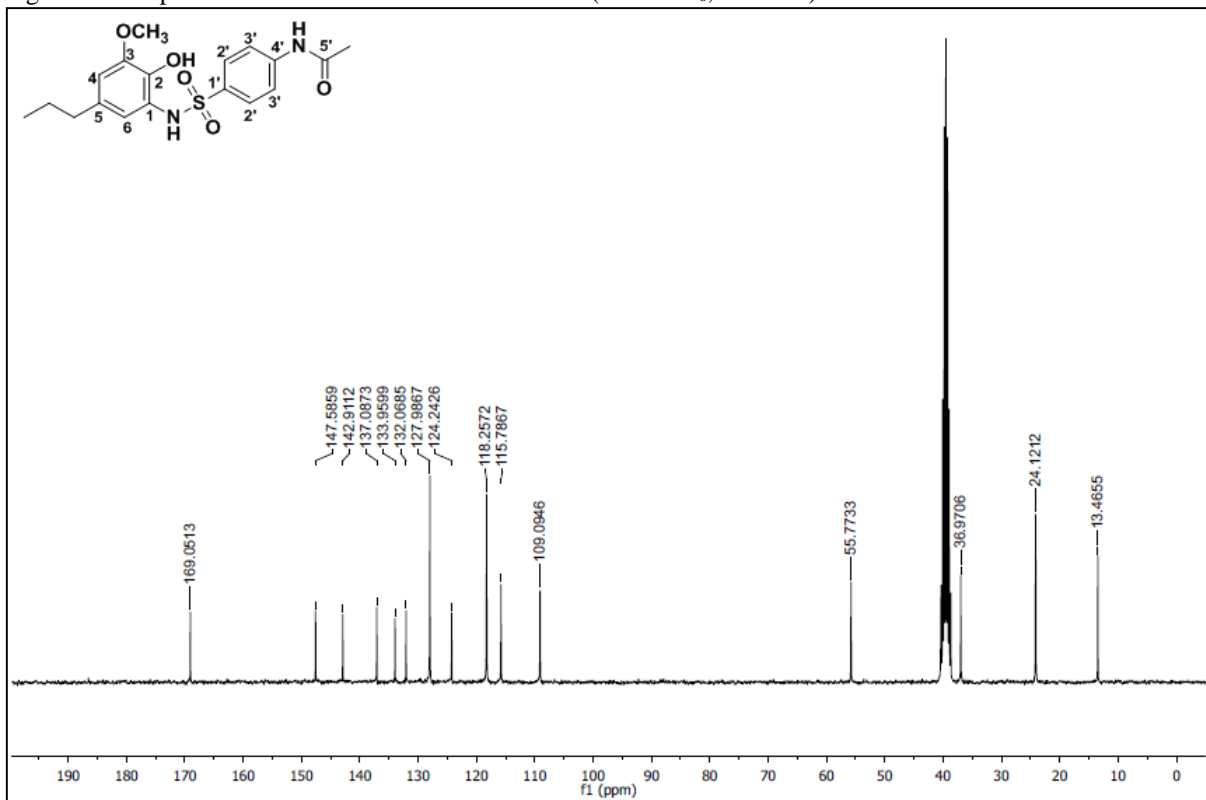
Fonte: Da autora.

Figura 69 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **HAB 3** (CDCl_3 , 75 MHz).



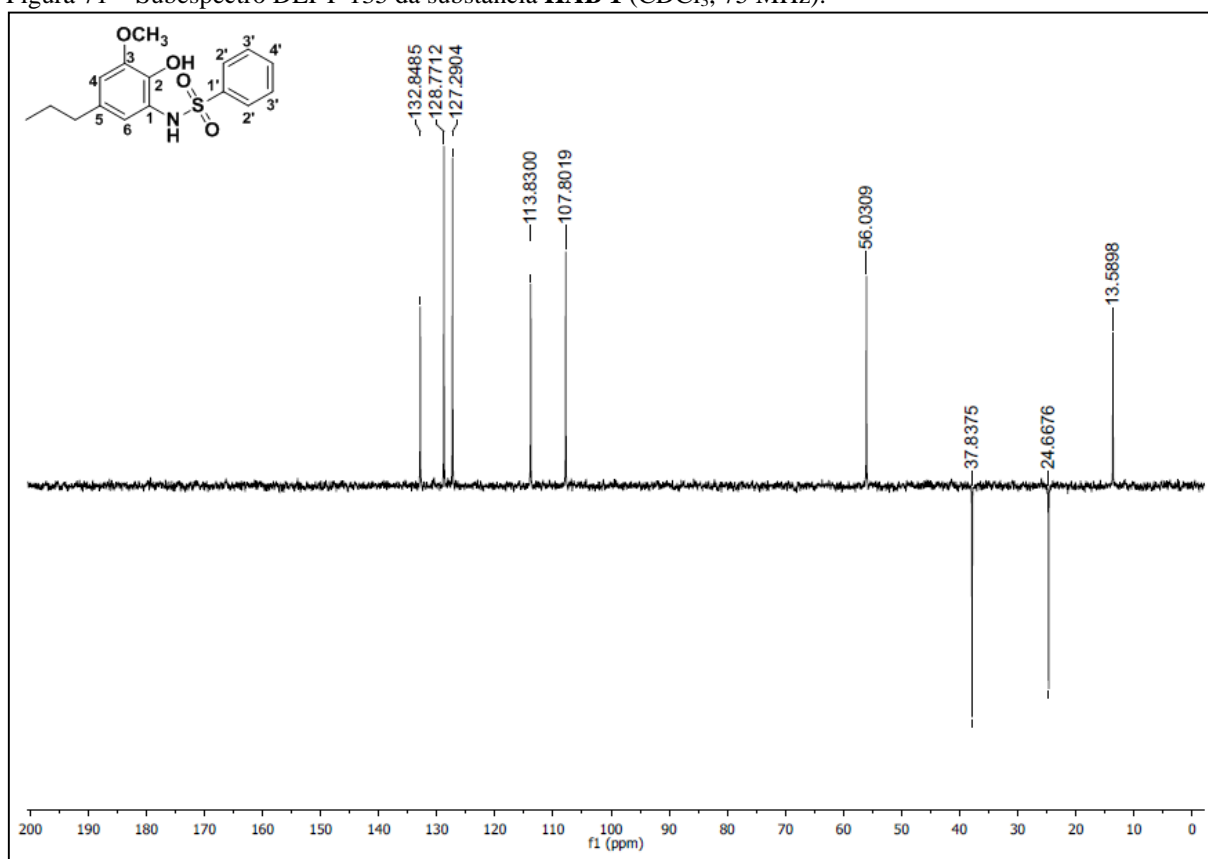
Fonte: Da autora.

Figura 70 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **4b** ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz).



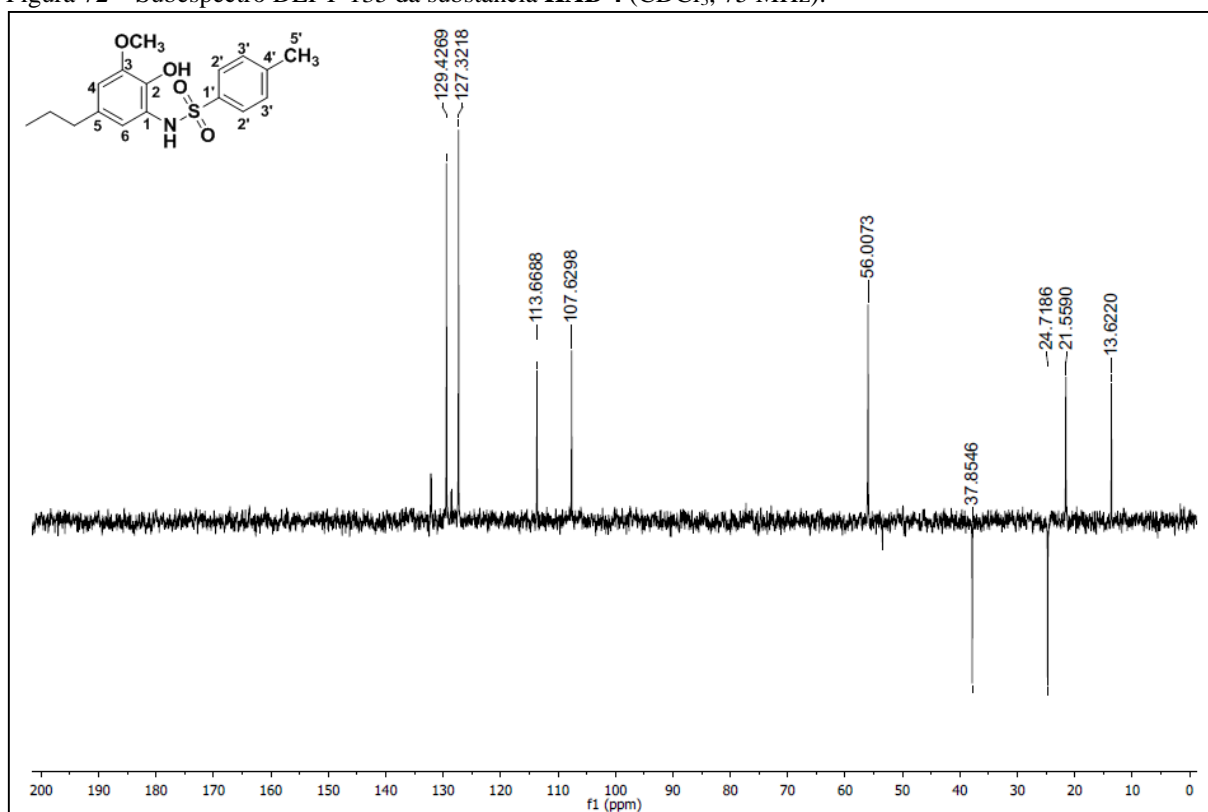
Fonte: Da autora.

Figura 71 – Subespectro DEPT-135 da substância **HAB 1** (CDCl₃, 75 MHz).



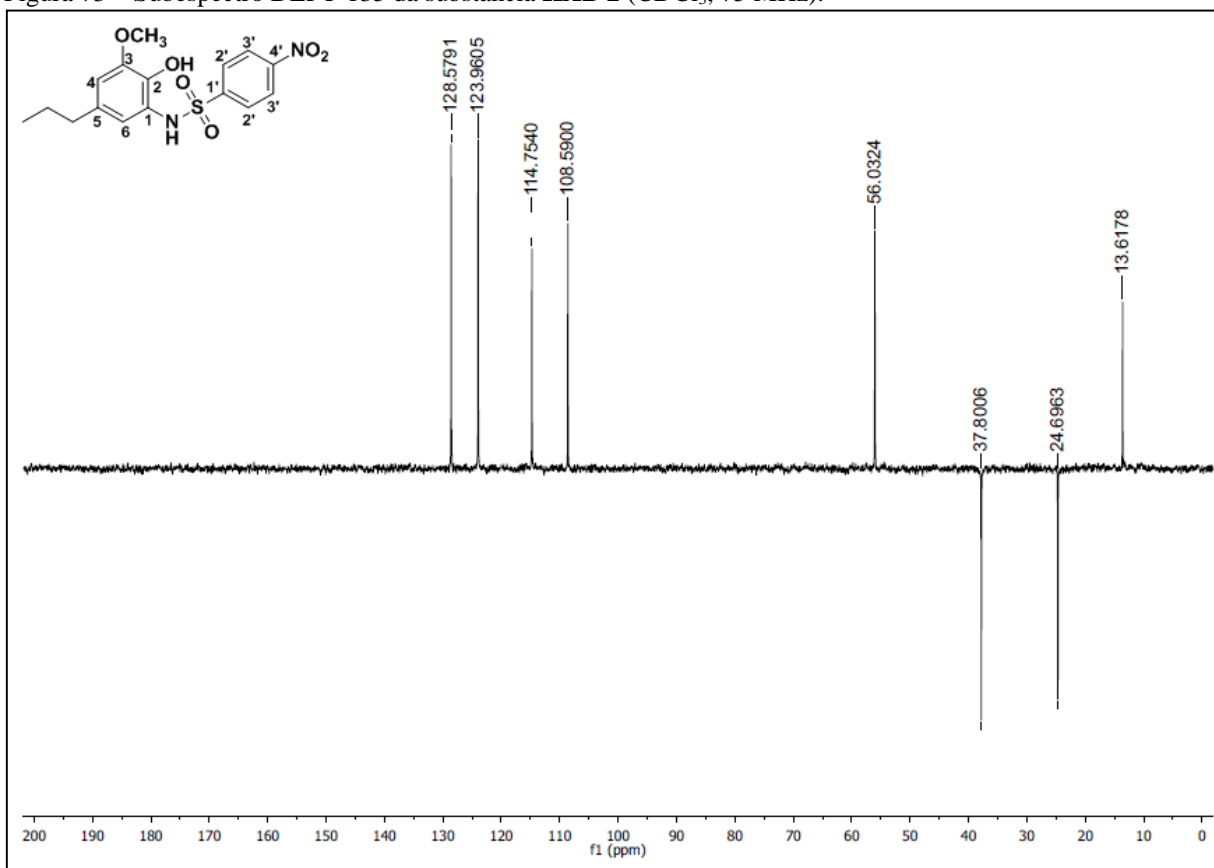
Fonte: Da autora.

Figura 72 – Subespectro DEPT-135 da substância **HAB 4** (CDCl₃, 75 MHz).



