

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

HELLOANA AZEVEDO BARBOSA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO,
ANTIPROLIFERATIVO E TRIPANOCIDA DE DERIVADOS SULFONAMÍDICOS
DO EUGENOL E DIIDROEUGENOL**

Alfenas/MG

2017

HELLOANA AZEVEDO BARBOSA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO,
ANTIPROLIFERATIVO E TRIPANOCIDA DE DERIVADOS SULFONAMÍDICOS
DO EUGENOL E DIIDROEUGENOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.
Orientador: Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho.
Colaboradores: Prof^ª. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias, Prof^ª. Dra. Marisa Ionta, Prof. Dr. Ivo Santana Caldas, Prof. Dr. Thiago Belarmino de Souza, Ms. Taciane Maíra Magalhães Hipólito, Ms. Josidel Conceição Oliver, Ms. Guilherme Álvaro Ferreira da Silva e Carolina Faria Silva.

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Barbosa, Helloana Azevedo.

Síntese e avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano, antiproliferativo e tripanocida de derivados sulfonamídicos do eugenol e diidroeuugenol / Helloana Azevedo Barbosa-- Alfenas-MG, 2017.

134 f.

Orientador: Diogo Teixeira Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Eugenol. 2. Sulfonamidas. 3. Anti-Infeciosos. 4. Anticarcinógenos. 5. Tripanossomicidas. I. Carvalho, Diogo Teixeira. II. Título.

CDD-615.321

HELLOANA AZEVEDO BARBOSA

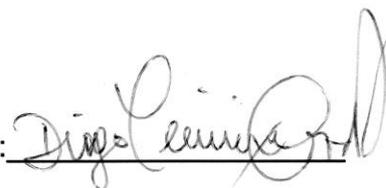
**“SÍNTESE E AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO, ANTIPROLIFERATIVO E TRIPANOCIDA DE
DERIVADOS SULFONAMÍDICOS DO EUGENOL E
DIIDROEUGENOL”**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 21/02/2017

Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Gustavo Henrique Ribeiro Viana
Instituição: UFSJ

Assinatura:



Profa. Dra. Danielle Ferreira Dias
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Dedico esse trabalho à minha família, em especial aos meus pais, Paulo e Lázara, meus exemplos de vida, que sempre me apoiam e me incentivam em todos os momentos. Ao Guilherme, pelo companheirismo, pela paciência, por todo amor e cuidado, me motivando a continuar mesmo nos momentos de dificuldades. Ao meu amado filho Bernardo, que veio para alegrar ainda mais a minha vida e me mostrar que para o amor não há limites.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho, pela oportunidade oferecida, dedicação e competência. Por sempre contribuir na formação profissional de seus alunos e também pela amizade.

Ao meu filho Bernardo, por me proporcionar a vivência desse momento tão sublime que é ser mãe. Por encher meu coração de esperança e amor, e por ser a luz na minha vida.

Ao Gui, pelo amor, cuidado e cumplicidade em todos esses anos juntos. Por me incentivar a alcançar meus sonhos e pela família que construímos.

A toda a minha família, especialmente, aos meus pais, Paulo e Lázara, pela educação, dedicação e por sempre apoiaram minhas decisões e fazerem o possível para que eu alcance minha felicidade.

Às minhas irmãs, Hellen e Hérika, pelo carinho e apoio em todas as minhas decisões.

À minha afilhada Isabela e aos meus sobrinhos Marina, Miguel e a mais nova integrante, Maria Luíza, pelos momentos de descontração, amor e pela enorme alegria que trazem às nossas famílias.

Aos meus cunhados, Ricardo e Cláudio, pelas boas conversas e conselhos.

À minha família Pouso Alegre, Anélio, Sandra, Gustavo e Maria Fernanda, por todo carinho e apoio a mim e ao Gui nessa caminhada e também pelas orações.

A todos os meus amigos e aos grandes amigos, Renato, Camila e Guiomar, que nunca deixam de se preocupar e comemoram comigo cada conquista.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho, em especial à Carolina Faria Silva, que tanto me auxiliou na parte sintética durante esses dois anos.

Aos professores Amanda Latércia Tranches Dias, Ivo Santana Caldas, Luiz Felipe Leomil Coelho e Marisa Ionta e aos doutorandos Guilherme Álvaro Ferreira da Silva, Josidel Conceição Oliver e Taciane Maíra Magalhães Hipólito, que realizaram os ensaios biológicos.

À técnica Kris Simone Tranches Dias, ao pós-doutorando Alexandre Bertoli Carvalho, aos professores Rudy Bonfilio, Lilian Sibelle (UFSC) e Louis Pergaud Sandjo (UFSC) que realizaram as análises de RMN, IV e EM.

À professora Marcia Paranho Veloso e ao discente Kassius Reis, pela contribuição com os estudos de modelagem molecular.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar), em especial, André, Antônio, Camila, Dalila, Guilherme Brancaglioni, Guilherme Tadeu (em

memória), Laira, Letícia, Luara, Luís Paulo, Thaynan, Thiago Belarmino e Thiago dos Santos por mostrarem-se sempre presentes e dispostos a ajudar em qualquer momento.

À Universidade Federal de Alfenas pelo espaço concedido na realização da pesquisa e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelos esforços em prol da pesquisa e do crescimento acadêmico da instituição.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Alfenas, em especial, a Márcia Dantas, que estão sempre fazendo seu melhor e procurando ajudar os alunos.

A todas as pessoas que fizeram e fazem parte dessa caminhada.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo financiamento da pesquisa.

E, finalmente, a Deus por permitir que tudo isso fosse possível!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

(José de Alencar)

RESUMO

Os produtos naturais bioativos são fontes em potencial para o tratamento de diversas doenças associadas a altos índices de mortalidade na população mundial como, por exemplo, os cânceres e doenças infecciosas. Alguns fenilpropanoídeos, em especial o eugenol, o qual está presente nos óleos essenciais de diversas espécies vegetais, demonstram atividades relevantes como antimicrobianos e antiparasitários. Além disso, há diversos relatos científicos que demonstram o potencial antiproliferativo do eugenol frente a linhagens distintas de células tumorais. Da mesma forma, diversas substâncias que contêm o grupo funcional sulfonamida foram citadas como bioativa, em vista de apresentarem efeitos biológicos importantes, como antibacteriano, antifúngico, antiparasitário e antitumoral. Buscando a obtenção de novos produtos bioativos e em vista das ações biológicas relacionadas ao uso do eugenol e de sulfonamidas, empregou-se nesse trabalho a estratégia de hibridação molecular para o planejamento de substâncias inéditas que contemplassem resíduos estruturais do eugenol ou diidroeuogenol e uma subunidade sulfonamídica. As oito substâncias finais propostas foram obtidas com sucesso a partir da condensação do cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila com derivados *orto* e *meta*-aminofenóis, originados por sua vez de derivados nitrados do eugenol ou de seu análogo, diidroeuogenol. Os produtos tiveram suas identidades confirmadas por meio de espectroscopia no infravermelho, de ressonância magnética nuclear e de massas. Na sequência, foram avaliados como antimicrobianos contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*) e contra espécies patogênicas ou oportunistas de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*). Avaliou-se, ainda, a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* em formas epimastigotas do parasito e também a atividade antiproliferativa contra linhagens celulares derivadas de cânceres humanos (A549, HepG2, HT144 e MCF7). Três derivados sulfonamídicos (**7a**, **7b** e **7c**) apresentaram atividade antibacteriana com valores de CI_{50} na faixa de 299,40 a 297,62 μ M, frente *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Seis derivados sulfonamídicos (**6a**, **6c**, **7a**, **7b**, **7c** e **7d**) exibiram atividade antifúngica com valores de CI_{50} entre 664,89 a 748,50 μ M, frente *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Na avaliação da atividade tripanocida, todos os oito derivados sulfonamídicos mostraram-se ativos com valores de CI_{50} na faixa de 217,26 a 420,21 μ M. Já na avaliação da atividade antiproliferativa, apenas três derivados (**6b**, **6d** e **7a**) exibiram atividade promissora frente a linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF7) com valores de CI_{50} entre 116,60 a 164,90 μ M. Mesmo que os valores de

CI₅₀ encontrados nestes ensaios biológicos sejam maiores que aqueles obtidos para os fármacos referência, é importante destacar que, em alguns, casos as substâncias híbridas propostas resultaram em produtos menos tóxicos e com maior atividade que seus precursores fenilpropanoides. Por conseguinte, representam moléculas inéditas passíveis de alteração estrutural para otimização de atividade.

Palavras-chave: Eugenol. Sulfonamidas. Hibridação Molecular. Antimicrobianos. Antiproliferativos. Tripanocidas.

ABSTRACT

Bioactive natural products are potential sources for the treatment of various diseases associated with high mortality rates in the world population, such as cancers and infectious diseases. Some phenylpropanoids, especially eugenol, which are present in the essential oils of several plant species, demonstrate relevant activities as antimicrobials and antiparasitics. In addition, there are several scientific reports that demonstrate the antiproliferative potential of eugenol against distinct lines of tumor cells. Likewise, several substances containing the sulfonamide functional group have been cited as responsible for important biological effects such as antibacterial, antifungal, antiparasitic and anticancer. In order to obtain new bioactive products and in view of the biological actions related to the use of eugenol and sulfonamides, it was proposed herein the use of molecular hybridization strategy in the design of new substances that contained structural motifs of eugenol or dihydroeugenol and a sulfonamide subunit. The eight final proposed substances were successfully obtained from the condensation of *p*-acetamidobenzenesulfonyl chloride with ortho and meta-aminophenols derivatives, which came from nitrated derivatives of eugenol or dihydroeugenol. The products checked by infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance and mass spectroscopy. They were evaluated as antimicrobials against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*) and against pathogenic or opportunistic species of *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity in epimastigote forms of the parasite and antiproliferative activity against cell lines derived from human cancers (A549, HepG2, HT144 and MCF7) were also evaluated. Three sulfonamides derivatives (**7a**, **7b** and **7c**) presented antibacterial activity with IC₅₀ values ranging from 299.40 to 297.62 μM, against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. Six sulfonamides derivatives (**6a**, **6c**, **7a**, **7b**, **7c** and **7d**) exhibited antifungal activity with IC₅₀ values between 664.89 and 748.50 μM, against *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. In the evaluation of trypanocidal activity, all eight sulfonamides derivatives were active with IC₅₀ values in the range of 217.26 to 420.21 μM. In the evaluation of antiproliferative activity, only three derivatives (**6b**, **6d** and **7a**) exhibited promising activity against the breast adenocarcinoma line (MCF7) with IC₅₀ values between 116.60 and 164.90 μM. Even though the IC₅₀ values found in these biological assays are higher than those obtained for the reference drugs, it is important to note that in some cases the proposed hybrid substances have resulted in less toxic and more active

products than their phenylpropanoid precursors. Therefore, they represent new molecules that can be altered structurally for optimization of activity.

