

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

TANIRIS CAFIERO BRAGA

Híbrido de monastrol-H<sub>2</sub>S: Síntese e atividade antiproliferativa contra células de câncer  
de ovário

BELO HORIZONTE

2015

UFMG/ICEx/DQ. 1106<sup>a</sup>

D.606<sup>a</sup>

TANIRIS CAFIERO BRAGA

Híbrido de monastrol-H<sub>2</sub>S: Síntese e atividade antiproliferativa contra células de câncer de ovário

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

BELO HORIZONTE

2015

B813h Braga, Taniris Cafiero  
2015 Híbrido de monastrol-H<sub>2</sub>S [manuscrito] : síntese e  
D atividade antiproliferativa contra células de câncer  
de ovário / Taniris Cafiero Braga. 2015.  
[ix], 66 f. : il.

Orientador: Ângelo de Fátima.  
Coorientadora: Luciana Maria Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais - Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Agentes  
antineoplásicos - Teses 3. Síntese orgânica - Teses 4.  
Sulfetos - Teses 5. Ovários - Câncer - Teses I.  
Fátima, Ângelo de, Orientador II. Silva, Luciana  
Maria, Coorientadora III. Título.

CDU 043



**"Híbrido de Monastrol-H<sub>2</sub>S: Síntese e Atividade Antiproliferativa contra Células de Câncer de Ovário"**

**Taniris Cafiero Braga**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Ângelo de Fátima - Orientador  
UFMG

Profa. Dorila Piló Veloso  
UFMG

Prof. Ricardo José Alves  
UFMG/FAFAR

Belo Horizonte, 07 de agosto de 2015.



Este trabalho foi realizado sob a orientação  
do Professor Doutor Ângelo de Fátima e  
co-orientação da Doutora Luciana Maria  
Silva

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora Aparecida por me fazerem forte e por colocarem ao meu lado pessoas que me ajudaram a fazer esse sonho realidade.

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão por estarem sempre presentes, por me ouvirem, e abençoarem. Ao meu pai, por dormir no carro esperando meu experimento acabar para poder me levar para casa em segurança, por me apoiar em minhas decisões e por ser meu grande amigo. A minha mãe, pelos conselhos, por conseguir me acalmar e realçar o melhor de mim em todos os momentos. Ao meu irmão, por ficar sempre ao meu lado, por cuidar de mim, por ouvir minhas lamentações e por me dar motivos para sorrir

Gostaria de agradecer a Bruna por ser minha companheira no RMN, pelas consultorias, e pela grande amizade. Ao Breno, Leonardo, Cleiton, Yuri e Victor pelas inúmeras consultorias e companheirismo. A Carolina, Pedro, Juliana, Aretha, Augusto, Débora, David, Carlos, Angélica, Ana Maria, Renato e Luiza pela companhia, pelas boas conversas. Ao GEQOB anexo, Clináscia, Aura e Rafael por emprestarem vidrarias e doarem alegrias.

Gostaria de agradecer a todos na FUNED que contribuíram de alguma forma para esse trabalho, em especial a Milene, Daniela, Marcela, Aline, Pedro, Bryan, Nickole, Rita, Josiane e Letícia pela paciência, pelos ensinamentos e pelo companheirismo. A Heloísa, que realizou os testes antiproliferativos, pela disponibilidade e amizade.

Aos meus orientadores, por confiarem em meu trabalho. Ao Ângelo por confiar em mim desde a graduação, por me dar oportunidade para crescer, por sempre me desafiar, por me motivar a ser sempre uma pesquisadora melhor, por me dar liberdade de expressar minhas idéias e opiniões e por me apresentar à Luciana minha co-orientadora. À Luciana por sempre se mostrar disponível, por me auxiliar e ter paciência com meu desespero.

Ao disco voador, Natália, Poliane, Vitor, Alexandre e Cristiane pela amizade verdadeira sem interesses, por me acompanharem com paciência desde a graduação.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e por se disponibilizarem a contribuir com esse trabalho que é tão importante para o meu aprendizado.

Às minhas pequenas Gualbertinhas, por me trazerem alegria com um simples sorriso, por fazerem de minhas histórias as mais interessantes e divertidas.

A toda minha família e a todos os meus amigos por sempre me apoiarem e entenderem minha ausência, principalmente tia Tânia, tia Lena, tio Dú, tio Popó, tia Delaine e tia Lita.

Ao Departamento de Química, à Pós-Graduação e aos órgãos de fomento CAPES e CNPq que fizeram este trabalho ser possível.

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	III
LISTA DE TABELAS .....	V
LISTA DE SÍMBOLOS .....	VI
LISTA DE EQUAÇÕES .....	VII
RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 CÂNCER .....	1
1.1.1 <i>Câncer de ovário</i> .....	2
1.2 O H <sub>2</sub> S E SUAS GENERALIDADES BIOLÓGICAS .....	3
1.3 CLASSE 1,2-DITIOLANO-3-TIONA .....	6
1.4 MONASTROL: INIBIDOR SELETIVO DA EG5 NO CÂNCER .....	9
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>11</b>
3.1 ANÁLISE RETROSSINTÉTICA .....	11
3.2 SÍNTESE DO MONASTROL (4) .....	12
3.3 SÍNTESE DO ÁCIDO DE MONASTROL (5) .....	16
3.4 SÍNTESE DO 5-(4-METOXIFENIL)-3H-1,2-DITIOLANO-3-TIONA [ADT (7)] .....	20
3.5 SÍNTESE DO 5-(4-HIDROXIFENIL)-3H-1,2-DITIOLANO-3-TIONA [ADTOH(8)] .....	24
3.6 SÍNTESE DO <i>TERC</i> -BUTIL(2-(4-(3-TIOXIO-3H-1,2-DITIOLANO-5- ILA)FENOXI)ETIL)CARBAMATO (10) .....	28
3.7 SÍNTESE DO HÍBRIDO MONASTROL-H <sub>2</sub> S .....	36
3.8 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO HÍBRIDO DE MONASTROL .....	42
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	49
5.1.1 <i>Temperaturas de fusão</i> .....	50
5.2 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E ESPECTROMÉTRICAS .....	50

5.2.1	<i>Espectroscopia no infravermelho</i> .....	50
5.2.2	<i>Espectrometria de massas de alta resolução</i> .....	50
5.2.3	<i>Ressonância magnética nuclear</i> .....	51
5.3	PROCEDIMENTOS: .....	51
5.3.1	<i>Obtenção do monastrol (4)</i> .....	51
5.3.2	<i>Obtenção do ácido de monastrol (5)</i> .....	52
5.3.3	<i>Obtenção do terc-butilcarbamato de 2-bromoetila (9)</i> .....	53
5.3.4	<i>Obtenção do 5-(4-metoxifenil)-3H-1,2-ditiolano-3-tiona (ADT) (7)</i> .....	54
5.3.5	<i>Obtenção da 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiolano-3-tiona (ADTOH) (8)</i> ...	55
5.3.6	<i>Obtenção do terc-butilcarbamato de (2-(4-(3-tioxo-3H-1,2-ditiolano-5-ila)fenoxi)etila (10)</i> .....	56
5.4	OBTENÇÃO DO CLORIDRATO DE 5-(4-(2-AMINOETOXI)FENIL)-3H-1,2-DITIOLANO-3-TIONA (11).....	57
5.5	OBTENÇÃO DO 4-(3-HIDROXIFENIL)-6-METIL-2-TIOXO-N-(2-(4-(3-TIOXO-3H-1,2-DITHIOL-5-IL)FENOXI) ETIL)-1,2,3,4-TETRAHIDROPIRIMIDINA-5-CARBOXAMIDA (H <sub>2</sub> S-MONASTROL) (12) .....	58
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM CÉLULAS DE OVÁRIO. ....	59
5.6.1	<i>Metodologia geral para cultivo das linhagens celulares in vitro</i> .....	60
5.6.2	<i>Teste de viabilidade celular por brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazóleo) (MTT)</i> .....	61
5.6.3	<i>Cálculos estatísticos</i> .....	62
<b>REFERÊNCIAS</b> .....		<b>63</b>



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Híbridos liberadores de H <sub>2</sub> S com aplicação biológica. ....	5
Figura 2. Exemplos de compostos capazes de liberar H <sub>2</sub> S. ....	5
Figura 3. Oltipraz e ADTOH exemplos de núcleo de 1,2-ditiolano-3-tionas empregado como liberadores de H <sub>2</sub> S. ....	6
Figura 4. Proposta adaptada de metabólitos intermediários na liberação de H <sub>2</sub> S pelo ADTOH <sup>30</sup> . ....	6
Figura 5. Reações que formam o núcleo 1,2-ditiolano-3-tionas em uma única etapa....	7
Figura 6. Proposta mecanística para a formação do ADT (adaptação de Neto 2013). <sup>34</sup>	8
Figura 7. Reação clássica de Biginelli para a formação de 3,4-diidropirimidin-2(1H)-ona. ....	9
Figura 8. Imunofluorescência: tubulina (em verde), cromatina (em azul) A) Microtubulo e fuso mitótico normal B) Microtubulo e fuso inibido pelo monastrol; Estrutura do monastrol.- Adaptado de Mayer(1999).....	10
Figura 9. Estrutura do híbrido monastrol H <sub>2</sub> S (12).....	11
Figura 10. Análise retrossintética para construção do híbrido liberador de H <sub>2</sub> S. ....	12
Figura 11. Síntese do monastrol. ....	12
Figura 12. Espectro na região do infravermelho (KBr) da amostra de monastrol. ....	13
Figura 13. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) do monastrol (4). ....	14
Figura 14. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (abaixo) e subespectro DEPT 135 (acima), do monastrol (50 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). ....	16
Figura 15. Proposta de mecanismo da hidrólise básica do aduto de Biginelli. ....	17
Figura 16. Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr do ácido de monastrol.....	18
Figura 17. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do ácido de monastrol (preto) comparado com o monastrol (vermelho) (200 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	19
Figura 18. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (abaixo) e subespectro DEPT 135 (acima), do ácido de monastrol (50 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). ....	20
Figura 19. Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr do ADT (7).....	21
Figura 20. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H ADT (preto) comparado com o do <i>trans</i> -anetol (vermelho) (200MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	22
Figura 21. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT 135 do <i>trans</i> -anetol (acima) Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e DEPT do ADT (abaixo) (50 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	23
Figura 22. Proposta de mecanismo de formação do ADTOH.....	26
Figura 23. Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr para o ADTOH...	26
Figura 24. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do ADTOH (200 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). ....	27

Figura 25. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo) e subespectro DEPT 135 (acima), do ADTOH (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). .....	28
Figura 26. Proposta de mecanismo da proteção da amina primária.....	29
Figura 27. Proposta de mecanismo para o acoplamento do ADTOH com o espaçador formando o composto 10. ....	30
Figura 28. Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr para o composto 10. ....	31
Figura 29. Espectro de RMN de <i>terc</i> -butilcarbamato de (2-(4-(3-tioxo-3 <i>H</i> -1,2-ditolano-5-ila)fenoxi)etila) (10) (200MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	32
Figura 30. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo) e subespectro DEPT 135 (acima) do composto 10 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), os sinais destacados no espectro foram atribuídos às modificações estruturais observadas no produto. ....	33
Figura 31. Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr do composto 11. 34	
Figura 32. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto 11 (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). ....	35
Figura 33. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (abaixo) e subespectro DEPT 135 (acima) do composto 11 (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). ....	36
Figura 34. Proposta para o mecanismo de formação do híbrido de monastrol- $\text{H}_2\text{S}$ . ...	37
Figura 35. Espectro na região de infravermelho (KBr) do híbrido de monastrol. ....	38
Figura 36. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) obtido para o híbrido de monastrol (12).....	39
Figura 37. Mapa de contornos COSY obtido para o híbrido de monastrol (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). ....	40
Figura 38. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto híbrido de monastrol (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). ....	41
Figura 39. Mapa de contornos HSQC do híbrido de monastrol (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ). 42	
Figura 40. Análise gráfica sigmoidal pela distribuição de Boltzmann: A) monastrol com $\text{IC}_{50}$ , B) ac. monastrol com $\text{IC}_{50}$ ; C) ADTOH; D) híbrido do monastrol. ....	45
Figura 41. Relação entre a viabilidade média da linhagem TOV-21G frente às diferentes concentrações dos compostos ADTOH (bege), monastrol (roxo), ácido de monastrol (azul) e híbrido de monastrol (verde). A linha tracejada indica a viabilidade celular de 50%. ....	46
Figura 42. Análise entre a viabilidade celular e as concentrações avaliadas. As diferenças significativas foram indicadas pelas letras, onde maiúsculas e minúsculas se diferem entre si. A linha tracejada indica a viabilidade de 50% da linhagem de TOV-21G. ....	47
Figura 43. Análise entre a viabilidade celular e os compostos avaliados e representação das diferenças significativas indicadas pelas letras, onde	

maiúsculas e minúsculas diferem entre si. A linha tracejada indica a viabilidade de 50%. ..... 48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bandas na região do infravermelho em pastilha de KBr observadas versus encontradas na literatura para o monastrol.....	13
Tabela 2. Dados de RMN de $^1\text{H}$ do monastrol em $\text{DMSO-}d_6$ versus dados da literatura .....	15
Tabela 3. Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ do monastrol versus citados na literatura .....	16
Tabela 4. Avaliação de condições para a hidrólise básica do aduto de Biginelli.....	17
Tabela 5. Condições e otimizações para a reação de obtenção de ADTOH a partir da O-desmetilação do ADT.....	25
Tabela 6. Bandas na região do infravermelho em KBr observadas para o composto ADTOH versus citadas na literatura.....	26
Tabela 7. Resultados de viabilidade para a linhagem de TOV-21G obtidos após tratamento com monastrol (4), ácido de monastrol (5), ADTOH (8) e híbrido de monastrol (12) utilizando método do MTT.....	43

## LISTA DE SÍMBOLOS

ADT-----	5-(4-Metoxifenil)-3H-1,2ditiolano-3-tiona
ADTOH-----	5-(4-Hidroxifenil)-3H-1,2-ditiolanoano-3-tiona
ar-----	Aromático
ATP-----	Trifosfato de adenosina
CBS-----	Cistationina- $\square$ -sintetase
CCD-----	Cromatografia em camada delgada
CDCl <sub>3</sub> -----	Clorofórmio deuterado
COSY-----	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CSE-----	Cistationina $\gamma$ -liase
d-----	Dupleto
DEPT-----	<i>Distortionsless enhancement by polarization transfer</i>
DIPEA-----	<i>N,N</i> -di-isopropiletilamina
DMA-----	Dimetilacetamida
DMSO-----	Dimetilsulfóxido
ESI-MS-----	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
FUNED-----	Fundação Ezequiel Dias
GSH-----	Glutationa
HCT116-----	Carcinoma colorretal humano
HT-29-----	Carcinoma de colon humano
IC <sub>50</sub> -----	Concentração inibitória capaz de matar 50% da população
INCA-----	Instituto Nacional do Câncer
IV-----	Infravermelho
<i>J</i> -----	Constante de acoplamento escalar
Lit-----	Literatura
LPS-----	Lipopolissacarídeos
LSD-----	Diferença mínima de significância
m-----	Multipeto
M-----	Multiplicidade
MPTS-----	3-Mercaptopiruvato enxofre transferase
MTT-----	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazóleo
Pi-----	Fosfato inorgânico

ppm-----	Parte por milhão
Pybop-----	Benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato
<i>q</i> -----	Quarteto
RMN-----	Ressonância magnética nuclear
<i>s</i> -----	Simpleto
<i>s/</i> -----	Sinal largo
S <sub>N</sub> 2-----	Substituição nucleofílica bimolecular
<i>t</i> -----	Tripleto
THF-----	Tetraidrofurano
TNF-----	Fator de necrose tumoral
TOV21-G-----	Cancer de ovário humano
UFMG-----	Universidade Federal De Minas Gerais
<i>v</i> -----	Estiramento
<i>δ</i> -----	Deslocamento químico
<i>λ</i> -----	Comprimento de onda

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação da viabilidade pelo método do MTT. ....	61
--	----



## Resumo

O câncer representa uma das principais causas de morte no mundo. Segundo a OMS, esta doença foi responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012 em grande parte causadas por ausência de tratamentos eficazes. Sendo assim, torna-se necessário desenvolver novas substâncias com potencial ação antitumoral. Dentre essas malignidades, o câncer de ovário é caracterizado pela alta mortalidade, pois o diagnóstico geralmente é tardio e o tratamento existente, muitas vezes, não se mostra eficiente. Com isso, na busca por tratamentos alternativos cabe citar dois compostos interessantes, monastrol e ADTOH. O monastrol é um reconhecido inibidor da enzima Eg5 que impede as células de completarem o ciclo de divisão. O ADTOH é uma substância reconhecida por liberar pequenas doses de H<sub>2</sub>S em meio biológico e apresenta-se como terapia promissora para o tratamento da inflamação. Motivado pelos efeitos peculiares dessas substâncias esse trabalho apresenta a síntese e a avaliação antiproliferativa do híbrido de monastrol-H<sub>2</sub>S oriundo da união entre o derivado ácido do monastrol e o ADTOH com um rendimento global de 0,4%. Não há na literatura relatos sobre a síntese desse híbrido bem como de suas propriedades antiproliferativas. Os ensaios antiproliferativos foram realizados em linhagem de tumor de ovário humano, TOV-21G (ATCC).

Os testes antiproliferativos em células TOV-21G mostraram que o híbrido de monastrol possui propriedades citotóxicas mais parecidas com o monastrol que com o ADTOH. Verificou-se ainda que a viabilidade da TOV-21G não é concentração dependente nas concentrações avaliadas (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 15 µg/mL) e que serão necessários outros testes em diferentes concentrações e com um painel tumoral maior para a análise da atividade antitumoral do híbrido.

**Palavras chaves:** Monastrol, Sulfeto de hidrogênio, Câncer de ovário, Atividade antiproliferativa, Adutos de Biginelli.

## Abstract

### Monastrol-H<sub>2</sub>S Hybrid: Synthesis and Antiproliferative Activity Against Ovarian Cancer Cells

Cancer represents one of the mayor causes of death in the world. According to OMS, this illness has been responsible for 8,2 million deaths in 2012, mainly due to the absence of efficient methods and drugs for treatment. Thus, it is necessary to develop new potential antitumor compounds Among these malignancy, the ovarian cancer is responsible by high mortality, because the diagnosis usually is late and existing treatment, it is often not efficient. In the search for alternative treatment could be mentioned monastrol and ADTOH. Monastrol is a recognized Eg5 enzyme inhibitor that prevents cells to complete the cell division cycle. ADTOH is a compound recognized for releasing H<sub>2</sub>S in small doses in biological media and shows itself as a promising drug for inflammation therapy. Motivated by these compounds peculiar effects this study introduce the synthesis and evaluation of hybrid of monastrol-H<sub>2</sub>S produced from the coupling between the acid monastrol derivative and the ADTOH with a global yield of 0,4%. There is not any report of the synthesis as well about antiproliferative properties of this hybrid. The antiproliferative trials were accomplished in human ovarian tumor lines TOV-21G (ATCC).

The antiproliferative test in TOV-21G cells showed that monastrol hybrid had cytotoxic properties more similarly to monastrol than to ADTOH. It was confirmed that the TOV-21G viability is not dose dependent in the evaluated concentrations (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL and 15 µg/mL). In addition, it will be necessary another trials with different concentrations and a bigger tumor panel for antitumor activity's hybrid analysis.

**Key words:** Monastrol, Hydrogen sulfide, Ovarian Cancer Cells, Antiproliferative Activity, Biginelli Aducts

## 1- Introdução

### 1.1 Câncer

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, INCA, 576580 novos casos de câncer foram estimados no Brasil para o ano de 2014<sup>1</sup>. Hábitos como exposição a alguns produtos químicos (fumo, fuligem de automóveis, entre outros), agentes físicos carcinogênicos (radiações oriundas do meio ambiente ou do ambiente de trabalho), hábitos alimentares (elevada ingestão de gorduras saturadas e baixa ingestão de fibras), obesidade, uso excessivo de álcool, entre outros, são comuns em países industrializados e são considerados fatores de risco no desenvolvimento do câncer.<sup>2</sup>

O câncer, também conhecido como neoplasia, é o conjunto de células alteradas geneticamente que crescem de maneira desordenada e diferente das células não alteradas. Essas alterações podem ser devidas a heranças genéticas, ou serem desenvolvidas em células somáticas, ou seja, adquiridas ao longo da vida do indivíduo devido à exposição a agentes carcinogênicos. Alguns tipos de alterações genéticas em um tumor permitem uma proliferação excessiva e não regulada de células modificadas.<sup>3</sup> O crescimento de um tumor pode ser dividido em quatro fases i) alteração maligna, ii) crescimento das células transformadas iii) invasão local iv) metástase à distância.<sup>3</sup>

Existem dois tipos de tumores, benigno e maligno. O primeiro é aquele que não evolui a um câncer e é constituído de células diferenciadas, ou seja, lembram as células normais tanto morfológica quanto funcionalmente. O segundo evolui a câncer e pode ser constituído de células diferenciadas, ou mesmo, indiferenciadas. A falta de diferenciação é chamada de anaplasia. Uma das características da anaplasia é o pleomorfismo (morfologia nuclear anormal), mitoses atípicas que formam fusos multipolares, crescimento desordenado (perda de polaridade), perda da uniformidade das células individuais, assim como perda na orientação arquitetural dessas células (displasia).<sup>3</sup>

A divisão celular é dividida em dois grandes grupos, a interfase ( $G_1$ , S,  $G_2$ ) e mitose (prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase).<sup>4</sup> A célula quando está na fase  $G_0$  encontra-se em processo de senescência e desenvolve suas funções específicas.<sup>2</sup> Se no ambiente extracelular houverem condições apropriadas para a divisão, a célula vai para a fase  $G_1$ . Na fase  $G_1$  a célula cresce e sintetiza proteínas e

organelas. Nesta fase existe um ponto de controle, enzimas reparadoras verificam se a célula está pronta para entrar em processo de divisão ou se ela deve voltar ao estado  $G_0$ .<sup>2,4,5</sup> Se as condições forem favoráveis a célula avança para a fase S, nesta fase ocorre a síntese de replicação do material genético.<sup>2,4,5</sup> Após a replicação, a célula entra na fase  $G_2$  onde ela cresce e enzimas verificam a integridade do DNA sintetizado. Deste modo, a célula entra em processo de mitose. Na prófase ocorre a condensação dos cromossomos e o fuso mitótico começa a se formar, em seguida, na prometáfase o núcleo se fragmenta e o material genético é liberado. Na metáfase os cromossomos são alinhados na equatorial pelos fusos mitóticos, em seguida, na anáfase esses cromossomos são separados em cromátides filhas e finalmente na telófase a célula se alonga, regenera o núcleo, se divide e dá origem a duas novas células idênticas.<sup>2,4,5</sup>

Quando os pontos de verificação do ciclo celular falham o risco de desenvolvimento e formação de câncer aumentam.<sup>5</sup> Células de câncer são capazes de escaparem desse sistema e, portanto, possuem alta taxa de multiplicação somada à alta instabilidade do material genético.<sup>5</sup>

### **1.1.1 Câncer de ovário**

O câncer de ovário não está entre os mais frequentes dos cânceres, contudo, apresenta alta mortalidade, pois o diagnóstico geralmente é realizado em estágios avançados.<sup>6</sup>

É denominado como câncer de ovário todo o câncer que se desenvolve em qualquer parte do ovário, indiferente do tipo de célula que lhe deu origem.<sup>7</sup> O INCA estima que para o ano de 2014, no Brasil, a ocorrência de 5320 novos casos de câncer desse tipo.<sup>1</sup>

Dentre os fatores de risco para esta doença pode-se apontar o próprio processo de ovulação. A ovulação consiste de um contínuo processo de reparação da superfície ovárica, sendo passível a mutação contribuindo com um possível surgimento de câncer. Por conseguinte, as mulheres que ovularam pouco ao longo da vida devido à menopausa precoce, menstruação tardia, entre outros motivos, são menos propensas ao desenvolvimento de câncer de ovário.<sup>8</sup> Cabe mencionar, entre outros fatores de risco, a endometriose a infertilidade e a obesidade.<sup>8</sup>

Mutações nos genes BRCA-1 ou BRCA-2 foram relacionados com a hereditariedade da doença principalmente em famílias que desenvolvem esse câncer

em idades inferiores a 60 anos.<sup>9</sup> Entre os casos hereditários a medida de profilaxia é a retirada do ovário e das tubas uterinas que, segundo Finch *et. al.* (2006), reduz o risco de desenvolvimento do câncer de ovário em até 80%.<sup>10</sup>

Atualmente a forma mais comum para o tratamento do câncer de ovário é a cirurgia com a retirada do material canceroso, quimioterapia seguida de radioterapia.<sup>11</sup> Esses tratamentos oferecem muito desconforto para o paciente, são passíveis de resistência celular e inúmeros efeitos colaterais são descritos como neurotoxicidade, febres, náuseas, entre outros.<sup>12</sup> Isto posto, se faz necessária a busca por um tratamento mais eficiente e com menores efeitos colaterais. Devido essa deficiência no tratamento do câncer de ovário este trabalho pretende avaliar a ação antitumoral do híbrido de monastrol-H<sub>2</sub>S sobre linhagem de câncer de ovário

## 1.2 O H<sub>2</sub>S e suas generalidades biológicas

O H<sub>2</sub>S é um gás reconhecido devido ao odor de ovo podre e, em concentrações acima de 530 ppm, pode ser associado a efeitos tóxicos ao homem como intoxicação do sistema nervoso central e inibição do sistema respiratório.<sup>13,14</sup>

Os aminoácidos cistina e metionina são os precursores da biossíntese do H<sub>2</sub>S. A biossíntese é mediada por três enzimas: cistationina- $\alpha$ -liase (CSE), cistationina- $\beta$ -sintetase (CBS) e 3-mercaptopiruvato enxofretransferase (MPST).<sup>15</sup> O metabolismo do H<sub>2</sub>S, por sua vez, se passa principalmente pela tiol-S-transferase formando o dimetilsulfeto ou, ainda, o metabolismo pode ocorrer por processos mitocondriais, visto que este composto também atua como redutor de espécies radicalares como NO, ClO<sup>-</sup> entre outros.<sup>16,17</sup>

Em meio biológico o H<sub>2</sub>S apresenta várias funções, a citar, o controle da concentração de cálcio nas células da microglia<sup>18</sup>, proteção de células neuronais do estresse oxidativo (*in vivo*)<sup>19</sup>, atuação na neurotransmissão<sup>20</sup>, dilatação de vasos sanguíneos (via canais de potássio)<sup>21</sup>. Esse gás ainda apresenta curiosa dualidade quanto aos efeitos sobre a inflamação<sup>22</sup> e sobre o câncer.<sup>23</sup>