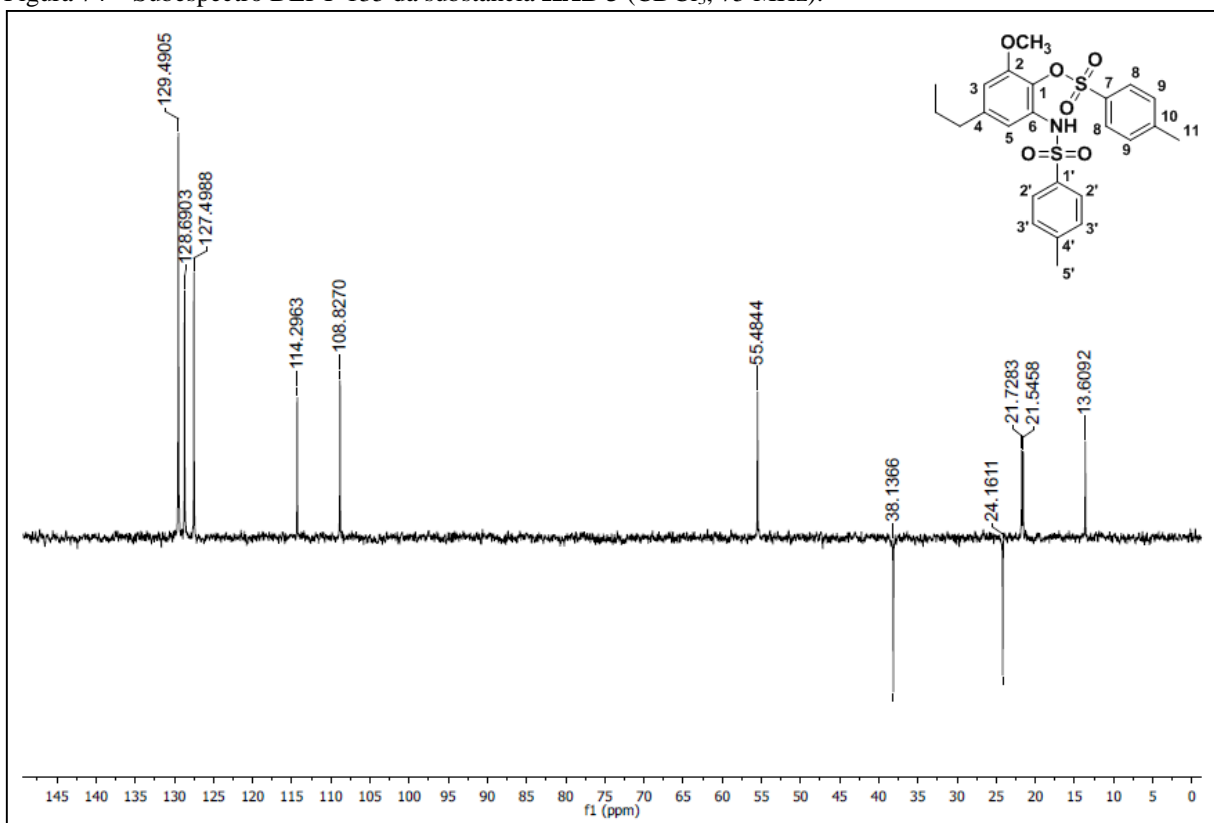
Fonte: Da autora.

Figura 73 – Subespectro DEPT-135 da substância **HAB 2** (CDCl₃, 75 MHz).



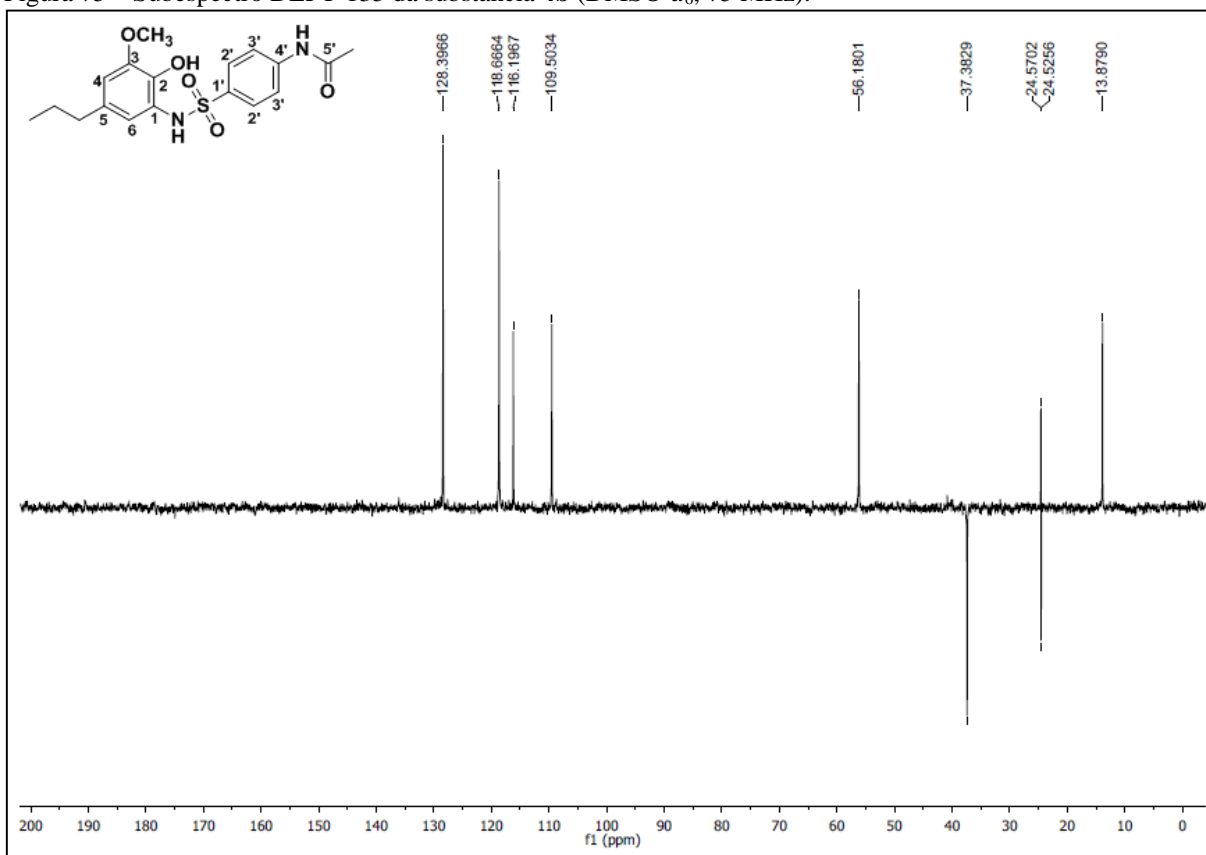
Fonte: Da autora.

Figura 74 – Subespectro DEPT-135 da substância **HAB 3** (CDCl₃, 75 MHz).



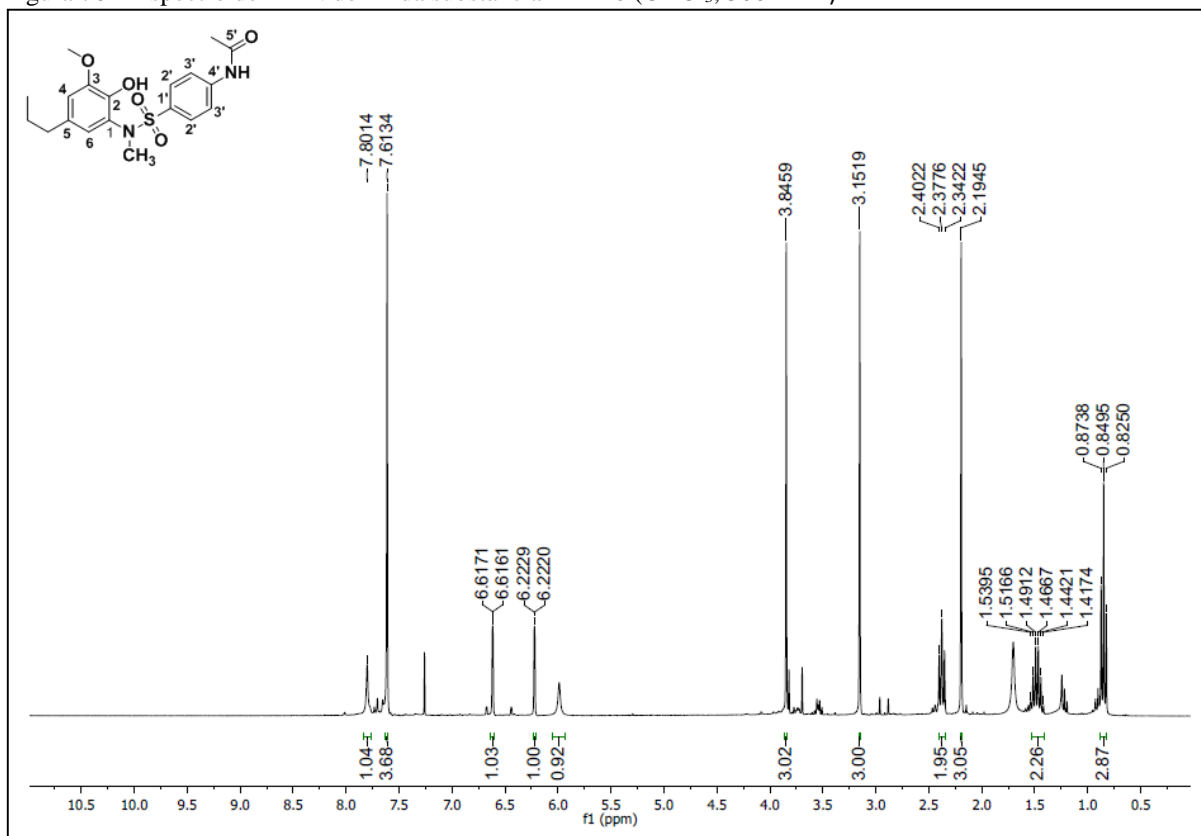
Fonte: Da autora.

Figura 75 – Subespectro DEPT-135 da substância **4b** (DMSO-*d*₆, 75 MHz).



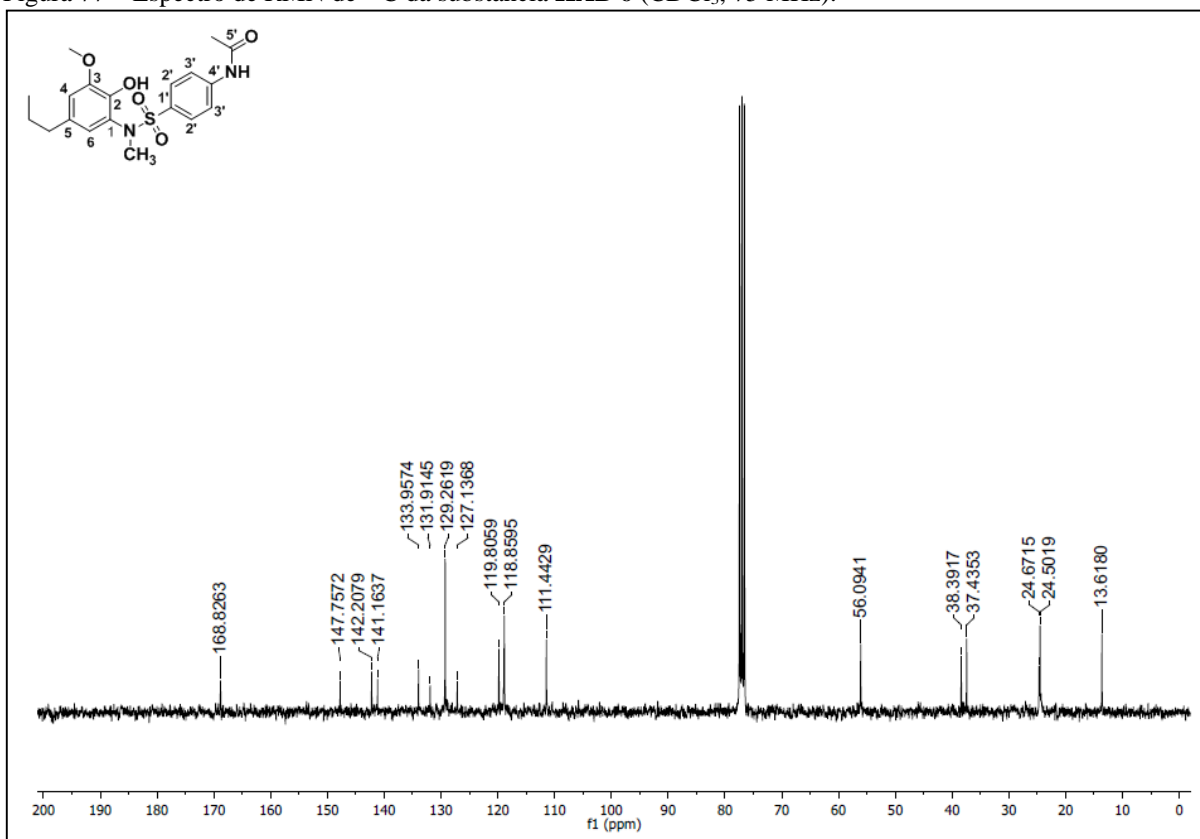
Fonte: Da autora.

Figura 76 – Espectro de RMN de ¹H da substância **HAB 6** (CDCl₃, 300 MHz).



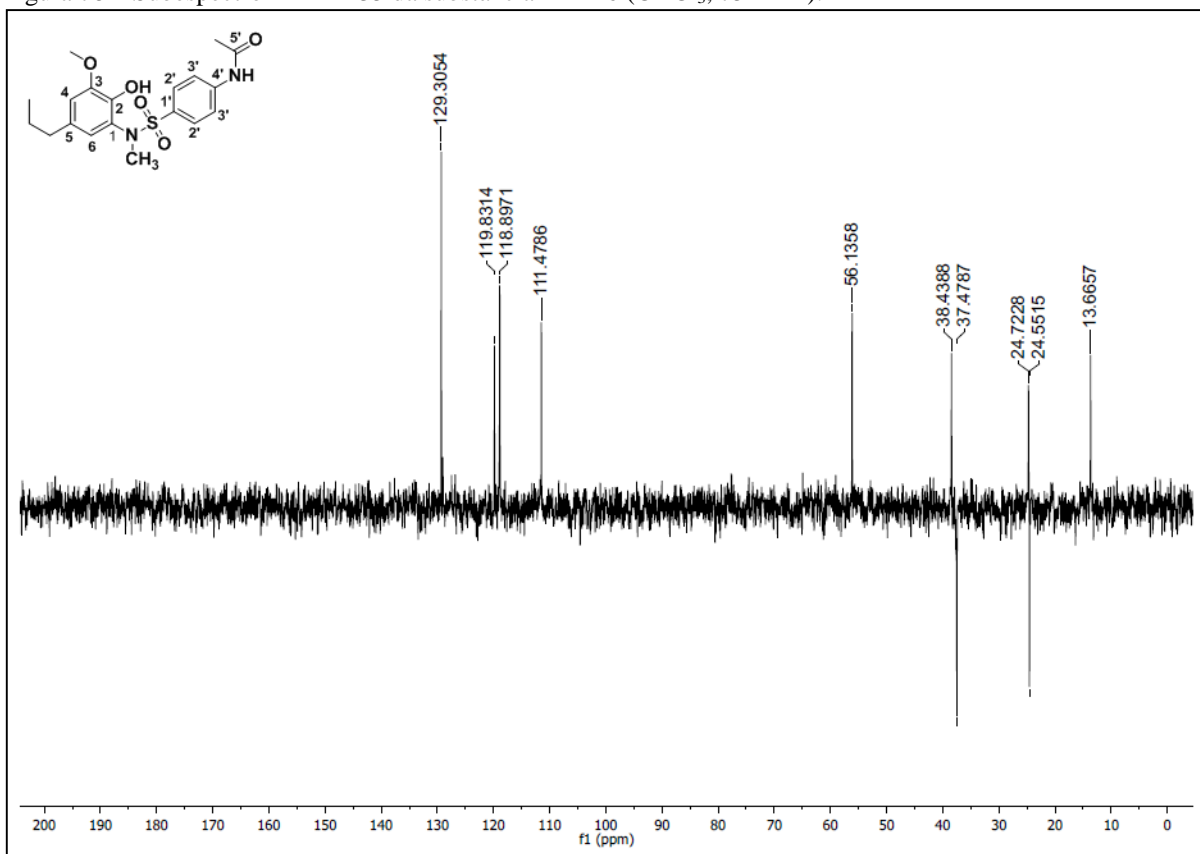
Fonte: Da autora.