Keywords: Eugenol. Sulfonamides. Molecular Hybridization. Antimicrobial drugs. Anticancer drugs. Trypanocidal drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química de <i>Prontosil rubrum</i> , descoberto por Domagk em 1935.....	23
Figura 2 -	Estruturas químicas do ácido <i>para</i> -aminobenzoico (PABA) e da sulfanilamida.....	23
Figura 3 -	Bioativação de <i>Prontosil rubrum</i> por ação das azorredutases à sulfanilamida, protótipo da classe dos antibacterianos sulfonamídicos.	24
Figura 4 -	Estrutura química geral da classe das sulfas. Os substituintes relacionados com a atividade farmacológica são o grupo 4-amino e o grupo 1-sulfonamida monossustituído.	24
Figura 5 -	Biossíntese do ácido fólico bacteriano. O THF atua fornecendo uma unidade carbônica para a síntese das bases purínicas do DNA e RNA bacteriano.....	25
Figura 6 -	Estrutura química das principais sulfas utilizadas clinicamente.....	26
Figura 7 -	Estruturas químicas de alguns derivados sulfonamídicos descritos na literatura com potencial atividade antimicrobiana, antiproliferativa e tripanocida.	28
Figura 8 -	Estruturas químicas do eugenol (1 ; 4-alil-2-metoxifenol) e diidroeuogenol (2 ; 2-metoxi-4-propilfenol).....	31
Figura 9 -	Exemplos de fármacos planejados a partir da técnica de hibridação molecular.	35
Figura 10 -	Estruturas químicas dos derivados sulfonamídicos híbridos do eugenol (6a , 6c , 7a e 7c) e diidroeuogenol (6b , 6d , 7b e 7d) propostos.....	37
Figura 11 -	Roteiro sintético seguido para obtenção dos derivados híbridos sulfonamídicos do eugenol (6a , 6c , 7a e 7c) e diidroeuogenol (6b , 6d , 7b e 7d).	39
Figura 12 -	Reação de nitração do eugenol (1) e do diidroeuogenol (2).....	40
Figura 13 -	Reação de nitração do eugenol (1) e do diidroeuogenol (2).....	42
Figura 14 -	Reação de nitro-redução das substâncias 3a , 3b , 3c e 3d	44
Figura 15 -	Reação de obtenção dos derivados sulfonamídicos a partir dos intermediários amínicos 4a , 4b , 4c ou 4d	47
Figura 16 -	Reação de desacetilação dos derivados 6a , 6b , 6c e 6d	51

Figura 17 -	Esquema da retrosíntese dos derivados sulfonamídicos híbridos do eugenol e diidroeu­genol.	62
Figura 18 -	Mecanismo proposto para a reação de nitração das substâncias 3a e 3b	63
Figura 19 -	Mecanismo proposto para a reação de nitração das substâncias 3c e 3d	64
Figura 20 -	Etapas envolvidas durante a redução de derivados nitro-aromáticos.	67
Figura 21 -	Mecanismo proposto para a reação de obtenção das sulfonamidas acetiladas 6a , 6b , 6c e 6d	69
Figura 22 -	Mecanismo proposto para a reação de obtenção dos derivados sulfonamídicos desacetilados 7a , 7b , 7c e 7d	72
Figura 23 -	Viabilidade celular determinada por ensaio de Resazurina, após 48h de tratamento com os derivados sulfonamídicos do eugenol e diidroeu­genol na concentração de 125 µM.	85
Figura 24 -	Histogramas da distribuição celular da linhagem MCF7 quando exposta ao tratamento com as substâncias 6b , 6d e 7a por 48h.	88
Figura 25 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 3a (cm ⁻¹).	101
Figura 26 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 3b (cm ⁻¹).	101
Figura 27 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 3c (cm ⁻¹).	102
Figura 28 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 3d (cm ⁻¹).	102
Figura 29 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 4a (cm ⁻¹).	102
Figura 30 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 4b (cm ⁻¹).	103
Figura 31 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 4c (cm ⁻¹).	103
Figura 32 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 4d (cm ⁻¹).	103
Figura 33 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 6a (cm ⁻¹).	104
Figura 34 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 6b (cm ⁻¹).	104
Figura 35 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 6c (cm ⁻¹).	104
Figura 36 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 6d (cm ⁻¹).	105
Figura 37 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 7a (cm ⁻¹).	105
Figura 38 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 7b (cm ⁻¹).	105
Figura 39 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 7c (cm ⁻¹).	106
Figura 40 -	Espectro de absorção na região do IV da substância 7d (cm ⁻¹).	106
Figura 41 -	Espectro de RMN de ¹ H da substância 3a (CDCl ₃ , 300 MHz).	107
Figura 42 -	Espectro de RMN de ¹ H da substância 3b (CDCl ₃ , 300 MHz).	107
Figura 43 -	Espectro de RMN de ¹ H da substância 3c (CDCl ₃ , 300 MHz).	108
Figura 44 -	Espectro de RMN de ¹ H da substância 3d (CDCl ₃ , 300 MHz).	108

Figura 45 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3a (CDCl_3 , 75 MHz).	109
Figura 46 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3b (CDCl_3 , 75 MHz).	109
Figura 47 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3c (CDCl_3 , 75 MHz).	110
Figura 48 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3d (CDCl_3 , 75 MHz).	110
Figura 49 -	Subespectro DEPT-135 da substância 3a (CDCl_3 , 75 MHz).	111
Figura 50 -	Subespectro DEPT-135 da substância 3b (CDCl_3 , 75 MHz).	111
Figura 51 -	Subespectro DEPT-135 da substância 3d (CDCl_3 , 75 MHz).	112
Figura 52 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 4a (CDCl_3 , 300 MHz).	112
Figura 53 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 4b (CDCl_3 , 300 MHz).	113
Figura 54 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 4c (CDCl_3 , 300 MHz).	113
Figura 55 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 4d (CDCl_3 , 300 MHz).	114
Figura 56 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4a (CDCl_3 , 75 MHz).	114
Figura 57 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4b (CDCl_3 , 75 MHz).	115
Figura 58 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4c (CDCl_3 , 75 MHz).	115
Figura 59 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4d (CDCl_3 , 75 MHz).	116
Figura 60 -	Subespectro DEPT-135 da substância 4a (CDCl_3 , 75 MHz).	116
Figura 61 -	Subespectro DEPT-135 da substância 4b (CDCl_3 , 75 MHz).	117
Figura 62 -	Subespectro DEPT-135 da substância 4c (CDCl_3 , 75 MHz).	117
Figura 63 -	Subespectro DEPT-135 da substância 4d (CDCl_3 , 75 MHz).	118
Figura 64 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 6a ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz).	118
Figura 65 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 6b ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz).	119
Figura 66 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 6c ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz).	119
Figura 67 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 6d ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz).	120
Figura 68 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6a ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz).	120
Figura 69 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6b ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz).	121
Figura 70 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6c ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz).	121
Figura 71 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6d ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz).	122
Figura 72 -	Subespectro DEPT-135 da substância 6a ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz).	122
Figura 73 -	Subespectro DEPT-135 da substância 6b ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz).	123
Figura 74 -	Subespectro DEPT-135 da substância 6c ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz).	123
Figura 75 -	Subespectro DEPT-135 da substância 6d ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz).	124
Figura 76 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 7a ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz).	124
Figura 77 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 7b ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz).	125
Figura 78 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 7c ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz).	125

Figura 79 -	Espectro de RMN de ^1H da substância 7d (DMSO- d_6 , 300 MHz).....	126
Figura 80 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 7a (DMSO- d_6 , 75 MHz).....	126
Figura 81 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 7b (DMSO- d_6 , 75 MHz).....	127
Figura 82 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 7c (DMSO- d_6 , 75 MHz).	127
Figura 83 -	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 7d (DMSO- d_6 , 75 MHz).....	128
Figura 84 -	Subespectro DEPT-135 da substância 7a (DMSO- d_6 , 75 MHz).	128
Figura 85 -	Subespectro DEPT-135 da substância 7b (DMSO- d_6 , 75 MHz).....	129
Figura 86 -	Subespectro DEPT-135 da substância 7c (DMSO- d_6 , 75 MHz).	129
Figura 87 -	Subespectro DEPT-135 da substância 7d (DMSO- d_6 , 75 MHz).....	130
Figura 88 -	Espectro de massas da substância 6a	131
Figura 89 -	Espectro de massas da substância 6b	131
Figura 90 -	Espectro de massas da substância 6c	132
Figura 91 -	Espectro de massas da substância 6d	132
Figura 92 -	Espectro de massas da substância 7a	133
Figura 93 -	Espectro de massas da substância 7b	133
Figura 94 -	Espectro de massas da substância 7c	134
Figura 95 -	Espectro de massas da substância 7d	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de nitração.....	40
Tabela 2 -	Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de nitração.....	42
Tabela 3 -	Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de nitro-redução.	45
Tabela 4 -	Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de obtenção dos derivados sulfonamídicos 6a , 6b , 6c e 6d	48
Tabela 5 -	Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de desacetilação.	51
Tabela 6 -	Resultados das avaliações do potencial antibacteriano, antifúngico e tripanocida <i>in vitro</i> dos derivados sulfonamídicos e de seus precursores (CI ₅₀ e CI ₉₀ em µM).	78
Tabela 7 -	Resultados da avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i> dos derivados sulfonamídicos e de seus precursores sobre a linhagem celular normal de fibroblasto renal de hamster (BHK-21) (CI ₅₀ e CC ₅₀ em µM).	82
Tabela 8 -	Valores de CI ₅₀ ± DP (µM) determinados a partir dos resultados obtidos no ensaio de Resazurina para a linhagem MCF7.	86
Tabela 9 -	Índices de seletividade calculados com base nos valores de CI ₅₀ obtidos por ensaio de Resazurina para as linhagens MCF7 e CCD-1059Sk.	87
Tabela 10 -	Porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular após 48 horas de tratamento com as substâncias 6b , 6d e 7a à 133, 116 e 164 µM, respectivamente.....	87

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
ATR	- <i>Attenuated Total Reflectance</i>
BOD	- <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CC₅₀	- Concentração citotóxica para 50% das células
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CCS	- Cromatografia em coluna de sílica
CI₅₀	- Concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular
CI₉₀	- Concentração capaz de inibir 90% do crescimento celular
CL₅₀	- Concentração letal capaz de matar 50% das células
cLogP	- Logaritmo do coeficiente de partição calculado
CMH	- Caldo Müeller-Hinton
CMI	- Concentração mínima inibitória
d	- Duplete
DMEM	- Meio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DNA	- Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DEPT	- Intensificação sem distorção via transferência de polarização (<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
DHPS	- Diidropteroato sintase
DHPP	- 7,8-diidropteridinapirofosfato
DHP	- 7,8-diidropteroato
DHFR	- Diidrofolato redutase
DP	- Desvio padrão
ELISA	- Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
EM	- Espectrometria de Massas
eq.	- Equivalente
ESI	- Ionização por electrospray (<i>Electrospray ionization</i>)
F.F.	- Faixa de fusão
F.M.	- Fórmula molecular
G0	- <i>Gap 0</i> (intervalo celular 0)
G1	- <i>Gap 1</i> (intervalo celular 1)
G2	- <i>Gap 2</i> (intervalo celular 2)

5-HTID	- 5-hidroxitriptamina
Hz	- Hertz
IS	- Índice de Seletividade
IV	- Infravermelho
J	- Constante de acoplamento escalar
Lit.	- Literatura
LIT	- <i>Liver Infusion Triptose</i>
m	- Multipleteo
M	- Mitose
m/z	- Razão massa/carga
MHz	- MegaHertz
M.M.	- Massa molar
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
μM	- Micromolar
nm	- Nanômetro
nM	- Nanomolar
PABA	- Ácido <i>para</i> -aminobenzoico
pág.	- Página
PBSA	- Tampão salina fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
RNA	- Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNase	- Ribonuclease
rpm	- Rotações por minuto
RPMI	- <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEAr	- Substituição Eletrofílica Aromática
S	- Fase celular de síntese de DNA
s	- Simpleto
sl	- Simpleto largo
sex	- Sexteto
SFB	- Soro fetal bovino
t	- Tripleto
t.a.	- Temperatura ambiente
THF	- Ácido tetraidrofólico