Li e colaboradores, em 2005, mostraram que a injeção de lipopolissacarídeos (LPS) *in vivo* aumenta a produção endógena de H<sub>2</sub>S e ativa mediadores inflamatórios.<sup>24</sup> Após a inibição da síntese endógena de H<sub>2</sub>S (inibição da enzima CSE) verificaram que os tecidos inflamados foram parcialmente protegidos. Para comprovar que o efeito

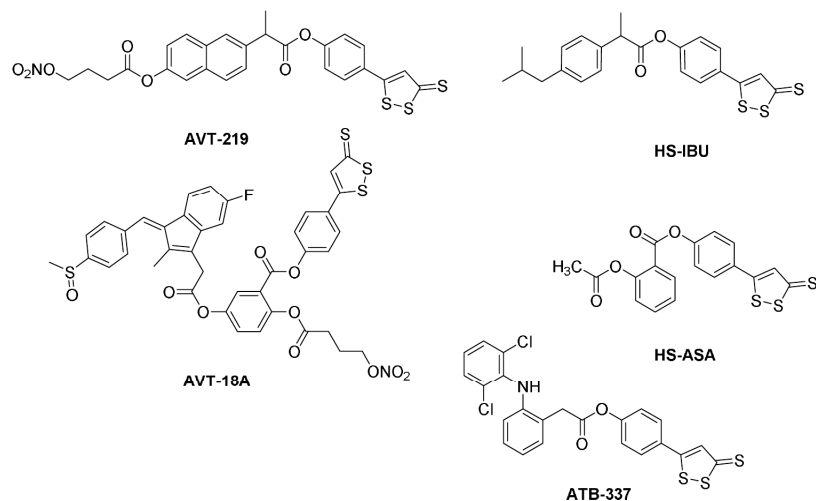


inflamatório ocorre por intermédio do H<sub>2</sub>S, os autores trataram os animais com NaHS (liberador de H<sub>2</sub>S) e observaram que a espécie H<sub>2</sub>S foi capaz de induzir resposta inflamatória caracterizada pela infiltração de neutrófilos principalmente no pulmão e no fígado.<sup>24</sup>

Em contrapartida, Wallace e colaboradores (2007) mostraram que o dano gástrico observado após a administração de diclofenaco foi reduzido a menos de 90% quando foi utilizado o ATB-337 (híbrido do diclofenaco liberador de H<sub>2</sub>S, Figura 1, página 5). Verificaram ainda que o híbrido inibiu a aderência de leucócitos, bem como a produção de TNF $\alpha$ . Além disso, o híbrido se mostrou um anti-inflamatório mais potente que o diclofenaco, pois exibiu o mesmo resultado na diminuição do volume da pata do camundongo no teste de carragenina em dose três vezes menor.<sup>25</sup>

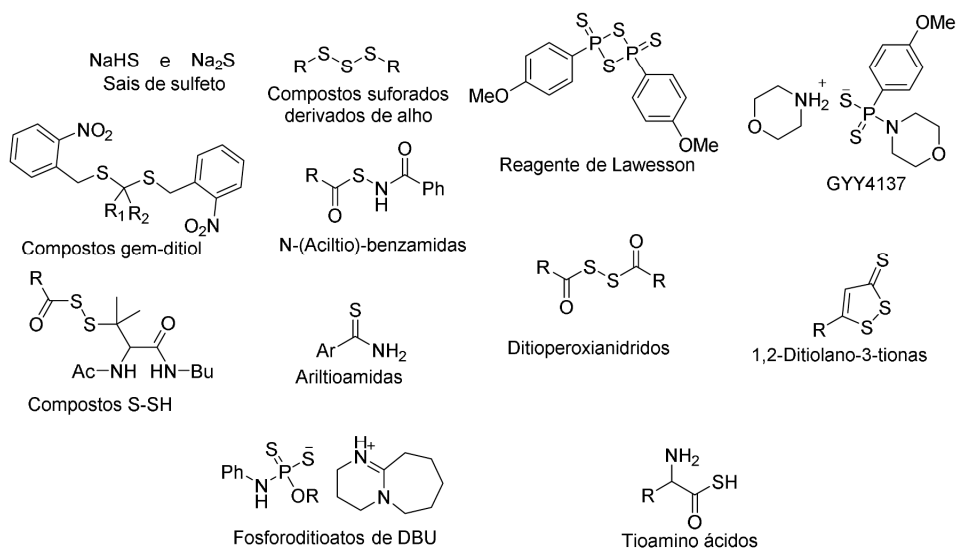
Hellmich e colaboradores (2004) demonstraram dualidade do H<sub>2</sub>S quanto à proliferação da linhagem HCT116, pois quando altos níveis de NaHS (1-3 mM) foram avaliados houve inibição da proliferação contudo, em concentrações de 10 a 100 vezes menores, foi observada a proliferação.<sup>23</sup> Os mecanismos de modulação da proliferação de células HCT116 por H<sub>2</sub>S ainda não foram esclarecidos.

Outro exemplo da ação anti-proliferativa do H<sub>2</sub>S foi apresentado por Chattopadhyay e colaboradores, em 2012. Os autores verificaram que a aspirina liberadora de H<sub>2</sub>S (HS-ASA) e o ibuprofeno liberador de H<sub>2</sub>S (HS-IBU) apresentam características anti-proliferativas interessantes, entre elas a capacidade de aprisionar as células de câncer de colo, mama, pulmão e leucemia nos estágios G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do ciclo de divisão celular, apresentando IC<sub>50</sub> de 1,8-4,2  $\mu$ M e 1,9-6,2  $\mu$ M respectivamente (Figura 1).<sup>26</sup> Um ano mais tarde, Kodela e colaboradores reportaram que os híbridos do naproxen liberadores de H<sub>2</sub>S também apresentaram atividade antitumoral com IC<sub>50</sub> promissores, AVT-219 (0,08-0,15  $\mu$ M) e AVT-18A (0,089-0,270 $\mu$ M), quando avaliados, *in vitro*, frente as mesmas linhagens testadas por Chattodadhyay (Figura 1).<sup>27</sup>



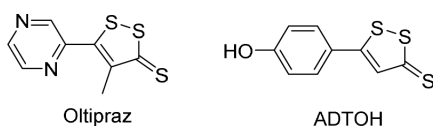
**Figura 1.** Híbridos liberadores de H<sub>2</sub>S com aplicação biológica.

Na Figura 2 são apresentados os compostos liberadores de H<sub>2</sub>S mais comuns na literatura. Esses compostos podem ter origem sintética ou natural como os derivados do alho.<sup>28</sup>



**Figura 2.** Exemplos de compostos capazes de liberar H<sub>2</sub>S.

Dentre os compostos liberadores de H<sub>2</sub>S tem se destaque as 1,2-ditiolano-3-tionas entre elas o Oltipraz e o ADTOH.(Figura 3, página 6)

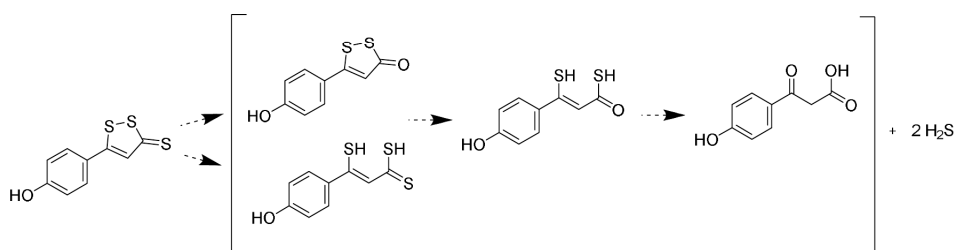


**Figura 3.** Oltipraz e ADTOH exemplos de núcleo de 1,2-ditolano-3-tionas empregado como liberadores de H<sub>2</sub>S.

O Oltipraz foi avaliado por Silvino e colaboradores, em 1986, no hospital das clínicas de São Paulo. Esse composto apresentou eficácia relativa de 59,2% de cura da esquistossomose, entretanto efeitos colaterais de caráter sistêmico principalmente como tonturas, sonolência, náuseas e cefaléias foram apresentados por 22% dos pacientes tratados. Entretanto, este núcleo Oltipraz vem ganhando mais espaço nas pesquisas, devido suas características quimioprotetoras de indução de enzimas de desintoxicação DTD e GSH transferase em células de câncer como foi mostrado por O'Dwyer e colaboradores em 1997.<sup>29</sup>

### 1.3 Classe 1,2-ditolano-3-tiona

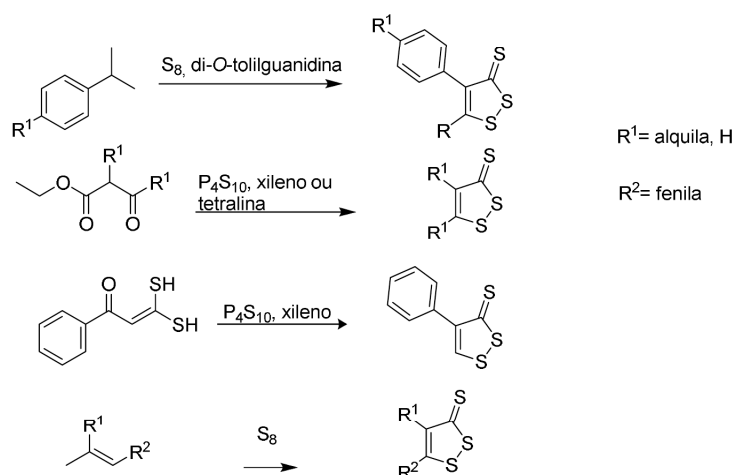
As 1,2-ditolano-3-ditionas são substâncias capazes de liberarem H<sub>2</sub>S lentamente no meio biológico.<sup>30</sup> Esse mecanismo de liberação ainda não foi completamente elucidado, contudo, em 2010, Giustarini e colaboradores sugeriram alguns dos possíveis metabólitos para o ADTOH que é um dos representantes mais comuns dessa classe de compostos (Figura 4).<sup>30</sup>



**Figura 4.** Proposta adaptada de metabólitos intermediários na liberação de H<sub>2</sub>S pelo ADTOH<sup>30</sup>.

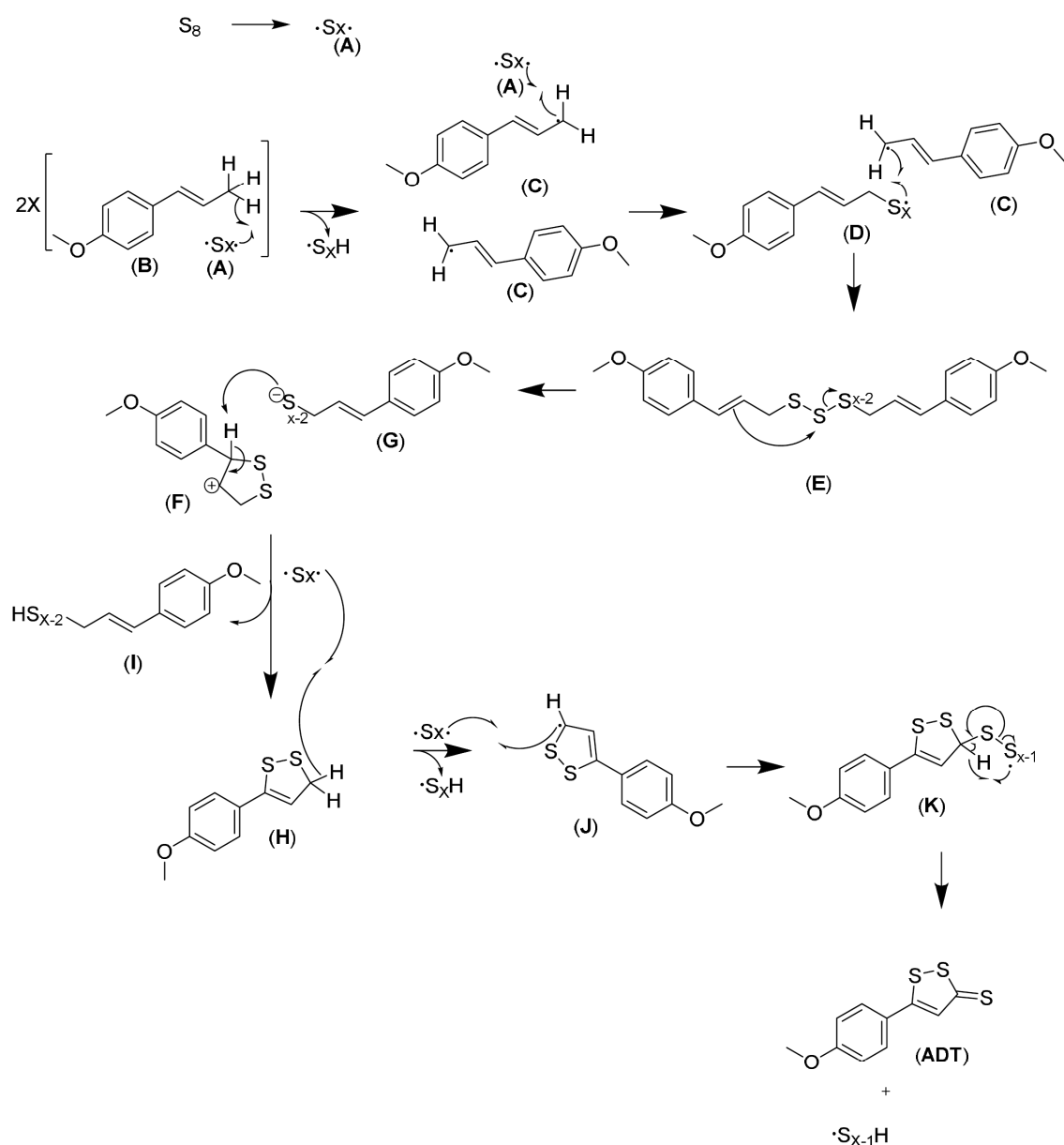
Landis e colaboradores, em 1965, revisaram os principais reagentes utilizados para a síntese do núcleo 1,2-ditolano-3-ditionas (Figura 5, página 7).<sup>31</sup> Entre os reagentes mais reportados, se destacam os grupos metilalílicos que geralmente são

tratados ou com enxofre molecular ou com pentassulfeto de fósforo. Esse tipo de reação se processa sob temperaturas elevadas e, geralmente, o produto é obtido em baixos rendimentos de 20-40%.<sup>32</sup>



**Figura 5.** Reações que formam o núcleo 1,2-ditolano-3-tionas em uma única etapa.

Alguns autores já descreveram propostas de mecanismo para a formação do núcleo 1,2-ditolano-3-tiona.<sup>31,33</sup> Todos os mecanismos propostos envolvem a adição de um radical alílico juntamente com produtos resultantes da quebra homolítica das ligações entre átomos de enxofre no enxofre molecular. Neto, em 2013, propôs o mecanismo para o núcleo ADT que é precursor metilado do ADTOH, um representante da classe das 1,2-ditionas. (Figura 6, página 8).<sup>34</sup>



**Figura 6.** Proposta mecanística para a formação do ADT (adaptação de Neto 2013).<sup>34</sup>

Em altas temperaturas o enxofre é clivado homoliticamente formando o dirradical **A** que abstrai um H<sup>•</sup> do *trans*-anetol originando o composto **C**. Com a adição de **A** em **C** ocorre a formação da espécie **D**. Outro equivalente de **C** é adicionado em **D** e forma um intermediário neutro **E** que sofre ciclização formando um cátion com anel de cinco membros **F** e liberando o ânion **G**. O próton benzílico do intermediário **F** é abstraído pelo par de elétrons não ligantes de **G**, formando o intermediário **H**. Um equivalente de **A** abstrai um H<sup>•</sup> de **H** formando o radical **J**. Em seguida, outro equivalente de **A** se

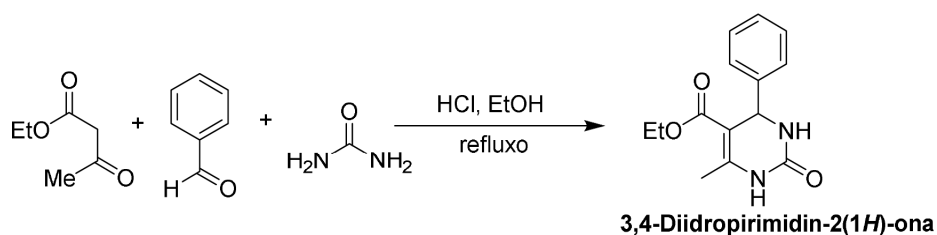


adiciona ao radical **J** formando **K** que finalmente é convertido no **ADT** através de um arranjo intramolecular.

A proposta de criar híbridos moleculares objetiva combinar propriedades singulares de cada substância, de tal maneira que ocorra melhoria nas atividades medicinais e diminuição dos efeitos colaterais.<sup>35</sup> A formação de compostos híbridos liberadores de H<sub>2</sub>S é uma estratégia que vem sendo usada e que visa melhoria na ação de compostos conhecidos como a aspirina e o diclofenaco, entre outros.

#### 1.4 Monastrol: inibidor seletivo da Eg5 no câncer

Em 1893, foi reportada por Pietro Biginelli a ciclocondensação do acetoacetato de etila, benzaldeído e ureia, catalisada por ácido clorídrico, em única etapa formando o núcleo de diidropirimidinona (Figura 7).<sup>36</sup>



**Figura 7.** Reação clássica de Biginelli para a formação de 3,4-diidropirimidin-2(1H)-ona.

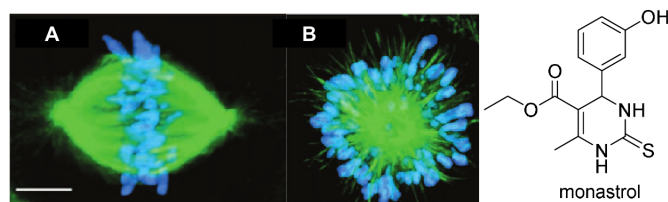
Dentre os adutos de Biginelli se destaca o monastrol (Figura 8, página 10) que é um reconhecido inibidor seletivo da enzima Eg5.<sup>37</sup>

Mayer e colaboradores, em 1999, após a triagem com 139 compostos buscando novos alvos para o tratamento de câncer descobriram que o monastrol apresentava inibição seletiva da enzima Eg5.<sup>37</sup>

A enzima Eg5 é uma proteína da classe das cinesinas que atua na separação dos centrossomos, sendo responsável pela formação do eixo bipolar durante a mitose.<sup>38</sup> As cinesinas estão entre as principais classes de proteínas motoras em células eucarióticas bem como as miosinas e dineínas.<sup>4,39</sup> No genoma humano encontram-se descritas 40 cinesinas e essas são responsáveis pela locomoção de proteínas vesículas e organelas ao longo dos microtubulos.<sup>4,39</sup>

As cinesinas hidrolizam ATP na taxa de 80 substâncias por segundo e se locomovem 80 Å por substância de ATP com a velocidade de 6400 Å por segundo. O complexo cinesina/ATP tem grande afinidade por microtubulos. As cinesinas usualmente realizam o transporte do centro para a periferia celular.<sup>4,39</sup>

Conchran e colaboradores, em 2005, sugeriram que o mecanismo de inibição da Eg5 seria via interação da substância do monastrol com o sítio alostérico dessa cinesina. Esse complexo seria capaz de manter o fosfato inorgânico (Pi) no sitio catalítico assim, o ATP, após sofrer hidrólise é reconstituído nesse complexo monastrol-Eg5. Logo, a liberação de energia requerida para os processos de produção e manutenção dos fusos mitóticos é interrompida.<sup>38</sup> Nessas condições a Eg5 não forma o fuso mitótico de maneira apropriada e os cromossomos se apresentam-se dispersos e, portanto, o ciclo celular é interrompido.



**Figura 8.** Imunofluorescência: tubulina (em verde), cromatina (em azul) A) Microtubulo e fuso mitótico normal B) Microtubulo e fuso inibido pelo monastrol; Estrutura do monastrol.- Adaptado de Mayer(1999).<sup>37</sup>

Os antimitóticos são utilizados em terapias para o tratamento do câncer visto que as células de câncer estão em constante fase de crescimento.<sup>40</sup> Antimitóticos como o paclitaxel e vincristina se ligam à tubulina, esses fármacos perturbam o sistema nervoso periférico, pois inibem os neurônios sensoriais.<sup>40,41</sup> Assim inibidores de Eg5 como o monastrol são uma alternativa para a criação de novos antimitóticos sem a manifestação de neurotoxicidade pois não atuam diretamente nas tubulinas.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

Sintetizar o híbrido monastrol-H<sub>2</sub>S e avaliar a atividade antiproliferativa em células de câncer de ovário (Figura 9, página 11).

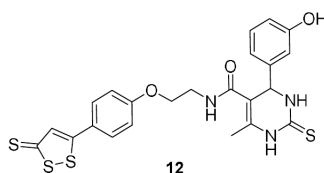


Figura 9. Estrutura do híbrido monastrol H<sub>2</sub>S (**12**).

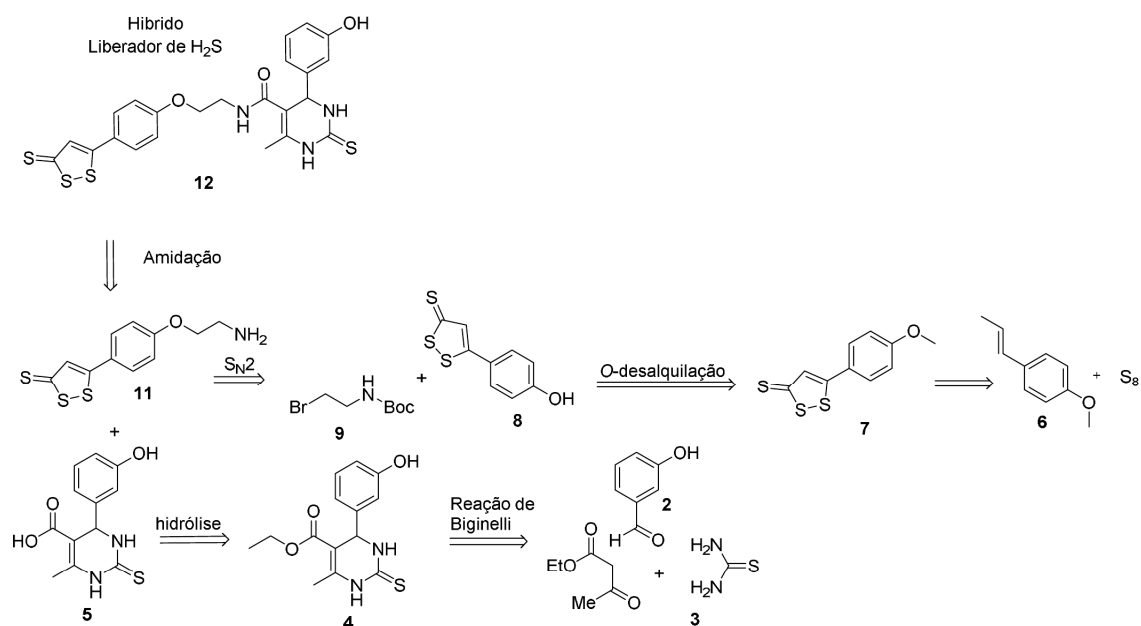
## 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar o monastrol;
- ✓ Sintetizar o ácido de monastrol;
- ✓ Sintetizar o ADTOH;
- ✓ Acoplar o ADTOH ao espaçador;
- ✓ Acoplar o 5-(4-(2-aminoetoxi)fenil)-3H-1,2-ditiolano-3-tiona (**11**) com o ácido de monastrol;
- ✓ Avaliar atividade antiproliferativa do híbrido monastrol-H<sub>2</sub>S e de seus precursores;

## 3 Resultados e discussões

### 3.1 Análise retrossintética

A estratégia utilizada para a síntese do híbrido monastrol-H<sub>2</sub>S (**12**) consistiria na amidação de (**11**) com o ácido de monastrol (**5**) (Figura 10, página 12). O ácido teria origem na hidrólise do aduto de Biginelli **4**. O aduto de Biginelli seria sintetizado a partir da ciclo-condensação do acetoacetato de etila (**1**), 3-hidroxibenzaldeído (**2**) e tiourea (**3**). O hidrocloreto de 5-(4-(2-aminoetoxi)fenil)-3H-1,2-ditiolano-3-tiona (**11**) teria sua origem na reação de substituição nucleofílica bimolecular (S<sub>N</sub>2) entre o ADTOH (**8**) (nucleófilo) e a amina protegida (**9**) (eletrófilo). Esse nucleófilo seria formado a partir da O-desalquilação do ADT (**7**). Finalmente o ADT seria sintetizado pela condensação do *trans*-anetol (**6**) tratado com enxofre molecular.

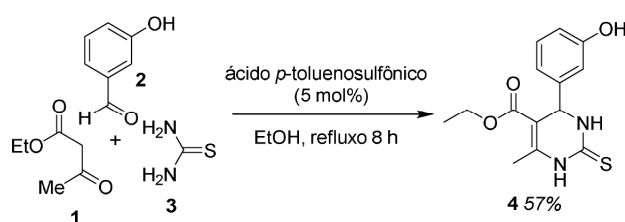


**Figura 10.** Análise retró sintética para construção do híbrido liberador de H<sub>2</sub>S.

### 3.2 Síntese do monastrol (4)

A síntese do monastrol foi realizada a partir da ciclocondensação do 3-hidroxiacetato de etila, do aldeído 4-hidroxi, da tiourea em etanol sob refluxo utilizando como catalisador o ácido *p*-toluenossulfônico (5 mol%) seguindo o protocolo adaptado de Biginelli (Figura 11).<sup>42</sup>

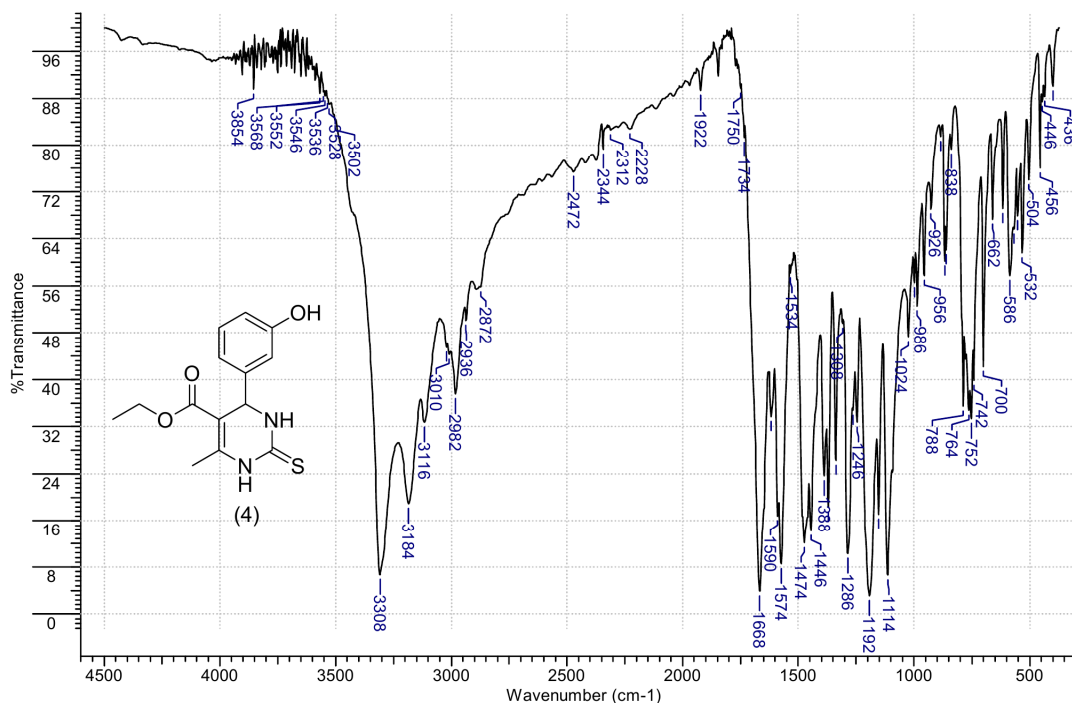
O produto foi purificado por precipitação ao adicionar água ao sistema. Foram obtidos rendimentos moderados, em torno de 57%, para o monastrol (4).