Figura 77 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **HAB 6** (CDCl_3 , 75 MHz).



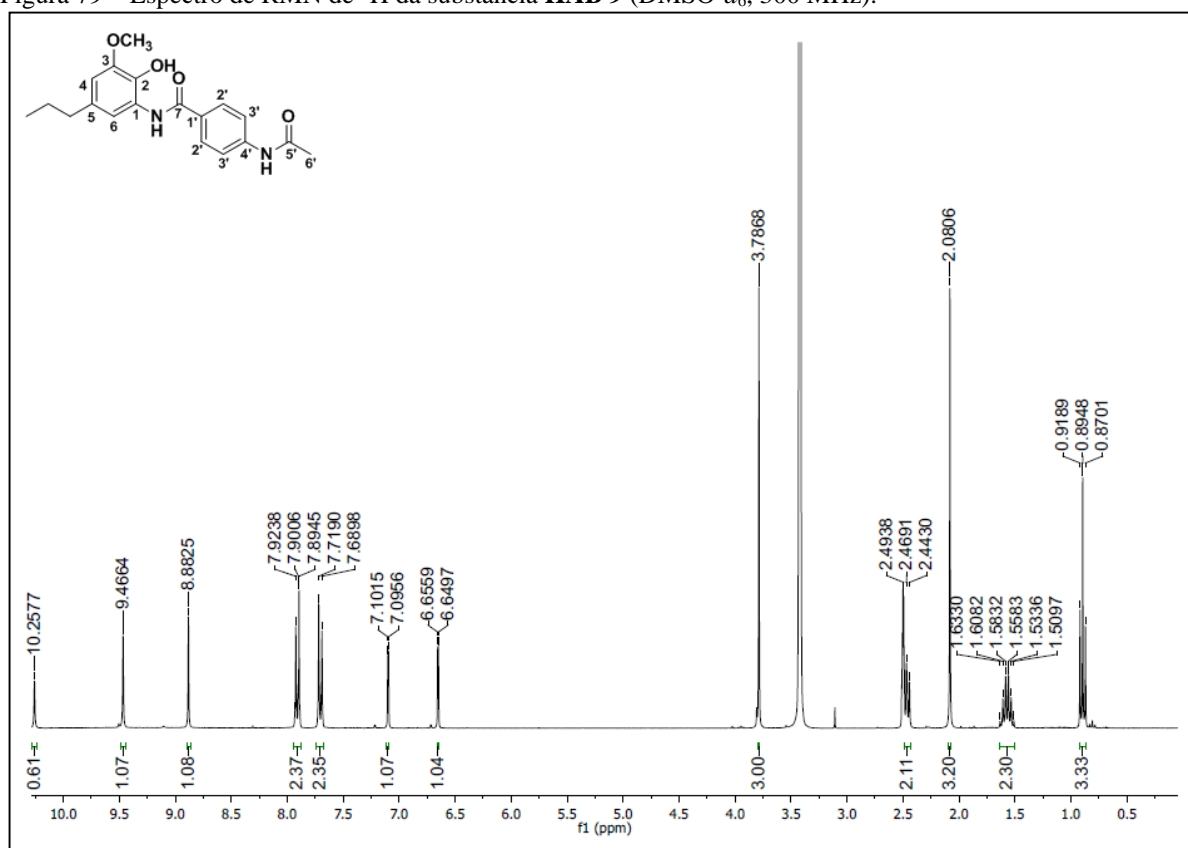
Fonte: Da autora.

Figura 78 – Subespectro DEPT-135 da substância **HAB 6** (CDCl_3 , 75 MHz).



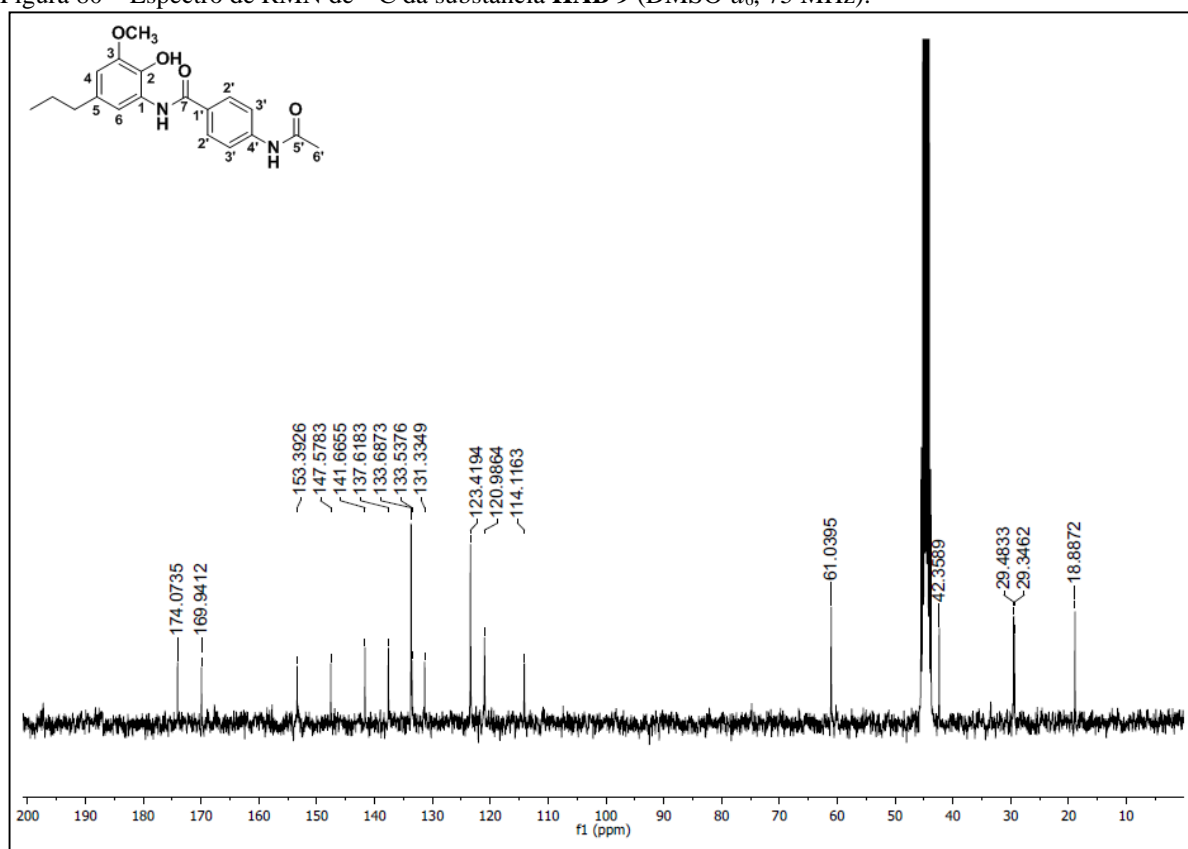
Fonte: Da autora.

Figura 79 – Espectro de RMN de ^1H da substância **HAB 9** (DMSO- d_6 , 300 MHz).



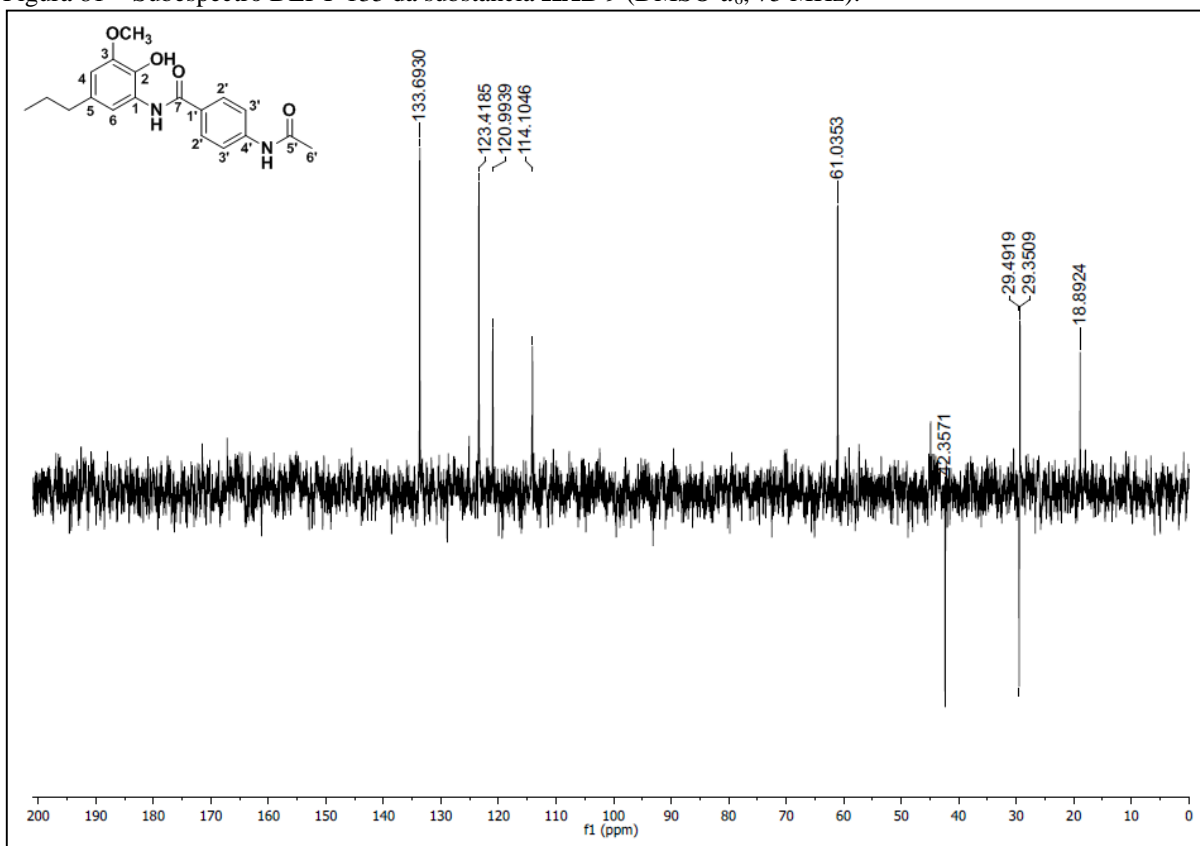
Fonte: Da autora.

Figura 80 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **HAB 9** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



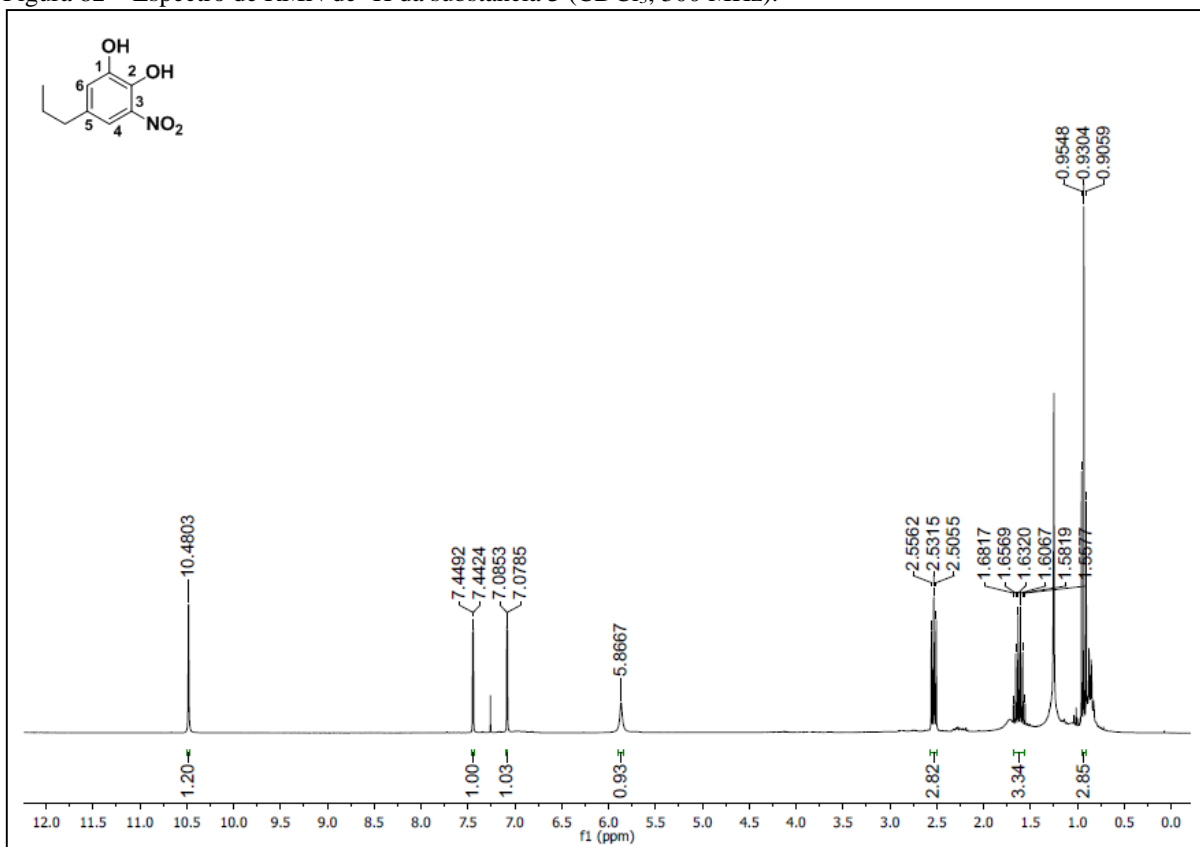
Fonte: Da autora.

Figura 81 – Subespectro DEPT-135 da substância **HAB 9** (DMSO-*d*₆, 75 MHz).