UFC	- Unidades formadoras de colônia
v/v	- Volume por volume
δ	- Deslocamento químico (ppm)
$\bar{\nu}$	- Número de onda (cm^{-1})
ν	- Estiramento ou deformação axial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	SULFONAMIDAS E SEUS DERIVADOS	22
1.2	EUGENOL	31
1.3	HIBRIDAÇÃO MOLECULAR	34
2	OBJETIVOS	36
3	PARTE EXPERIMENTAL	38
3.1	QUÍMICA.....	38
3.1.1	Procedimentos gerais	38
3.1.2	Métodos de síntese	38
3.1.2.1	Obtenção do 4-alil-2-metoxi-6-nitrofenol (3a) e do 2-metoxi-6-nitro-4-propilfenol (3b).....	40
3.1.2.1.1	<i>Dados de caracterização de 4-alil-2-metoxi-6-nitrofenol (3a)</i>	41
3.1.2.1.2	<i>Dados de caracterização de 2-metoxi-6-nitro-4-propilfenol (3b)</i>	41
3.1.2.2	Obtenção do 4-alil-2-metoxi-5-nitrofenol (3c) e do 2-metoxi-5-nitro-4-propilfenol (3d).....	42
3.1.2.2.1	<i>Dados de caracterização de 4-alil-2-metoxi-5-nitrofenol (3c)</i>	43
3.1.2.2.2	<i>Dados de caracterização de 2-metoxi-5-nitro-4-propilfenol (3d)</i>	43
3.1.2.3	Método geral de obtenção dos intermediários amínicos 4a , 4b , 4c e 4d	44
3.1.2.3.1	<i>Dados de caracterização de 4-alil-2-amino-6-metoxifenol (4a)</i>	45
3.1.2.3.2	<i>Dados de caracterização de 2-amino-6-metoxi-4-propilfenol (4b)</i>	45
3.1.2.3.3	<i>Dados de caracterização de 4-alil-5-amino-2-metoxifenol (4c)</i>	46
3.1.2.3.4	<i>Dados de caracterização de 5-amino-2-metoxi-4-propilfenol (4d)</i>	46
3.1.2.4	Obtenção dos derivados sulfonamídicos acetilados 6a , 6b , 6c e 6d	47
3.1.2.4.1	<i>Dados de caracterização de N-(4-(N-(5-alil-2-hidroxi-3-metoxifenil)sulfamoil)fenil)acetamida (6a)</i>	49
3.1.2.4.2	<i>Dados de caracterização de N-(4-(N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)sulfamoil)fenil)acetamida (6b)</i>	49
3.1.2.4.3	<i>Dados de caracterização de N-(4-(N-(2-alil-5-hidroxi-4-metoxifenil)sulfamoil)fenil)acetamida (6c)</i>	49
3.1.2.4.4	<i>Dados de caracterização de N-(4-(N-(5-hidroxi-4-metoxi-2-propilfenil)sulfamoil)fenil)acetamida (6d)</i>	50
3.1.2.5	Obtenção dos derivados sulfonamídicos desacetilados 7a , 7b , 7c e 7d	51

3.1.2.5.1	Dados de caracterização de <i>N</i> -(5-alil-2-hidroxi-3-metoxifenil)-4-aminobenzenossulfonamida (7a)	52
3.1.2.5.2	Dados de caracterização de 4-amino- <i>N</i> -(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)benzenossulfonamida (7b)	52
3.1.2.5.3	Dados de caracterização de <i>N</i> -(2-alil-5-hidroxi-4-metoxifenil)-4-aminobenzenossulfonamida (7c).....	53
3.1.2.5.4	Dados de caracterização de 4-amino- <i>N</i> -(5-hidroxi-4-metoxi-2-propilfenil)benzenossulfonamida (7d)	54
3.3	AVALIAÇÕES DO POTENCIAL BIOLÓGICO <i>IN VITRO</i>	54
3.3.1	Método de avaliação do potencial antibacteriano	54
3.3.2	Método de avaliação do potencial antifúngico	55
3.3.3	Método de avaliação do potencial tripanocida	56
3.3.4	Método de avaliação da citotoxicidade frente à linhagem celular normal	57
3.3.5	Método de avaliação do potencial antiproliferativo	58
3.3.5.1	Linhagens celulares e condições de cultivo.....	58
3.3.5.2	Viabilidade Celular - Ensaio Colorimétrico (Resazurina)	58
3.3.5.3	Análise da progressão do ciclo celular por quantificação de DNA em citometria de fluxo	59
3.3.5.4	Avaliação da citotoxicidade frente à linhagem celular normal	59
3.3.5.5	Análise estatística.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	PLANEJAMENTO DOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS DO EUGENOL E DIIDROEUGENOL	61
4.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS DO EUGENOL E DIIDROEUGENOL.....	62
4.3	RESULTADOS DAS AVALIAÇÕES DO POTENCIAL BIOLÓGICO <i>IN VITRO</i>	74
4.3.1	Resultados das avaliações do potencial antibacteriano, antifúngico e tripanocida	74
4.3.2	Resultado da avaliação do potencial de citotoxicidade sobre linhagem celular normal	81
4.3.3	Resultado da avaliação do potencial antiproliferativo	85
5	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	91

APÊNDICE 101

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos fármacos atualmente em uso terapêutico ou tem sua origem nos produtos naturais ou foram planejados quimicamente a partir destes (BARREIRO, 2009; COSTA-LOTUFO et al., 2010). O território brasileiro é riquíssimo em substâncias bioativas, sendo de extrema importância a sua preservação pelo enorme potencial como fonte na descoberta de novos protótipos a fármacos (BARREIRO, 2009).

Como exemplo de substâncias bioativas presentes em plantas têm-se os óleos essenciais, amplamente estudados devido às inúmeras atividades biológicas que apresentam (BAKKALI et al., 2008). Neste contexto, alguns fenilpropanoides, como o eugenol, destacam-se pela excelente ação antimicrobiana (HEMAISWARYA; DOBLE, 2009) e antiparasitária (MACHADO et al., 2011). Da mesma forma, diversas substâncias que contêm o grupo funcional sulfonamida em sua estrutura foram citadas como bioativas, em vista de apresentarem efeitos biológicos importantes, como antibacteriano, antifúngico, antiparasitário e antitumoral (IBRAHIM et al., 2014).

Buscando a obtenção de novos produtos bioativos e em vista das ações biológicas relacionadas ao uso do eugenol e de sulfonamidas, empregou-se nesse trabalho a estratégia de hibridação molecular para o planejamento de substâncias inéditas que contemplassem resíduos estruturais do eugenol ou diidroeuugenol e uma subunidade sulfonamídica.

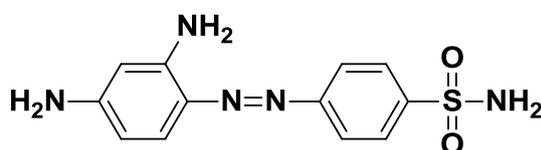
1.1 SULFONAMIDAS E SEUS DERIVADOS

Os antibacterianos sulfonamídicos foram os primeiros agentes antimicrobianos quimicamente sintetizados e que revelaram elevada eficácia, sendo utilizados no tratamento de infecções por bactérias, fungos e protozoários (IBRAHIM et al., 2014). Esta classe antibacteriana apresenta amplo espectro de ação, sendo ativa frente a uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (TOLIKA; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2010).

A atividade antibacteriana das sulfas foi relatada pela primeira vez por Domagk (1935) em seu trabalho intitulado como “Uma contribuição para a quimioterapia de infecções bacterianas”. A substância responsável pela atividade observada foi sintetizada por Mietzsch e Klarer, em 1932, com base na química de compostos contendo grupos azo (-N=N-) e tratava-se do derivado 4-((2,4-diaminofenil)diazenil)benzenossulfonamida (FIGURA 1), denominado comercialmente de *Prontosil rubrum*, devido a sua coloração avermelhada. Por meio de seus

estudos, Domagk percebeu que este derivado não apresentava atividade antibacteriana nos testes *in vitro* contra *Streptococcus hemolyticus*, patógeno relacionado a elevados casos de sepse na época. Entretanto, nas avaliações *in vivo*, *Prontosil rubrum* mostrou seletiva ação antibacteriana, resultando em aumento do tempo de sobrevivência dos animais infectados. Apesar dos excelentes resultados para a época, ainda era incerto o modo de ação de *Prontosil*. A contribuição da descoberta de Domagk fortaleceu as pesquisas com base na obtenção de novos derivados sulfonamídicos com atividade antimicrobiana, vindo o autor a receber, em 1939, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina (NOBEL LECTURE, 1947).

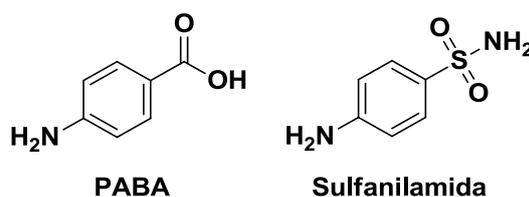
Figura 1 - Estrutura química de *Prontosil rubrum*, descoberto por Domagk em 1935.



Fonte: Adaptado de DOMAGK (1935).

O modo de ação das sulfas foi apresentado por Woods (1940) que sugeriu uma relação estritamente competitiva entre o ácido *para*-aminobenzoico (PABA) e a sulfanilamida nos ensaios *in vitro* realizados, devido à similaridade estrutural de ambos (FIGURA 2).

Figura 2 - Estruturas químicas do ácido *para*-aminobenzoico (PABA) e da sulfanilamida.

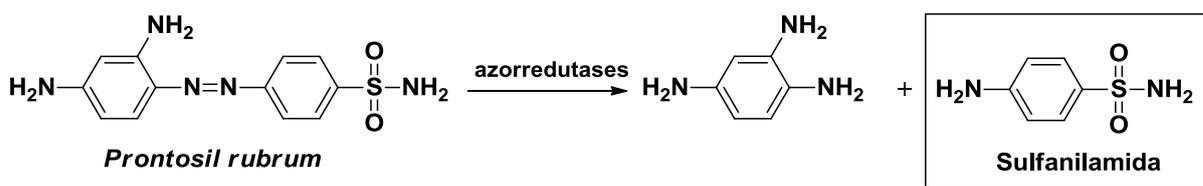


Fonte: Da autora.

Woods (1940) verificou que a sulfanilamida inibia o crescimento bacteriano e que esta inibição poderia ser revertida com a adição de extrato leveduriforme contendo PABA, um fator de crescimento para as colônias bacterianas. Este antagonismo competitivo também foi observado por Selbie (1940), relatando que o efeito terapêutico da sulfanilamida sobre os animais infectados era antagonizado após a administração de PABA. O trabalho de Tréfouël e

colaboradores (1935) foi de grande importância para o entendimento do que se sabe, atualmente, que o efeito antibacteriano não estava relacionado diretamente ao *Prontosil rubrum*, e sim ao metabólito decorrente da sua biotransformação. *Prontosil*, quando administrado *in vivo*, era bioativado pelas enzimas azorredutases, responsáveis pela redução do grupo azo ao grupo amino (NH₂), liberando a substância precursora da classe dos antibacterianos sulfonamídicos, a sulfanilamida (FIGURA 3) (STORK, 2005).

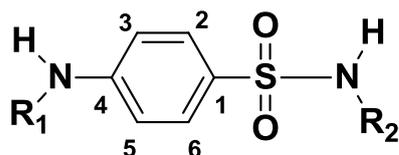
Figura 3 - Bioativação de *Prontosil rubrum* por ação das azorredutases à sulfanilamida, protótipo da classe dos antibacterianos sulfonamídicos.



Fonte: Da autora.

Após avaliar a relação estrutura-atividade de derivados sulfonamídicos, Seydel (1968) notou que o anel aromático com os substituintes amino e sulfonamida em orientação *para*, conforme ilustrado na Figura 4, são essenciais para a atividade biológica. Para aperfeiçoar as propriedades físico-químicas e farmacológicas, Tolika, Samanidou e Papadoyannis (2010) realizaram modificações estruturais e inserção de outros grupos funcionais, geralmente no grupo substituinte R₂, por conseguinte, os melhores substituintes foram anéis aromáticos ou heterocíclicos (SEYDEL, 1968). O grupo substituinte R₁ é preferencialmente não substituído, exceto se o mesmo for um grupo biorreversível, como no caso de amidas, iminas e azocompostos que serão convertidos *in vivo* ao grupo amino (SEYDEL, 1968).

Figura 4 - Estrutura química geral da classe das sulfas. Os substituintes relacionados com a atividade farmacológica são o grupo 4-amino e o grupo 1-sulfonamida monossustituído.