**Figura 11.** Síntese do monastrol.

A espectroscopia na região do infravermelho auxiliou na identificação dos grupos funcionais presentes na substância de monastrol. Na Figura 12 (página 13) está apresentado o espectro na região do infravermelho obtido em pastilha de KBr para o monastrol. Em 3010 cm<sup>-1</sup> pode-se verificar a banda de estiramento das ligações C<sub>sp</sub>2-H do anel aromático, em 1668 cm<sup>-1</sup> encontra-se a banda de estiramento referente à ligação C=O característica de ésteres vinílicos. O estiramento da ligação

C=S é representado pela banda em  $1192\text{ cm}^{-1}$ . Em  $3184\text{ cm}^{-1}$  tem-se a banda devida ao estiramento N-H e em  $3308\text{ cm}^{-1}$  aquela devida ao estiramento O-H de fenol. Esses dados estão coerentes com os apresentados por Ramos e colaboradores em 2012 (Tabela 1).<sup>43</sup>



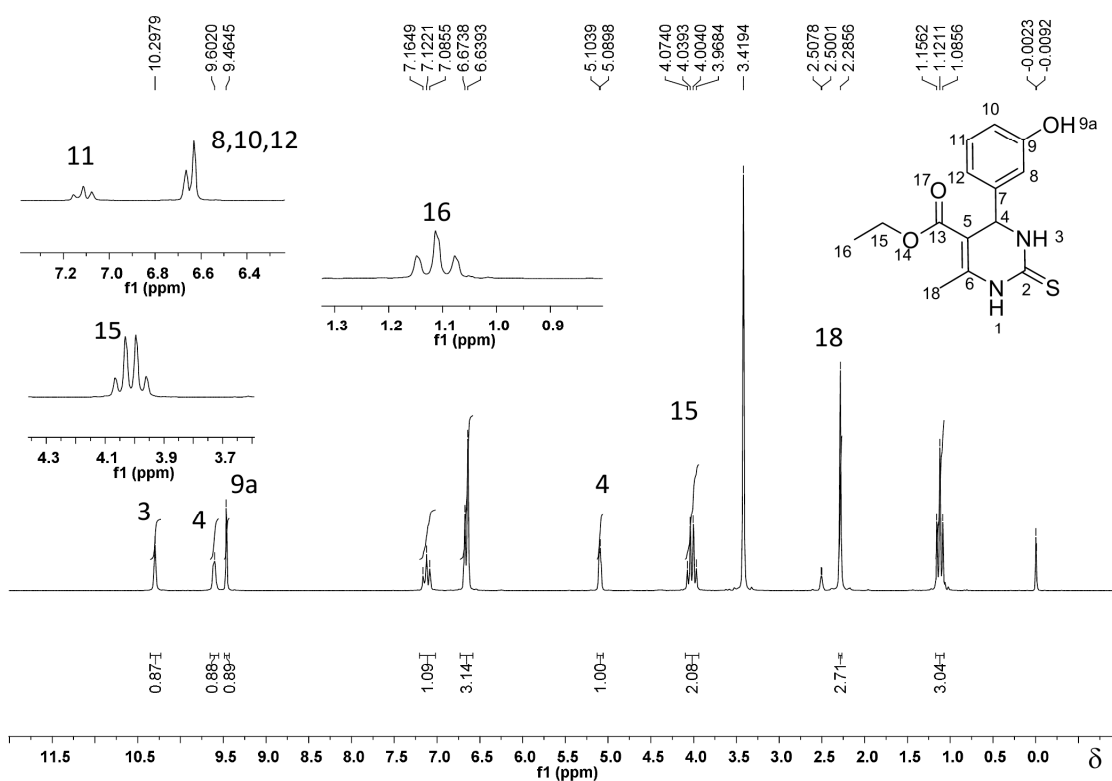
**Figura 12.** Espectro na região do infravermelho (KBr) da amostra de monastrol.

**Tabela 1.** Bandas na região do infravermelho em pastilha de KBr observadas versus encontradas na literatura para o monastrol

Banda observada/ $\text{cm}^{-1}$ FT-IR (KBr)	Banda citada na literatura <sup>43</sup> / $\text{cm}^{-1}$ FT-IR (KBr)
3308, 3184, 3010, 2982, 1668, 1574, 1474, 1286, 1192, 1114, 752	3304, 3179, 3109, 2982, 1662, 1573, 1479, 1375, 1293, 1196, 1117, 747

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 13, página 14) também apresentou resultados coerentes com os encontrados na literatura (Tabela 2, página 15). O tripleto com deslocamento químico ( $\delta$ ) 1,12 ppm, integrado para três núcleos de hidrogênio, foi atribuído ao hidrogênio H16 (Figura 13). H16 acopla com os hidrogênios do carbono metilênico (H15) com uma constante de  $J = 7,0\text{ Hz}$ . o sinal de H15 é apresentado como um quarteto centralizado em 4,02 ppm, constante de acoplamento de  $J = 7,0\text{ Hz}$ . O sinal presente em 2,29 ppm é um simpleto e foi atribuído aos hidrogênios da metila H18. Esse conjunto de sinais evidencia a presença da unidade estrutural proveniente do acetoacetato de etila ao produto.

Centralizado em 5,10 ppm, está localizado o duplete ( $J = 2,8$  Hz) que foi atribuído ao hidrogênio benzílico (H4). Os hidrogênios aromáticos H8, H10, H12 são representados pelo multiplete em 6,64–6,67 ppm integrado para três hidrogênios. O sinal centralizado em 7,12 ppm, integrado para um hidrogênio, correspondente ao H11. Este pode acoplar tanto com H10 quanto com H12 formando assim, um triplete ( $J = 7,0$  Hz). Em altos valores de deslocamento químico 9,46 ppm, 9,60 ppm e 10,30 ppm são encontrados sinais largos integrados para um hidrogênio cada, atribuídos aos hidrogênios da hidroxila fenólica (H9a), ao H1 e H3 respectivamente. Estes conjuntos de sinais são característicos da tioureia e 3-hidroxibenzaldeído no esqueleto molecular do monastrol.



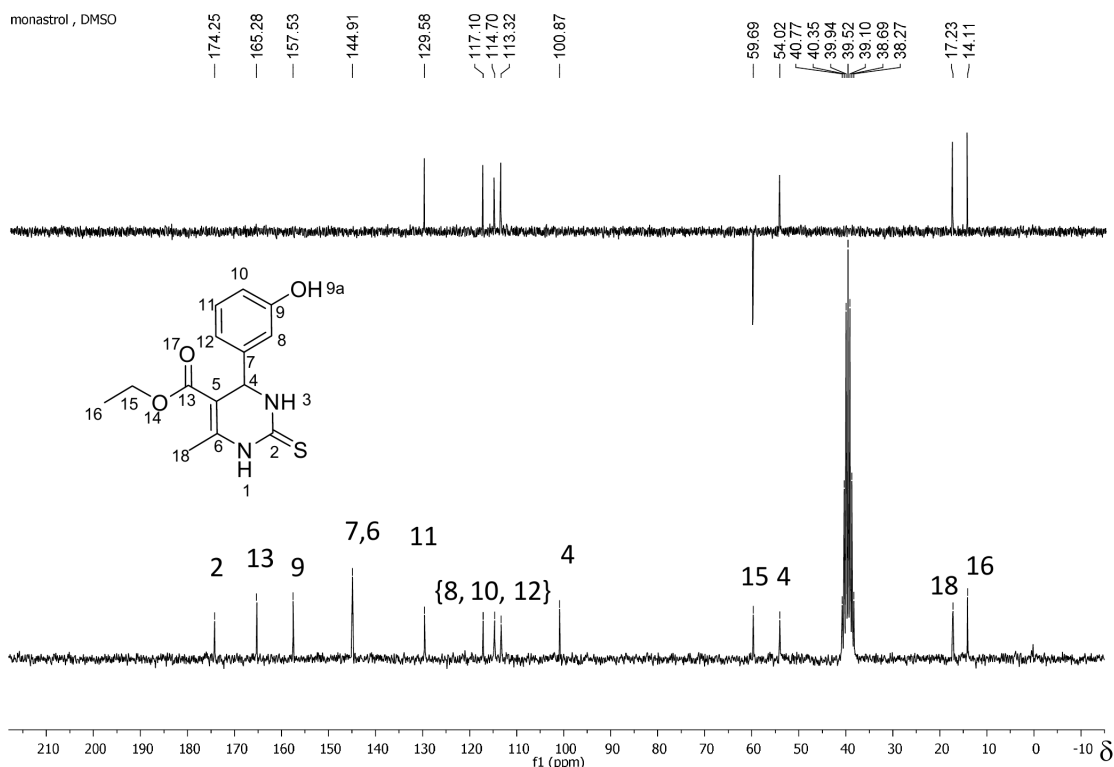
**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do monastrol (4).

**Tabela 2.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do monastrol em  $\text{DMSO-}d_6$  versus dados da literatura

200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$					300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ (Ramos et al 2012) <sup>43</sup>			
H	$\delta$ (ppm)	M	I	J(Hz)	$\delta$ (ppm)	M	I	J(Hz)
16	1,12	t	3	7,0	1,08	t	3	6,9
18	2,29	s	3	-	2,27	s	3	-
15	4,02	q	2	7,0	3,98	q	2	6,7
4	5,10	d	1	2,8	5,09	d	1	2,7
12,8,10	6,63-6,67	m	3	-	6,65	m	3	-
11	7,12	m	1	8,5	7,09	t	1	7,9
9a	9,46	sl	1	-	9,44	s	1	-
1	9,59	sl	1	-	9,59	s	1	-
3	10,29	sl	1	-	10,28	s	1	-

\*M=multipeto, I= integração, t=tripeto, s=simpleto, q=quarteto, sl=sinal largo.

Os sinais observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 14, página 16) foram atribuídos com o auxílio do programa *ChemBioDraw Ultra 14* (versão 14.0.0.117) e estão coerentes com os observados na literatura (Tabela 3, página 16). O sinal em 59,7 ppm está apresentado em fase negativa do DEPT, logo representa o carbono metilênico C15. O conjunto de sinais em 113,3 ppm, 114,7 ppm, 117,1 ppm foi atribuído aos carbonos C8, C10, C12 e os sinais em 129,6 ppm, 144,9 ppm e 157,5 ppm foram atribuídos aos carbonos aromáticos C6=C7, C9 e C11 respectivamente. Os sinais das metilas representadas pelos carbonos C16 e C18 possuem deslocamento químico de 14,1 ppm e 17,2 ppm respectivamente. Em 54,0 ppm verifica-se o sinal relativo ao carbono benzílico C4.



**Figura 14.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo) e subspectro DEPT 135 (acima), do monastrol (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

**Tabela 3.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  do monastrol versus citados na literatura

50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ $\delta$ (ppm)	75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ referência literatura <sup>43</sup> $\delta$ (ppm):
174,3; 165,3; 157,5; 144,9; 129,6; 117,1; 114,7; 113,3; 100,9; 59,7; 54,0; 17,2; 14,1.	174,6; 165,6; 157,9; 145,3; 145,2; 129,9; 117,5; 115,0; 113,7; 101,2; 60,5; 54,4; 17,6; 14,4.

### 3.3 Síntese do ácido de monastrol (5)

A hidrólise básica do monastrol foi avaliada utilizando as condições descritas na Tabela 4 (página 17). Verificou-se que grandes excessos de base não eram interessantes para que a reação de hidrólise ocorresse, pois nessas condições se observava a formação de uma mistura complexa, muito provavelmente oriunda da decomposição do aduto **4**. Ao diminuir em dez vezes a relação base/aduto de Biginelli ocorreu diminuição dos subprodutos, verificado por cromatografia em camada delgada (CCD). Como consequência, a purificação se tornou simples. Com a adição lenta de



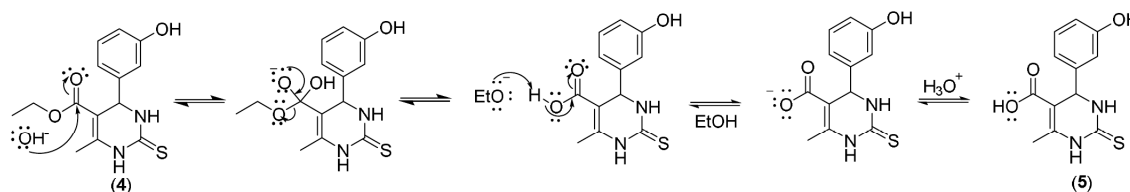
uma solução de HCl 2 mol/L o pH do sistema diminui (pH≈3) e o ácido precipitou puro. Finalmente, ao variar a base de hidróxido de sódio para hidróxido de potássio não observou-se variação significativa no rendimento

**Tabela 4.** Avaliação de condições para a hidrólise básica do aduto de Biginelli.

Reagente (eq.)	Solvente	Tempo	Rendimento	Referência
NaOH (33 eq.)	Metanol:água(1:1)	48 h	-	Kim, J. et al. (2012) <sup>44</sup>
NaOH (33 eq.)	Metanol:água(1:2)	48 h	Traços	Kim, J. et al. (2012)* <sup>44</sup>
KOH (3 eq.)	H <sub>2</sub> O	3 dias	80%	Klein, E. et al. (2007) <sup>45</sup>
NaOH (3 eq)	H <sub>2</sub> O	3 dias	84%	Klein, E. et al. (2007)* <sup>45</sup>

\*adaptada

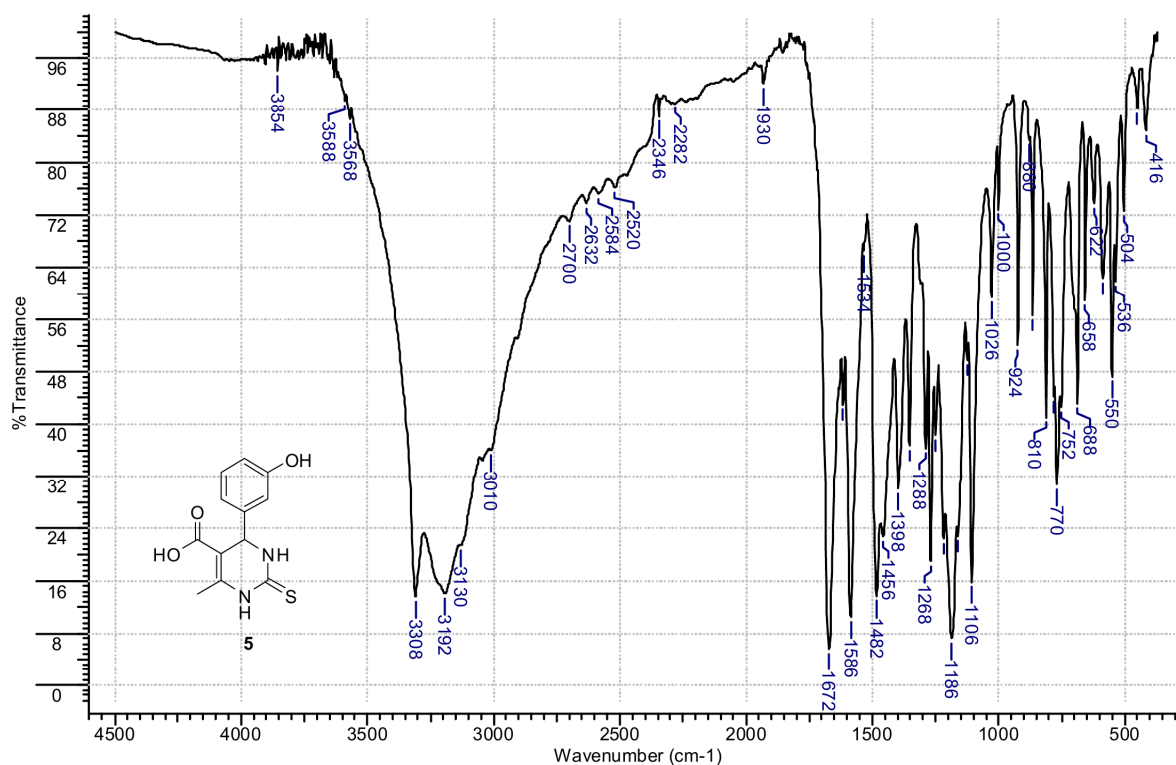
O mecanismo de hidrólise básica (Figura 15) consiste no ataque nucleofílico do  $\text{OH}^-$  ao carbono da carbonila seguido pelo deslocamento dos elétrons da dupla da carbonila para o átomo de oxigênio. O par de elétrons do oxigênio restabelece a dupla ligação com a liberação de um ânion etóxido. Prontamente o etóxido abstrai o próton do aduto de Biginelli formando etanol. Ao acidificar o meio as espécies aniônicas são protonadas dando origem ao ácido derivado do aduto de Biginelli.



**Figura 15.** Proposta de mecanismo da hidrólise básica do aduto de Biginelli.

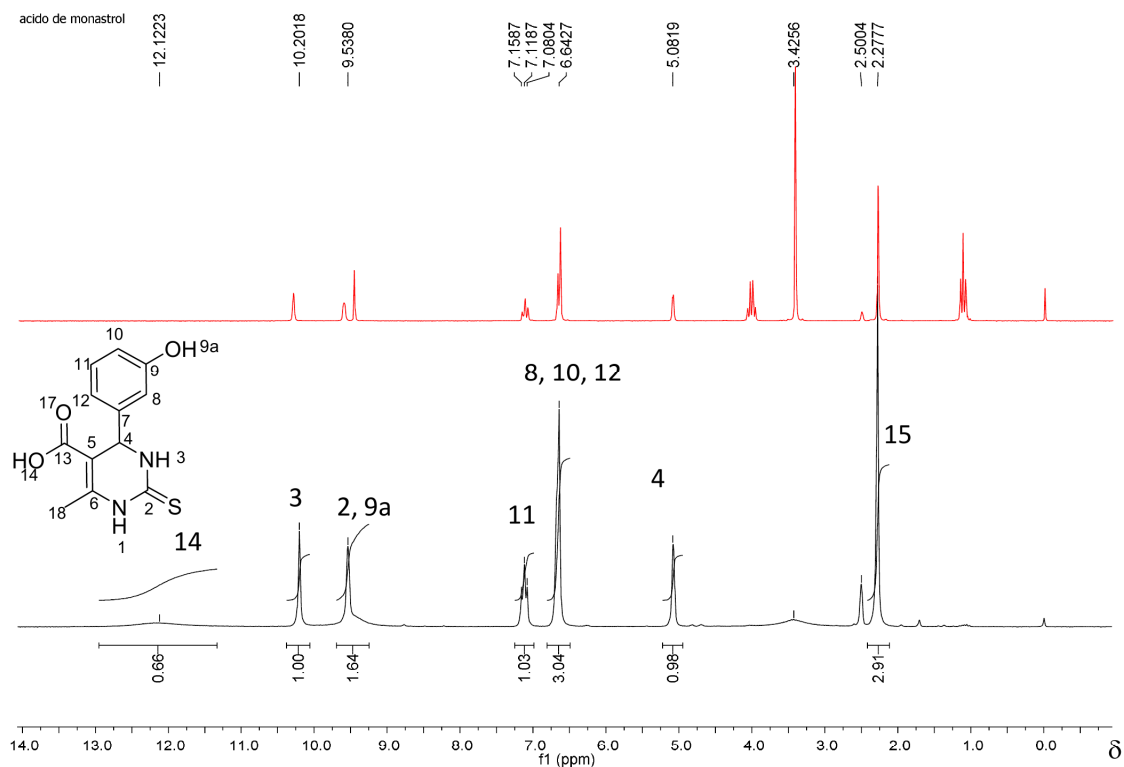
A espectroscopia na região do infravermelho auxiliou na identificação dos grupos funcionais do composto **5** (Figura 16). Em  $3308\text{ cm}^{-1}$  observa-se uma banda referente ao estiramento da ligação O-H do grupo fenólico. A banda em  $1586\text{ cm}^{-1}$  é

relativa ao estriamento da ligação C=C do alceno conjugado, o estiramento O-H do ácido é representado pela banda em  $3192\text{ cm}^{-1}$  até aproximadamente  $2500\text{ cm}^{-1}$  e a banda característica da carbonila do ácido está apresentada em  $1672\text{ cm}^{-1}$ . Em  $3130\text{ cm}^{-1}$  tem-se a banda atribuída à ligação N-H e finalmente em  $1186\text{ cm}^{-1}$  a banda correspondente ao estiramento assimétrico da ligação C=S.



**Figura 16.** Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr do ácido de monastrol.

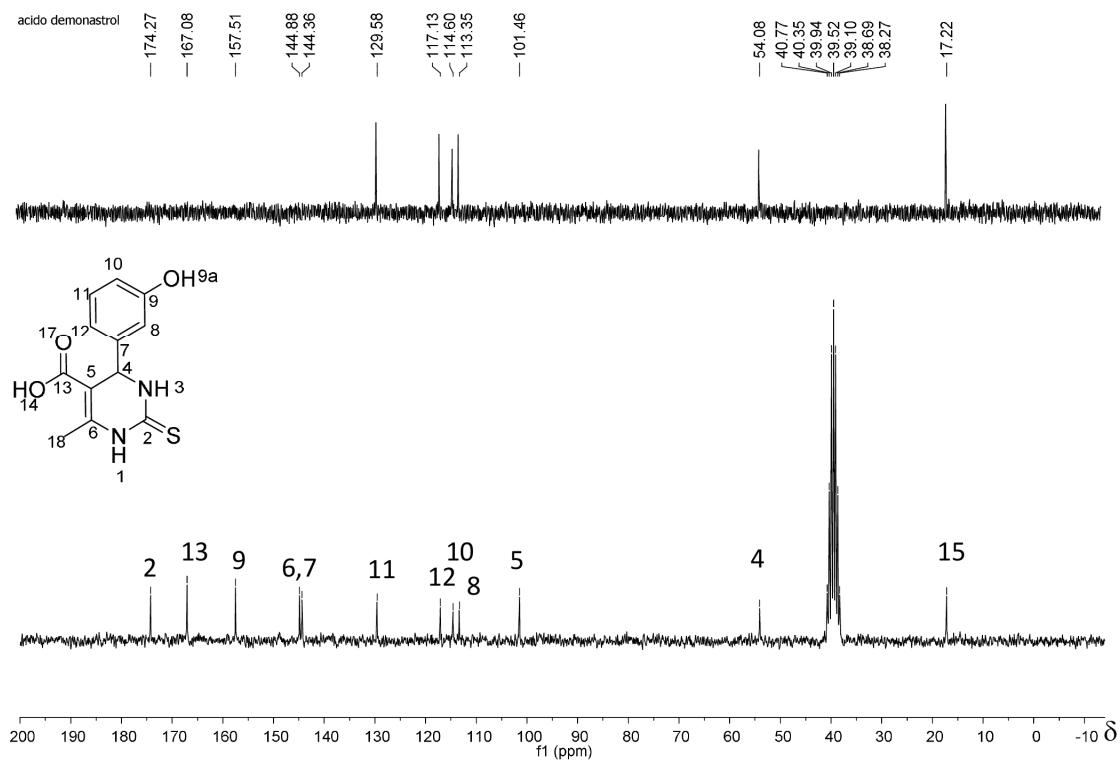
É possível comprovar a formação do ácido de monastrol comparando as diferenças entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do produto ácido (em preto) e do material de partida (em vermelho), Figura 17 (página 19). A ausência do tripleto próximo a 1 ppm e do quarteto próximo a 4 ppm no espectro em preto indica que o grupo etoxila não está mais presente na substância do produto. E, além disso, o sinal largo em 12,12 ppm indica a presença de um hidrogênio ácido.



**Figura 17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido de monastrol (preto) comparado com o monastrol (vermelho) (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ).

No experimento de RMN DEPT 135 (Figura 18, página 20) não se observam sinais com fase invertida, isto posto, confirma a ausência de grupos metilênicos, resultado esperado para o produto de hidrólise, **5**.

No espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 18, página 20) foram observados 12 sinais que podem ser atribuídos aos carbonos do ácido de monastrol. O sinal mais blindado em 17,2 ppm pode ser atribuído ao carbono da metila (C18). O carbono benzílico (C4) apresentou sinal em 54,1 ppm, os carbonos aromáticos apresentaram sinais na região de 113,4-144,9 ppm. Os outros sinais foram atribuídos aos carbonos não hidrogenados, como o carbono da tionila, em 174,3 ppm, o carbono carbonílico, em 167,1 ppm, os carbonos do alqueno conjugado do núcleo da pirimidina, em 101,5 ppm (C2) e em 157,5 ppm (C3).