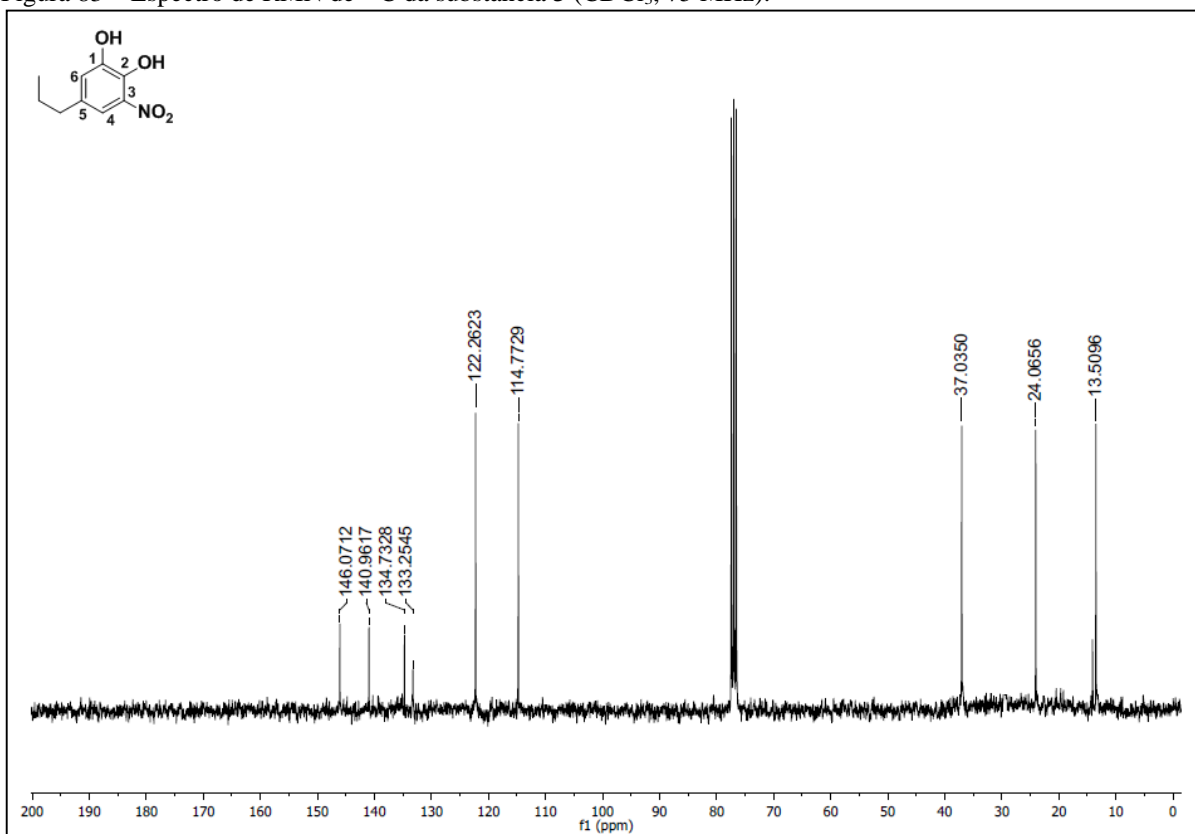


Fonte: Da autora.

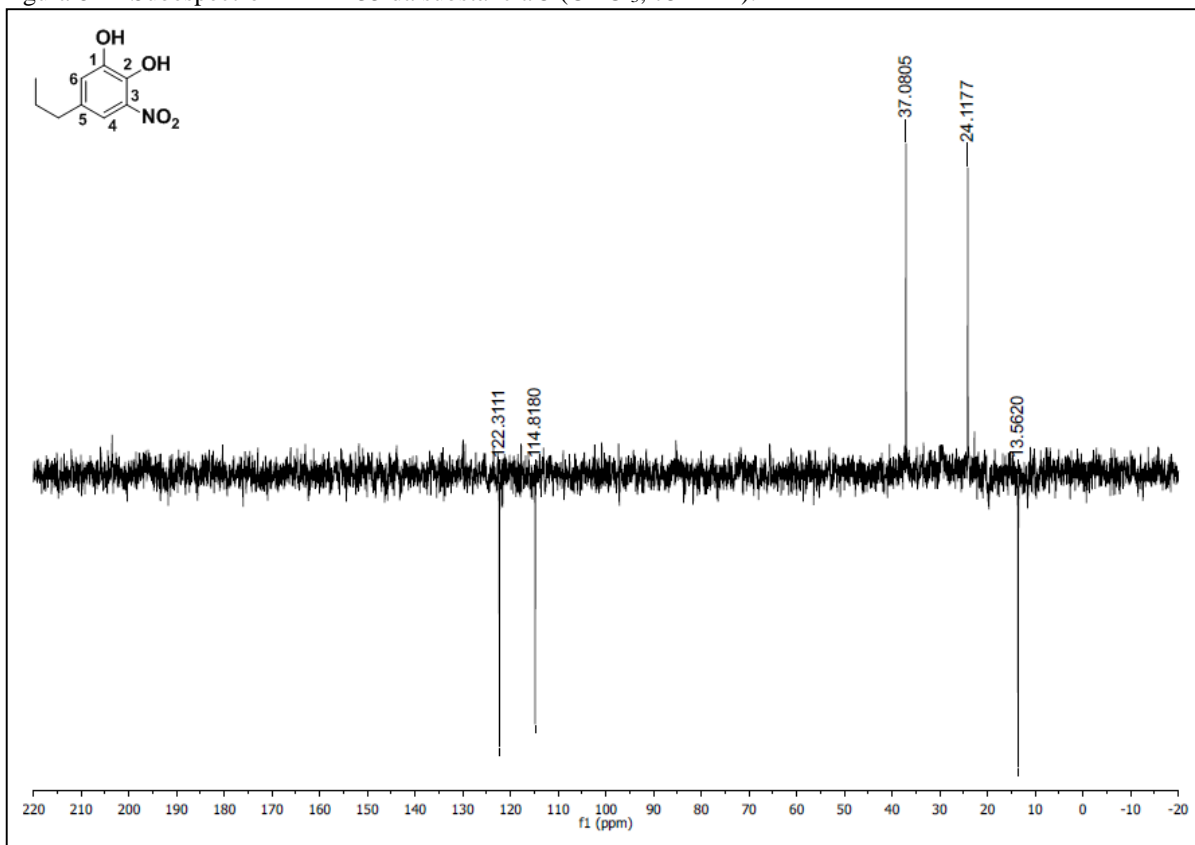
Figura 82 – Espectro de RMN de ¹H da substância **3** (CDCl₃, 300 MHz).



Fonte: Da autora.

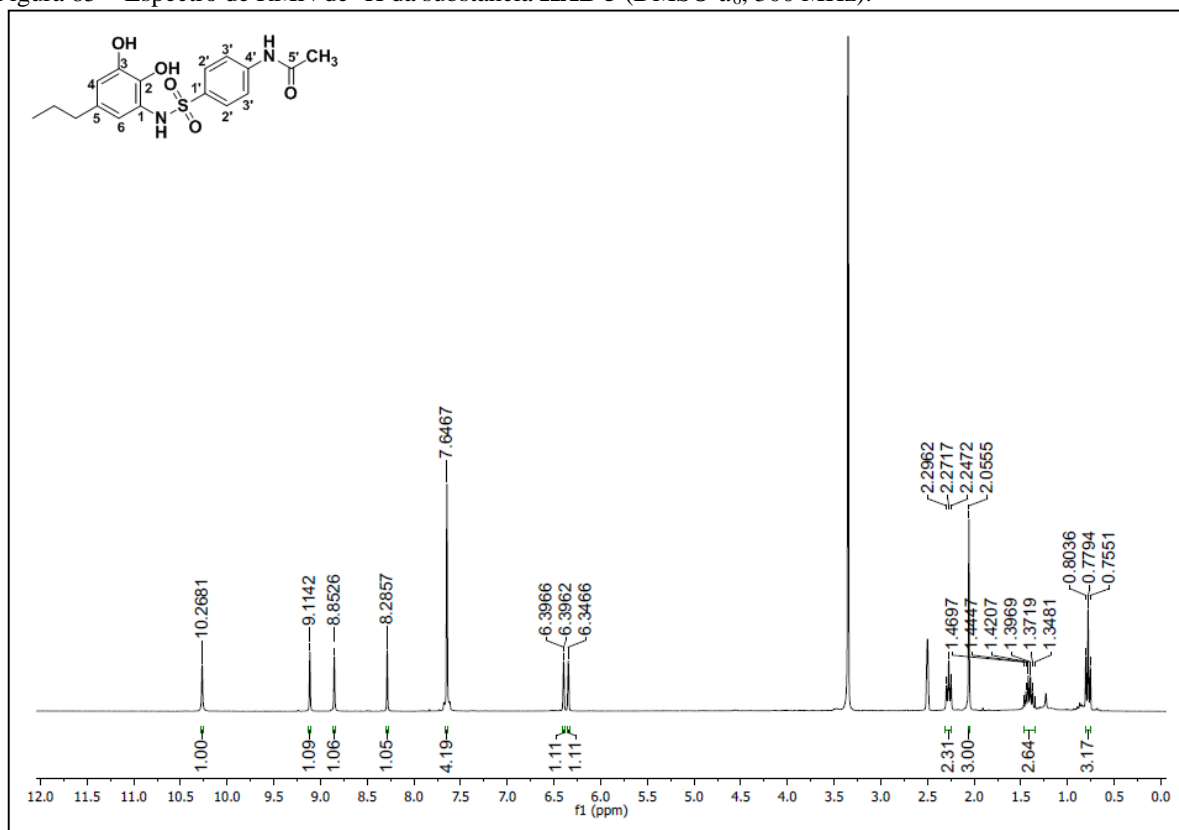
Figura 83 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **3** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 84 – Subespectro DEPT-135 da substância **3** (CDCl_3 , 75 MHz).

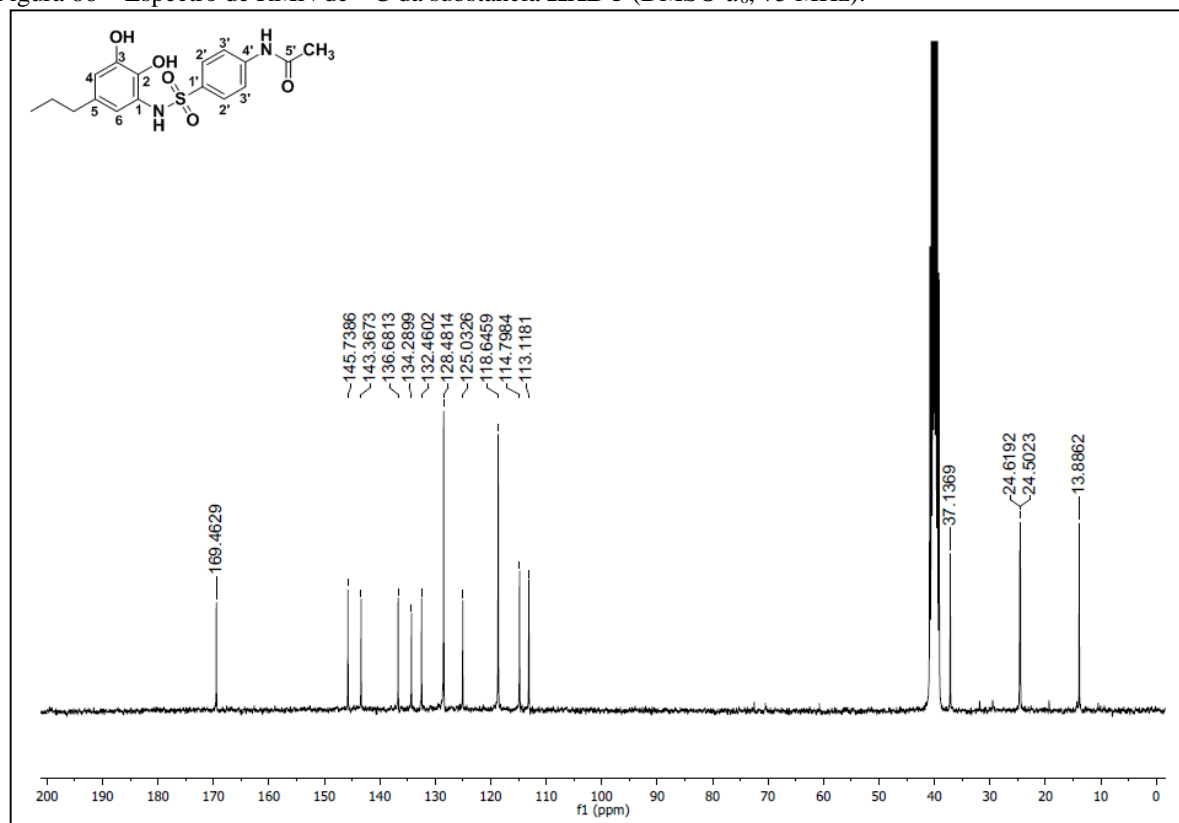
Fonte: Da autora.

Figura 85 – Espectro de RMN de ^1H da substância **HAB 5** (DMSO- d_6 , 300 MHz).

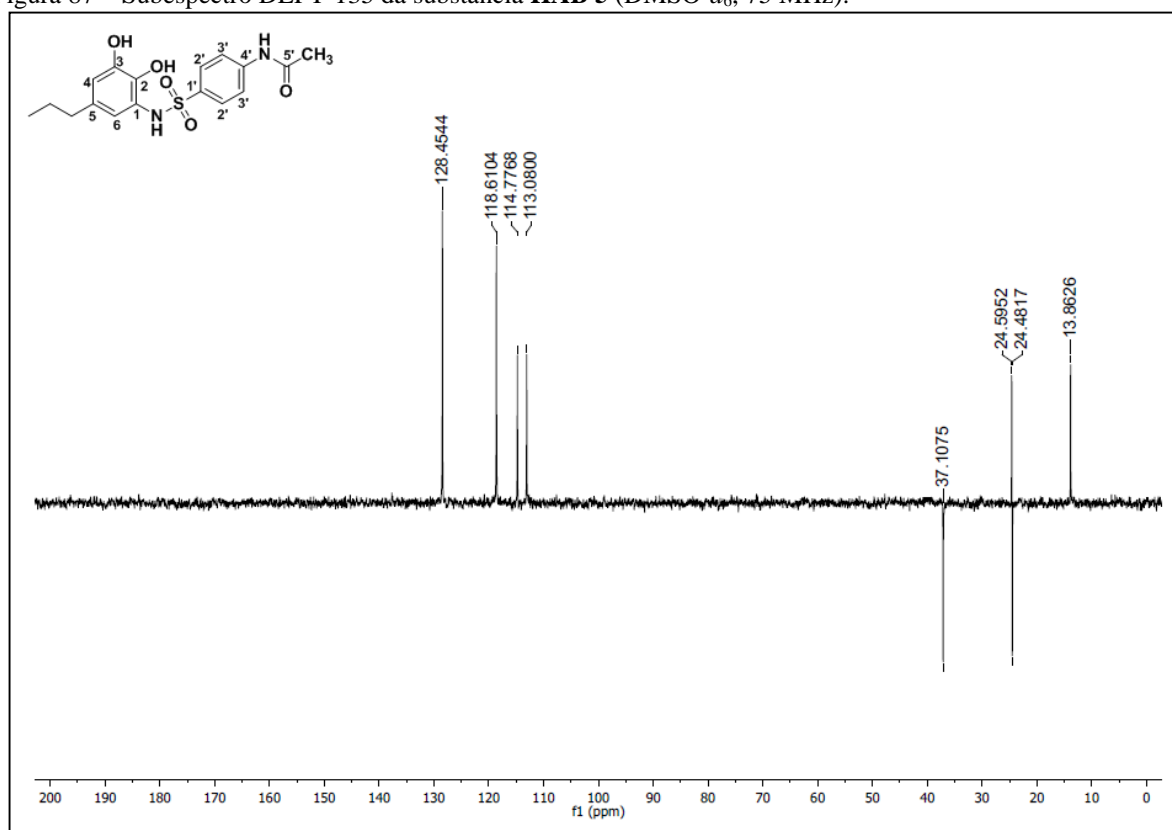


Fonte: Da autora.