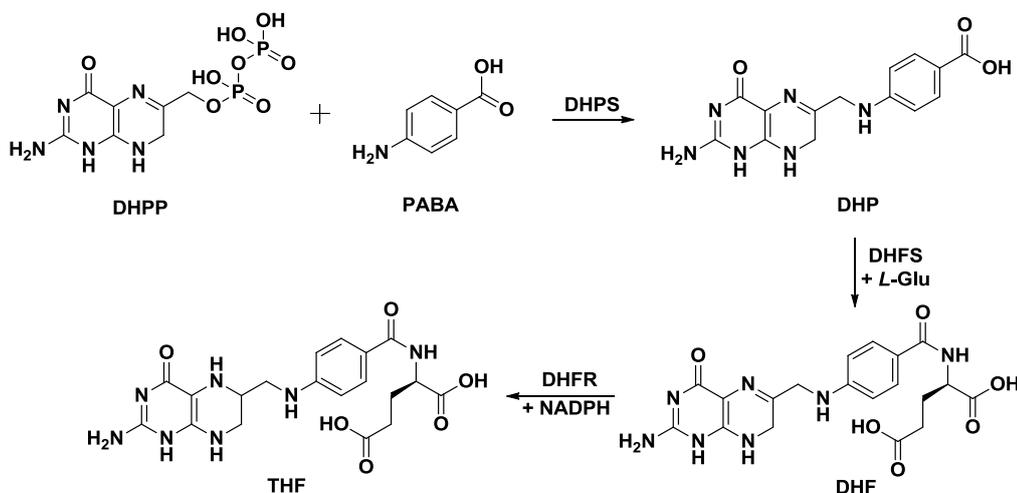


Fonte: Da autora.

As sulfas são antagonistas competitivos de PABA, substrato da enzima diidropteroato sintase (DHPS) (BROWN, 1962; WOODS, 1940). Segundo Richey e Brown (1969), a enzima

DHPS é responsável por catalisar a condensação de PABA com 7,8-diidropteridinapirófosfato (DHPP), formando 7,8-diidropteroato (DHP), passo fundamental para a biossíntese do ácido tetraidrofólico (THF) e ácido fólico pela bactéria e, conseqüentemente, para a síntese dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), conforme ilustrado na Figura 5 (CAPASSO; SUPURAN, 2014).

Figura 5 - Biossíntese do ácido fólico bacteriano. O THF atua fornecendo uma unidade carbônica para a síntese das bases purínicas do DNA e RNA bacteriano.



Fonte: Adaptado de CAPASSO; SUPURAN, 2014.

Notas: DHFS: diidrofolato sintase; L-Glu: glutamato; DHF: diidrofolato; DHFR: diidrofolato redutase.

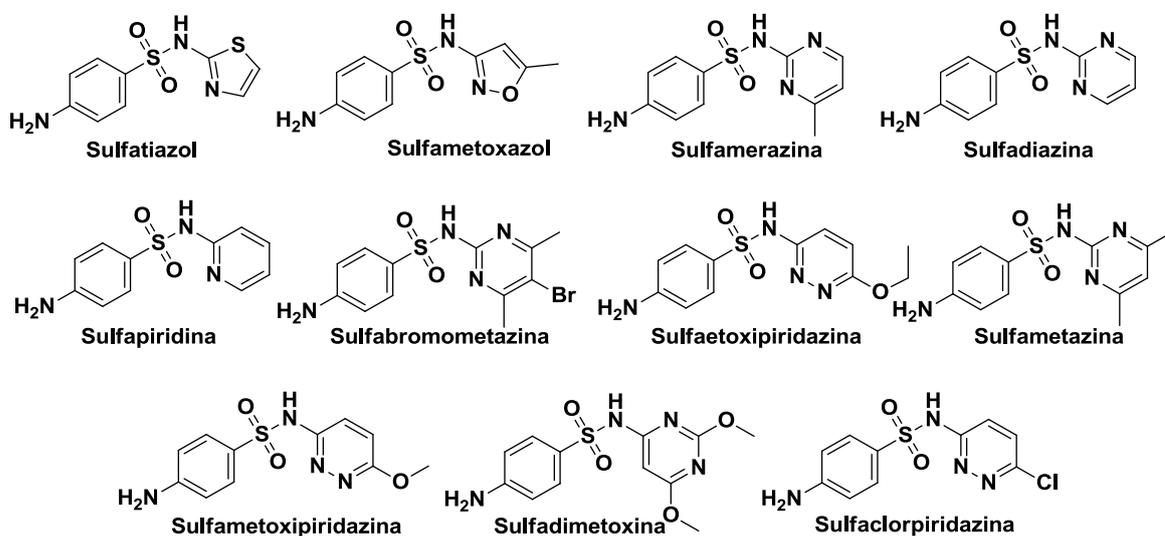
A via biossintética do ácido fólico está presente em bactérias, plantas e organismos eucariontes unicelulares, estando ausente em mamíferos, os quais adquirem o ácido fólico ou vitamina B9, por meio da alimentação (KORNFELD; NICHOLS, 2005). Desta forma, os antibacterianos sulfonamídicos são melhor classificados como “antimetabólitos”, pois impedem a biossíntese de componentes essenciais para o desenvolvimento do micro-organismo (CAPASSO; SUPURAN, 2014). Na ausência do ácido fólico, as bactérias são incapazes de sofrerem divisão celular, portanto, as sulfas exibem um perfil bacteriostático ao invés de bactericida (BOUFAS et al., 2014; IBRAHIM et al., 2014).

As sulfas são, geralmente, combinadas com inibidores da enzima diidrofolato redutase (DHFR), como o fármaco trimetoprima. Esta combinação, muito usada clinicamente, auxilia no tratamento das infecções bacterianas mais comuns, como infecções do trato urinário, conjuntivite, infecções de ouvido, sinusite aguda, bronquite crônica, septicemia e meningite bacteriana, principalmente em pacientes com sensibilidade à penicilina (IBRAHIM et al.,

2014). Também auxilia na profilaxia e no tratamento da pneumonia provocada pelo micro-organismo *Pneumocystis carinii* em pacientes imunocomprometidos e transplantados (KORNFELD; NICHOLS, 2005; TOLIKA; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2010).

As sulfas utilizadas convencionalmente em infecções sistêmicas são sulfatiazol, sulfametoxazol, sulfamerazina, sulfadiazina, sulfapiridina, sulfabromometazina, sulfaetoxipiridazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfadimetoxina e sulfaclopiridazina (TOLIKA; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2010). As estruturas químicas dessas sulfas estão ilustradas na Figura 6.

Figura 6 - Estrutura química das principais sulfas utilizadas clinicamente.



Fonte: Da autora.

Ao longo dos anos, a classe dos antibacterianos sulfonamídicos foi sendo substituída por outros antimicrobianos, contudo, com o surgimento da resistência bacteriana as sulfas foram novamente incluídas no mercado e, graças à fácil obtenção e ao baixo custo, houve um intenso crescimento no desenvolvimento de novos derivados sulfonamídicos (BORGES et al., 2005).

Os derivados sulfonamídicos podem ser sintetizados de diversas maneiras, sendo o método mais convencional a reação de amônia ou aminas, primárias ou secundárias, com cloreto de benzenossulfonila (SOLTANI RAD et al., 2009). O uso de suportes sólidos como catalisadores nas reações convencionais também foi relatado na literatura, proporcionando menores tempos reacionais e melhores rendimentos (CAMARGO-ORDEÑEZ et al., 2011). As sulfonamidas também podem ser obtidas a partir da oxidação de derivados tiólicos com hipoclorito de sódio (WRIGHT; HALLSTROM, 2006), peróxido de hidrogênio e cloreto de

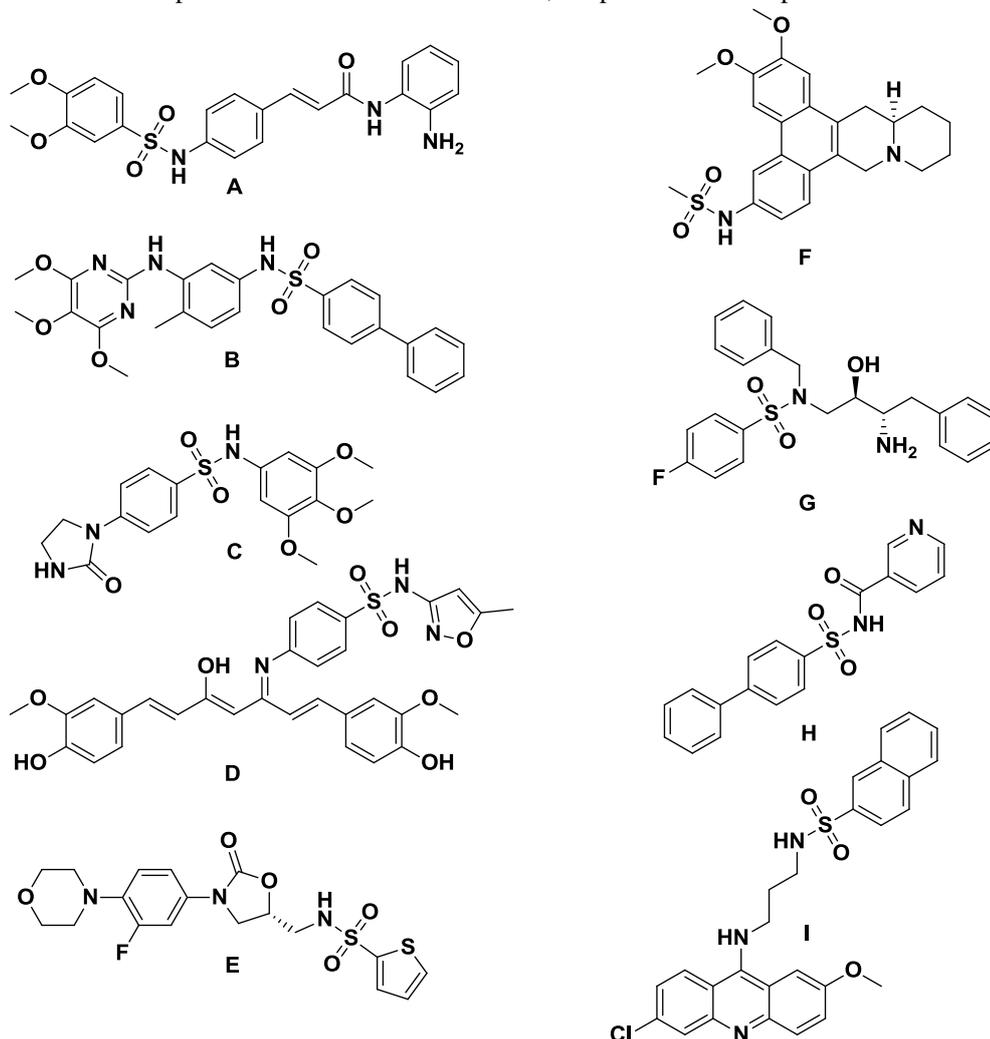
tionila (BAHRAMI; KODAEI; SOHEILIZAD, 2009) ou na presença de ácido triclorocianúrico e cloreto de benziltrimetilamônio em meio aquoso (BONK; AMOS; OLSON, 2007), gerando *in situ* os respectivos cloretos de benzenossulfonila que reagirão, posteriormente, com os derivados amínicos, obtendo-se as aril-sulfonamidas de interesse.

Outra metodologia envolve a reação de ácido sulfônico ou seu sal sódico e cloreto cianúrico, com diferentes derivados amínicos sob irradiação de micro-ondas (DE LUCA; GIACOMELLI, 2008) ou a temperatura ambiente, em apenas uma etapa reacional (SOLTANI RAD et al., 2009). Nestes últimos trabalhos, as metodologias não se limitaram apenas a aminas primárias ou secundárias, sendo empregado também hidrazinas e derivados de aminoácidos. A obtenção de sulfonamidas a partir de ésteres sulfonatos, substituindo o uso do cloreto de benzenossulfonila, é descrita como uma maneira eficaz para a redução da toxicidade e da reatividade quando comparados ao uso do cloreto (WILDEN et al., 2007).