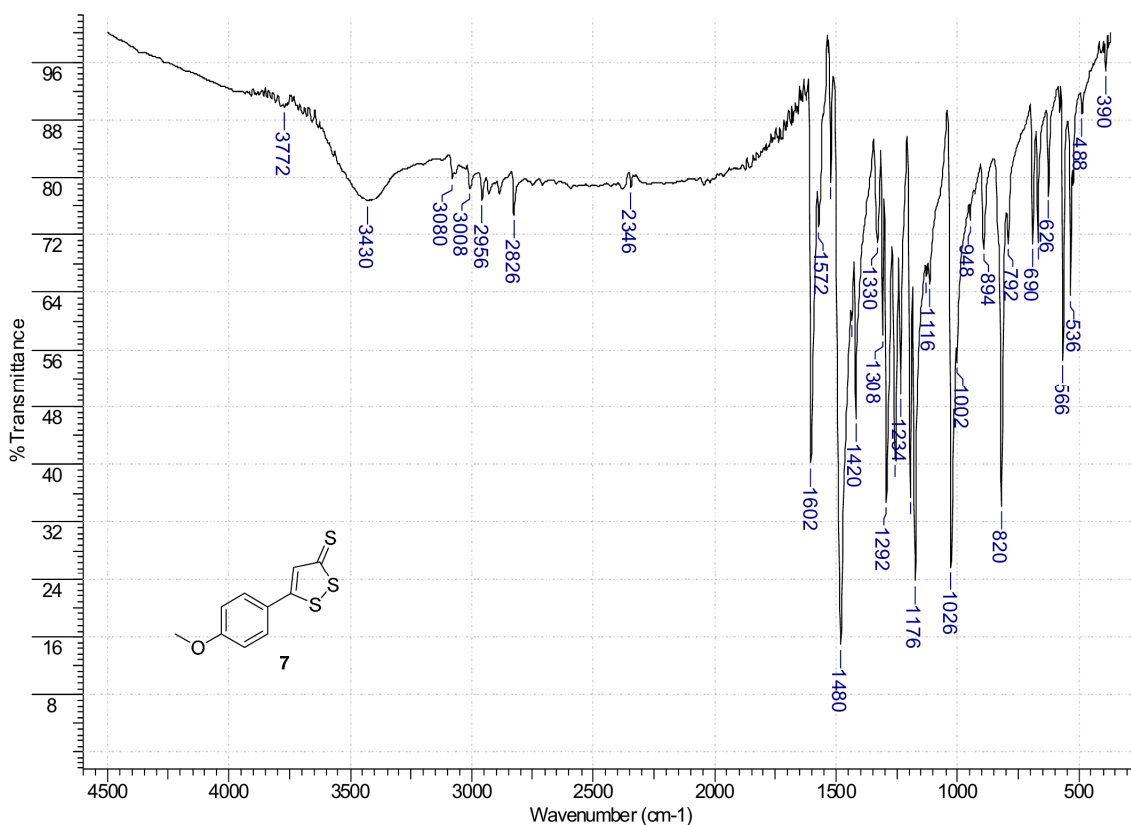


**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo) e subespectro DEPT 135 (acima), do ácido de monastrol (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

### 3.4 Síntese do 5-(4-metoxifenil)-3H-1,2-ditiolano-3-tiona [ADT (7)]

O ADT (7) foi obtido após o tratamento do *trans*-anetol com o enxofre molecular em excesso. O rendimento obtido foi de 15%, coerente ao encontrado na literatura (26% Sparatore *et al.* 2009<sup>46</sup>)

O espectro na região do infravermelho para o ADT (Figura 19, página 21), apresentou: uma banda em  $3080\text{ cm}^{-1}$  que foi atribuída ao estiramento do  $\text{Csp}^2\text{-H}$ , uma banda devida ao estiramento da ligação dupla do anel de cinco membros em  $1602\text{ cm}^{-1}$  e, finalmente, uma banda devida ao estiramento da ligação  $\text{C=S}$  em  $1176\text{ cm}^{-1}$ .



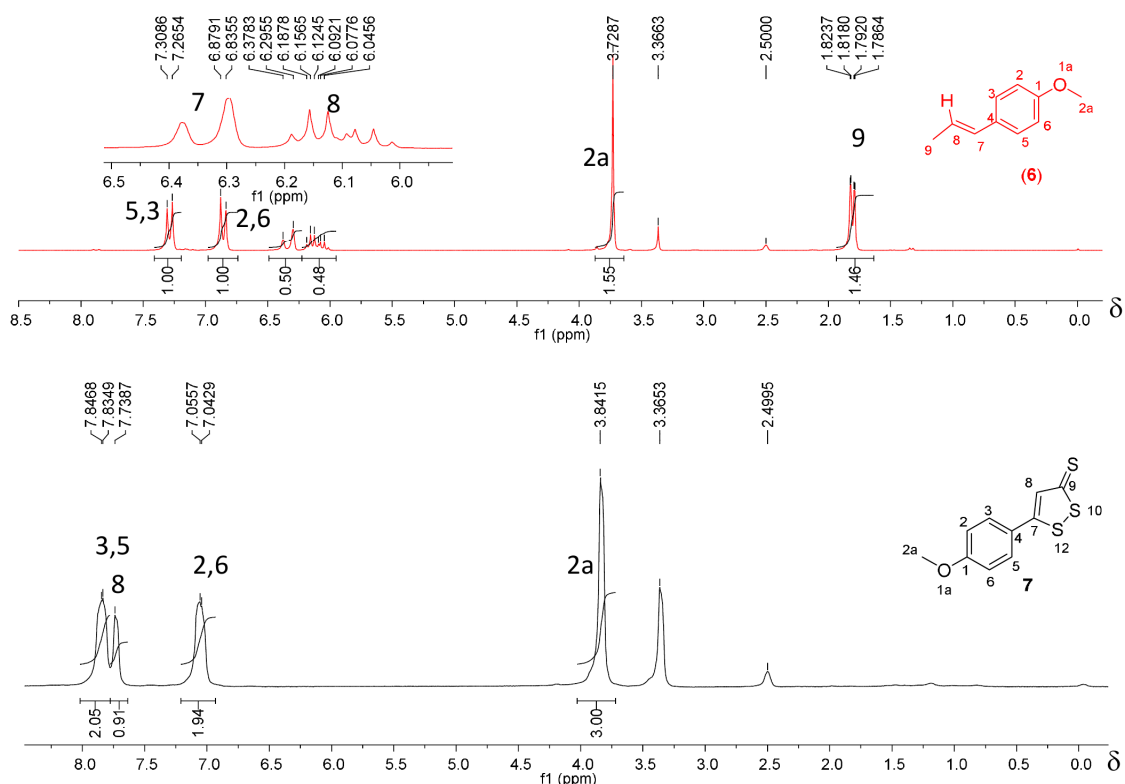
**Figura 19.** Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr do ADT (**7**).

Para confirmar a formação do grupo ADT compararam-se os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos deste composto com o seu material de partida [*trans*-anetol, (**6**)] (Figura 20, página 22).

No espectro RMN de  $^1\text{H}$  obtido para o composto **6**, verifica-se a presença de um duplete duplo, integrado para três hidrogênios centralizado em 1,81 ppm, característico do hidrogênios alílicos (H9). Esse desdobramento é consequente do sistema rígido do alqueno que permite o acoplamento entre o hidrogênio vinílico (H8) com uma constante  $^3J = 6,7$  Hz, bem como o acoplamento a longa-distância com o hidrogênio H6 ( $^4J = 1,2$  Hz). Outro sinal bem característico desse material é o quarteto duplo centralizado em 6,11 ppm atribuído ao H8. Este sinal é distorcido devido a influência do sinal do duplete em 6,86 ppm (fenômeno conhecido como efeito de teto). O desdobramento de H8 em quarteto duplo é devido ao acoplamento com H9, constante  $^3J = 6,7$  Hz, bem como, o acoplamento com hidrogênio vinílico H7 com constante  $^3J = 18$  Hz (acoplamento *trans*). O duplete aparente centralizado em 6,86 ( $^3J = 16$  Hz) foi atribuído ao H7. O acoplamento entre H7 com H9 existe mas não é

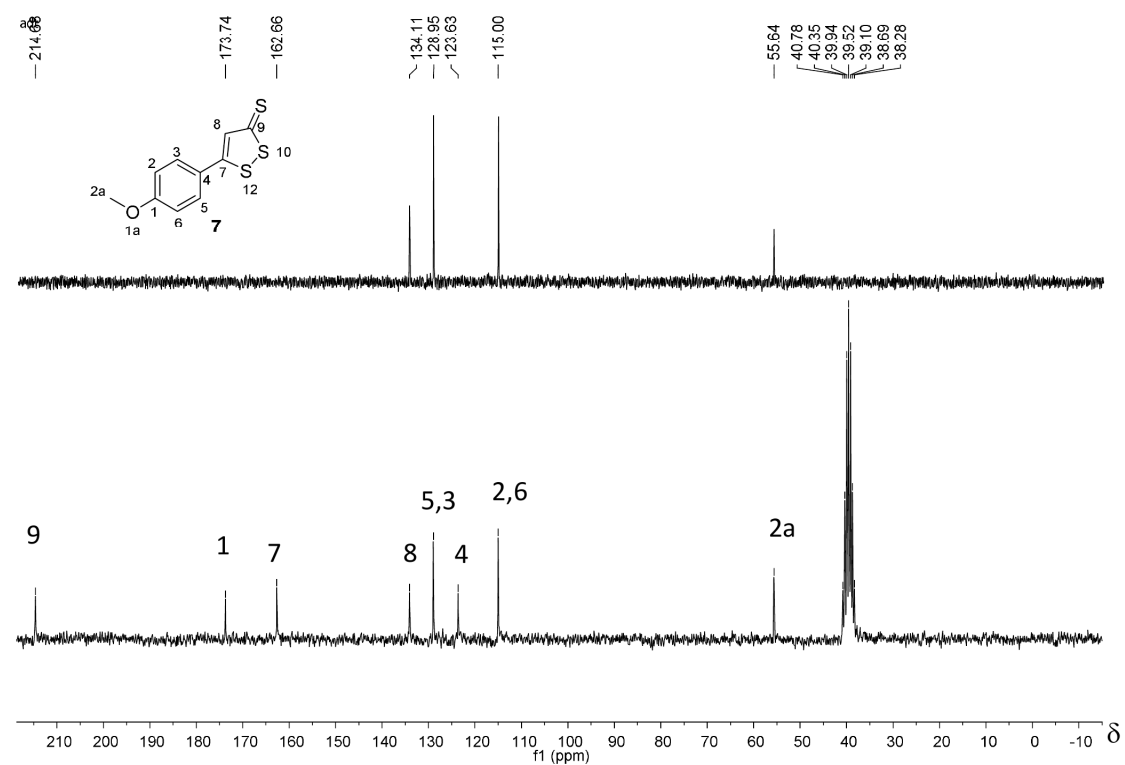
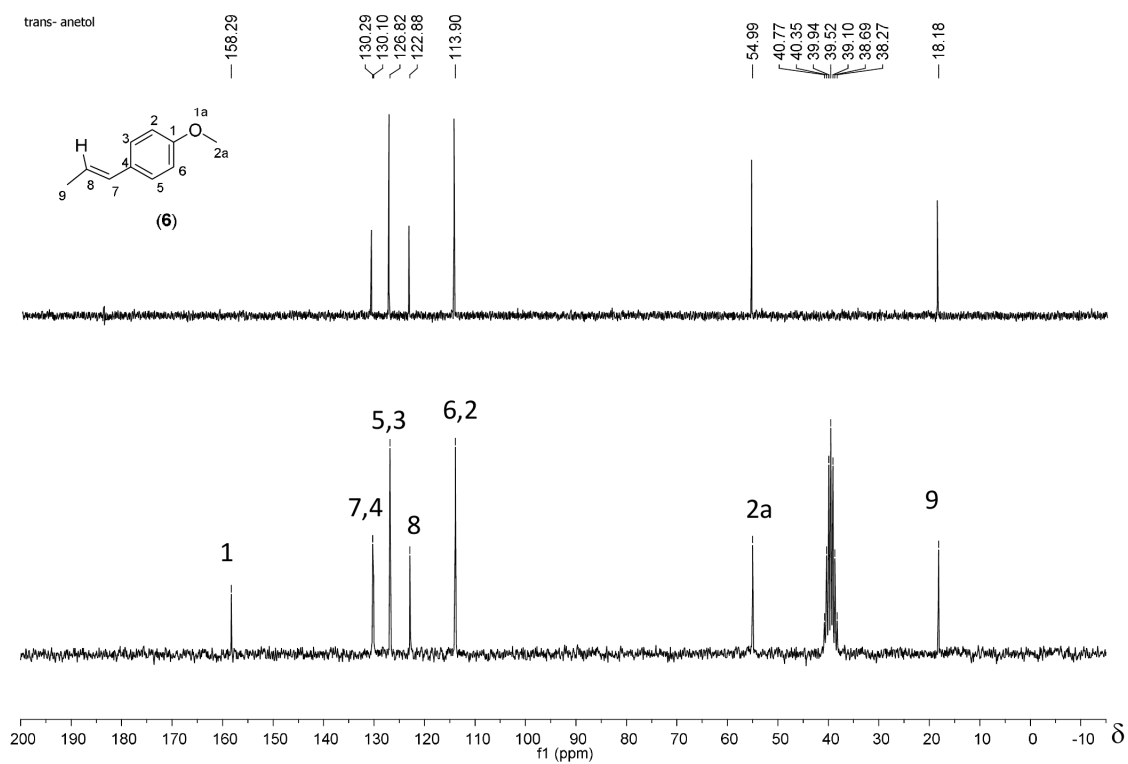
observado devido a resolução do equipamento o sinal se apresentou como um duplete aparente.

Como esperado, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o produto ADT (**7**), esse sinais destacados anteriormente para **6** não estão presentes. No ADT são observados dois dupletos na região de aromáticos característicos da simetria de substituição dessa substância. Adicionalmente observa-se um simpleto em 7,74 ppm atribuído ao hidrogênio vinílico (H8) e, em 3,84 ppm, o simpleto observado foi atribuído aos hidrogênios da metoxila. Desta forma se confirma a formação do núcleo ADT (**7**).



**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ADT (preto) comparado com o do *trans*-anetol (vermelho) (200MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ).

Pela espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram comparados os deslocamentos entre os sinais do *trans*-anetol e do produto ADT (Figura 21, página 23). Duas mudanças são bastante significativas e características da reação de conversão do *trans*-anetol em ADT como: i) Para o *trans*-anetol o sinal relativo ao carbono da metila (C8) se apresenta na região mais blindada do espectro (18,2 ppm). No ADT, o carbono C8 é hibridizado  $\text{sp}^2$  e está diretamente ligado ao enxofre, portanto apresenta-se mais desblindado (214,7 ppm). ii) fenômeno similar ocorre com o carbono C7 que no ADT apresenta-se bastante desblindado (162,7 ppm) devido à influência do enxofre.



**Figura 21.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 do *trans*-anetol (acima) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT do ADT (abaixo) (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

### 3.5 Síntese do 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditolano-3-tiona [ADTOH(8)]

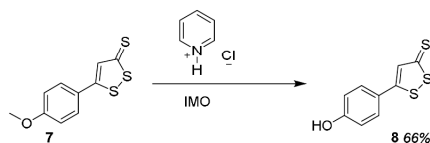
A O-desmetilação do ADT foi realizada sem solvente, na presença do cloridrato de piridina e com aquecimento por microondas, uma técnica que vem se mostrando muito interessante na química orgânica, pois reações podem ser realizadas em poucos minutos.

A irradiação de microondas é bastante usada em química, o aquecimento por esse método pode seguir dois mecanismos, por rotação de dipolos ou por condução iônica.<sup>47</sup> O primeiro segue o princípio no qual o campo oscilante da radiação de microondas (2,45 GHz) é capaz de alinhar os dipolos das substâncias (dipolo permanente ou induzido). A variação no campo elétrico induz as substâncias a mudarem a orientação de seus dipolos muito rapidamente, essa perda de energia do dipolo gera calor. O segundo mecanismo considera que o campo elétrico da radiação induz a migração de íons e o calor é obtido através das fricções desses íons. O aquecimento convencional ocorre por irradiação, condução e convecção, fenômenos que ocorrem de fora para dentro do meio reacional. Na radiação de microondas o aquecimento se propaga do interior para fora do meio reacional por isso muitas vezes esse método é capaz de diminuir o tempo das reações. Ainda existem controvérsias se o efeito da radiação influencia na cinética ou se apenas este tipo de aquecimento é mais eficiente.<sup>47</sup>

A síntese e purificação do ADTOH foram realizadas por diferentes métodos que estão apresentados na Tabela 5 (página 26).



**Tabela 5.** Condições e otimizações para a reação de obtenção de ADTOH a partir da O-desmetilação do ADT



entrada	Temperatura/°C (período)	rampa	Método purificação	Rendimento/%
1	200 (13min)	4min	Cromatografia Coluna*	40
2	200 (13min)	4min	Extração líquido-líquido	58
3	100 (6 min) 200 (4min)	4min 3min	Extração líquido-líquido	66

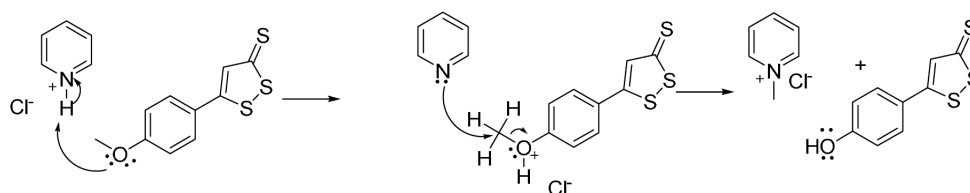
\*eluyente: hexano:acetato (3:1), sílica.

Para a síntese foram avaliadas mudanças no aquecimento (temperatura constante ou rampa até 200°C) e no método de purificação (cromatografia em coluna, ou extração líquido-líquido).

Durante a purificação por cromatografia em coluna foi observado que parte do bruto de reação permanecia retido na sílica e ao aumentar a polaridade do eluyente a resolução da separação diminuía. Sendo assim, parte do produto era perdida, ou ficava presa na sílica, ou contaminada com os subprodutos da reação.

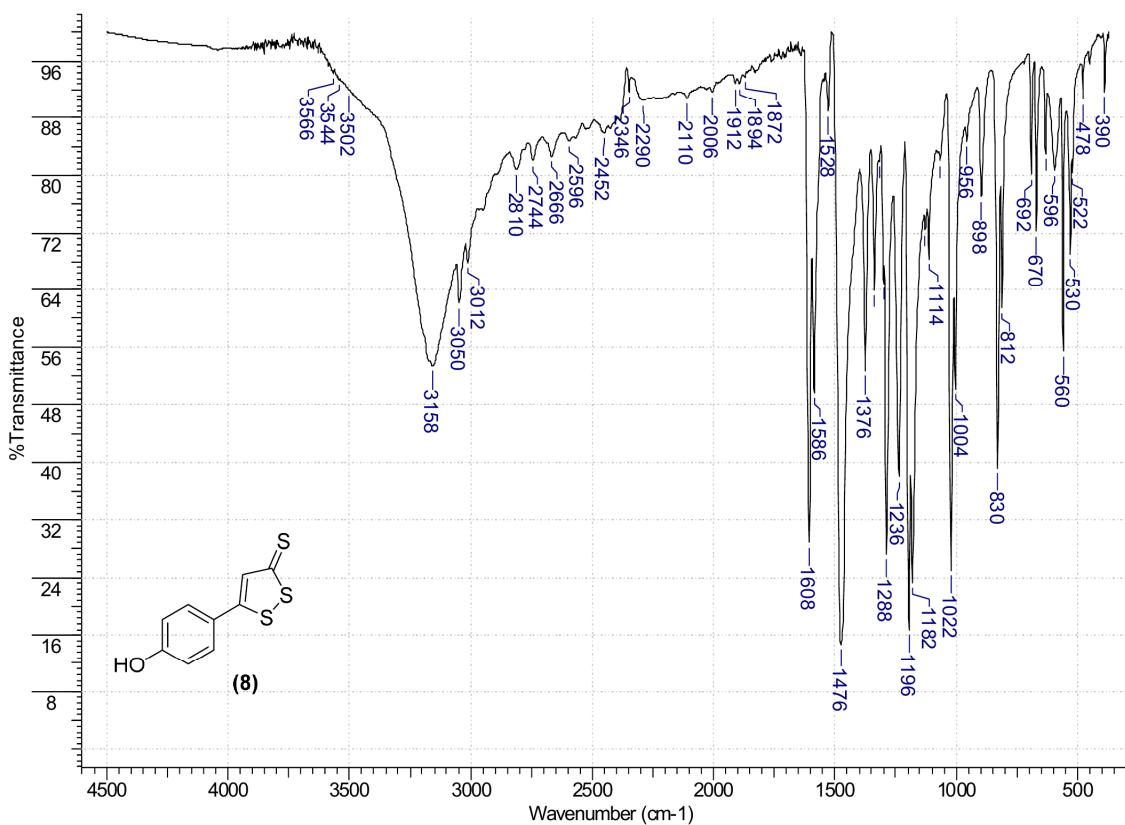
Ao realizar o procedimento de extração química líquido-líquido a separação foi mais eficiente. O ADTOH apresenta-se desprotonado em meio básico (pH ≈12), nessa forma ele é solúvel em água. Contudo, ainda existe em equilíbrio a forma protonada que tem a afinidade com solvente orgânico, como o diclorometano, sendo assim, o diclorometano deslocou o equilíbrio para a obtenção ADTOH protonado que foi extraído da mistura de reação enquanto os outros subprodutos permaneceram na fase aquosa.

O mecanismo de reação de O-desmetilação do ADT em ADTOH se processa via reação S<sub>N</sub>2 (Figura 22, página 26). Como o meio é ácido, inicialmente ocorre a protonação do oxigênio do grupo metoxila. O carbono da metoxila se torna bastante eletrofílico e susceptível ao ataque nucleofílico da piridina com liberação do ADTOH como grupo abandonador.



**Figura 22.** Proposta de mecanismo de formação do ADTOH.

O espectro no infravermelho obtido para ADTOH (Figura 23) se difere do obtido para o ADT porque o espectro do ADTOH apresenta uma banda em  $3158\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da ligação O-H do anel fenólico. As outras bandas observadas estão coerentes com as apresentadas para esse composto na literatura (Tabela 6).<sup>48</sup>

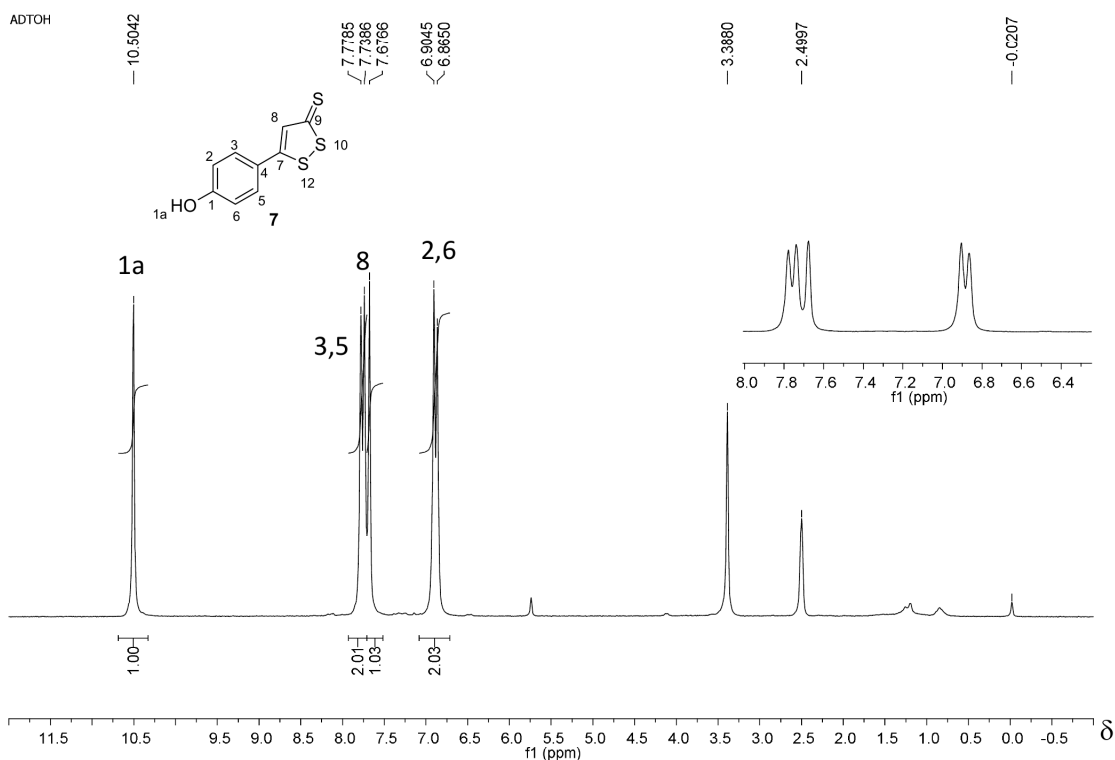


**Figura 23.** Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr para o ADTOH.

**Tabela 6.** Bandas na região do infravermelho em KBr observadas para o composto ADTOH versus citadas na literatura

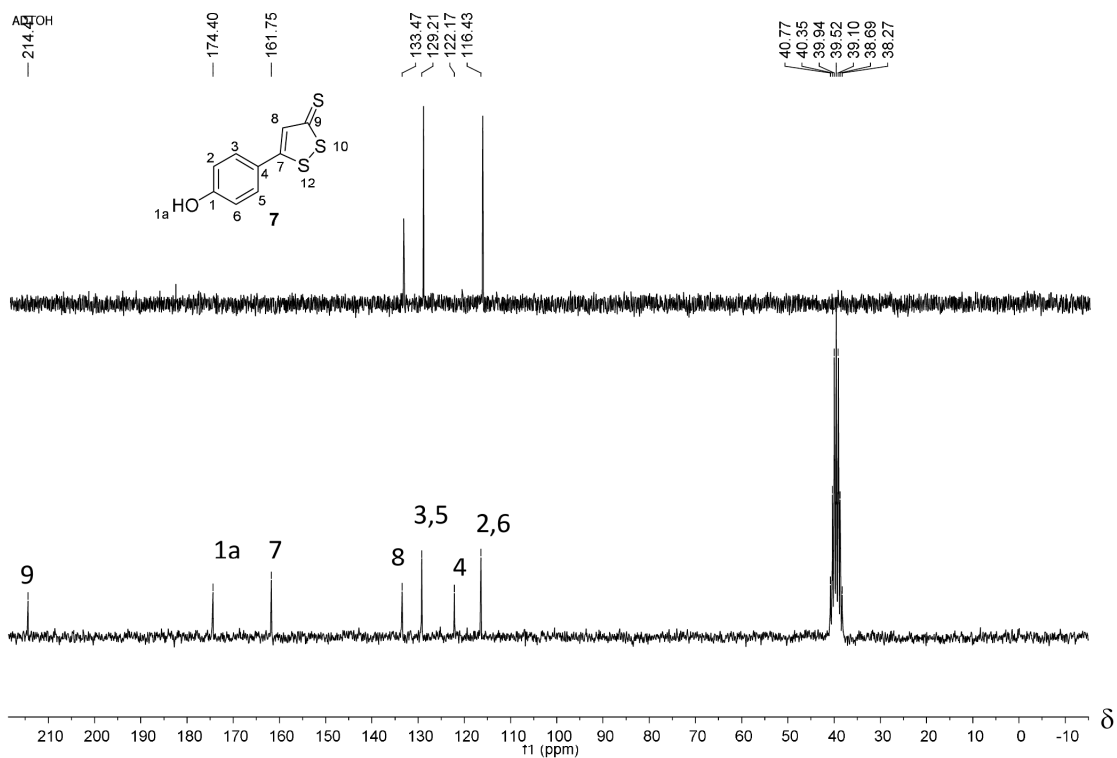
Banda observada (KBr)	Banda citadas na literatura <sup>48</sup> /cm <sup>-1</sup> (KBr)
3158, 3050, 1608, 1476, 1197, 1022 cm <sup>-1</sup>	3179, 3050, 1608, 1474, 1197, 1023 cm <sup>-1</sup>

O ADTOH foi caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 24). Como esperado, no espectro foi observada a ausência do sinal em 3,84 ppm correspondente aos hidrogênios da metila. O sinal mais característico da obtenção desse composto aparece em 10,50 ppm e foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila fenólica. Os outros sinais obtidos neste experimento são bastante similares aos obtidos para o ADT devido às poucas modificações estruturais.