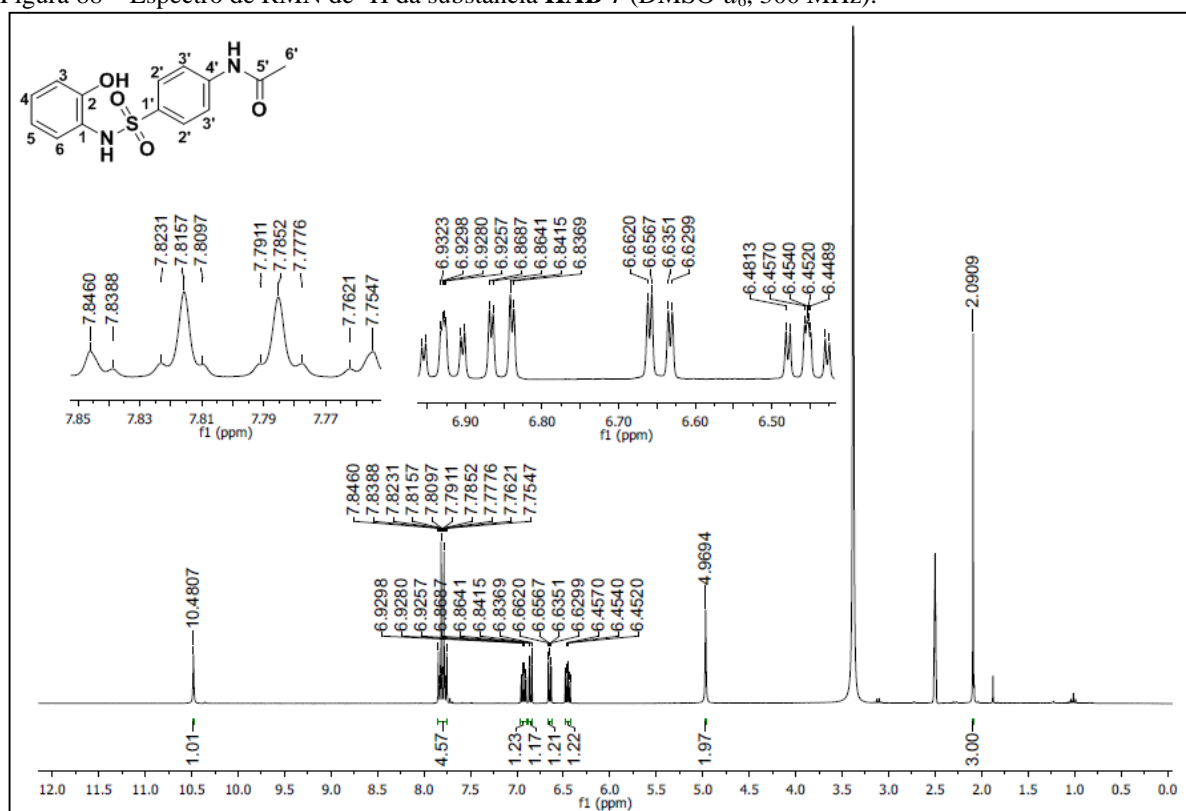
Figura 86 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **HAB 5** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



Fonte: Da autora.

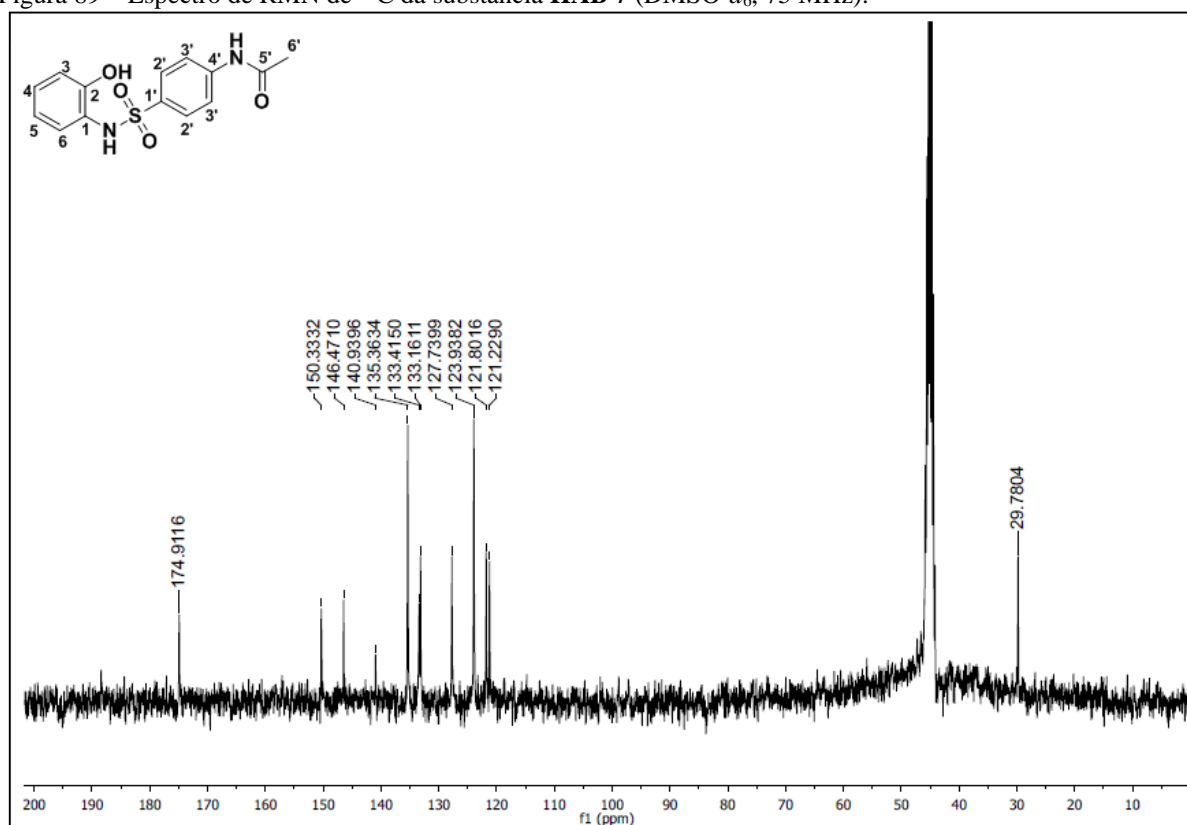
Figura 87 – Subespectro DEPT-135 da substância **HAB 5** (DMSO-*d*₆, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 88 – Espectro de RMN de ¹H da substância **HAB 7** (DMSO-*d*₆, 300 MHz).

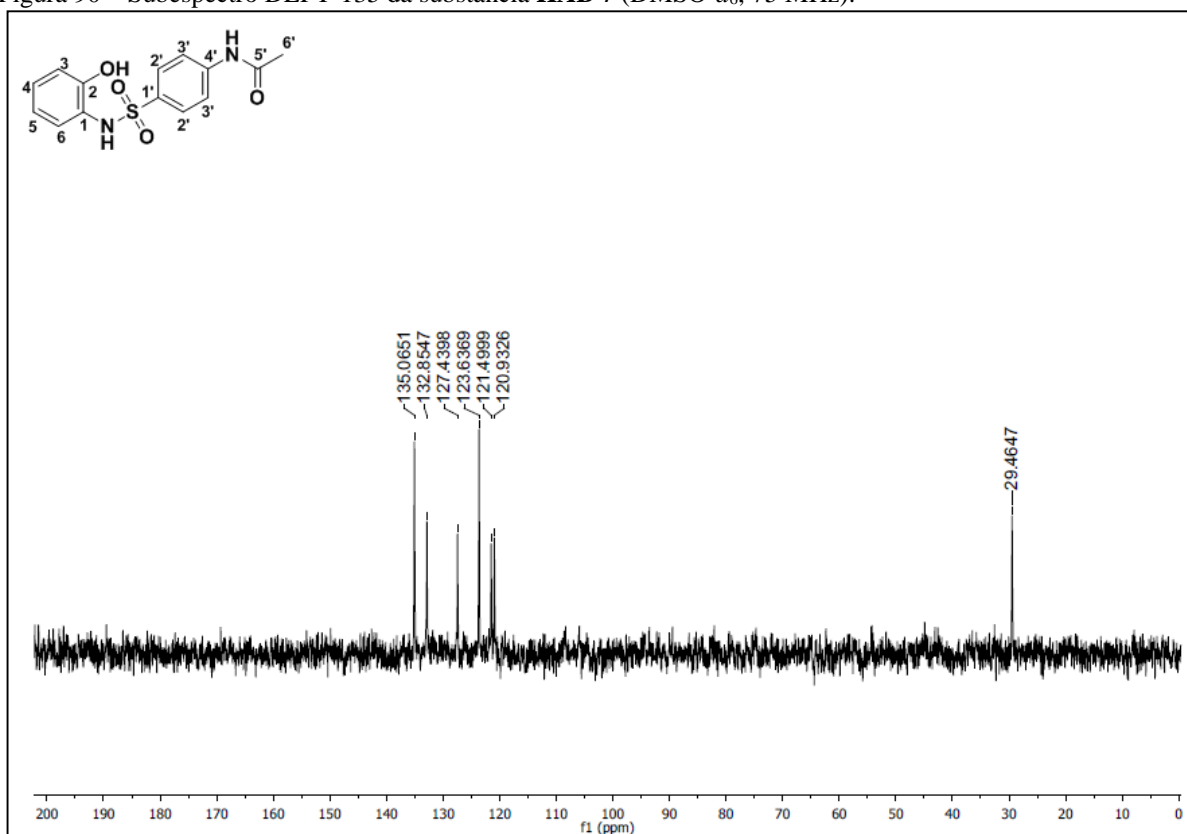
Fonte: Da autora.

Figura 89 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **HAB 7** ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz).



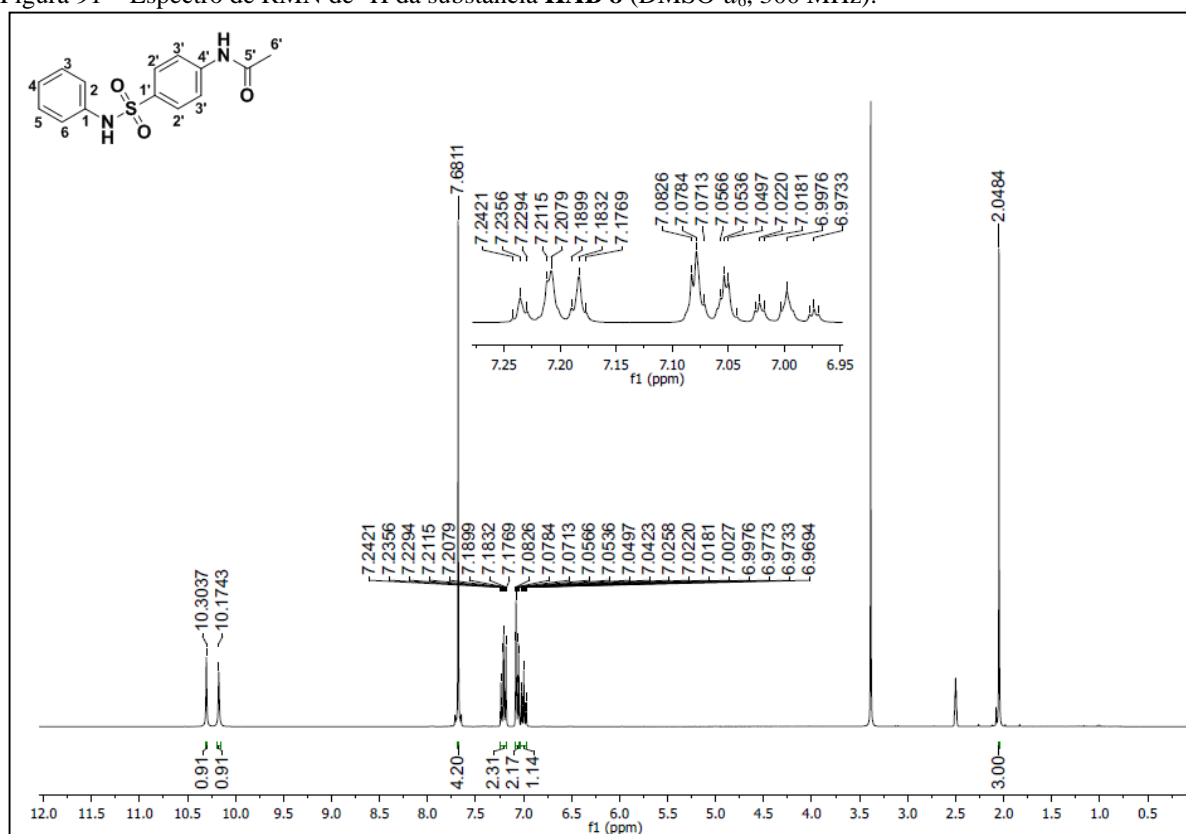
Fonte: Da autora.

Figura 90 – Subespectro DEPT-135 da substância **HAB 7** ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz).