Derivados sulfonamídicos têm sido estudados, através de diferentes abordagens sintéticas, devido às potenciais atividades biológicas apresentadas por essas substâncias. Entre as atividades terapêuticas atribuídas ao grupo sulfonamida estão as atividades antibacteriana (BOUFAS et al., 2014; KAMAL et al., 2013; WANG; WAN; ZHOU, 2010), antifúngica (MASTROLORENZO; SCOZZAFAVA; SUPURAN, 2000; WANG; WAN; ZHOU, 2010), antitumoral (FACCHINETTI et al., 2014; KWON et al., 2015), anti-inflamatória, analgésica (CHEN; RAO; KNAUS, 2005), antiangiogênica (FUNAHASHI et al., 2002), antiglaucoma (AGRAWAL et al., 2004), antiviral (SUPURAN et al., 2004), antimalárica (DOMÍNGUEZ et al., 2005), diurética (NEFF; NAWARSKAS, 2010), hipoglicemiante (BOYD, 1988), anti-hipertensiva (KANDA et al., 2001), anticonvulsivante (PARKER et al., 2009), antiprotozoária (CHIBALE et al., 2001), anti-*Trypanosoma cruzi* (BOCANEGRA-GARCIA et al., 2012), como inibidores da anidrase carbônica (GITTO et al., 2010) e da glicogênio fosforilase (TITE et al., 2012), agonistas do receptor serotoninérgico 5-HT_{1D} (CASTRO et al., 1994), inibidores da colesterol aciltransferase (TAKAHASHI et al., 2010), da metaloproteinase de matriz (CHENG et al., 2008), da cicloxigenase (CHEN; RAO; KNAUS, 2005) e da protease do HIV (STRANIX et al., 2006).

Tendo como foco o potencial antimicrobiano, antiproliferativo e tripanocida do grupo sulfonamida, diversos pesquisadores relataram seus achados na literatura e as estruturas gerais de alguns dos produtos potencialmente ativos sintetizados por eles estão representadas na Figura 7.

Figura 7 - Estruturas químicas de alguns derivados sulfonamídicos descritos na literatura com potencial atividade antimicrobiana, antiproliferativa e tripanocida.



Fonte: Da autora.

Notas: **A:** adaptado de BOUCHAIN et al., 2003; **B:** adaptado de KAMAL et al., 2011; **C:** adaptado de FORTIN et al., 2011; **D:** adaptado de LAL et al., 2013; **E:** adaptado de KAMAL et al., 2013; **F:** adaptado de KWON et al., 2015; **G:** adaptado de FACCHINETTI et al., 2014; **H:** adaptado de BOCANEGRA-GARCIA et al., 2012; **I:** adaptado de CHIBALE et al., 2001.

A atividade antiproliferativa de derivados sulfonamídicos foi descrita por Bouchain e colaboradores (2003) (FIGURA 7, estrutura A) e apresentam atividade inibitória contra as histonas desacetilases, enzimas envolvidas nos processos de condensação da cromatina e na transcrição de importantes genes responsáveis pela diferenciação e progressão do ciclo celular. Os autores verificaram que a subunidade sulfonamídica é essencial, pois quando substituída acarreta redução da atividade e que a presença de grupos doadores de elétrons no anel aromático ligado ao grupo sulfonamida, principalmente o grupo metoxila, contribui, significativamente, para a atividade observada.

Ao avaliar alguns derivados sulfonamídicos contendo um anel pirimidínico, Kamal e colaboradores (2011) também observaram que a presença do grupo sulfonamida, substituindo

o grupo amino, e que a metoxila contribuem para a ação citotóxica, sendo o derivado trimetoxilado (FIGURA 7, estrutura B), segundo os autores, um candidato promissor na terapia do câncer, com valores de CI_{50} menores que 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ para todas as linhagens celulares analisadas (MCF7 e MDA-MB-231: adenocarcinoma de mama humano e K562: leucemia mieloide crônica). No mesmo ano, Fortin e colaboradores relataram a ação antimetabólica de derivados oxoimidazolidínicos contendo o grupo sulfonamida (FIGURA 7, estrutura C), ao invés do grupo sulfonato, como capazes de promover a parada do ciclo celular na fase G2/M e a desorganização do citoesqueleto. O derivado sulfonamídico representado (FIGURA 7, estrutura C) apresentou excelente atividade antiproliferativa com CI_{50} na faixa de 13 a 21 nM/mL contra três linhagens celulares malignas (MCF7, HT-29: carcinoma de cólon humano e M21: melanoma humano).

Lal e colaboradores (2013) sintetizaram uma série de derivados curcuminóides contendo uma subunidade sulfonamídica. Os testes antibacterianos e citotóxicos indicaram que as moléculas de curcumina que apresentam o grupo carbonila ligado ao grupo sulfonamida, especificamente ao sulfametoxazol (FIGURA 7, estrutura D), obtiveram atividade biológica superior ao da própria curcumina. Este derivado inibiu o crescimento de cepas bacterianas, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 20 $\mu\text{M}/\text{mL}$, e mostrou-se citotóxico com CI_{50} entre 25 e 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$ contra as linhagens HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), QG-56 (carcinoma de pulmão humano) e HCT-116 (carcinoma de cólon humano).

Outro trabalho conduzido por Kamal e colaboradores (2013) avaliou a atividade antimicrobiana de derivados oxazolidinônicos contendo um grupo sulfonamida (FIGURA 7, estrutura E). Os resultados mostraram que a inserção de grupos retiradores de elétrons em orientação *para* ao grupo sulfonamida foram fundamentais para o aumento da ação antimicrobiana, que se mostrou eficaz contra cepas patogênicas Gram-positiva (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus MLS-16* e *S. aureus*) e Gram-negativa (*P. aeruginosa*), sendo também eficiente contra o fungo oportunista *Candida albicans*. Ambos os ensaios apresentaram valores de CIM equivalentes aos fármacos usados como referência, fluconazol e linezolida.

Kwon e colaboradores (2015) investigaram as propriedades farmacocinéticas e a atividade antiproliferativa de análogos sulfonamídicos da antofina e criptopleurina, substâncias naturais da classe dos alcaloides. Os autores concluíram a partir dos resultados obtidos que o análogo metanossulfonamida de criptopleurina (FIGURA 7, estrutura F)

mostrou-se muito mais ativo que seu precursor com CI_{50} menor que 0,8 nM/mL sobre todas as linhagens celulares malignas avaliadas (A549: carcinoma de pulmão humano, HCT-116, SNU-638: carcinoma de estômago humano, MDA-MB-231, SK-Hep-1: hepatocarcinoma humano, PC-3: carcinoma de próstata humano, Caki-1: carcinoma renal humano), inibindo a proliferação celular por uma via diferente daquela encontrada para os antineoplásicos atualmente comercializados. Este análogo também exibiu excelentes propriedades farmacocinéticas, apresentado boa biodisponibilidade por via oral.

A partir da avaliação da citotoxicidade de derivados aril-sulfonamídicos (FIGURA 7, estrutura G), Facchinetti e colaboradores (2014) enfatizaram a importância da presença deste potencial grupo, relacionando-o com a interessante ação biológica encontrada. A substituição do grupo sulfonamida acarretou diminuição da atividade e a inserção de grupos retiradores de elétrons no anel aromático conectado a sulfonamida contribuiu para a atividade observada. Os valores de CI_{50} encontrados foram menores que 10 μ M/mL frente às linhagens derivadas de cânceres humanos de ovário (OVCAR-8), cólon (HCT-116), leucemia (HL-60), glioblastoma (SF-295) e para linfócitos normais (PBMC).

A respeito da atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, Bocanegra-Garcia e colaboradores (2012) planejaram uma série de derivados híbridos contendo a subunidade sulfonamídica e um núcleo quinolínico, e relataram em seu estudo a importância do grupo sulfonamida sobre a atividade tripanocida. O derivado representado (FIGURA 7, estrutura H) exibiu concentração letal (CL_{50}) superior aos fármacos referência benznidazol e nifurtimox, sobre duas diferentes cepas da forma tripomastigota do parasito (LC_{50} de 50,61 e 55,06 μ g/mL sobre NINOA e INC-5, respectivamente). Na avaliação antiprotozoária realizada por Chibale e colaboradores (2001), a série de análogos da quinacrina contendo a porção sulfonamídica (FIGURA 7, estrutura I) apresentou atividade superior em relação à molécula precursora contra a enzima tripanotiona redutase, exclusivamente presente nos parasitos do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania* spp., sendo um alvo eficaz contra a tripanossomíase e leishmaniose (KHAN, 2007).

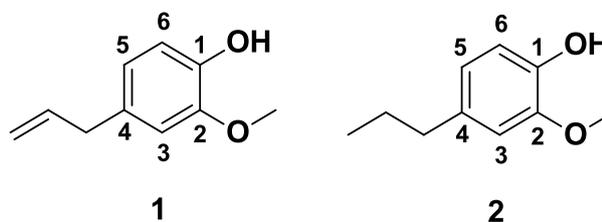
Frente ao exposto, percebe-se que a subunidade sulfonamídica é um importante grupo funcional utilizado no planejamento, na pesquisa e síntese de novos fármacos, especialmente pela diversidade de seu potencial terapêutico.

1.2 EUGENOL

As plantas são fontes ricas de substâncias bioativas que trazem benefícios à saúde sendo, tradicionalmente, utilizadas na prevenção de doenças crônicas. Os óleos essenciais presentes nas plantas, ao longo de anos, são utilizados como agentes antimicrobianos naturais, pelo fato de inibirem o desenvolvimento de um grande número de micro-organismos, causando mínimos efeitos colaterais (BASKARAN; PERIYASAMY; VENKATRAMAN, 2010).

O eugenol (**1**; 4-alil-2-metoxifenol; FIGURA 8) é o principal constituinte do óleo essencial da espécie *Eugenia caryophyllata*, popularmente conhecida como cravo-da-índia. Pertencente à classe dos fenilpropanóides, o eugenol apresenta-se como um líquido de coloração amarelada e altamente volátil, estando presente também nos óleos essenciais de canela, louro, manjerição e noz-moscada. Apresenta um aroma característico e um sabor picante, contudo o seu maior destaque é a excelente ação antifúngica e antibacteriana (PARODI et al., 2012; BASKARAN; PERIYASAMY; VENKATRAMAN, 2010).

Figura 8 - Estruturas químicas do eugenol (**1**; 4-alil-2-metoxifenol) e diidroeugenol (**2**; 2-metoxi-4-propilfenol).



Fonte: Adaptado de BAKKALI et al., 2008.

O eugenol foi isolado pela primeira vez em 1929 e sua produção comercial teve início em 1940 nos Estados Unidos (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012). Pode ser produzido sinteticamente, no entanto é predominantemente extraído a partir dos óleos essenciais das folhas, brotos e outras partes das árvores de cravo (família Myrtaceae) por hidrodestilação, destilação por arraste a vapor ou extração etanólica por Soxhlet (KAUFMAN, 2015) A utilização comercial do eugenol é variada, sendo empregado em produtos inseticidas, na conservação de alimentos, na área cosmética e odontológica e na produção de vanilina (NAM; KIM, 2013; RENAULT et al., 2011).

A característica hidrofóbica do eugenol permite a sua incorporação à membrana citoplasmática do micro-organismo, alterando a permeabilidade da membrana e resultando em rompimento, extravasamento de conteúdo intracelular e, conseqüentemente, morte celular (DEVI et al., 2010; GILL; HOLLEY, 2006). Outro provável mecanismo de ação antimicrobiano do eugenol relaciona-se com a supressão, pela hidroxila fenólica, de enzimas localizadas na superfície da membrana que são responsáveis por catalisar a síntese de polissacarídeos essenciais à estrutura microbiana (LI et al., 2015).

O eugenol pode interferir em várias vias de sinalização celular, especificamente com o fator nuclear kappa B (NF-κB) que é ativado por radicais livres. Esta ativação resulta na expressão de genes que suprimem os processos apoptóticos e induzem os processos celulares, como modificação celular, proliferação, invasão tecidual e metástase (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006).