**Figura 24.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ADTOH (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 25, página 28) também não apresentou grandes mudanças quanto aos deslocamentos químicos se comparado com o do material de partida (ADT). A diferença mais importante é a ausência do sinal em 55,64 atribuído à metila do grupo metoxila do ADT, comprovando, assim, a eficiência da O-desmetilação.



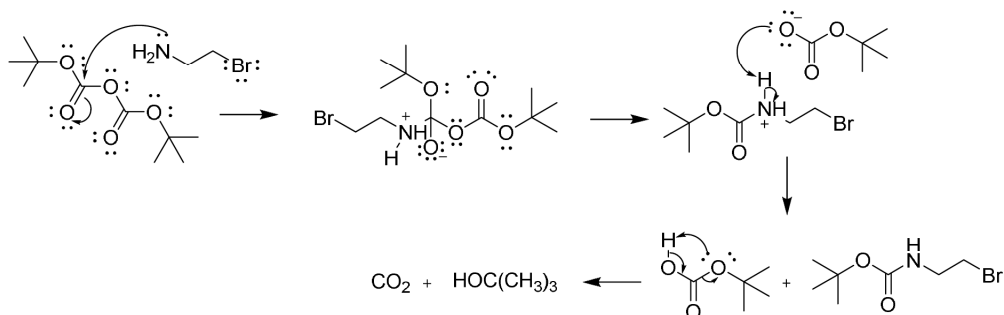
**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo) e subespectro DEPT 135 (acima), do ADTOH (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

### 3.6 Síntese do *terc*-butil(2-(4-(3-tioxi-3H-1,2-ditolano-5-ila)fenoxi)etil)carbamato (10)

As amins primárias são melhores nucleófilos que os fenóis uma vez que essas possuem os elétrons não ligantes mais disponíveis para o ataque que os fenóis que possuem seus elétrons livres deslocalizados sobre o sistema aromático. Deste modo, foi necessário proteger a amina primária do composto 2-bromoetilamina antes de realizar a reação de acoplamento com o ADTOH para, desta forma, evitar que reações paralelas ocorressem. Assim sendo, a amina primária foi convertida em *terc*-butil carbamato.

A proposta de mecanismo para essa reação é apresentada na Figura 26 (página 29). Na presença de trietilamina, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons livres do nitrogênio da amina à carbonila, seguido pelo deslocamento do par de elétrons da ligação  $\pi$  para o oxigênio (Figura 26). Em seguida, o par de elétrons restabelece a ligação dupla com liberação do grupo *terc*-butil carbonato. Este grupo

abstrai o próton do nitrogênio, formando o bicarbonato de *terc*-butila que é rapidamente convertido em CO<sub>2</sub> e álcool *terc*-butílico.

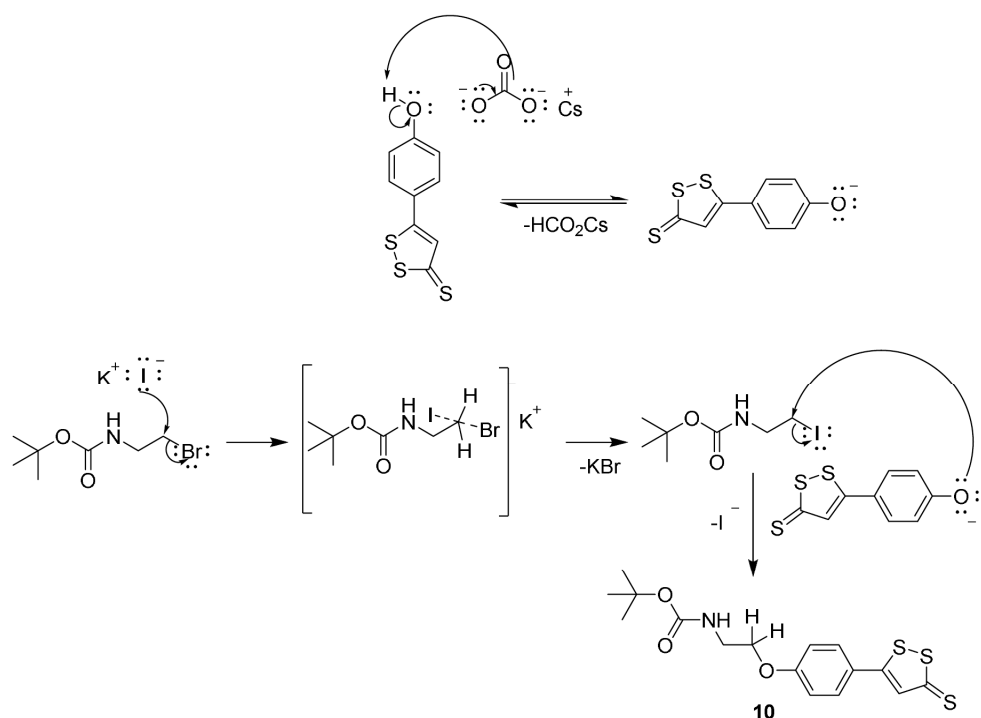


**Figura 26.** Proposta de mecanismo da proteção da amina primária.

Após a etapa de proteção da amina, realizou-se uma reação de substituição nucleofílica S<sub>N</sub>2 com o objetivo de acoplar o espaçador ao grupo ADTOH para formar o composto **10**.

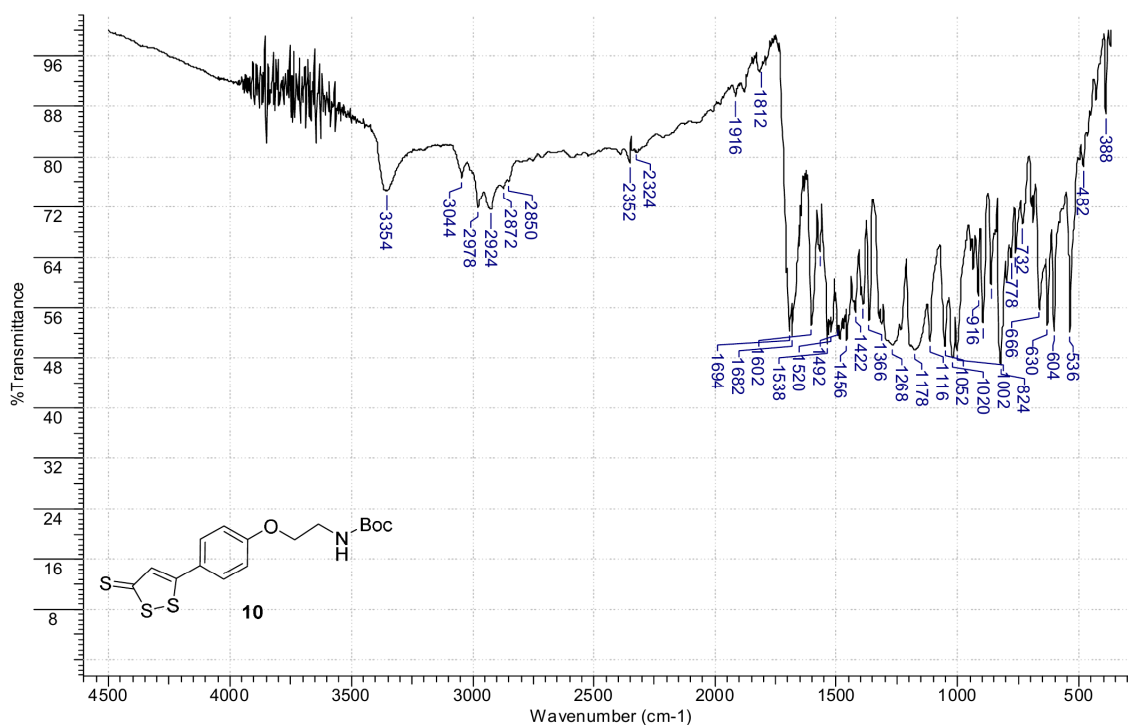
Foram utilizados o ADTOH e o carbonato de céscio em condições de refluxo utilizando acetonitrila anidra e iodeto de potássio como ativador. Após elaboração e purificação por cromatografia em coluna utilizando como eluente a mistura clorofórmio e metanol (100:1), o produto **10** foi obtido 62% de rendimento.

A proposta de mecanismo para essa reação está apresentada na Figura 27 (página 30). Inicialmente ocorre a desprotonação do ADTOH pela base, formando o íon fenóxido correspondente. O composto **9** sofre o ataque do iodeto e libera o brometo em uma substituição nucleofílica bimolecular. O iodeto é melhor grupo abandonador que o brometo, pois é mais polarizável. Assim, essa substituição é meramente catalítica e facilita a reação com o ADTOH. Isto posto, o ADTO<sup>-</sup> realiza o ataque nucleofílico ao carbono primário com a liberação do iodeto e formação do produto desejado **10**.



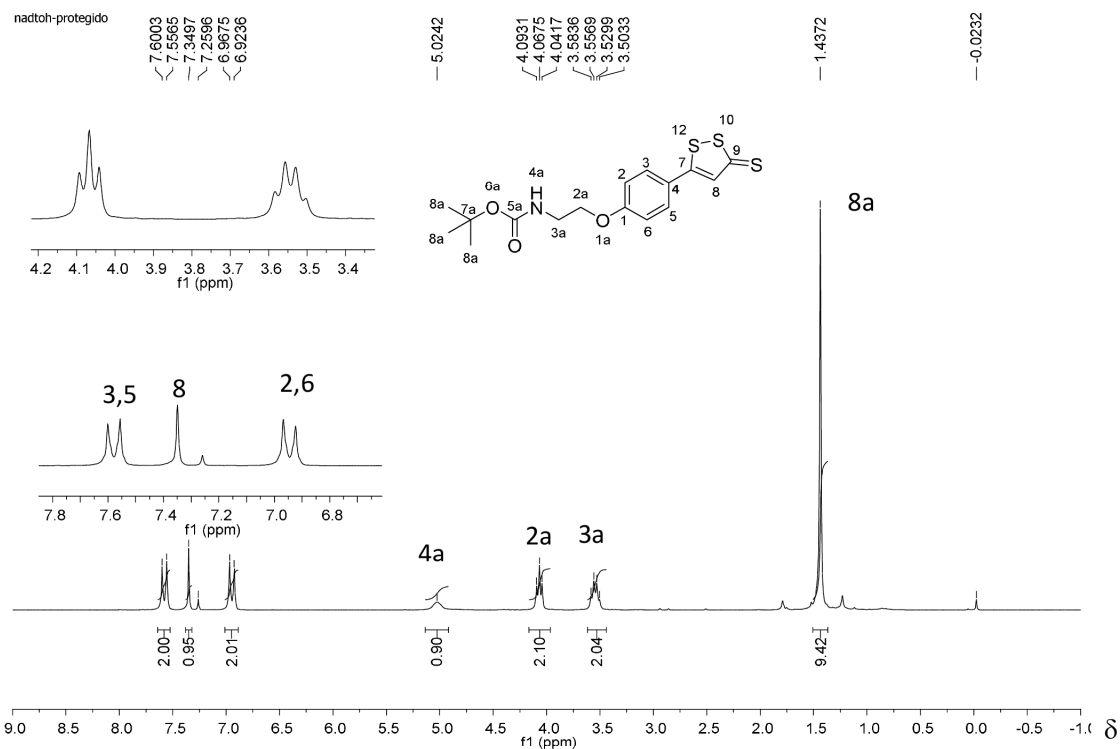
**Figura 27.** Proposta de mecanismo para o acoplamento do ADTOH com o espaçador formando o composto **10**.

A espectroscopia no infravermelho fornece informações importantes para a confirmação estrutural dos grupos funcionais (Figura 28, página 31). O estiramento  $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$  de aromáticos apresentou banda em  $3044\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1694\text{ cm}^{-1}$  foi observado a banda de estiramento de  $\text{C}=\text{O}$  de carbonila e finalmente em  $1078\text{ cm}^{-1}$  a banda devida ao estriamento assimétrico da ligação  $\text{C}=\text{S}$ .



**Figura 28.** Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr para o composto **10**.

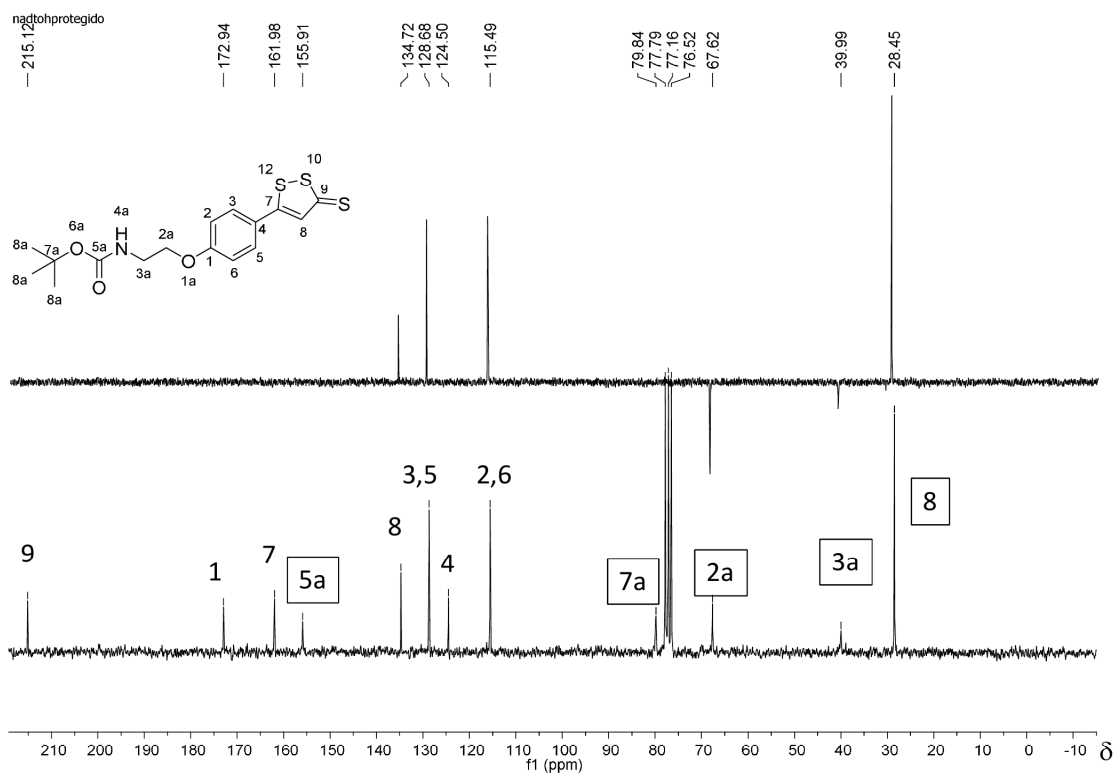
Pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obteve-se a comprovação da formação do composto **10** (Figura 29, página 32). Em 1,44 ppm é observado um sinal integrado para nove hidrogênios característico do grupo da metila da *terc*-butoxila (H8a). Os hidrogênios do grupo metilênico (H3a) correspondem ao quarteto ( $J = 5,2$  Hz) centralizado em 3,55 ppm e integrado para dois hidrogênios. Este desdobramento se deve ao acoplamento tanto com os hidrogênios (H2a) grupo metilênico vizinho, quanto com o hidrogênio H4a. O tripleto centralizado em 4,07 ppm ( $J = 5,2$  Hz), integrado para dois hidrogênios, corresponde aos hidrogênios do grupo metilênico (H2a). O sinal largo em 5,02 ppm é característico do hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo carbamato. Os outros sinais obtidos foram similares aqueles encontrados para o ADTOH (página 27), contudo, verifica-se a ausência do sinal em 10,50 ppm que indica a ausência de hidrogênio fenólico do ADTOH e confirma a eficiência da reação de acoplamento.



**Figura 29.** Espectro de RMN de *tert*-butilcarbamato de (2-(4-(3-tioxo-3*H*-1,2-ditolano-5-ila)fenoxi)etila (**10**) (200MHz, CDCl<sub>3</sub>).

A espectro de RMN de <sup>13</sup>C também foi muito importante para a confirmação da estrutura do composto **10** (Figura 30, página 33). Além dos sinais característicos do ADTOH, são apresentados os sinais característicos da presença do espaçador. O sinal em 28,5 é característico dos carbonos das metilas (C8a), em 40,0 ppm e 67,6 ppm são observados sinais atribuídos aos carbonos metilênicos, pois esses sinais apresentam-se com fase invertida no experimento de DEPT 135. O sinal do carbono não hidrogenado da *tert*-butila (C7a) e o carbono da carbonila (C5a) apresentam-se em 79,8 ppm e 155,9 ppm respectivamente. Os demais sinais estão atribuídos no espectro.

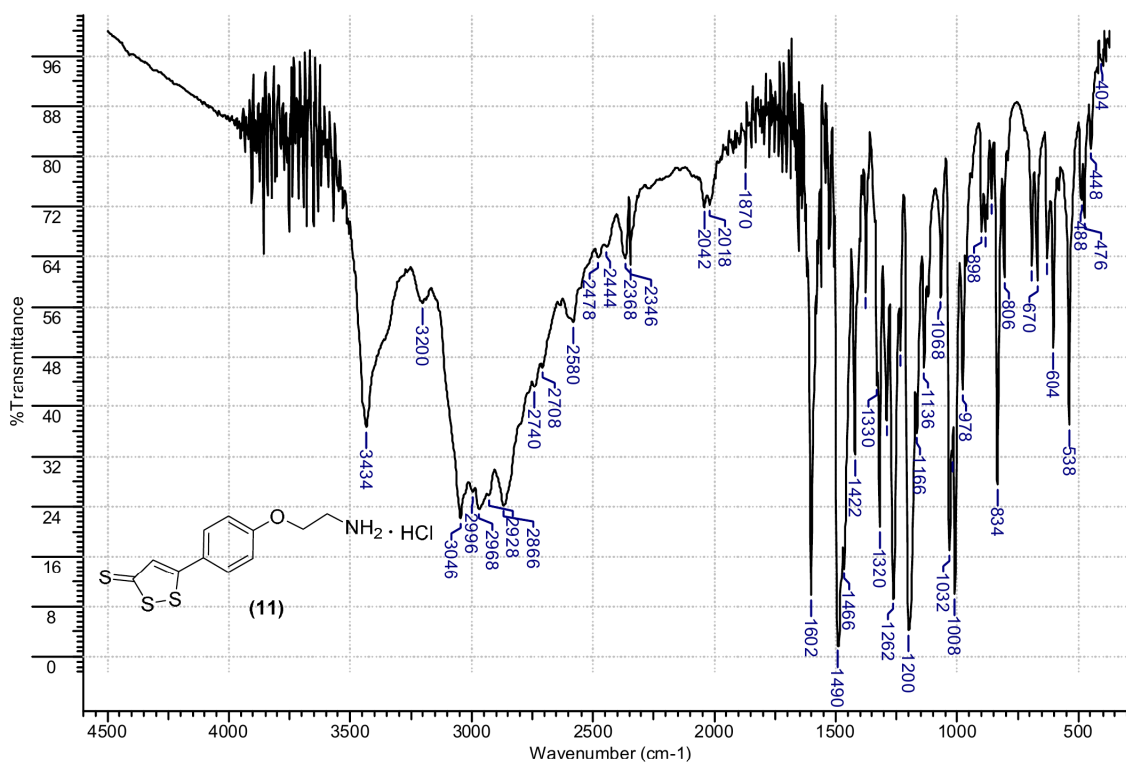




**Figura 30.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo) e subespectro DEPT 135 (acima) do composto **10** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), os sinais destacados no espectro foram atribuídos às modificações estruturais observadas no produto.

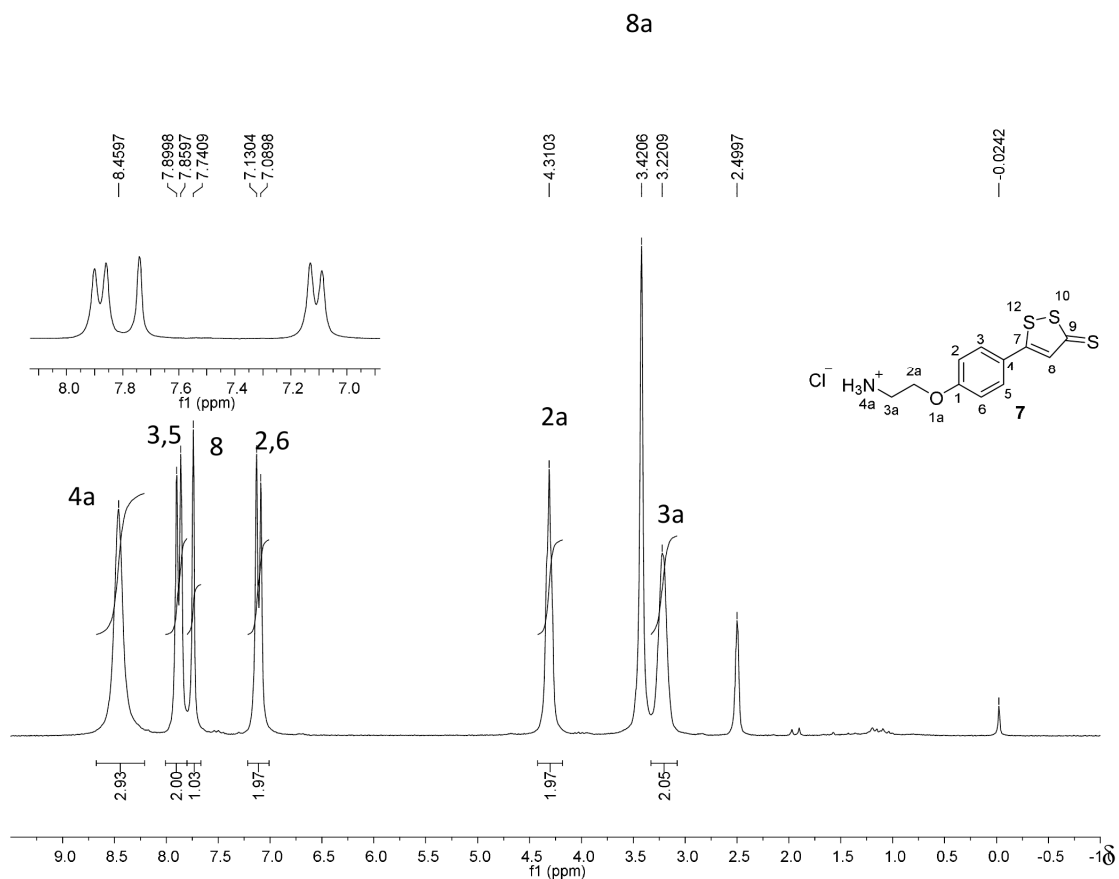
A desproteção do composto **10** foi realizada com adição de HCl em acetato de etila à temperatura ambiente, a reação foi acompanhada por CCD. Quando se verificou que todo o material de partida foi consumido, cessou a agitação e a solução reacional foi mantida em geladeira até a precipitação do produto com rendimento de 62%.

As mudanças funcionais após a reação de formação do cloridrato do composto **11** podem ser verificadas pela espectroscopia de infravermelho (Figura 31, página 34). As bandas devidas ao estiramento N-H são observadas em  $3434\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1200\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda do estiramento de C=S.



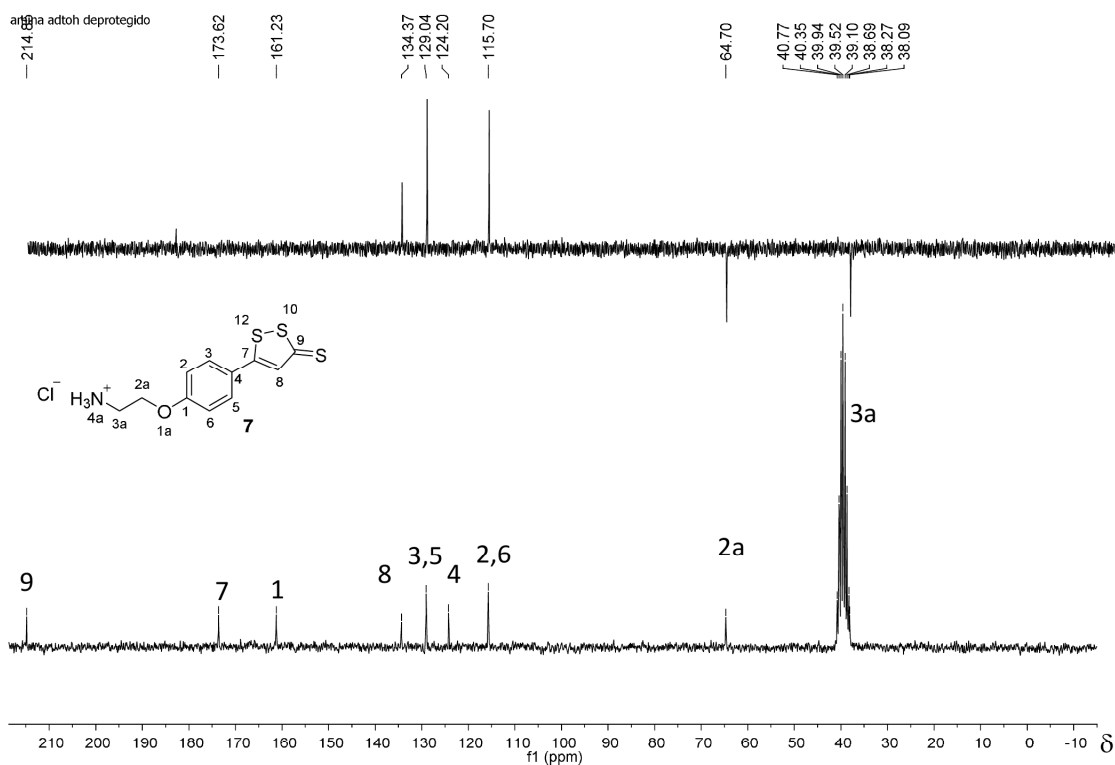
**Figura 31.** Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr do composto **11**.