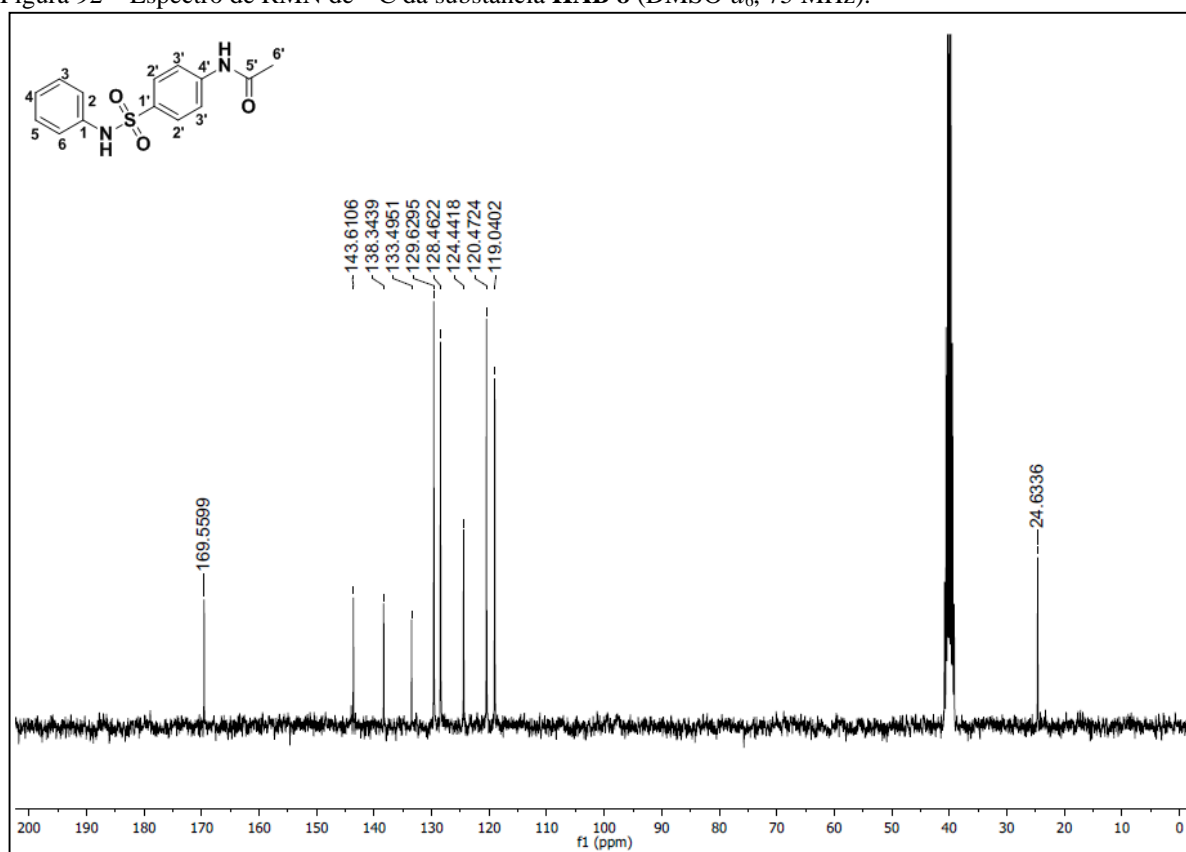
Fonte: Da autora.

Figura 91 – Espectro de RMN de ^1H da substância **HAB 8** (DMSO- d_6 , 300 MHz).

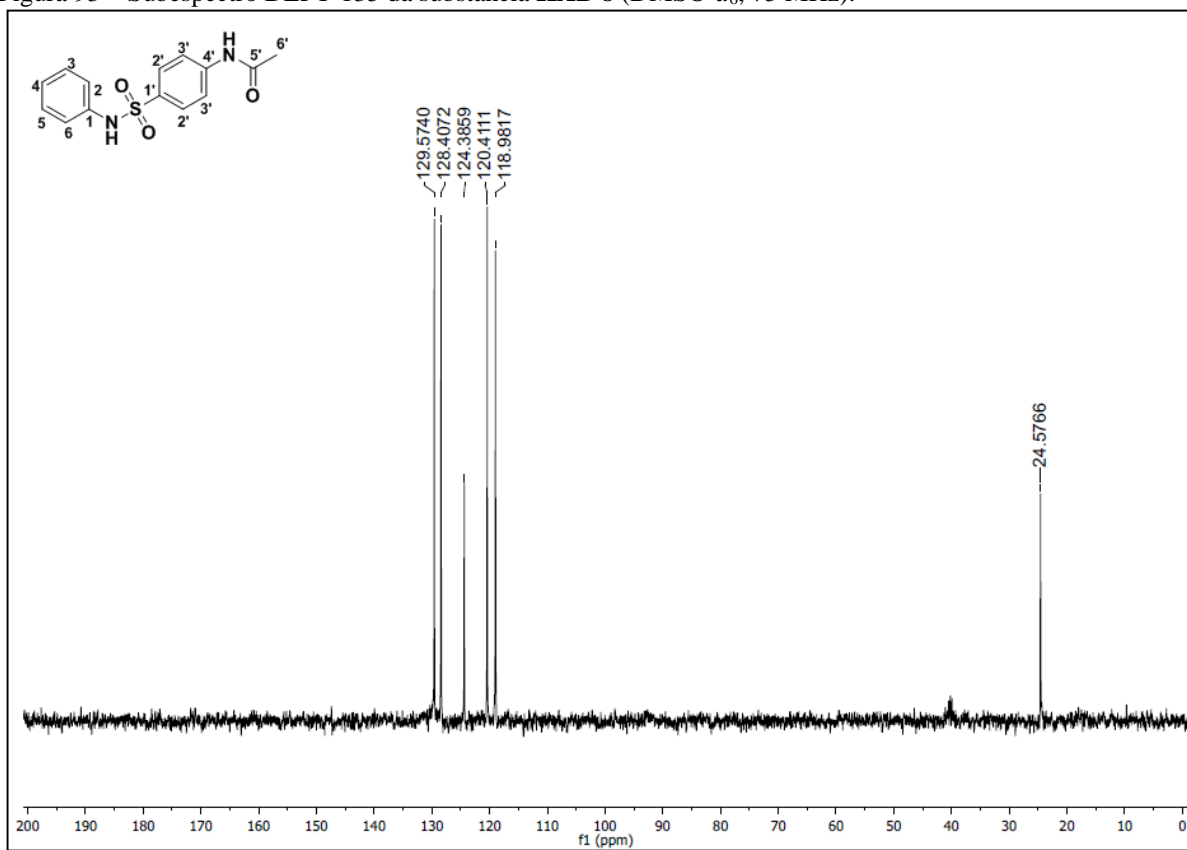


Fonte: Da autora.

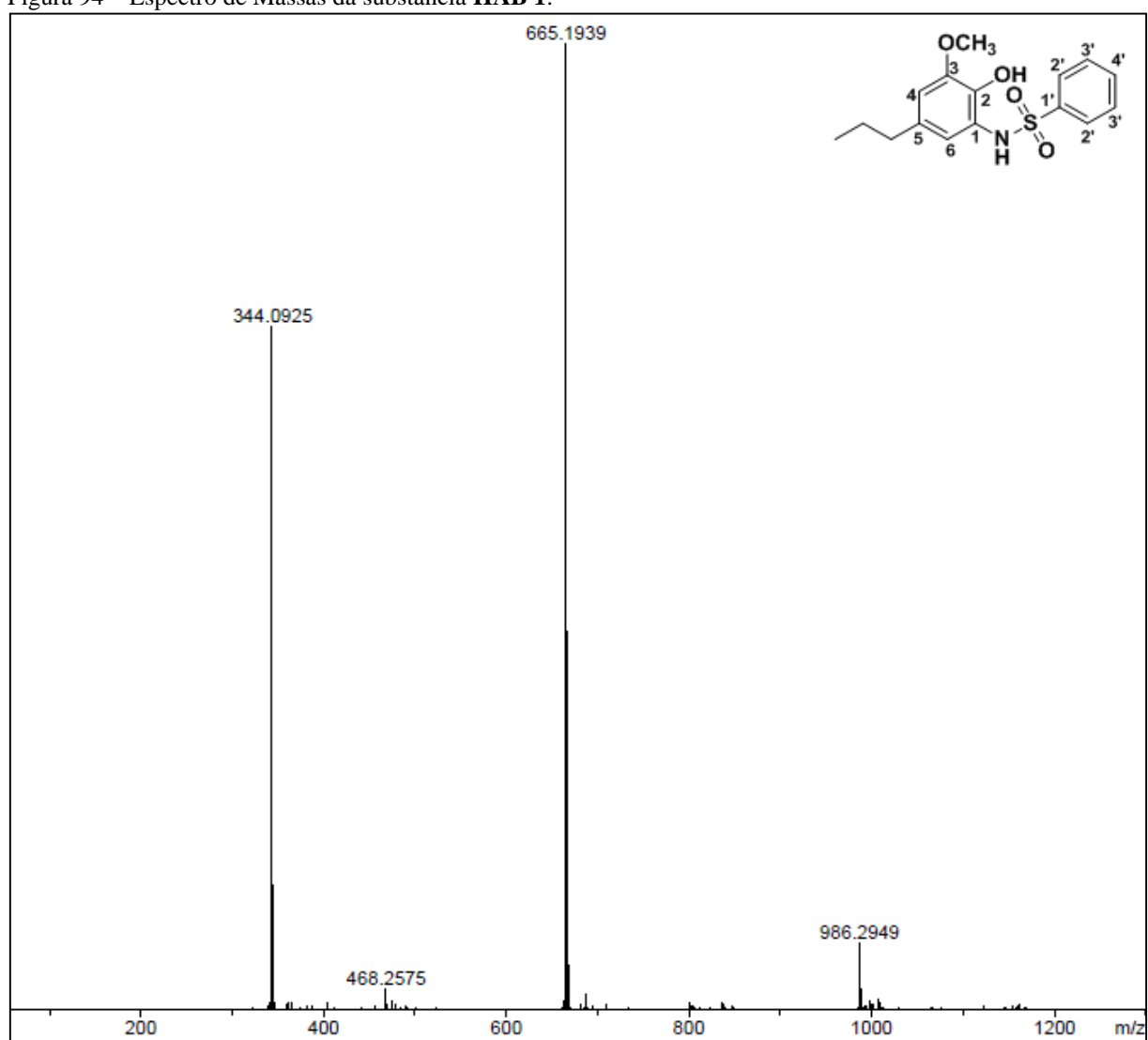
Figura 92 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **HAB 8** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



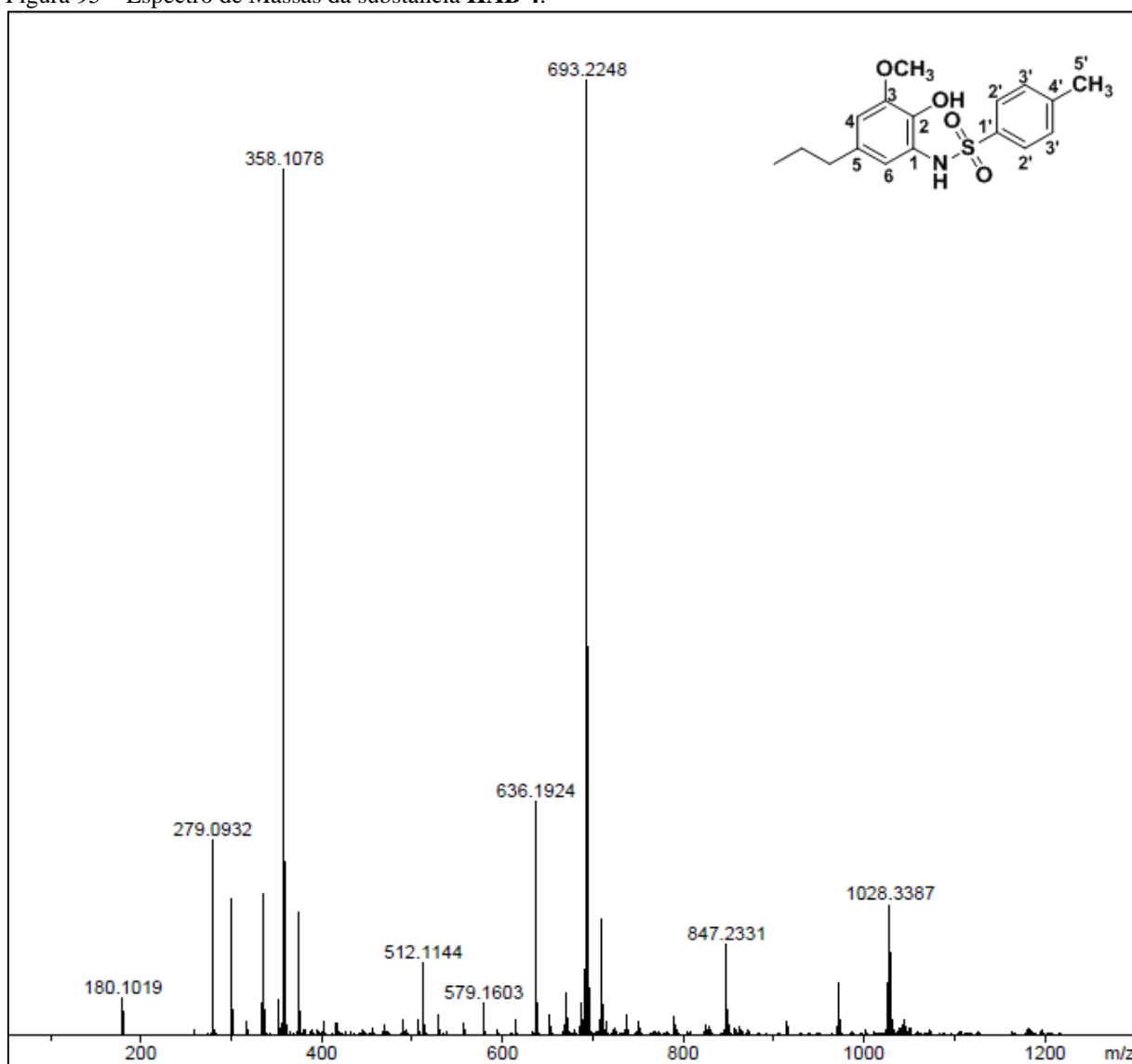
Fonte: Da autora.

Figura 93 – Subespectro DEPT-135 da substância **HAB 8** (DMSO-*d*₆, 75 MHz).