Inúmeras atividades biológicas do eugenol foram relatadas, incluindo atividade antibacteriana (DAS et al., 2016; DEVI et al., 2010; DI PASQUA et al., 2006; HEMAISWARYA; DOBLE, 2009; XU et al., 2016), antifúngica (AHMAD et al., 2010a; AHMAD et al., 2010b; AHMAD et al., 2010c), antiparasitária (MACHADO et al., 2011; UEDA-NAKAMURA et al., 2011), anti-inflamatória, antinociceptiva (DANIEL et al., 2009), anti-hiperglicemiante (JEONG et al., 2014), antiviral (BENENCIA; COURRGES, 2000), antioxidante (GÜLÇİN, 2011), antitumoral (ATSUMI; FUJISAWA; TONOSAKI, 2005; JÚNIOR et al., 2016; NAM; KIM, 2013; SLAMENOVÁ et al., 2009), anestésica (RENAULT et al., 2011), neuroprotetora, como inibidor da enzima monoaminoxidase (KABUTO; TADA; KOHNO, 2007) e larvicida, sendo uma alternativa interessante no combate ao mosquito transmissor da dengue (BARBOSA et al., 2012).

A ação antibacteriana do eugenol foi descrita contra várias espécies patogênicas, como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sakei* e *Helicobacter pylori* (HEMAISWARYA; DOBLE, 2009). O eugenol também se mostrou altamente ativo contra espécies de *Candida*, sendo um agente promissor na profilaxia e tratamento da candidíase vaginal (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014).

Um estudo conduzido por Yoo e colaboradores (2005) confirmou a importância da hidroxila fenólica na ação citotóxica do eugenol, pois o metil-eugenol mostrou-se muito menos ativo. Os autores também concluíram que o eugenol induz a morte celular por apoptose, através da geração de radicais livres sobre a linhagem celular maligna HL-60 (leucemia pro-mielocítica humana).

Slameňová e colaboradores (2009) relataram os efeitos antioxidantes, citotóxicos e genotóxicos do eugenol e borneol quanto à capacidade de modulação dos efeitos prejudiciais do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sobre o DNA de diferentes linhagens celulares derivadas de cânceres humanos malignos (HepG2: carcinoma hepatocelular humano e Caco-2: adenocarcinoma de cólon humano) e não malignos (VH10: fibroblastos humanos). O eugenol apresentou excelente ação antioxidante em todas as concentrações testadas e a citotoxicidade do mesmo foi mais elevada que a do borneol. Com relação à genotoxicidade, eugenol mostrou-se ativo sobre VH10, com atividade moderada sobre Caco-2 e inativo sobre HepG2.

Um estudo de sinergismo sobre a interação do potencial antibacteriano do eugenol com diferentes antibióticos hidrofóbicos e hidrofílicos foi realizado por Hemaiswarya e Doble (2009). Este estudo revelou que a ação antibacteriana do eugenol, principalmente em romper a membrana citoplasmática, foi capaz de aumentar a atividade dos antibióticos testados. Segundo os autores, pesquisas como esta auxiliam na descoberta de novas estratégias de tratamento que diminuam a quantidade de antibióticos prescritos. Deste modo, reduz-se a toxicidade e os efeitos colaterais e, conseqüentemente, a resistência microbiana por parte da utilização inadequada destes fármacos.

Outro estudo de sinergismo foi conduzido por Ahmad e colaboradores (2010) e avaliou a interação do eugenol e metileugenol com o fármaco referência fluconazol frente cepas patogênicas e oportunistas de *Candida* spp. Observou-se, com este estudo, uma maior potencialização da atividade antifúngica e redução da dose efetiva quando fluconazol encontra-se em associação com estes fenilpropanoides.

Carrasco e colaboradores (2012) avaliaram a influência dos substituintes sobre a atividade antifúngica de uma série de derivados do eugenol contra espécies fúngicas patogênicas. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que a presença da cadeia alílica é de extrema importância para a ação antifúngica, pois a sua modificação causa redução e, em alguns casos, perda total da atividade. Assim como, a substituição da metoxila leva a um decréscimo da ação. Ao contrário, constataram que a hidroxila fenólica não é essencial para a atividade. Avaliaram ainda, a influência da presença de grupos nitro em diferentes posições, concluindo que quando esse grupo é inserido *orto* à hidroxila fenólica, percebe-se maior atividade antifúngica que quando outras posições livres são substituídas. Por fim, observaram que a di-nitração do anel leva a uma diminuição na atividade antifúngica.

Junior e colaboradores (2016) relataram em seu trabalho os efeitos pró-apoptóticos do eugenol sobre linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231 e MCF7). Notou-se que o eugenol induz bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, associado à

produção de espécies reativas de oxigênio, toxicidade mitocondrial e, conseqüentemente, apoptose.

Como observado, vários trabalhos confirmam as propriedades terapêuticas do eugenol, sendo assim, essa substância pode ser utilizada como ponto de partida na síntese de novos candidatos a protótipos de fármacos com potencial ação biológica.

1.3 HIBRIDAÇÃO MOLECULAR

A hibridação molecular, recente estratégia da Química Medicinal, surge atualmente como uma importante técnica de planejamento racional de futuros fármacos, visto que há um crescente aumento de novas patologias e de micro-organismos resistentes aos fármacos existentes no mercado (LAZAR et al., 2004).

Esta técnica consiste na união de subunidades farmacofóricas, tanto de substâncias naturais quanto sintéticas, a fim de obter um derivado híbrido que conserve características pré-selecionadas das substâncias que o originaram. Por conseguinte, espera-se que a nova molécula apresente melhorias na ação farmacológica, reduzidos efeitos colaterais e menor toxicidade, além de um preço mais acessível (BARBOSA et al., 2011; VIEGAS-JUNIOR et al., 2007; YEMPALA et al., 2012).

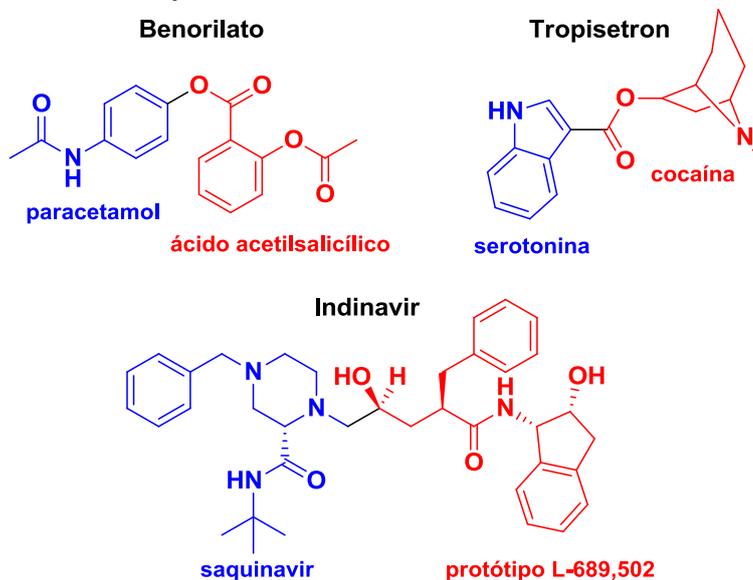
Durante o planejamento de substâncias híbridas, alguns aspectos importantes devem ser levados em consideração, como os mecanismos de ação das subunidades farmacofóricas de interesse, o tipo de ligação química existente entre estas subunidades e, quando conhecida, a geometria molecular adquirida no alvo de ação (WALSH; BELL, 2009).

Quanto à atividade farmacológica, as moléculas precursoras podem apresentar a mesma ação biológica, porém com atuação em alvos distintos, fornecendo um híbrido com ação sinérgica; também podem exibir atividades diferentes, resultando em uma molécula com dupla ação sobre determina fisiopatologia; pode-se ainda unir moléculas onde uma delas apresenta atividade biológica e a outra atua sobre determinado efeito adverso causado pela primeira, obtendo-se um híbrido chamado de modulador (ARAÚJO, 2015).

Como exemplos de substâncias bioativas obtidas por meio da estratégia de hibridação molecular, podem-se citar os fármacos benorilato, com ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética, planejado a partir da união entre o paracetamol e o ácido acetilsalicílico (ARAÚJO et al., 2015); tropisetron (Navoban[®]), com ação antiemética, desenhado a partir das estruturas da cocaína e serotonina e o indinavir (Crixivan[®]), usado no tratamento da AIDS, obtido através das sobreposições das estruturas do saquinavir e do protótipo da Merck (L-

689,502) (BARREIRO; FRAGA, 2008). As estruturas químicas relacionadas com estes fármacos estão representadas na Figura 9.

Figura 9 - Exemplos de fármacos planejados a partir da técnica de hibridação molecular.



Fonte: Benorilate: adaptado de ARAÚJO et al., 2015; Tropisetron e Indinavir: adaptado de BARREIRO; FRAGA, 2008.

Vários estudos recentes também abordaram a síntese e avaliação da atividade antimicrobiana (ADDLA et al., 2012; KALARIA et al., 2014; RANE; TELVEKAR, 2010), antiproliferativa (CHAUDHARY et al., 2015; CHEN et al., 2015; KARTHIKEYAN et al., 2013) e tripanocida (BOCANEGRA-GARCIA et al., 2012; PORCAL et al., 2008) de substâncias híbridas obtidas pela união de diferentes subunidades biologicamente ativas. Em todos eles, pelo menos parte das substâncias sintetizadas apresentou atividade superior quando comparados aos seus precursores.

Sendo assim, essa estratégia pode ser usada para obtenção de moléculas híbridas de eugenol e diidroeuugenol com outras substâncias que apresentem propriedades biológicas semelhantes a eles, como os derivados sulfonamídicos, objetivando-se obter produtos com ação mais potencializada que as substâncias de partida.

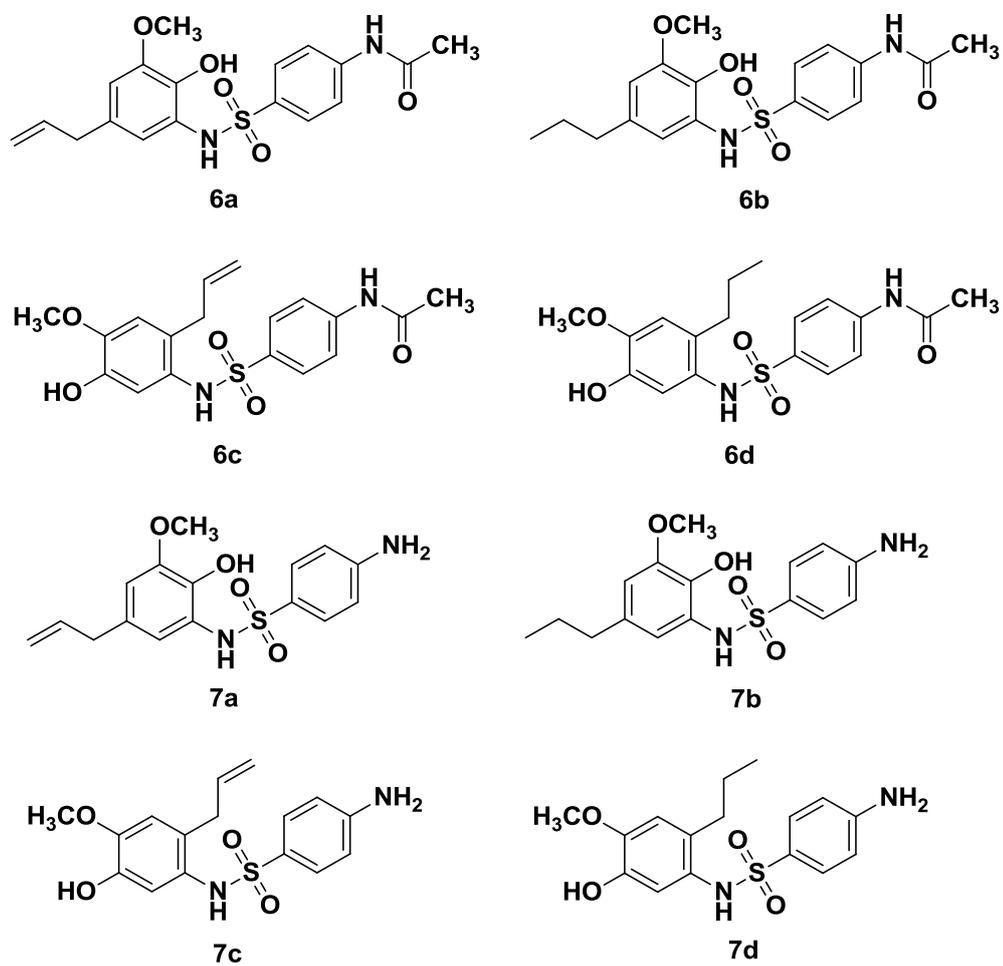
2 OBJETIVOS

Face ao exposto, tem-se por objetivo com esse trabalho a obtenção de derivados híbridos que contemplem uma subunidade sulfonamídica e uma relacionada ao eugenol ou diidroeuogenol, que apresentem potencial ação antimicrobiana, antiproliferativa e tripanocida.