Ao comparar com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **10** (página 32) verifica-se no respectivo espectro do composto **11** a ausência do simpleto em 1,44 ppm que é uma das evidências da retirada do grupo protetor (Figura 32, página 35). O aparecimento de um sinal largo 8,46 ppm, integrado para três hidrogênios é característico de amina primária protonada, o que também é uma forte evidência do sucesso na reação de desproteção.



**Figura 32.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **11** (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Pelo espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  juntamente com o espectro de DEPT 135 de **11** (Figura 33, página 36) pode-se verificar a ausência apenas dos sinais correspondentes aos carbonos do grupo *terc*-butoxicarbonila em 28,5 ppm, 79,8 ppm e 155,9 ppm no espectro do composto **10** (página 33). Assim, se pode confirmar a eficiência na remoção do grupo protetor.



**Figura 33.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (abaixo) e subespectro DEPT 135 (acima) do composto **11** (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

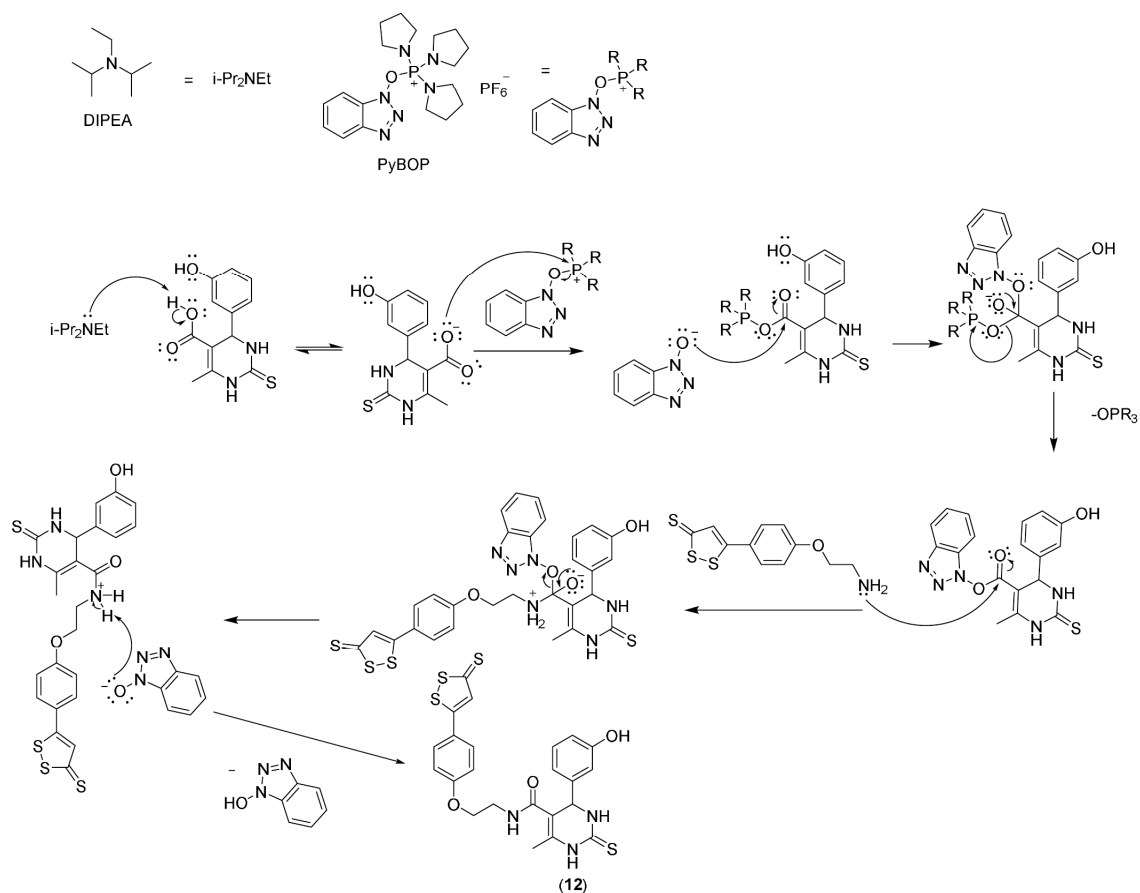
### 3.7 Síntese do Híbrido monastrol- $\text{H}_2\text{S}$

O híbrido foi obtido de monastrol a partir da reação de acoplamento do composto **11** com o ácido de monastrol (**5**) na presença de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) e com o auxílio do agente de acoplamento de aminas o benzotriazol-1-iloxitri(pirrolidino)fosfônio hexafluorofosfato (PyBOP).

Foram realizadas várias cromatografias em coluna, empregando sílica como suporte, utilizando diversas misturas de solventes, uma resolução razoável foi obtida utilizando como eluente acetato de etila/hexano (3:1) foi necessário ainda uma segunda cromatografia em coluna utilizando como eluente diclorometano/etanol (15:1). Contudo, essa metodologia não se apresentou reprodutível.

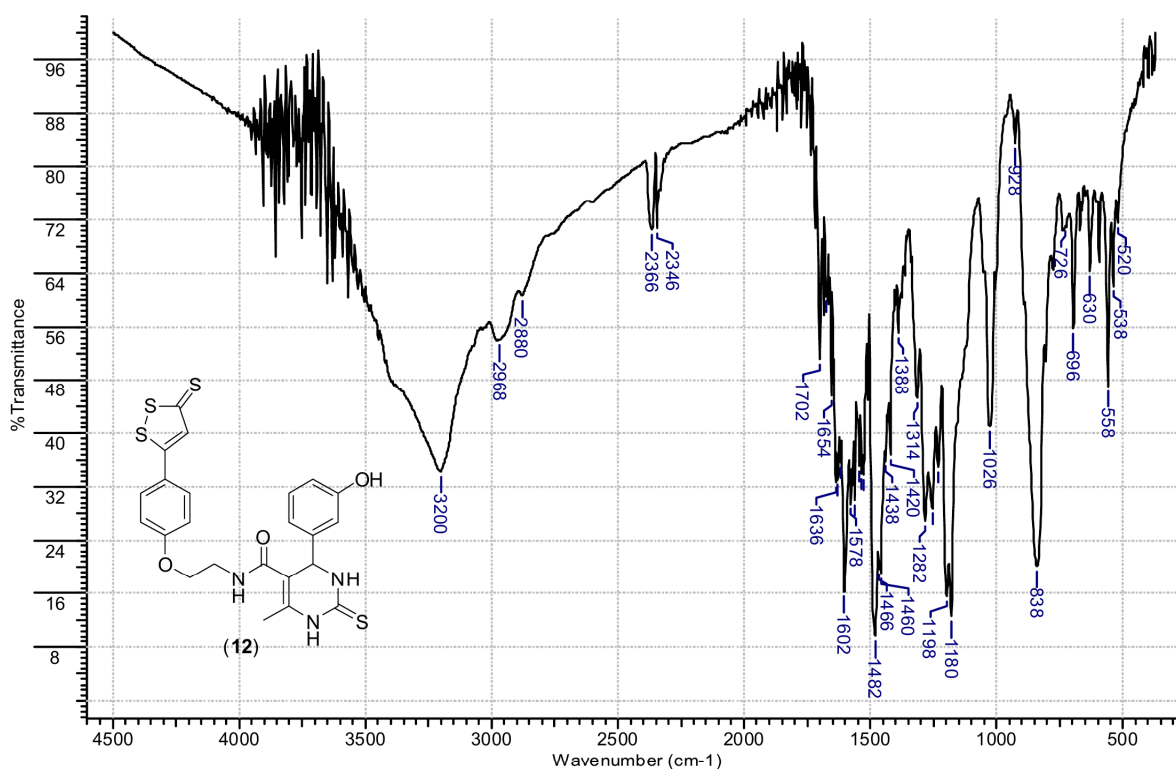
Então percebeu-se que a adição de etanol ao bruto de reação ocasionava a precipitação de um sólido laranja rico no produto **12**. Assim, realizou-se a cromatografia em coluna desse sólido utilizando como eluente a mistura de cloreto de metileno/etanol (15:1) e obteve-se o produto **12** com o rendimento de 11%.

O mecanismo sugerido (37Figura 34) é que a DIPEA abstrai o próton do ácido de monastrol, em seguida o par de elétrons não ligados do oxigênio do ácido ataca o fósforo do PyBOP com liberação do grupo 1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-olato. Este por sua vez, ataca a carbonila e em seguida ocorre o deslocamento da dupla para o oxigênio e quando a dupla ligação é restabelecida, ocorre a liberação do fosfato. Finalmente, o par de elétrons não ligados da amina primária ataca o carbono carbonílico prontamente e ocorre o deslocamento da dupla para o oxigênio. Quando a dupla ligação é restabelecida ocorre a liberação do 1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-ol que abstrai o hidrogênio da amida formando assim o híbrido monastrol-H<sub>2</sub>S (12).



**Figura 34.** Proposta para o mecanismo de formação do híbrido de monastrol-H<sub>2</sub>S.

No espectro obtido na região do infravermelho para o híbrido monastrol-H<sub>2</sub>S (Figura 35 página 38) foi possível observar uma banda em 3200 cm<sup>-1</sup> atribuída ao estiramento da ligação O-H do fenol; em 1602 cm<sup>-1</sup> uma banda referente ao estiramento da carbonila da amida e em 1180 cm<sup>-1</sup> o estiramento C=S da ditona.



**Figura 35.** Espectro na região de infravermelho (KBr) do híbrido de monastrol.

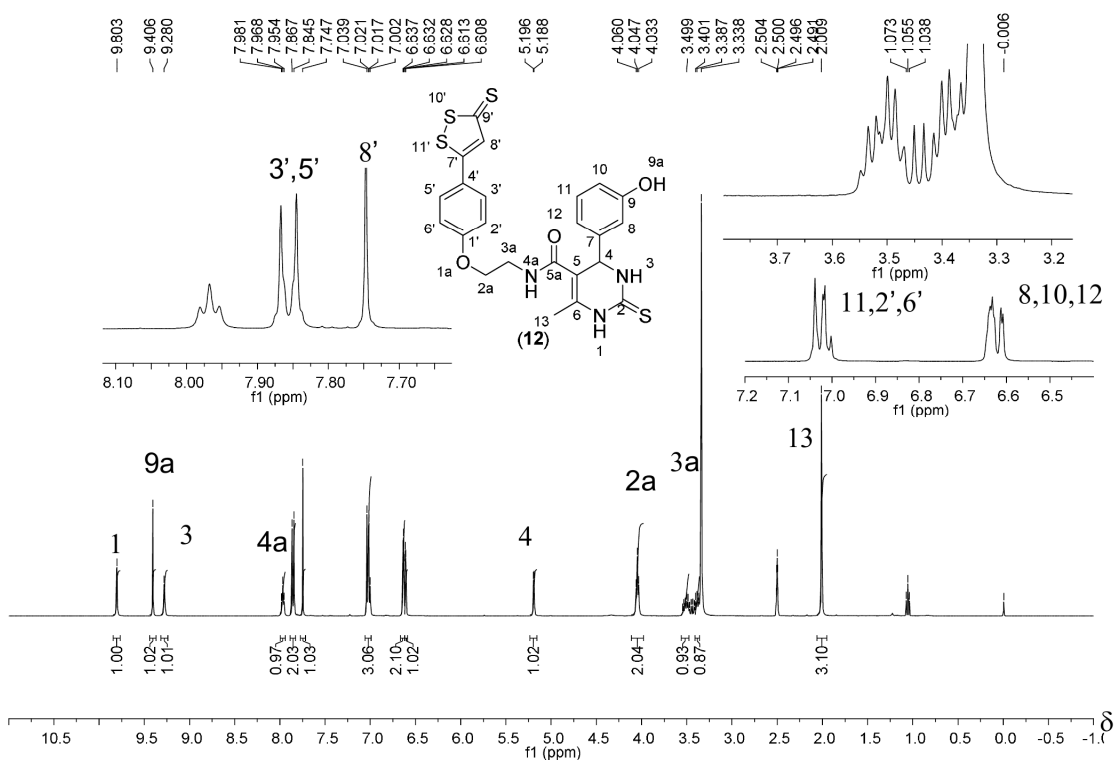
Como esse composto é inédito, realizaram-se experimentos de RMN bidimensional COSY e HSQC além dos experimentos usuais em uma dimensão de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e o DEPT-135.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 36, página 39) foi observado um simpleto integrado para três hidrogênios em 2,00 ppm, característico dos hidrogênios da metila (H12). Em 3,55-3,34 encontra-se um multiplete que foi atribuído aos hidrogênios H3a que não são magneticamente equivalentes, pois pelo mapa de contornos COSY (Figura 37, página 40) verificou-se que há correlação entre eles (3,49 ppm e 3,38 ppm). No COSY os hidrogênios H3a apresentam correlação com o hidrogênio da amida (H4a) em 7,98 ppm bem como apresentam correlações com os hidrogênios do grupo metilênico vizinho (H2a) em 4,05 ppm.

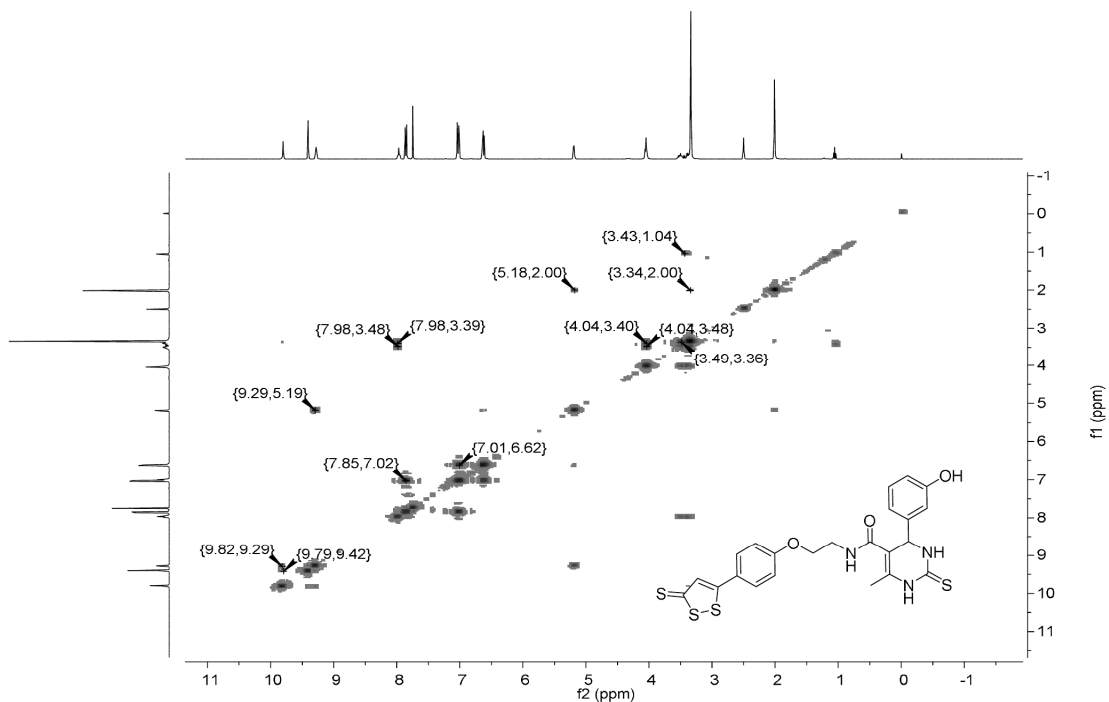
O duplete ( $J^3 = 3,2$  Hz), integrado para um hidrogênio, em 5,18 ppm. corresponde ao hidrogênio benzílico (H4). Essa atribuição foi confirmada pela correlação observada no COSY com o hidrogênio pirimidínico (H3) em 9,31 ppm.

O hidrogênio pirimidínico (H1) apresenta sinal em 9,80 ppm, confirmado pelas correlações do COSY com 9,31 ppm que o relaciona com H3. Os hidrogênios do anel aromático do monastrol H8, H10 e H12, se superpõem formando um multiplete, integrado para três, na região de 6,61-6,64 ppm. Eles se correlacionam no COSY com

(6,61 ppm, 7,01 ppm e 7,79 ppm) região do multipletto devido a H11. O sinal de H11 apresenta-se sobreposto no espectro de  $^1\text{H}$  com o dupletto atribuído ao H2' e H6'. Este dupletto centralizado em 7,03 ppm ( $J = 8,8$  Hz) correlaciona no COSY com dupletto, integrado para dois ( $J = 8,8$  Hz) centralizado em 7,86 ppm do H3' e H5'. O simpleto em 9,41 ppm foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila (H9a) e o simpleto em 7,74 ppm foi atribuído ao H8'.



**Figura 36.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) obtido para o híbrido de monastrol (12).

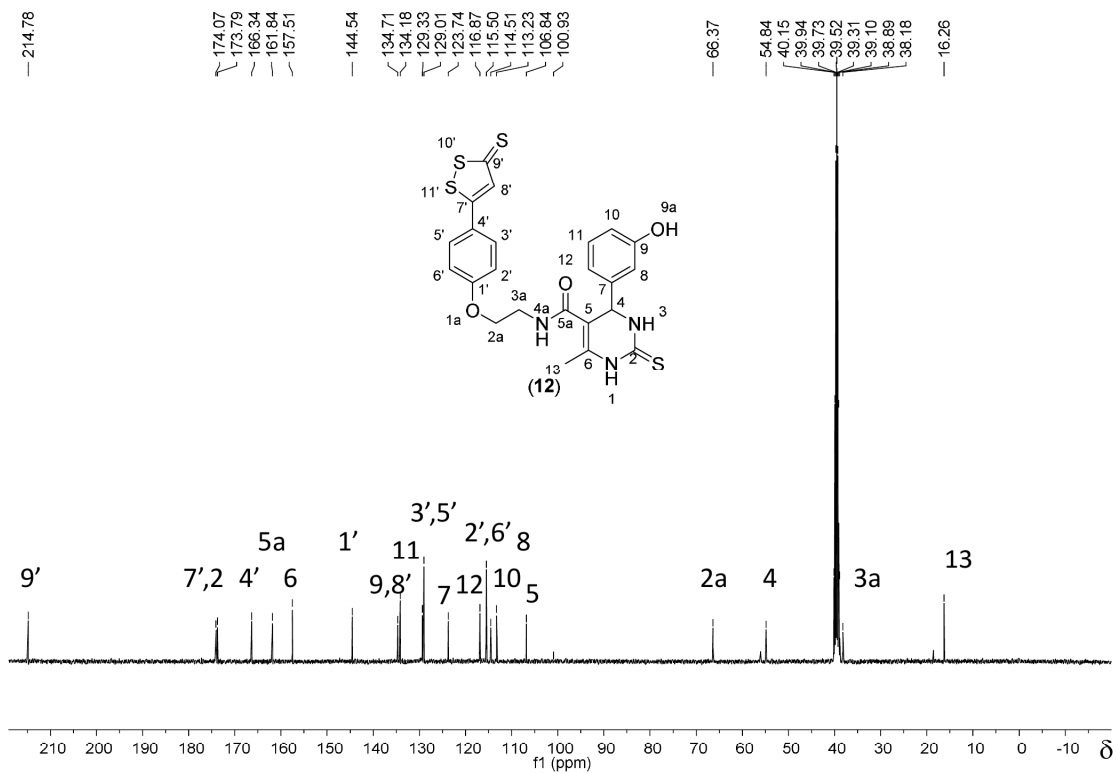


**Figura 37.** Mapa de contornos COSY obtido para o híbrido de monastrol (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).

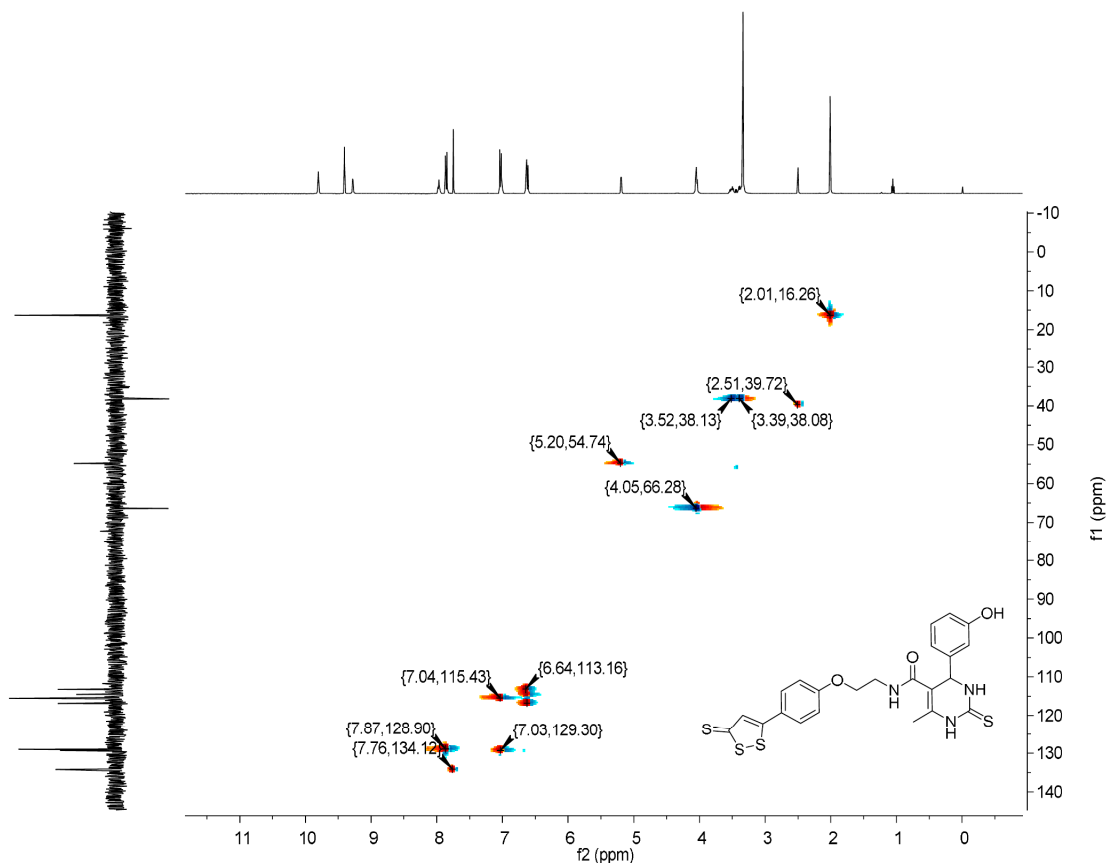
Os sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  do híbrido de monastrol (Figura 38, página 41) foram atribuídos com o auxílio dos experimentos de DEPT 135 e de HSQC (Figura 39, página 42). Pelo DEPT 135 verificou-se que os sinais em 66,34 ppm e em 38,18 ppm eram referentes a carbonos do tipo  $\text{CH}_2$ . O mapa de contornos HSQC também apresenta essa informação, pois essa correlação apresenta cor diferente indicando mudança na fase.

Comparando os dados do HSQC com os do espectro de hidrogênio verificaram-se as seguintes correlações  $\text{C}13\text{-H}13$  ( $\delta$  16,26 ppm, 2,01 ppm),  $\text{C}3\text{a-H}3\text{a}$  ( $\delta$  39,72 ppm, 2,51 ppm),  $\text{C}2\text{a-H}2\text{a}$  ( $\delta$  66,28 ppm, 4,05 ppm),  $\text{C}4\text{-H}4$  ( $\delta$  54,74 ppm, 5,20 ppm),  $\text{C}2',6'\text{-H}2',6'$  ( $\delta$  115,43 ppm, 7,04 ppm),  $\text{C}8\text{-H}8$  ( $\delta$  113,16 ppm, 6,64 ppm),  $\text{C}11\text{-H}11$  ( $\delta$  129,30 ppm, 7,03 ppm),  $\text{C}3',5'\text{-H}3',5'$  ( $\delta$  128,90 ppm, 7,86 ppm),  $\text{C}8'\text{-H}8'$  ( $\delta$  134 ppm, 7,76 ppm). Os carbonos não hidrogenados foram atribuídos com o auxílio do programa *ChemBioDraw Ultra 14* (versão 14.0.0.117).





**Figura 38.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto híbrido de monastrol (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



**Figura 39.** Mapa de contornos HSQC do híbrido de monastrol (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

Após a obtenção do híbrido de monastrol foi avaliada a atividade antiproliferativa do mesmo frente a linhagem TOV-21G (câncer de ovário). Também foram avaliados os precursores ácido de monastrol, ADTOH e como controle utilizou-se o próprio monastrol.

### 3.8 Atividade citotóxica do híbrido de monastrol.

A Célula TOV-21G é uma linhagem de câncer de ovário de origem epitelial, que pode ser mantida em cultivo em passagens superiores a 70<sup>49</sup>. Essa linhagem apresenta o gene p-53 ativo<sup>50</sup>. Este gene é responsável pela síntese da proteína p-53. Essa proteína é capaz de aumentar o tempo do processo de divisão celular, dessa maneira, a célula verifica os danos no DNA e ativa os mecanismos de reparação do mesmo, antes de entrar na fase S da divisão celular. O gene p-53 também é responsável por acionar o processo de apoptose quando o reparo no DNA não é

realizado.<sup>51</sup> Nesse contexto, a TOV-21G se apresenta como uma linhagem resistente ao mecanismo de danificação do material genético.

Essa linhagem é caracterizada como uma subcultura contínua, ou seja, escapa dos processos de senescência (envelhecimento celular)<sup>49</sup>. Logo, pode ser expandida diversas vezes e o número de passagens desde que ela foi descongelada é muito importante para a reprodutibilidade no comportamento observado para a linhagem em um dado experimento.