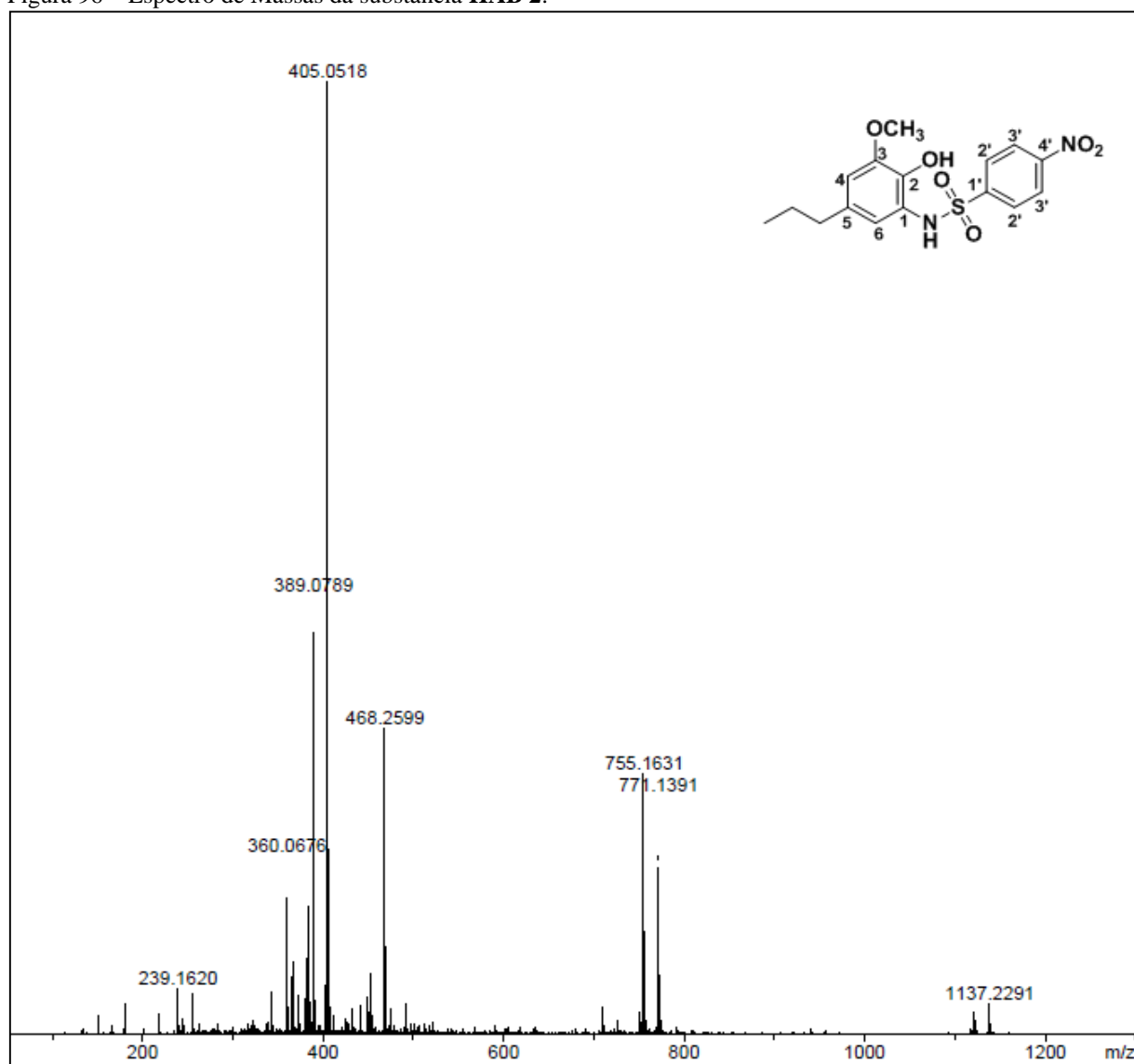
Fonte: Da autora.

Figura 94 – Espectro de Massas da substância **HAB 1**.

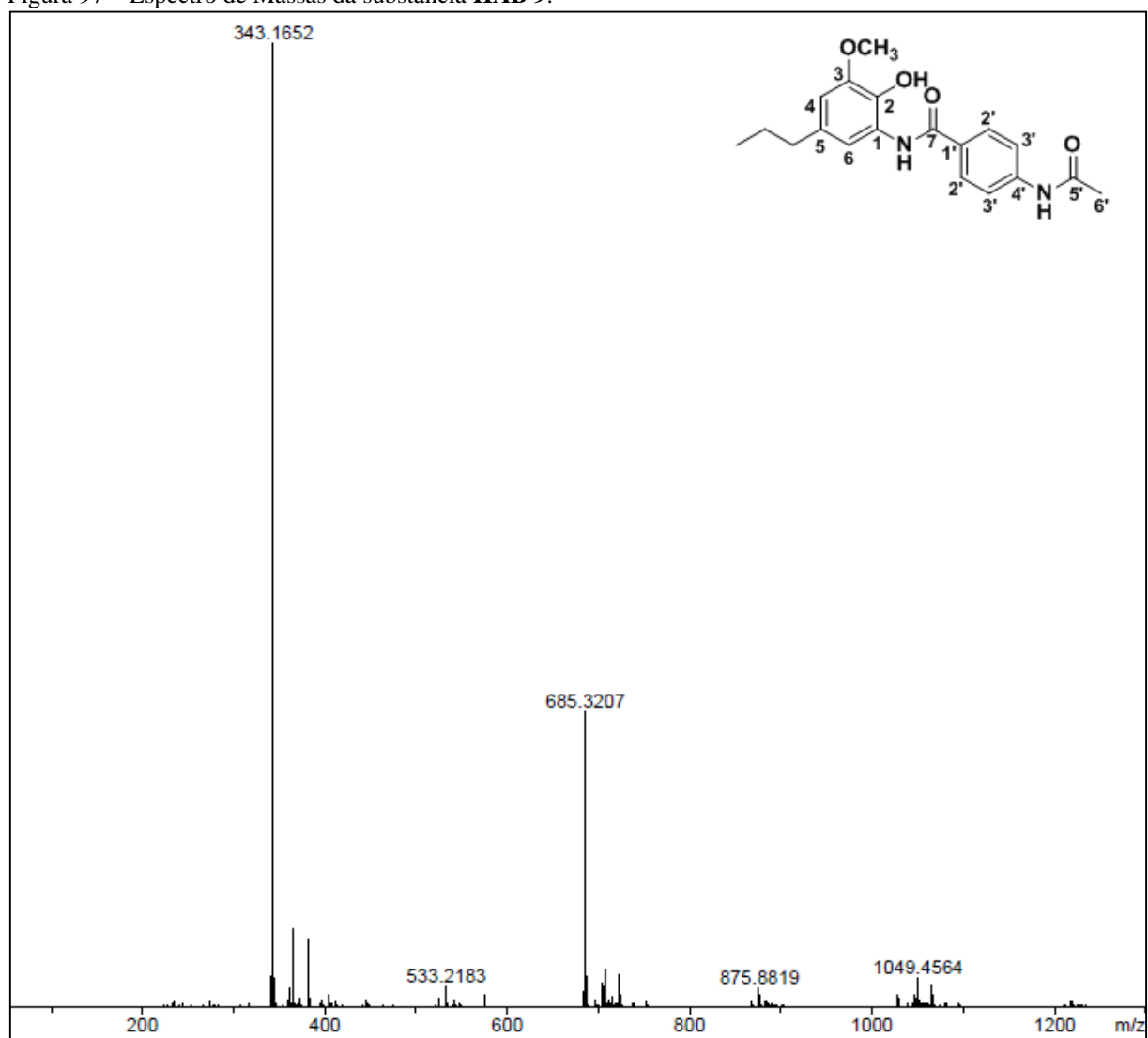
Fonte: Da autora.

Figura 95 – Espectro de Massas da substância **HAB 4**.

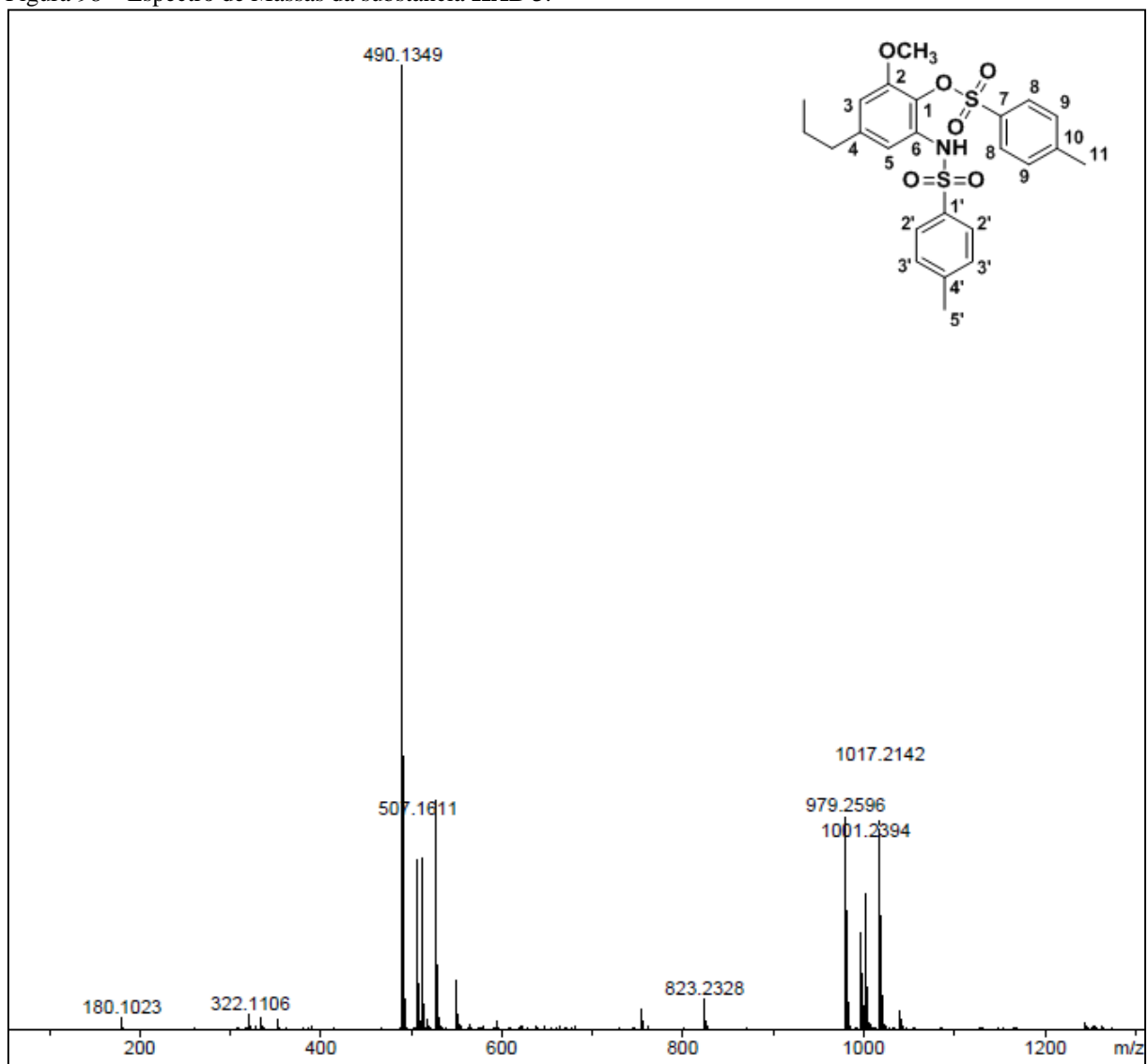
Fonte: Da autora.

Figura 96 – Espectro de Massas da substância **HAB 2**.

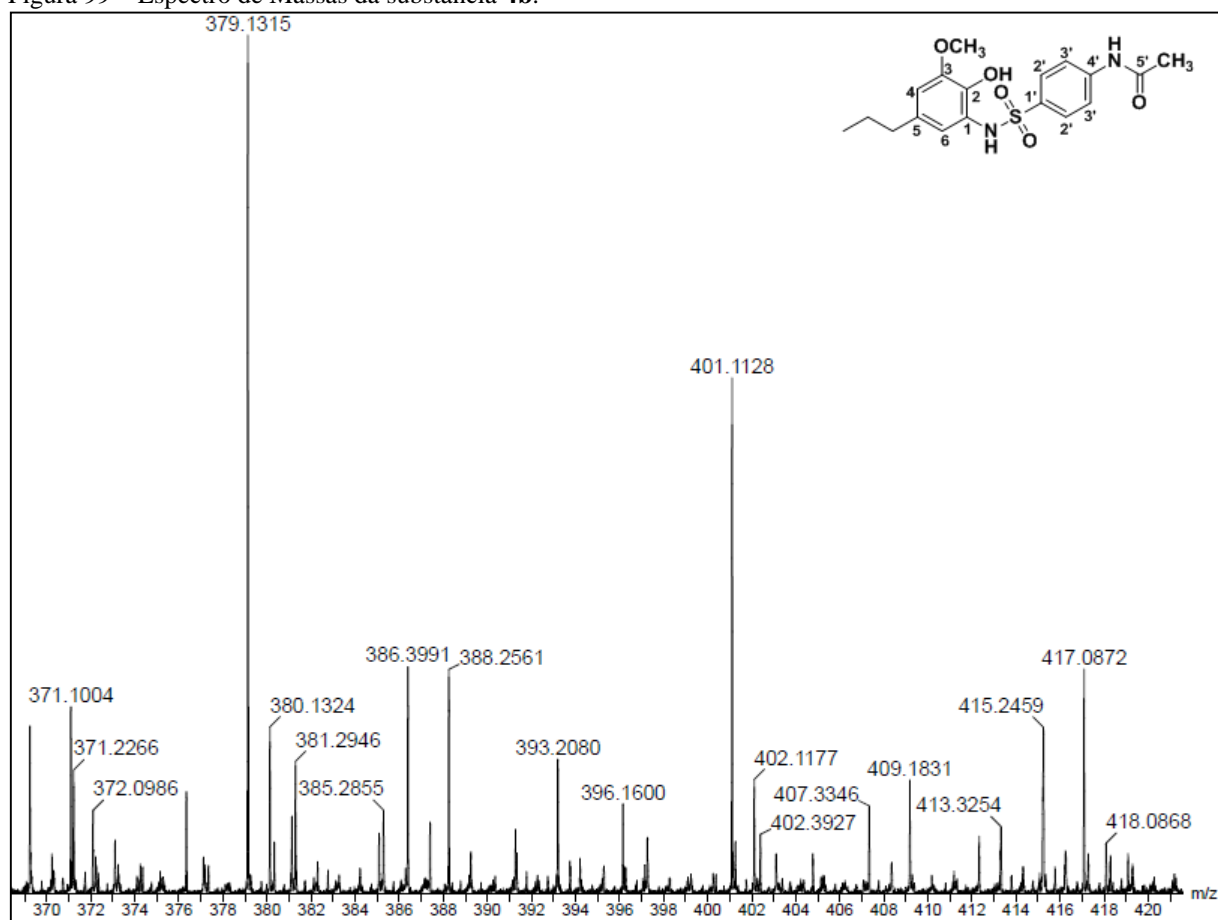
Fonte: Da autora.

Figura 97 – Espectro de Massas da substância **HAB 9**.