Mais especificamente objetiva-se:

- a) Sintetizar as substâncias inéditas derivadas do eugenol e diidroeuogenol (FIGURA 10), por meio da estratégia de hibridação molecular;
- b) Caracterizar as substâncias obtidas por determinação de suas faixas de fusão e pelos métodos convencionais de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), de ressonância magnética nuclear (RMN) e de massas (EM);
- c) Avaliar a atividade antibacteriana dos derivados finais frente a bactérias Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*);
- d) Avaliar a atividade antifúngica dos derivados finais frente a espécies patogênicas ou oportunistas de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*);
- e) Avaliar a atividade antiproliferativa dos derivados finais frente às linhagens derivadas de cânceres humanos (carcinoma hepatocelular – HepG2, adenocarcinoma de mama – MCF7, melanoma – HT144 e adenocarcinoma de pulmão – A549);
- f) Avaliar a atividade tripanocida dos derivados finais frente à forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*;
- g) Avaliar a atividade citotóxica dos produtos finais e seus precursores frente às linhagens celulares normais (fibroblasto de pele humana – CCD-1059Sk e fibroblasto renal de hamster – BHK-21);
- h) Estabelecer relações preliminares e qualitativas entre a estrutura química dos derivados e a atividade biológica observada.

Figura 10 - Estruturas químicas dos derivados sulfonamídicos híbridos do eugenol (**6a**, **6c**, **7a** e **7c**) e diidroeugenol (**6b**, **6d**, **7b** e **7d**) propostos.



Fonte: Da autora.

3 PARTE EXPERIMENTAL

As etapas de síntese e caracterização dos derivados sulfonamídicos híbridos do eugenol e diidroeugenol propostos são descritos a seguir.

3.1 QUÍMICA

As oito substâncias finais propostas foram sintetizadas no Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da UNIFAL-MG. Estas substâncias tiveram suas identidades confirmadas por meio de espectroscopia no infravermelho, de ressonância magnética nuclear e de massas.

3.1.1 Procedimentos gerais

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

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

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

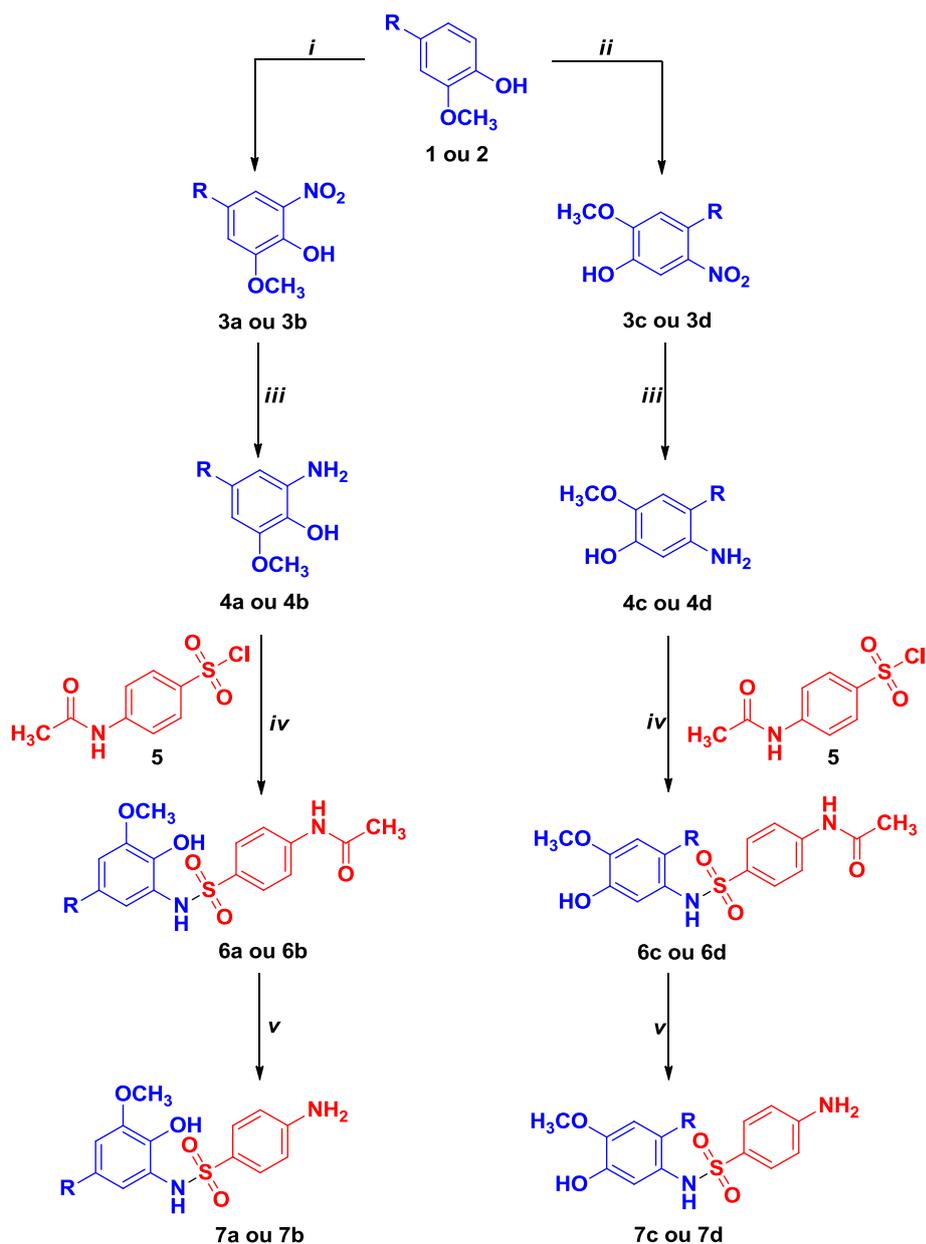
As análises de espectroscopia de massas (EM) foram realizadas na Universidade Federal de Santa Catarina, obtidas em espectrômetro Waters Xevo G2-S QTOF, Massachusetts, EUA.

3.1.2 Métodos de síntese

As etapas sintéticas foram executadas segundo técnicas clássicas de química orgânica ou por adaptação das mesmas. A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel em suporte de alumínio com

detector de fluorescência (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien ALUGRAM[®] Xtra Sil G/UV₂₅₄). As purificações por cromatografia em coluna de sílica (CCS) foram realizadas com sílica gel 60, 70-230 mesh (Sorblin). Os eluentes empregados estão descritos em cada procedimento. Na Figura 11 está esquematizado o roteiro sintético seguido.

Figura 11 - Roteiro sintético seguido para obtenção dos derivados híbridos sulfonamídicos do eugenol (**6a**, **6c**, **7a** e **7c**) e diidroeugenol (**6b**, **6d**, **7b** e **7d**).



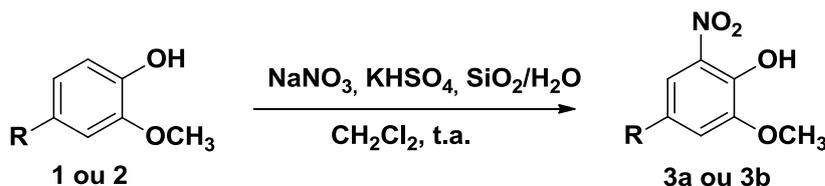
Fonte: Da autora.

Notas: **1**, **3a**, **3c**, **4a**, **4c**, **6a**, **6c**, **7a** e **7c**: R = CH₂=CH-CH₂-; **2**, **3b**, **3d**, **4b**, **4d**, **6b**, **6d**, **7b** e **7d**: R = CH₃-CH₂-CH₂-. *i*) NaNO₃, KHSO₄, SiO₂/H₂O, CH₂Cl₂, t.a.; *ii*) Bi(NO₃)₃.5H₂O, SiO₂, CHCl₃, refluxo; *iii*) SnCl₂.2H₂O, Etanol, refluxo; *iv*) Piridina, refluxo; *v*) SOCl₂, Metanol, t.a.

3.1.2.1 Obtenção do 4-alil-2-metoxi-6-nitrofenol (**3a**) e do 2-metoxi-6-nitro-4-propilfenol (**3b**)

O procedimento realizado para a reação de nitração do eugenol (**1**) e do diidroeuugenol (**2**) (ZOLFIGOL; GHAEMI; MADRAKIAN, 2001) está ilustrado na Figura 12.

Figura 12 - Reação de nitração do eugenol (**1**) e do diidroeuugenol (**2**).



Fonte: Da autora.

Notas: **3a**: R = CH₂=CH-CH₂-; **3b**: R = CH₃-CH₂-CH₂-.

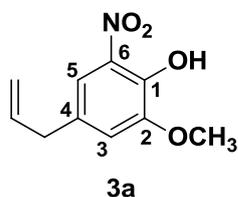
Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 50 mL de diclorometano, foram adicionados eugenol (**1**) ou diidroeuugenol (**2**) comerciais (marca SIGMA-ALDRICH®) e quantidades equimolares de nitrato de sódio e bissulfato de potássio, além de sílica gel (3,3 eq.) previamente hidratada com água destilada (TABELA 1). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética vigorosa, à temperatura ambiente (25 ± 3°C), por cerca de 48 horas. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente clorofórmio e metanol (9,5/0,5, v/v). Após o término, a mistura reacional foi filtrada por gravidade em papel de filtro e o filtrado foi seco com sulfato de sódio anidro. Em seguida, o sal foi separado por filtração simples e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por múltiplas extrações com hexano.

Tabela 1 - Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de nitração.

Material de partida	NaNO ₃	KHSO ₄	SiO ₂ /H ₂ O
1 (5 mL; 32,53 mmol)	2,76 g (32,53 mmol)	4,43 g (32,53 mmol)	6,5 g/ 6,5 mL
2 (5 mL; 31,26 mmol)	2,65 g (31,26 mmol)	4,26 g (31,26 mmol)	6,2 g/ 6,2 mL

Fonte: Da autora.

3.1.2.1.1 Dados de caracterização de 4-alil-2-metoxi-6-nitrofenol (**3a**)



4-alil-2-metoxi-6-nitrofenol

Óleo amarelo

Massa obtida: 2,38 g (11,38 mmol, 35%)

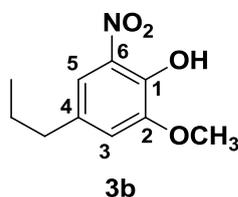
F.M.: C₁₀H₁₁NO₄ **M.M.:** 209,1986 g.mol⁻¹

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3520 (O-H), 3000 (C-H sp²), 1515, 1440 (NO₂), 1270 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 10,63 (s; 1H; O-H), 7,48 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H5), 6,95 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H3), 5,95-5,83 (m; 1H; CH₂=CH-CH₂), 5,14-5,07 (m; 2H; CH₂=CH-CH₂), 3,91 (s; 3H; OCH₃), 3,34 (d; 2H; *J* = 6,6 Hz; CH₂=CH-CH₂).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 149,8 (C6), 144,8 (C1), 135,9 (CH₂=CH-CH₂), 133,5 (C2), 131,2 (C4), 118,5 (C5), 117,1 (CH₂=CH-CH₂), 115,0 (C3), 56,6 (OCH₃), 39,3 (CH₂=CH-CH₂).