A manutenção da linhagem TOV-21G foi realizada em períodos de 48h, pois, esse período era suficiente para a formação de monocamada. Após formação de monocamada, o repique (clivagem por ação enzimática das proteínas de adesão<sup>52</sup>) foi realizado. O ciclo de manutenção foi repetido até que quantidades suficientes de células viáveis fossem acumuladas.

Quando bastante células foram acumuladas (passagem 59), realizou-se o cálculo da viabilidade utilizando azul de tripan e câmara de Neubauer. Após o cálculo foram encontradas  $690,5 \times 10^4$  células/mL.

A placa de 96 poços foi preparada aplicando  $10^5$  células por poços. Os compostos testes (ácido de monastrol, ADTOH e híbrido de monastrol) foram distribuídos em triplicatas e foram avaliados pelo teste do MTT, como controle foi utilizado o monastrol que possui reconhecida atividade citotóxica.<sup>42</sup>

A absorbância média do controle de vida obtido após o teste do MTT foi de  $1,5095 \pm 0,080456$ . Este resultado foi utilizado para obtenção da viabilidade dos compostos testados usando Equação 1 (página 61). Os resultados de viabilidade obtidos após o tratamento com o monastrol, ácido de monastrol, ADTOH e híbrido de monastrol estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Resultados de viabilidade para a linhagem de TOV-21G obtidos após tratamento com monastrol (4), ácido de monastrol (5), ADTOH (8) e híbrido de monastrol (12) utilizando método do MTT.

concentração( $\mu\text{g/mL}$ )	Viabilidade média (%) $\pm$ desvio padrão			
	4	5	8	12
15	73 $\pm$ 6	115 $\pm$ 5	187 $\pm$ 19	96 $\pm$ 2
10	77 $\pm$ 9	104 $\pm$ 8	184 $\pm$ 13	77 $\pm$ 21
5	43 $\pm$ 9	47 $\pm$ 4	120 $\pm$ 27	57 $\pm$ 6
1	43 $\pm$ 3	43 $\pm$ 4	89 $\pm$ 10	55 $\pm$ 4

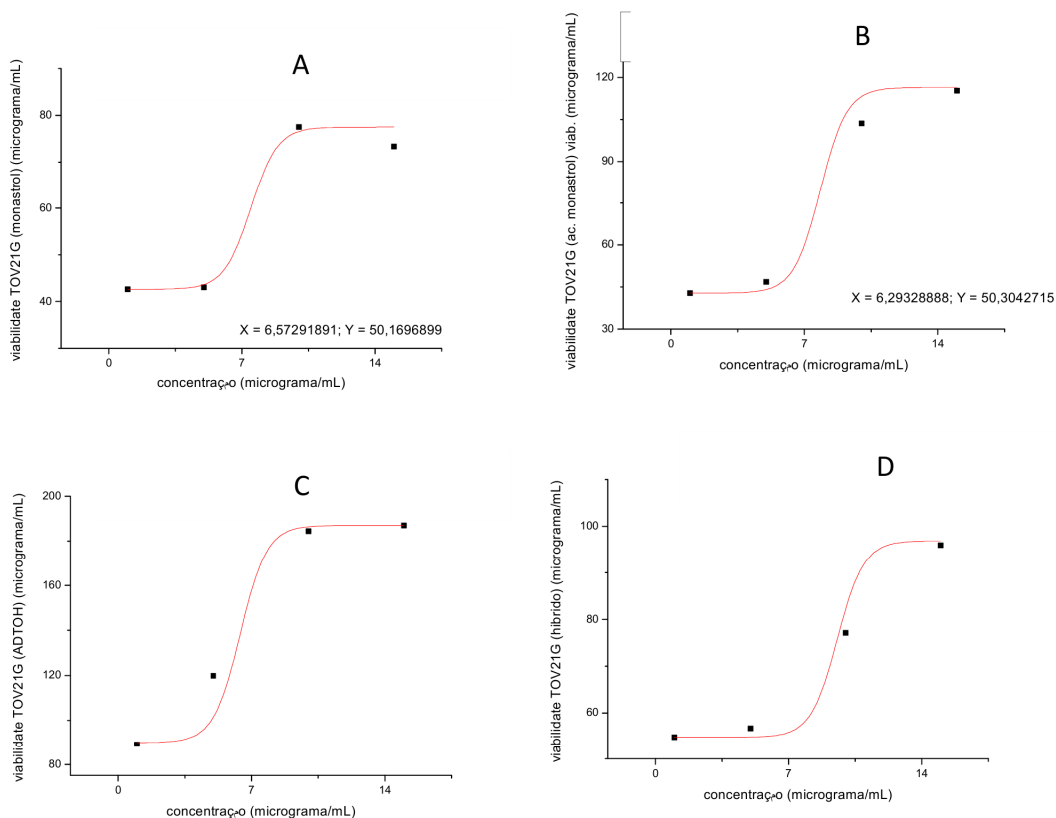
Utilizando programa *OriginPro 9*<sup>®</sup>, foram construídos os gráficos que relacionam a viabilidade e a concentração dos compostos avaliados. O ajuste matemático a partir de uma curva sigmoideal foi utilizado seguindo a distribuição de Boltzman. Esse ajuste foi adequado, pois, descreveu o evento observado de maneira satisfatória.

A análise dos gráficos apresentados na Figura 40 (página 45) mostra que o aumento da concentração dos compostos causa diminuição da citotoxicidade e para o ADTOH, inclusive, ocorre o fenômeno de proliferação celular.

Pela curva obtida com o programa *OriginPro 9*<sup>®</sup> para o monastrol e seu ácido foi possível estimar os IC<sub>50</sub>, concentração necessária para matar 50% da população de células, de 6,6 µg/mL e 6,3 µg/mL respectivamente. O híbrido na menor concentração avaliada foi capaz de matar 45% das células, assim essa concentração tem características próximas do IC<sub>50</sub>.

O valor de IC<sub>50</sub> = 6,6 µg/mL para o monastrol avaliado para a linhagem de TOV-21G apresenta-se na faixa de IC<sub>50</sub> encontrada por Silva e colaboradores em 2012 entre 4-29 µg/mL quando avaliaram esse composto frente a diversas linhagens de câncer como U251(glioma), NCI-ADR/RES (câncer de ovário resistente a adrimicina), 786-0 (câncer de rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (câncer de próstata), OVCAR-03 (câncer de ovário), HT29 (colon).<sup>42</sup>

O ácido de monastrol apresentou atividade citotóxica frente a linhagem de TOV-21G. Klein, em 2007, reportou que a citotoxicidade do ácido de monastrol ocorre via inibição da enzima Eg5 apresentando IC<sub>50</sub> = 32,0±4,5 µM.<sup>45</sup>

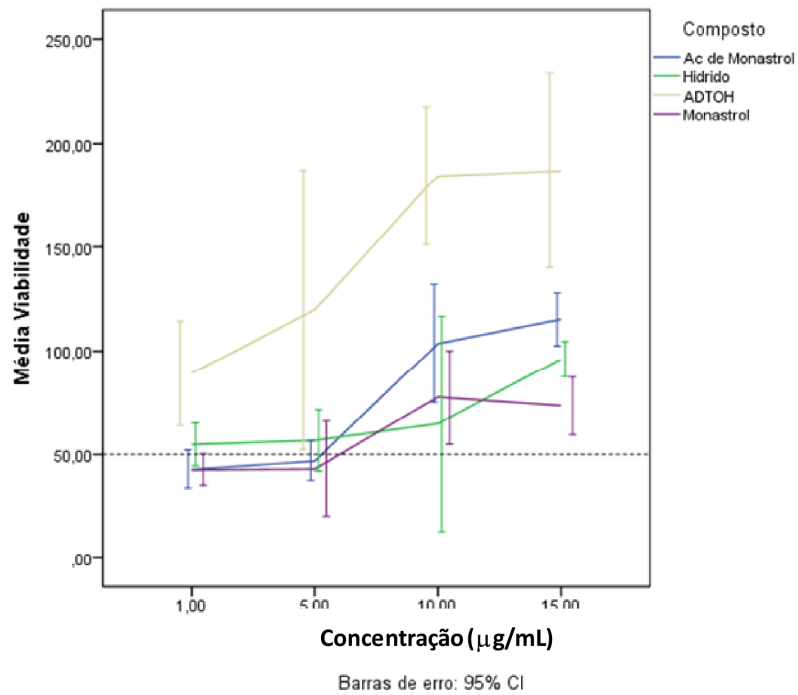


**Figura 40.** Análise gráfica sigmoidal pela distribuição de Boltzmann: A) monastrol com  $IC_{50}$ , B) ac. monastrol com  $IC_{50}$ ; C) ADTOH; D) híbrido do monastrol.

Ainda que Chattopadhyay, em 2012, tenha mostrado que ADTOH apresenta comportamento citotóxico ( $IC_{50} = 0,027$  mM) frente a linhagens de HT-29 (células de câncer de colon humano), o presente estudo mostrou que nas concentrações avaliadas este composto induziu a proliferação da linhagem de TOV-21G. Esse fenômeno deve ser devido à resistência da linhagem de TOV-21G, portanto mesmo em concentrações mais elevadas que as testadas por Chattopadhyay, até 0,067 mM não foi possível definir o  $IC_{50}$ .<sup>26</sup>

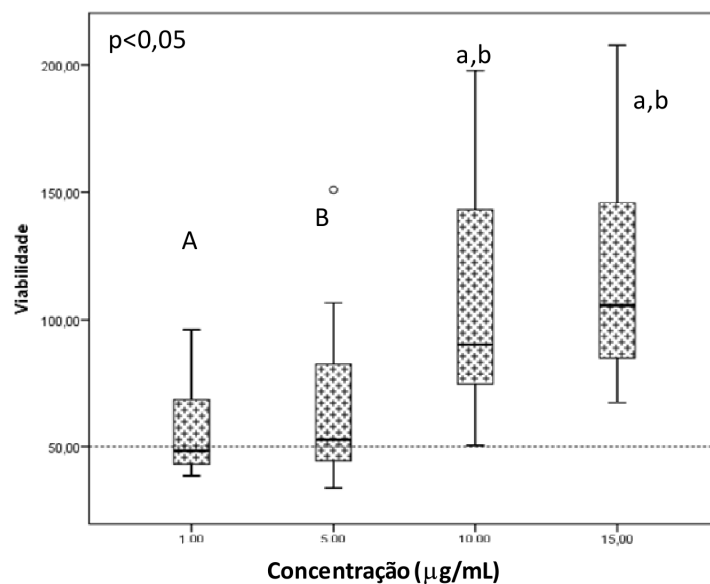
Inicialmente, foi construído um gráfico relacionando a viabilidade e a concentração de cada composto avaliado (Figura 41, página 46).

Em baixas concentrações tanto o monastrol como o ácido derivado apresentaram-se citotóxicos, o híbrido de monastrol não apresentou citotoxicidade nas concentrações avaliadas e o ADTOH induziu proliferação celular.



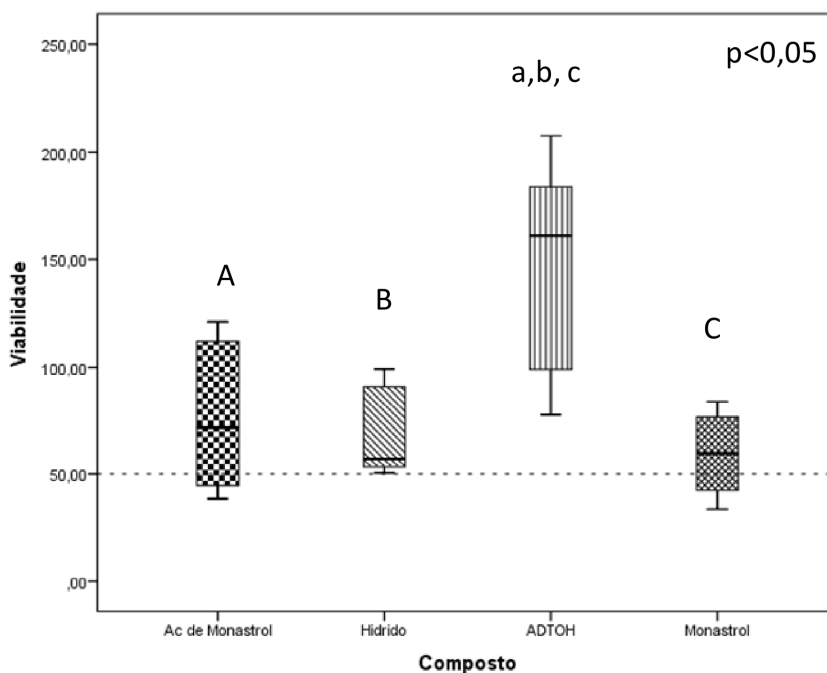
**Figura 41.** Relação entre a viabilidade média da linhagem TOV-21G frente às diferentes concentrações dos compostos ADTOH (bege), monastrol (roxo), ácido de monastrol (azul) e híbrido de monastrol (verde). A linha tracejada indica a viabilidade celular de 50%.

Para verificar matematicamente se existe diferença significativa entre os resultados observados foi realizada a análise de ANOVA com um fator *post-hoc* com método LSD (teste da diferença mínima de significância) (Figura 42, página 47). O resultado obtido foi que não existem diferenças significativas entre as concentrações avaliadas de 1 µg/mL e 5 µg/mL nem entre as concentrações de 10 µg/mL e 15 µg/mL. Contudo, existem diferenças significativas entre esses dois conjuntos de grupos.



**Figura 42.** Análise entre a viabilidade celular e as concentrações avaliadas. As diferenças significativas foram indicadas pelas letras, onde maiúsculas e minúsculas se diferem entre si. A linha tracejada indica a viabilidade de 50% da linhagem de TOV-21G.

Também foi avaliado pelo método Kruskal-Wallis a relação entre os compostos avaliados e as viabilidades observadas (Figura 43, página 48). Verificou-se que o ADTOH não apresentou atividade citotóxica e mostrou diferenças significativas em relação a todos os outros compostos avaliados. O híbrido de monastrol também não apresentou atividade citotóxica, contudo, seu comportamento matematicamente não diferiu do comportamento observado para o monastrol e para o ácido de monastrol. Assim, sugere-se que o híbrido de monastrol, que estruturalmente mimetiza tanto o monastrol quanto o ADTOH, tenha a atividade citotóxica regida, principalmente, pela unidade equivalente ao monastrol.



**Figura 43.** Análise entre a viabilidade celular e os compostos avaliados e representação das diferenças significativas indicadas pelas letras, onde maiúsculas e minúsculas diferem entre si. A linha tracejada indica a viabilidade de 50%.

O ADTOH na concentração (0,004-0,067 mM) induziu a proliferação da linhagem TOV-21G. Segundo Hellmich e colaboradores em concentrações entre 0,03-0,3 mM o NaHS e o GY4137, também liberadores de H<sub>2</sub>S, estimularam o crescimento da linhagem HCT116 (linhagem de câncer de colon humano).<sup>23</sup> Esses dados estão de acordo com os resultados do presente trabalho.

Czabo e colaboradores sugeriram alguns possíveis mecanismos para o H<sub>2</sub>S, em baixas concentrações, induzir a proliferação celular. Por exemplo, a atuação do H<sub>2</sub>S como fator bioenergético doador de elétrons para cadeia mitocondrial<sup>53</sup>, como ativador da quinase PI3K (responsável pela manutenção do ciclo de divisão celular), além de inibição da enzima p21<sup>CIP</sup> (responsável pela restrição no controle G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>).<sup>54,55</sup> Ainda não foi estabelecida uma via concreta de indução de proliferação celular pelo H<sub>2</sub>S, sendo necessário o desenvolvimento de estudos nessa área.

De posse desses resultados, pode-se sugerir que o ADTOH e o híbrido devem estar causando danos no DNA ativando mecanismos de reparo da TOV-21G. Este fenômeno justificaria a diminuição da citotoxicidade dos mesmos ao aumentar a concentração. Pois, em baixa concentração desses compostos, o gene p-53 não é ativado e a célula não repara os danos de DNA ocasionando a morte celular. Em concentrações mais elevadas esse mecanismo de proteção e reparo é acionado e a



célula repara o dano do DNA, conseqüentemente, a morte celular diminui e citotoxicidade observada também.

#### **4 Conclusão.**

A metodologia empregada foi eficiente para a síntese do híbrido de monastrol liberador de H<sub>2</sub>S. Contudo, ainda são necessários estudos para melhorar os rendimentos das reações intermediárias, bem como, o método de purificação da última etapa.

Testes iniciais sobre a atividade citotóxica dos compostos monastrol, ácido de monastrol, ADTOH e híbrido de monastrol, foram realizados e permitiram verificar que nas concentrações avaliadas apenas o monastrol e o ácido de monastrol apresentaram IC<sub>50</sub>. Além disso, foi mostrado por cálculos estatísticos que o comportamento citotóxico do híbrido de monastrol é mais parecido com o do monastrol que com o ADTOH.

Como perspectiva, espera-se que ao aumentar a concentração dos compostos avaliados, sejam saturados os mecanismos de reparo. E assim, provavelmente fossem obtidos melhores resultados quanto à citotoxicidade, principalmente, do ADTOH.

Ainda é necessário conhecer qual é a citotoxicidade desses compostos frente a uma linhagem de células normais, bem como: i) confirmar se os alvos moleculares nas concentrações avaliadas para a linhagem de TOV-21G são realmente a Eg5 e a mitocôndria, ii) se a Eg5 está sendo inibida e iii) se o composto híbrido realmente está liberando H<sub>2</sub>S em meio biológico.

#### **5 Materiais e Métodos**

##### **5.1 Considerações gerais**

Na síntese dos compostos foram utilizados reagentes de grau P.A.. As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas

POLYGRAM-UV2540, 20 mm MACHEREY – NAGEL (20 x 20 cm). As placas de CCD, com suporte em sílica gel, foram reveladas com vapores de iodo ( $I_2$ ), solução de alcoólica de vanilina [(4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (6 g) + etanol (100 mL) +  $H_2SO_{4(conc.)}$  (1 mL)], e solução de  $KMnO_4$  [ $KMnO_4$  (6g) +  $K_2CO_3$  (20g) + 5% NaOH(aq) (5 mL) + água (300 mL)] , após terem sido observadas sob lâmpada de ultravioleta ( $\lambda = 254$  e 365 nm). Quando necessário, os solventes foram tratados, secados e purificados seguindo a metodologia previamente descrita por Perrin.<sup>56</sup> As cromatografias em colunas empregadas neste trabalho, foram realizadas utilizando sílica como suporte e em cada caso a mistura do eluente usada foi especificada.

### **5.1.1 Temperaturas de fusão**

As temperaturas de fusão, não corrigidas, foram determinadas em um aparelho GEHAKA-PF1500.

## **5.2 Técnicas espectroscópicas e espectrométricas**

### **5.2.1 Espectroscopia no infravermelho**

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro Spectro One Perkin Elmer (Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Química - UFMG) utilizando pastilha de KBr na região de 400-4000  $cm^{-1}$ .

### **5.2.2 Espectrometria de massas de alta resolução**

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em Espectrômetro de Massas com Fonte de Ionização Electrospray (ESI-MS) modelo SHIMADZU LC-ITTOF (Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG).

### 5.2.3 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ , 200 MHz), de carbono (RMN de  $^{13}\text{C}$ , 50 MHz) e DEPT- 135 (50 MHz) foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE DPX 200 (Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Química - UFMG). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelos sinais dos respectivos solventes.

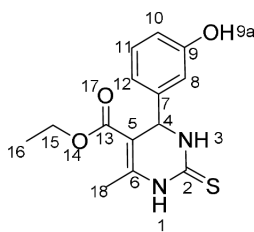
Apenas o híbrido monastrol- $\text{H}_2\text{S}$  foi analisado no espectrômetro Bruker AVANCE-III 400 (Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Química - UFMG).

## 5.3 Procedimentos:

### 5.3.1 Obtenção do monastrol (4)

Para a síntese do composto **4** foi utilizada a metodologia adaptada de Silva e colaboradores 2012.<sup>42</sup>

Em um balão de fundo redondo de 125 mL foram adicionados 41 mmol do 3-hidroxibenzaldeído, 62 mmol de acetoacetato de etila, 62 mmol de tioureia e 2,2 mmol de ácido *p*-toluenosulfônico em 34 mL de etanol. O sistema de reação foi aquecido até a temperatura de refluxo e mantido sob agitação magnética durante 8 horas. Após esse período, o aquecimento foi desligado. Quando o sistema atingiu a temperatura ambiente, pequenos volumes de água foram adicionados lentamente até a turvação. Após aproximadamente 30 min, o sólido branco foi isolado por filtração e lavado com água destilada. O rendimento obtido foi de 57%.



**Formula molecular:**  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

**Aspectos:** sólido branco

**Rendimento:** 57%

**Faixa de temperatura de fusão:** 180-183°C [lit 183-185°C (Glasnov et al. 2008)]<sup>57</sup>

**IV  $I_{\nu}$  (KBr):** 3308 (fenol O-H), 3184 (N-H), 3010 ( $C_{sp^2}$ -H), 1668 (éster C=O), 1474 (ar. C=C), (1286 C-N), 1192 (C=S).

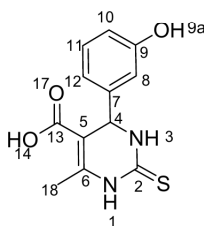
**RMN de  $^1H$**  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta_H$  (ppm), multiplicidade, integração,  $J$  (Hz), atribuição) 1,12 (*t*, 3H,  $J = 7,0$  Hz, H16), 2,29 (*s*, 3H, H18), 5,10 (*d*, 1H,  $J = 2,8$  Hz, H15) 4,02 (*q*, 2H,  $J = 7,0$  Hz, H4), 6.63-6,67(*m*, 3H, H8-H10-H12), 7,12 (*m*, 1H,  $J = 8,5$  Hz H11), 9,46 (*s*, 1H, H9a), 9,59 (*sl*, 1H, H1), 10,29 (*sl*, 1H, H3).

**RMN de  $^{13}C$**  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta_C$  (ppm), atribuição), 14,1 (C16), 17,2 (C18), 54,02 (C4), 59,7 (C15), 100,9 (C5), 113,3 (C8), 114,7 (C10), 117,1 (C12), 129,6 (C11), 144,9 (C7-C6), 157,5(C9), 165,3 (C13), 174,3 (C2).

**HRMS (ESI):** calculado  $m/z$  [M+1]: 293,0882; encontrado  $m/z$  [M+1]: 293,1116 erro: - 80 ppm; calculado  $m/z$  [M+Na]: 315,0779; encontrado  $m/z$  [M+Na]: 315,0683 erro: -31 ppm.

### 5.3.2 Obtenção do ácido de monastrol (5).

A hidrólise do monastrol foi realizada utilizando metodologia adaptada de Klein e colaboradores (2007).<sup>45</sup> Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 1,7 mmol do monastrol, 5 mmol do KOH em 6mL de água. O sistema foi mantido sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 3 dias. Ao final deste período, foram adicionados gota a gota uma solução de 2 mol.L<sup>-1</sup> de HCl até que houvesse turvação da solução. O sistema de reação foi mantido sob agitação e após 30 minutos o sólido amarelado formado foi filtrado e lavado com água destilada. O rendimento obtido foi de 80%.



**Formula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S

**Aspectos:** sólido amarelado

**Rendimento:** 80%

**Faixa de temperatura de fusão:**195-198°C

**IV**  $I_{\nu}$  (KBr): 3308 (fenol O-H), 3192 (ácido O-H), 3130 (N-H), 1672 (ácido C=O), 1586 (alceno conjugado C=C), 1482 (ar. C=C), 1268 (C-N), 1186 (C=S).

**RMN  $^1\text{H}$ :** (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta_{\text{H}}$  (ppm), multiplicidade, integração,  $J$  (Hz), atribuição) 2,26 (s, 3H, H15), 5,08 (sl, 1H, H4), 6,64 (sl, 3H, H8-H10-H12), 7,12 (t, 1H,  $J = 8\text{Hz}$ , H11), 9,54 (sl, 2H, 9a, 2), 10,20 (sl, 1H, 3), 12,12 (sl, 1H, 14).

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_{\text{C}}$  (ppm), 17,2 (C15), 54,1 (C4), 101,5 (C5), 113,4 (C8), 114,6 (C10), 117,1 (C12), 129,6 (C11), 144,4 (C7), 144,9 (C6), 157,5 (C9), 167,1 (C13), 174,3 (C2).

**HRMS (ESI):** calculado  $m/z$  [M-1]: 263,0569; encontrado  $m/z$  [M-1]: 263,0446 erro: -46,7ppm .

### 5.3.3 Obtenção do *terc*-butilcarbamato de 2-bromoetila (9)

O *terc*-butilcarbamato de 2-bromoetila foi obtido utilizando metodologia adaptada de Li *et al.* 2009.<sup>58</sup>

Um balão de fundo redondo de 100 mL foi resfriado em banho de gelo e nele foram adicionados 29 mmol de bromidrato de 2-bromoetilamina em 40 mL de dioxano sob agitação. Em seguida, foram adicionados 27 mmol de dicarbonato de di-*terc*-butila e 25 mmol de trietilamina (gota a gota, durante aproximadamente 2 minutos).

O sistema de reação foi mantido em banho de gelo por mais 50 minutos e posteriormente foi aquecido até temperatura ambiente, e permaneceu a essa temperatura por 48 horas. Ao final deste período, o bruto de reação foi concentrado a pressão reduzida utilizando evaporador rotatório. A mistura de reação foi solubilizada em 100 mL de diclorometano e foi realizada uma extração líquido-líquido com água destilada (2 x 50 mL) .

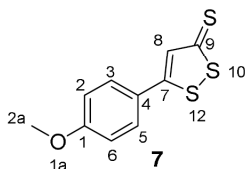
A fase orgânica, finalmente, foi seca com sulfato de magnésio e concentrada no evaporador rotatório. Foi obtido um líquido viscoso amarelado com 54% de rendimento.

#### 5.3.4 Obtenção do 5-(4-metoxifenil)-3*H*-1,2-ditolano-3-tiona (ADT) (7)

O 5-(4-metoxifenil)-3*H*-1,2-ditolano-3-tiona foi obtido utilizando metodologia adaptada de Sparatore *et. al.* 2009.<sup>46</sup>

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 8 mmol de *trans*-anetol e 56 mmol de enxofre molecular em 7mL de dimetilacetamida (DMA). O sistema foi aquecido até temperatura de refluxo, sob agitação durante 6 horas. Após esse período, o aquecimento foi desligado e manteve-se apenas a agitação durante mais 18 horas.

O bruto de reação foi filtrado com a finalidade de retirar o enxofre residual. À água mãe foram adicionados 30 mL de água destilada gelada. Esta solução foi mantida em banho de gelo durante 5 horas. Realizou-se nova filtração e o resíduo formado foi lavado com 30 mL de éter etílico. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna (suportada em sílica) empregando-se, como eluente, a mistura hexano e acetato de etila (7:1). O rendimento final obtido foi de 15%.