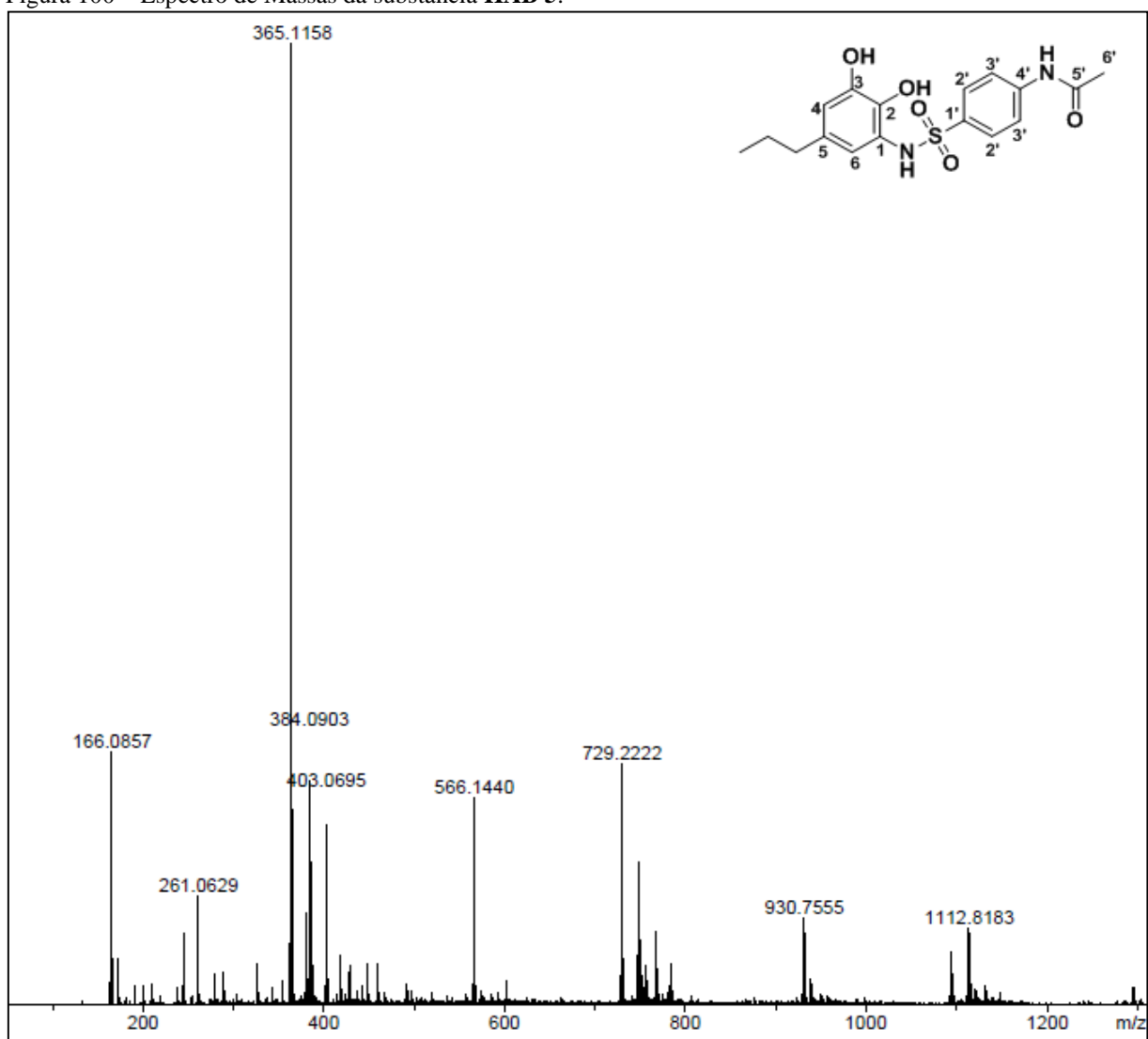
Fonte: Da autora.

Figura 98 – Espectro de Massas da substância **HAB 3**.

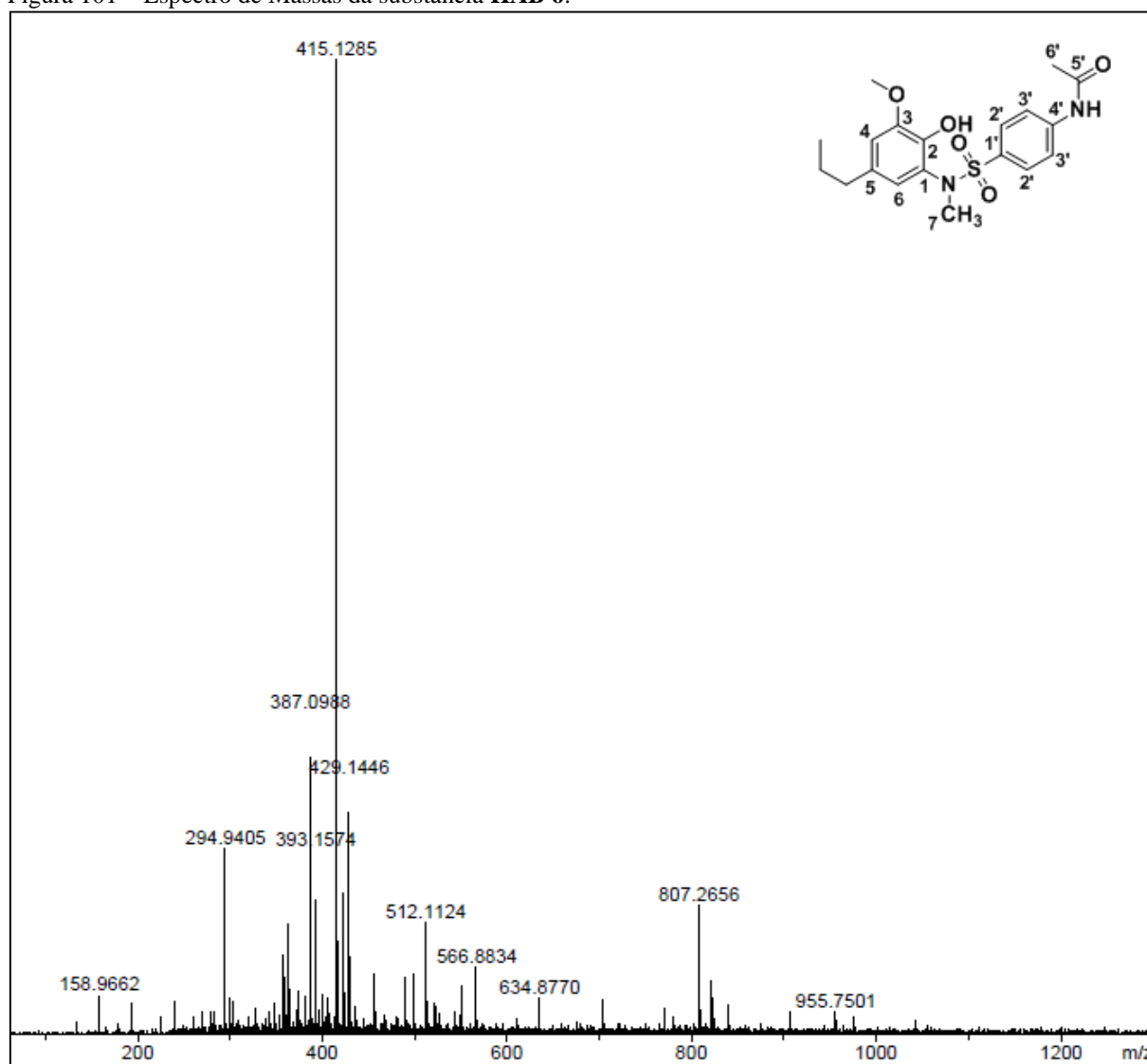
Fonte: Da autora.

Figura 99 – Espectro de Massas da substância **4b**.

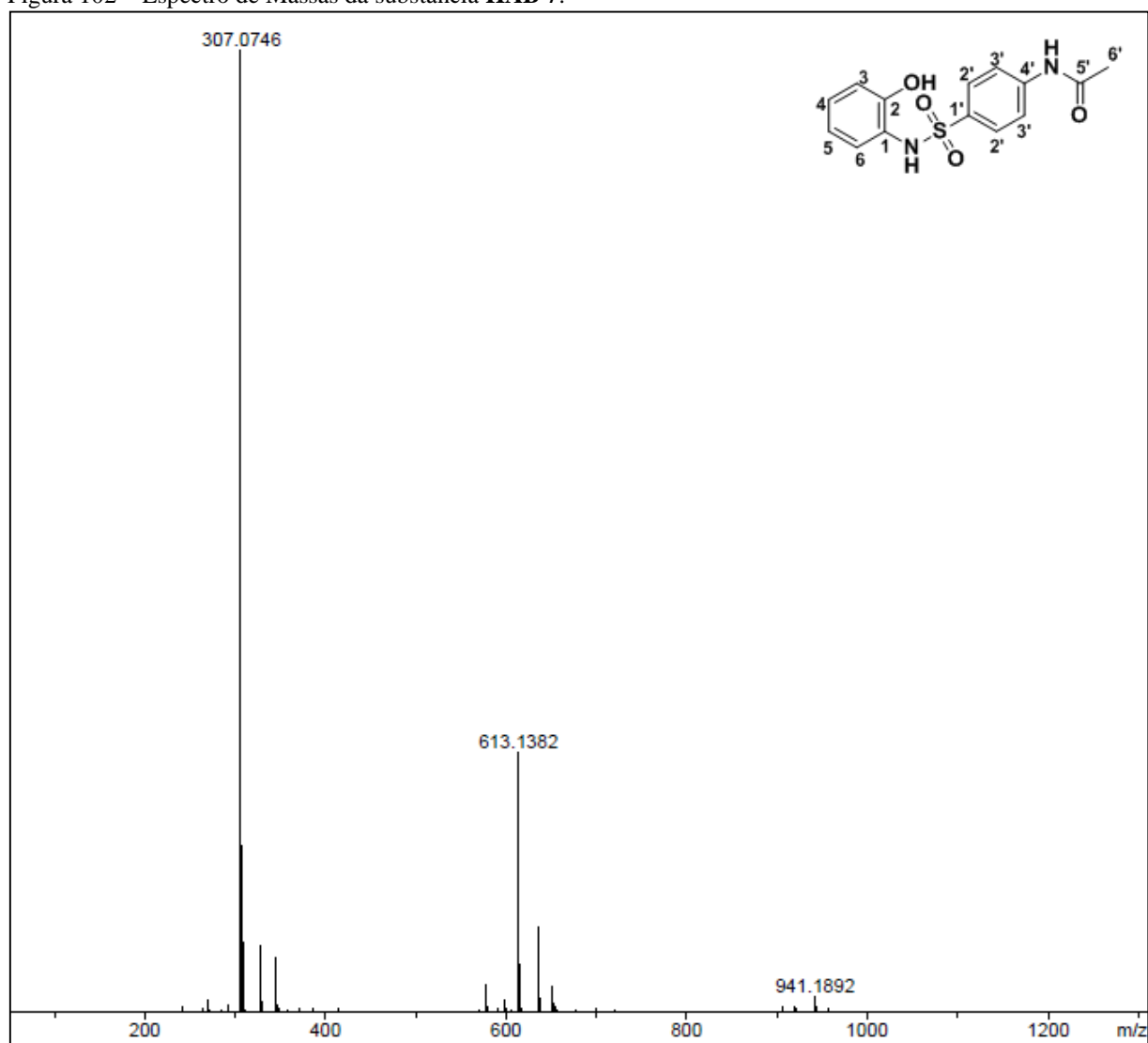
Fonte: Da autora.

Figura 100 – Espectro de Massas da substância **HAB 5**.

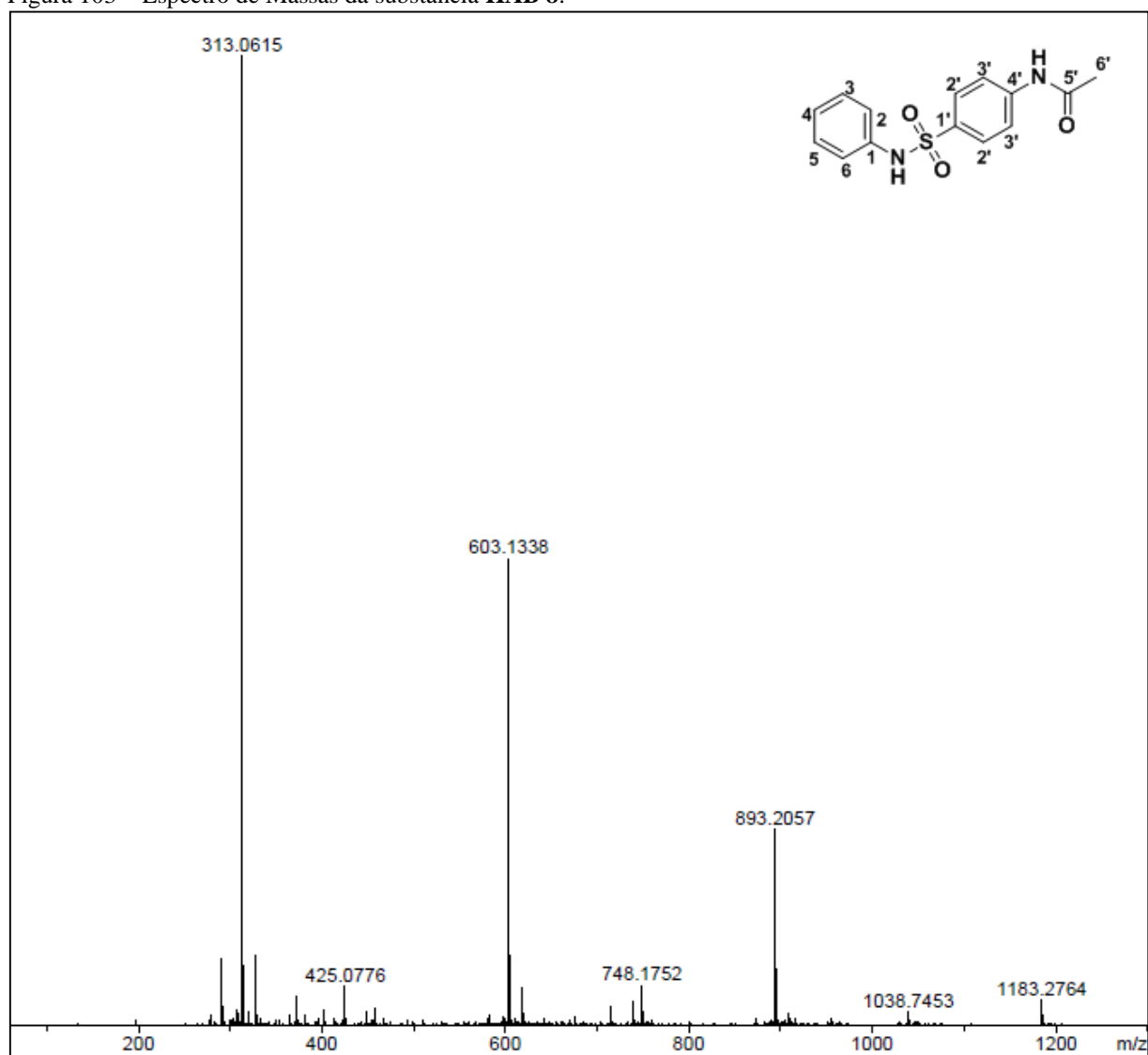
Fonte: Da autora.

Figura 101 – Espectro de Massas da substância **HAB 6**.

Fonte: Da autora.

Figura 102 – Espectro de Massas da substância **HAB 7**.

Fonte: Da autora.

Figura 103 – Espectro de Massas da substância **HAB 8**.

Fonte: Da autora.