**Formula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>OS<sub>3</sub>

**Aspectos:** sólido laranja

**Rendimento:** 15%

**Faixa de temperatura de fusão:** 106-108°C [lit. 118°C<sup>45</sup>]

**IV/V (KBr):** 3080 (C<sub>sp</sub>2-H ar), 1602 (C=C), 1176(C=S) cm<sup>-1</sup>.

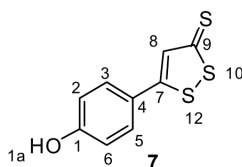
**RMN <sup>1</sup>H:** (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ<sub>H</sub> (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição) 3,84 (s, 3H, H2a), 7,05 (*d*, 2H, *J* = 4Hz, H2-H6), 7,74 (s, 1H, H8), 7,84 (*d*, 2H, *J* = 4Hz, H3-H5).

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta_c$  (ppm), 55,6 (C2a), 115,0 (C2-C6), 123,6 (C4), 128,9 (C5-C3), 134,11 (C8), 162,7 (C7), 173,7 (C1), 214,7 (C9).

### 5.3.5 Obtenção da 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiolano-3-tiona (ADTOH) (8)

O ADTOH foi obtido utilizando metodologia adaptada de Li e colaboradores 2010<sup>59</sup>

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 4,16 mmol de ADT e 24 mmol de cloridrato de piridina. O sistema de reação foi submetido ao aquecimento por irradiação de microondas com potência de 300 W e agitação magnética. O aquecimento foi programado com uma rampa de 4 minutos até a temperatura de 100 °C permanecendo nesta temperatura durante 6 minutos e então, iniciou-se uma nova rampa de 3 minutos até a temperatura de 200°C, permanecendo a esta temperatura durante 4 minutos. Ao final, foi adicionado ao bruto de reação, de aspecto negro, oleoso e forte odor de  $\text{H}_2\text{S}$ , água destilada próxima a fervura até que o óleo fosse adquirindo o aspecto de um sólido marrom. O sistema foi filtrado e o sólido obtido solubilizado em 80 mL de solução de carbonato de potássio 10%. Essa solução foi lavada com (4 x 500 mL) diclorometano. A fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio e em seguida o solvente foi evaporado utilizando evaporador rotatório. O produto (sólido laranja) foi obtido com 66% de rendimento.



**Formula molecular:**  $\text{C}_9\text{H}_6\text{OS}_3$

**Aspectos:** sólido laranja

**Rendimento:** 66%

**Faixa de temperatura de fusão:** 178-180°C [lit. 172-174°C<sup>59</sup>]

**IV/v** (KBr): 3158 (Ar-OH), 3050 ( $\text{C}_{sp^2}\text{-H ar}$ ), 1608 (C=C), 1476 (O-H $\delta$ ), 1197 (C=S),  $\text{cm}^{-1}$

1

**RMN <sup>1</sup>H:** (200 MHz, DMSO,  $\delta_H$  (ppm), multiplicidade, integração,  $J$  (Hz), atribuição) 6,86 (d, 2H,  $J = 6$ Hz, H1-H6), 7,68 (s, 1H, H8), 7,76 (d, 2H,  $J = 4$ Hz, H3-H5), 10,50 (s, 1H, 1a)

**RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz, DMSO):  $\delta_C$  (ppm), 116,4 (C2-C6), 122,2 (C4), 129,2 (C3-C5), 133,5 (C8), 161,8 (C7), 174,4 (C1), 214,4 (C9).

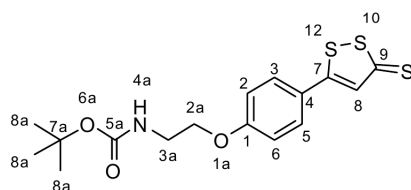
**HRMS (ESI):** calculado  $m/z$  [M-1]: 224,9581, encontrado  $m/z$  [M-1]: 224,9477 erro: 46ppm .

### 5.3.6 Obtenção do *terc*-butilcarbamato de (2-(4-(3-tioxo-3*H*-1,2-ditolano-5-ila)fenoxi)etila (10)

O *terc*-butilcarbamato de (2-(4-(3-tioxo-3*H*-1,2-ditolano-5-ila)fenoxi)etila foi obtido utilizando metodologia adaptada de Georgiades, *et. al.* 2006.<sup>60</sup>

Em um balão de 50 mL de três vias com fundo redondo foram adicionados 2 mmol de ADTOH, 2,86 mmol de KI e 6 mmol de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 4 mL de acetonitrila anidra. A mistura foi mantida sob temperatura de refluxo e agitação durante 20 minutos, e então foi adicionada uma solução contendo 8 mL de acetonitrila e 6 mmol de **9**.

Após 48 horas, o solvente foi removido utilizando evaporador rotatório e obteve-se um material oleoso de coloração escura. Este material foi solubilizado em 40 mL de diclorometano e foi lavado com solução de NaOH 10% (2 X 30 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio e o solvente removido em evaporador rotatório. Finalmente, foi realizada uma cromatografia em coluna empregando como suporte sílica e utilizando como eluente clorofórmio:metanol (100:1). O composto foi purificado com 62% de rendimento.



**Formula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>S<sub>3</sub>

**Aspectos:** sólido laranja



**Rendimento:** 62%

**Faixa de temperatura de fusão:** 116-117 °C

**IV/v** (KBr): 3044 (C<sub>sp</sub>2-H), 1694 (carbamato C=O), 1602 (C=C), 1078(C=S) cm<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H:** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ H (ppm), multiplicidade, integração, J (Hz), atribuição) 1,44 (s, 9H, H8a), 3,54 (q, 2H, J= 5,2Hz, H3a), 4,07 (t, 2H, J= 5,2, H2a), 5,02 (sl, 1H,H4a), 6,94 (d, 2H, J= 8,8 Hz, H2'-H6'), 7,35 (s, 1H, H8'), 7,58 (d, 2H, J=8,8 H3',5')

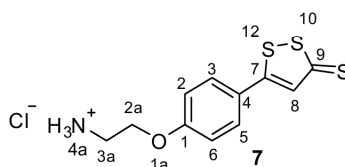
**RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ C (ppm), 28,5 (C8a), 40,0 (C3a), 67,6 (C2a), 79,8 (C7a), 115,5 (C2'-C6'), 124,5 (C4'), 128,7 (C3'-C5'), 134,7 (C8'), 155,9 (C5a),162,0 (C7'), 172,9 (C1'), 215,1 (C9').

**HRMS (ESI):** calculado *m/z* [M+1]: 370,0527, encontrado *m/z* [M+1]: 370,0050 erro: - 129 ppm; calculado *m/z* [M+Na]: 391,9872, encontrado *m/z* [M+Na]:392,0425 erro:-141 ppm.

#### 5.4 Obtenção do cloridrato de 5-(4-(2-aminoetoxi)fenil)-3H-1,2-ditolano-3-tiona (11)

Em um balão de fundo redondo de 125 mL foi adicionado 1 mmol de **10** em 19 mL de acetato de etila. Em seguida, foram adicionados 16 mL de uma solução de HCl 4 mol/L.

O sistema de reação foi mantido sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 3 horas. Ao final, o balão de fundo redondo foi armazenado em geladeira e houve a formação de um precipitado laranja. Este foi isolado por filtração e lavado com água destilada com rendimento de 56%.



**Formula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>NOS<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>

**Aspectos:** sólido laranja

**Rendimento:** 56%

**IV/V** (KBr): 3434 (N-H), 3200 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 3046 (C<sub>sp</sub>2-H ar), 1602 (C=C), 1200 (C=S) cm<sup>-1</sup>.

**RMN <sup>1</sup>H:** (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ<sub>H</sub> (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição) 3,22 (*sl*, 2H, H3a), 4,31 (*sl*, 2H, H2a), 7,11 (*d*, 2H, *J* = 8,0Hz, H2'-H6'), 7,74 (*s*, 1H, H8'), 7,88 (*d*, 2H, *J* = 8,0 Hz, H5'-H3'), 8,46 (*sl*, 3H, H4a).

**RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ<sub>C</sub> (ppm), 38,1 (C3a), 64,7 (C2a), 111,7 (C2-C6), 124,2 (C4), 129,0 (C3-C5), 134,4 (C8), 161,2 (C1), 173,6 (C7), 214,8 (C9).

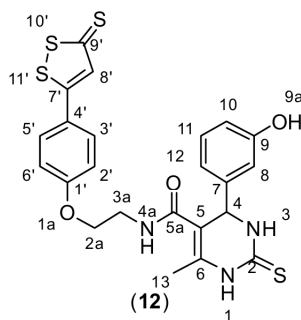
**HRMS (ESI):** calculado *m/z* [M+1]: 270,0076, encontrado *m/z* [M+1]: 269,9589 erro: - 180 ppm .

### **5.5 Obtenção do 4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-tioxo-N-(2-(4-(3-tioxo-3H-1,2-ditioil-5-il)fenoxi) etil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (H<sub>2</sub>S-monastrol) (12)**

Em um balão de fundo redondo de 25 mL (**A**) foram adicionados 0,4 mmol do ácido de monastrol e 0,4 mmol de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfônio hexafluorofosfato (Pybop) em 5 mL de tetrahidrofurano (THF) anidro. O sistema foi mantido sob atmosfera de argônio e temperatura ambiente.

Em outro balão de fundo redondo de 25 mL (**B**) foram adicionados 0,39 mmol de hidrocloreto de 5-(4-(2-aminoetoxi)fenil)-3H-1,2-ditiolano-3-tiona, 3 mmol de (*N,N*-diisopropiletilamina) DIPEA e 7 mL de THF. Após 5 min a suspensão do balão **A** foi lentamente transferida (3 min) para o balão **B** por intermédio de uma seringa de vidro. Finalmente a reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 24 horas.

Ao final, foi evaporado o solvente obtendo-se um óleo laranja. Ao óleo obtido foram adicionadas algumas gotas de etanol até que se verificasse a formação de um sólido laranja. Esse sólido foi isolado por filtração e purificado por cromatografia em coluna utilizando a mistura diclorometano:etanol (15:1) como eluente. Para averiguar a pureza das frações obtidas na cromatografia em coluna foi necessária a utilização de dois reveladores distintos: a vanilina indicava bem o subproduto remanescente e o iodo indicava bem os derivados de ADTOH. O rendimento obtido do composto **12** foi de 11%.



Formula molecular:  $C_{23}H_{21}N_3O_3S_4$

Aspectos: sólido laranja

Rendimento: 11%

IV/v (KBr): 3200 (OH-Ar), 2968( $C_{sp2}$ -H), 2868(C-H), 2880 (C-O-C-H), 1602(C=O) 1198 (C=S), 1180(C=S ditiolano-tiona)

**RMN  $^1H$ :** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta_H$  (ppm), multiplicidade, integração,  $J$  (Hz), atribuição) 2,00 (s, 3H, H13), 3,55-3,338 (*m*, 2H, H3a), 4,05 (*q*, 2H,  $J^3 = 5,6$  Hz, H2a ), 5,18 (*d*, 1H,  $J^3 = 3,2$  Hz, H4), 6,61-6,64 (*m*, 3H, H8,H10, H12), 7,03 (*d*, 2H,  $J = 8,8$  Hz, H2' e H6'), 7,14 (*sl*, 1H, H8'), 7,86 (*d*, 2H,  $J = 8,8$  Hz, H3',H5'), 7,97(*t*, 1H, $J = 5,2$  Hz, H4a),9,28 (s, 1H, H3) 9,41 (s, 1H, H9a), 9,80(*sl*, 1H, H1).

**RMN de  $^{13}C$**  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_C$  (ppm) 16,3 (C13), 38,2 (C3a), 54,8 (C4), 66,4 (C2a), 106,8 (C5), 113,2 (C8), 114,5 (C10), 155,5 (C2',C6'), 166,9 (C12), 123,7 (C7), 129,0 (C3',C5'),129,3 (C8'),134,2 (C11),134,7 (C8'), 144,5 (C1'), 157,5 (C6), 161,8 (C5a), 166,3 (C4'),173,8 (C2), 174,1 (C7'), 214,8 (C9').

**HRMS (ESI):** calculado  $m/z$  [M-1]: 514,0466, encontrado  $m/z$  [M-1]: 514,0347 erro: 23 ppm .

## 5.6 Avaliação da atividade antiproliferativa em células de ovário.

Estes experimentos foram realizados no Serviço de biologia celular da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da FUNED (Fundação Ezequiel Dias).

### **5.6.1 Metodologia geral para cultivo das linhagens celulares *in vitro***

Foi utilizada a Linhagem TOV-21G (ATCC® CRL-11730™ – adenocarcinoma de ovário). As células foram manipuladas com materiais esterilizados em uma sala contendo cabine de segurança biológica.

Essa linhagem foi cultivada em garrafas próprias para o cultivo celular. O meio de cultura utilizado foi o DEMEM alta glicose suplementado com 15% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina. A esterilidade do meio de cultura foi comprovada através de testes microbiológicos.

#### **5.6.1.1 Expansão da linhagem**

As células de TOV-21G após serem descongeladas foram incubadas em estufa a 37°C e atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a formação de uma monocamada celular, o meio de cultura foi retirado do recipiente contendo as células. Em seguida, foram adicionados 4 mL de tripsina 0,025%, o sistema foi mantido em repouso durante 5 min, em estufa, para desprendimento das células. A solução contendo as células e a tripsina foram centrifugadas a 800 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi descartado.

A viabilidade celular foi calculada utilizando o método colorimétrico de azul de tripan 1% em câmara de Neubauer. A distinção entre células vivas e células mortas foi realizada com o auxílio do reagente azul de tripan. Este composto é capaz de corar as células que possuem danos na membrana.<sup>61</sup> As células vivas que não possuem danos na membrana, portanto, são capazes de excluir o azul de tripan de seu interior<sup>61</sup>. Isto posto, as células coradas são consideradas mortas e as células translúcidas são consideradas vivas. Esse mecanismo colorimétrico é muito rápido e permite que células sejam contadas, prontamente, na câmara de Neubauer<sup>61</sup>.

De posse da concentração de células viáveis por mililitro, as células foram destinadas ao experimento de citotoxicidade.

### 5.6.2 Teste de viabilidade celular por brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazóleo) (MTT)

Foi utilizada uma placa de 96 poços, cada aplicação desse teste foi realizada em triplicada e o controle de vida foi realizado em hexaplicata.

Para o experimento,  $10^5$  células viáveis foram colocadas em cada poço. O volume total de cada poço foi de 200  $\mu$ L. Após a aplicação das células, a placa foi mantida em estufa 37°C com fluxo de CO<sub>2</sub> (5%) durante 24 horas. O meio foi retirado com pipeta e lavado com 100  $\mu$ L de PBS 1X.

As amostras ácido de monastrol, ADTOH, e a mistura rica do híbrido de monastrol foram solubilizadas em 1% de DMSO, meio de cultura e gentamicina. Como droga controle foi utilizado o próprio monastrol. Cada composto foi avaliado nas concentrações de 1  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL e 15  $\mu$ g/mL. No controle de vida foi adicionado apenas as células com o meio de cultura e no controle de morte foi adicionado as células em meio de cultura contendo peróxido de hidrogênio 30 mM.

Após incubação o meio de cultura foi descartado, os poços foram lavados com solução de PBS 1X seguido da adição de 100  $\mu$ L da solução de MTT. O sistema foi incubado durante 3 horas. Ao final, a placa foi centrifugada por 10 min a 1000 rpm e o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 50  $\mu$ L de DMSO. A leitura foi realizada a 540 nm em um monocromador *SpectramaxM5<sup>o</sup>*, *Molecular Devices Corporation<sup>®</sup>* e a viabilidade foi calculada utilizando a Equação 1.

O MTT, em contato com células vivas, é reduzido a formazan, pois reage com metabólitos dessas células.<sup>62</sup> O formazan é um cristal azul, quando solubilizado pode ser quantificado por espectrofotometria<sup>62</sup>. Diante desse quadro, a absorbância observada é diretamente proporcional à quantidade de formazan e, conseqüentemente, é proporcional a quantidade de células viáveis<sup>62</sup>.

$$viabilidade\ celular = \frac{absorb\ancia\ da\ amostra\ de\ células\ tratadas\ X100}{absorb\ancia\ do\ controle\ de\ vida}$$

**Equação 1.** Equação da viabilidade pelo método do MTT.

### 5.6.3 Cálculos estatísticos

Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do programa *OriginPro 9*<sup>®</sup>, e com o programa *IBM SPSS Statistics 20* para Windows.

Os métodos estatísticos empregados permitiram obter informações sobre a variabilidade, a simetria dos dados obtidos, ponto de mínimo e ponto de máximo.

Para verificar matematicamente se existem diferenças significativas entre os resultados observados foi realizada a análise de ANOVA com um fator *post-hoc* com método LSD (teste da diferença mínima de significância).

A análise de ANOVA, variação do teste *t*, avalia se as diferenças são realmente confiáveis ou são simplesmente eventos oriundos do acaso<sup>63</sup>. Este teste relaciona os intervalos de confiança e mostra se existem, ou não, diferenças entre os conjuntos de dados avaliados<sup>63</sup>. Para evidenciar, qual o grupo no conjunto de dados apresenta diferença é necessário outro teste. No caso foi usado o teste LSD que determina as diferenças significativas por comparação entre todos os grupos testados com uma confiabilidade de 95%<sup>63</sup>.

Também foi avaliado os testes não paramétricos por Kruskal-Wallis para relação entre os compostos avaliados e as viabilidades observadas. O teste de Kruskal-Wallis é um teste não paramétrico utilizado pra conferir se um conjunto de amostras provém da mesma distribuição.<sup>63</sup>

## Referências

- [1] [http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tbregioes\\_consolidado.asp](http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tbregioes_consolidado.asp) acesso dia 09-07-15.
- [2] WARD, L.S.; *Arq Bras Endocrinol Metab.* **2002**, 46(4)-351-60.
- [3] KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; *et. al. Robbins - Bases patológicas das doenças.* Elsevier, **2005**.
- [4] ALBERTS, B.; JROHNSON, A.; LEWI, J.; *et. al. Molecular Biology of The Cell* ed. 5 Taylor e Francis group **2002**.
- [5] PAULOVICH, A.G.; TOCZYSKI, D.P.; HARTWELL, H.L.; *Cell.* **1997**, 88:315-21.
- [6] THIBAUT, B.; CASTELLS, M.; DELORD, JP.; *et. al. Cancer. Metast. Rev.* **2014**, 33:17–39.
- [7] JAMBAZ, K.H.; ASHFAQ, M.A.; QADIR, M.I.; *Adv. Cancer. Res. Treat.* **2012**, 2014:1-11.
- [8] SÁNCHEZA, A.R.; FERNÁNDEZA, B.C.; RAPOSO, C.G.; *Medicine.* **2013**, 11(27):1641-8.
- [9] NARODE, S.; FORD, D.; DEVILEE, P.; *et. al. Am. J. Hum. Genet.* **1995**, 7:957-8.
- [10] FINCH, A.; BEINER, M.; LUBINSKI, J.; *JAMA.* **2006**, 296(2):185-92.
- [11] AGARWAL, R.; KAYE, S.B.; *Nat. Rev.*, **2003**, 3:502-16.
- [12] JACKSON, J.R.; PATRICK, D.R.; DAR, M.M.; *et. al. Nat. Rev.*, **2007**, 7:107-17.
- [13] WANG, R.; *Physiol. Rev.* **2012**, 92:791–896.
- [14] GUIDOTTI, T. L.; *Occup. Mad.*, **1996**, 46(5):367-71.
- [15] BENAVIDES, G.A.; SQUADRITO G.L.; MILLS R.W., *et. al. PNAS.* **2007**, 104(46):17977–17982.
- [16] WHITEMAN, M.; Le TRIONNAIRE, S.; CHOPRA M.; *et. al. Clin. Sci.* **2011**, 121:459–88.
- [17] LI, L.; ROSE, P.; MOORE, P.K.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2011**, 51:169-87.
- [18] LEE, S.W.; HU, S.Y.; HU, L-F; *et. al. Glia.* **2006**, 54:116–24.

- [19] TYAGI, N.; MOSHAL, K.S.; SEN, U.; *et al. Antioxid. Redox. signal.* **2009**, 11(1):25-33.
- [20] QU, K.; LEE, S.W.; BIAN, J.S.; *et al. Neurochem. Int.* **2008**, 52:155–65.
- [21] ZHAO, W.; ZHANG, J.; LU, Y.; *et al. EMBO J.* **2001**, 20(21):6008-16.
- [22] BHATIA, M.; *Scientifica.* **2012**, 2012:1-12.
- [23] HELLMICH, M.R.; COLETTA, C.; CHAO, C.; *et al. Abstr/ Nitric. Oxide*, **2014**, 39:S16–S49.
- [24] Li, L.; BHATIA, M.; ZHU, Y.Z.; *et al. FASEB J.*, **2005**, 19:1196-98.
- [25] WALLACE, J.L.; CALIENDO, G.; SANTAGADA, V.; *et al. Gastroenterology*, **2007**, 132:261-71.
- [26] CHATTOPADHYAY, M.; KODELA, R.; NATH, N.; *et al. Biochem. Pharmacol.* **2012**, 83:715–22.
- [27] KODELA,R.; CHATTOPADHYAY, M.; KASHFI, K.; *Med. Chem. Comm.* **2013**, 4:1472-81.
- [28] ZHAO, Y.; BIGGS, T.D.; *Chem. Commun.* **2014**, 50:11788-805.
- [29] O'DWYER, P.J.; CLAYNTON, M., HALBHERR, T.; *et al. Clin. Cancer Res.* **1997**, 3:783-91.
- [30] GIUSTARINI,D.; SOLDATO, P.D.; SPARATORE, A.; *et al.; Free Radical Bio Med.* **2010**, 48:1263–72.
- [31] LANDIS, P.S.; *Chem. Rev.*, **1965**, 65(2):237-45.
- [32] VORONKOV, M.G.; VYAZANKIN, N.S.; DERYAGINA, E.N.; *et al. Reactions of sulfur with organic compounds.* ed J.S.Pizey (formerly of University of Aston Girmingham, England), **1987**. p14, 63-5.
- [33] BATEMAN, L.; MOORE, C.G.; *Reactions of sulfur with olefins*, **1961**. Pergamon Press.
- [34] NETO, L.S; Estudos visando a síntese do nicorandil-liberador de H<sub>2</sub>S, *Dissertação de mestrado.* UFMG **2013**.
- [35] DECKER, M.; *Current. Med. Chem.* **2011**, 18:1464-75.



- [36] BIGINELLI, P.; *Gazz. Chim. Ital.* **1893**, 23:360-13.
- [37] MAYER, T.U.; KAPOOR, T.M.; HAGGARTY, S.J.; *et. al. Science.* **1999**, 286(5441):971.
- [38] COCHRAN, J.C.; GATIAL, J.E.; KAPPOOR, T.M.; *et. al. J. Biol.Chem.* **2005**, 280:12658-67.
- [39] BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L.; *Biochemistry* 5ed. W.H. Freeman and company **2002**.
- [40] AGARWAL, R.; KAYE, S.B.; *Nat. Rev.* **2003**, 3:502-16.
- [41] JACKSON, J.R.; PATRICK, D.R.; DAR, M.M.; *et.al. Nat. Rev.*, **2007**, 7:107-17.
- [42] SILVA, D.L.; FERNANDES, F.A.; SABINO, A. A.; *et. al. Tetrahedron Lett.*; **2012**, 77:101084-93.
- [43] RAMOS, L.M.; TOBIO, A.Y.P.L.; SANTOS, M.R.; *et. al. J. Org. Chem.* **2012**, 77:10184-93.
- [44] KIM, J.; PARK, C.; OK, T.; *et. al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22:2119-24.
- [45] KLEIN, E.; DeBONIS, S.; THEIDE, B.; *et al. Bioorg. Med. Chem.* 15 (**2007**) 6474-88.
- [46] SPARATORE, A.; SOLDATO, P.; SANTUS, G.; patent WO 2009/065926 A2 **2009**.
- [47] SANSEVERINO, A.M.; *Quím. Nov.* **2002**, 25:660-7.
- [48] MISRA, P. K.; MISRA, S. C.; MOHAPATRA, R. M.; MITTRA, A. S.; *J. Ind. Chem. Soc.* **1979**, 56:404-07.
- [49] DOLLARD-DES-ORMEAUX, A.M.; PROVENCHER, D.; *Primary Cultures Of Normal And Tumoral Human Ovarian Epithelium*, United States Patent, Patent Number: 5,710,038 ,**1998**.
- [50] [http://www.atcc.org/Search\\_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cTOV%2f-21G%7c3%7c,Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=TOV-21G&redir=1](http://www.atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cTOV%2f-21G%7c3%7c,Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=TOV-21G&redir=1) acesso dia 26/06/15.
- [51] PINTO, F.N.; PRUDENTE, F.V.B.; GONÇALVES, M.S.; *et. al. Rev. Med. (São Paulo)* **2002**, 81(1/4):42-6.

- [52] FRESHNEY, R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, ed5, Copyright **2005**.
- [53] MÓDIS, K.; COLETTA, C.; ERDÉLYI, K.; *et al. FASEB J.* February **2013**, 27:601-61.
- [54] CZABO, C.; HELLMICH, M.; *Cell Cycle*. **2013** 12(18):2915–6.
- [55] GOUBERN, M.; ADRIAMIHAJA, M.; NUBEL, T.; *FASEB J.*, **2007**,21:1699-706.
- [56] PERRIN, D.D.; *Purification of laboratory chemicals* 4°ed, ed.Butterworh Heinemann, **1997**.
- [57] GLASNOV, T.N; TYE, H.; KAPPE, C.O; *Tetrahedron*. **2008**, 64:2035-41.
- [58] LI, H.; HAO, M.; WANG, L.; *et. al. Org. Prep. Proced. Int.* **2009**, 41:301–7.
- [59] LI, X.; FAN, W.; HAI, S.; *et al. Lett. Drug. Des. Discov.* **2010**, 7:747-53.
- [60] GEORGIADES, S.N.; CLARDY, J.; *et. al. Org. Lett.* **2006**, 8(19):4251-4.
- [61] TRAN, S.L.; PUHAR, A.; CAMUS, M.N.; *et. al. PLoS ONE*. **2011**, 6(9): e22876.
- [62] MOSMANN, TIM; *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65:55-63.
- [63] MAGALHÃES, M.N.; LIMA, A.C.P.; *Noções de probabilidade e estatística* Ed. Universidade de São Paulo, Ed<sup>6</sup>, **2014**.