3.1.2.1.2 Dados de caracterização de 2-metoxi-6-nitro-4-propilfenol (**3b**)



2-metoxi-6-nitro-4-propilfenol

Óleo amarelo

Massa obtida: 4,42 g (20,93 mmol, 67%)

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

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3250 (O-H), 2960 (C-H sp³), 1541, 1448 (NO₂), 1260 (C-O-C).

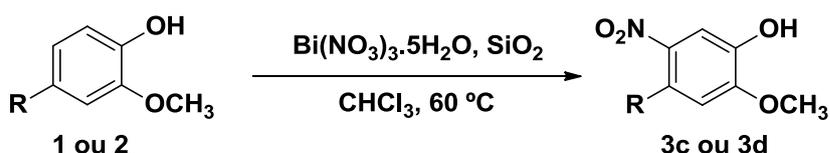
RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 10,62 (s; 1H; O-H), 7,49 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H5), 6,96 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H3), 3,93 (s; 3H; OCH₃), 2,56 (t; 2H; *J* = 7,2 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 1,70-1,57 (m; 2H; CH₃-CH₂-CH₂), 0,95 (t; 3H; *J* = 7,2 Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

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

3.1.2.2 Obtenção do 4-alil-2-metoxi-5-nitrofenol (**3c**) e do 2-metoxi-5-nitro-4-propilfenol (**3d**)

O procedimento geral realizado para a reação de nitração do eugenol (**1**) e do diidroeuugenol (**2**) (CANALES; BANDYOPADHYAY; BANIK, 2011), está ilustrado na Figura 13.

Figura 13 - Reação de nitração do eugenol (**1**) e do diidroeuugenol (**2**).



Fonte: Da autora.

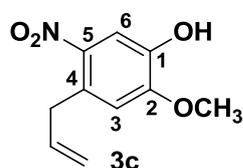
Notas: **3c**: R = CH₂=CH-CH₂-; **3d**: R = CH₃-CH₂-CH₂-.

Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 50 mL de clorofórmio, foram adicionados eugenol (**1**) ou diidroeuugenol (**2**) comerciais (marca SIGMA-ALDRICH[®]) e quantidade equimolar de nitrato de bismuto penta-hidratado, além de sílica gel (8 eq.) (TABELA 2). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética vigorosa, em refluxo, por 30 minutos. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente clorofórmio e metanol (9,5/0,5, v/v). Após o término, a mistura reacional foi filtrada por gravidade em papel de filtro e o filtrado foi seco com sulfato de sódio anidro. Em seguida, o sal foi separado por filtração simples e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por múltiplas extrações com hexano.

Tabela 2 - Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de nitração.

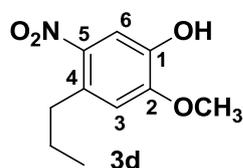
Material de partida	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O	SiO ₂
1 (5 mL; 32,53 mmol)	15,78 g (32,53 mmol)	15,63 g (260,24 mmol)
2 (5 mL; 31,26 mmol)	15,16 g (31,26 mmol)	15,02 g (250,08 mmol)

Fonte: Da autora.

3.1.2.2.1 Dados de caracterização de 4-alil-2-metoxi-5-nitrofenol (**3c**)

4-alil-2-metoxi-5-nitrofenol

Óleo amarelo escuro

Massa obtida: 2,92 g (13,96 mmol, 43%)**F.M.:** C₁₀H₁₁NO₄ **M.M.:** 209,1986 g.mol⁻¹**IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹):** 3231 (O-H), 3000 (C-H sp²), 1538, 1444 (NO₂), 1261 (C-O-C).**RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz):** 10,65 (s; 1H; O-H), 7,52 (s; 1H; H₆), 6,97 (s; 1H; H₃), 5,96-5,87 (m; 1H; CH₂=CH-CH₂), 5,17-5,10 (m; 2H; CH₂=CH-CH₂), 3,94 (s; 3H; OCH₃), 3,37 (d; 2H; *J* = 5,0 Hz; CH₂=CH-CH₂).**RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz):** 149,7 (C₅), 145,0 (C₁), 136,0 (CH₂=CH-CH₂), 133,0 (C₂), 131,1 (C₄), 118,6 (C₆), 117,1 (CH₂=CH-CH₂), 115,1 (C₃), 56,8 (OCH₃), 39,5 (CH₂=CH-CH₂).3.1.2.2.2 Dados de caracterização de 2-metoxi-5-nitro-4-propilfenol (**3d**)

2-metoxi-5-nitro-4-propilfenol

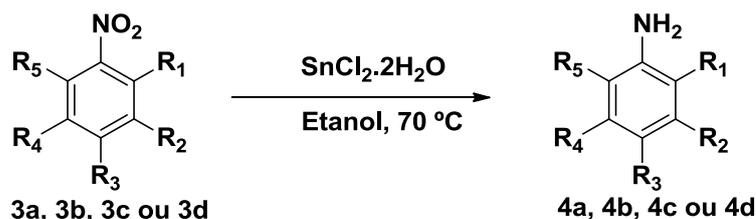
Óleo amarelo

Massa obtida: 1,42 g (6,72 mmol, 21%)**F.M.:** C₁₀H₁₃NO₄ **M.M.:** 211,2145 g.mol⁻¹**IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹):** 3221 (O-H), 2960 (C-H sp³), 1541, 1448 (NO₂), 1260 (C-O-C).**RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz):** 10,62 (s; 1H; O-H), 7,49 (d; 1H; *J* = 2,0 Hz; H₆), 6,96 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H₃), 3,93 (s; 3H; OCH₃), 2,58 (t; 2H; *J* = 7,5 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 1,70-1,58 (m; 2H; CH₃-CH₂-CH₂), 0,97 (t; 3H; *J* = 7,2 Hz; CH₃-CH₂-CH₂).**RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz):** 149,8 (C₅), 144,7 (C₁), 133,9 (C₂), 133,7 (C₄), 118,8 (C₆), 115,0 (C₃), 56,8 (OCH₃), 37,5 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,3 (CH₃-CH₂-CH₂), 13,7 (CH₃-CH₂-CH₂).

3.1.2.3 Método geral de obtenção dos intermediários amínicos **4a**, **4b**, **4c** e **4d**

Após a reação de nitração, os derivados nitrados **3a**, **3b**, **3c** e **3d** foram submetidos a reação de nitro-redução (BELLAMY; OU, 1984), levando aos intermediários amínicos **4a**, **4b**, **4c** e **4d**, conforme o procedimento ilustrado na Figura 14.

Figura 14 - Reação de nitro-redução das substâncias **3a**, **3b**, **3c** e **3d**.



Fonte: Da autora.

Notas: **3a**, **3c**, **4a** e **4c**: R₁ = OH; R₂ = OCH₃; R₃ = H; R₄ = CH₂=CH-CH₂-; R₅ = H; **3b**, **3d**, **4b** e **4d**: R₁ = H; R₂ = OH; R₃ = OCH₃; R₄ = H; R₅ = CH₃-CH₂-CH₂-.

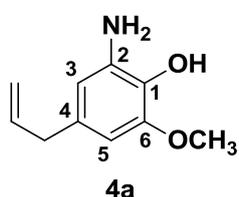
Em um balão de fundo redondo de 125 mL contendo 50 mL de etanol, foram adicionados as substâncias **3a**, **3b**, **3c** ou **3d** (1 eq.) e cloreto de estanho II di-hidratado (5 eq.) (TABELA 3). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética vigorosa, em refluxo, por 3 horas. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente clorofórmio e metanol (9,5/0,5, v/v). Após o término, a mistura reacional foi vertida em béquer contendo água destilada e gelo, sendo o pH da mistura reacional neutralizado com solução aquosa de bicarbonato de sódio. Após ajuste do pH, a mistura reacional foi filtrada a pressão reduzida. O filtrado foi extraído com acetato de etila (5 x 100 mL de acetato de etila). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o sal separado por filtração simples. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório, obtendo-se o produto que, quando necessário, foi purificado por CCS (hexano/acetato de etila, 9/1, v/v).

Tabela 3 - Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de nitro-redução.

Material de partida	SnCl ₂ .2H ₂ O
3a (2,38 g; 11,38 mmol)	12,84 g (56,90 mmol)
3b (4,42 g; 20,93 mmol)	23,61 g (104,65 mmol)
3c (2,92 g; 13,96 mmol)	15,75 g (69,80 mmol)
3d (1,42 g; 6,72 mmol)	7,58 g (33,60 mmol)

Fonte: Da autora.

3.1.2.3.1 Dados de caracterização de 4-alil-2-amino-6-metoxifenol (**4a**)



4-alil-2-amino-6-metoxifenol

Sólido amarelo claro

F.F.: 95 - 98 °C

Massa obtida: 1,14 g (6,36 mmol, 60%)

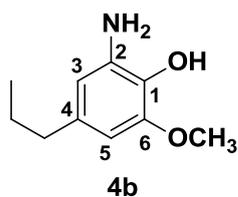
F.M.: C₁₀H₁₃NO₂ **M.M.:** 179,2157 g.mol⁻¹

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3371, 3311 (NH₂), 3074 (O-H), 3000 (C-H sp²), 1606, 1456 (C=C), 1512 (N-H), 1230 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 6,25 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H5), 6,19 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H3), 6,00-5,87 (m; 1H; CH₂=CH-CH₂), 5,11-5,02 (m; 2H; CH₂=CH-CH₂), 3,84 (s; 3H; OCH₃), 3,24 (d; 2H; *J* = 6,9 Hz; CH₂=CH-CH₂).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 146,6 (C6), 137,9 (CH₂=CH-CH₂), 133,8 (C2), 131,7 (C4), 131,2 (C1), 115,3 (CH₂=CH-CH₂), 109,5 (C5), 102,0 (C3), 56,0 (OCH₃), 40,1 (CH₂=CH-CH₂).

3.1.2.3.2 Dados de caracterização de 2-amino-6-metoxi-4-propilfenol (**4b**)



2-amino-6-metoxi-4-propilfenol

Sólido bege claro

F.F.: 63 - 66 °C

Massa obtida: 0,76 g (4,20 mmol, 20%)

F.M.: C₁₀H₁₅NO₂ **M.M.:** 181,2316 g.mol⁻¹

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3370, 3307 (NH₂), 3012 (O-H), 2954 (C-H sp³), 1513 (N-H), 1212 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 6,24 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H5); 6,19 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H3), 3,85 (s; 3H; OCH_3), 2,45 (t; 2H; $J = 7,2$ Hz; $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1,66-1,53 (m; 2H; $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 0,93 (t; 3H; $J = 7,5$ Hz; $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 146,5 (C6), 134,4 (C2), 133,8 (C4), 130,9 (C1), 109,3 (C5), 101,8 (C3), 55,9 (OCH_3), 38,0 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 24,7 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 13,8 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

3.1.2.3.3 Dados de caracterização de 4-alil-5-amino-2-metoxifenol (4c)



4-alil-5-amino-2-metoxifenol

Sólido alaranjado claro

F.F.: 105 - 107 °C

Massa obtida: 0,90 g (5,03 mmol, 36%)

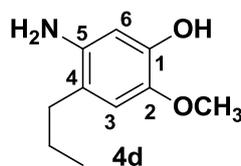
F.M.: $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ **M.M.:** 179,2157 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 3369, 3305 (NH_2), 3071 (O-H), 3010 (C-H sp^2), 1606, 1456 (C=C), 1513 (N-H), 1214 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 6,25 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H3), 6,20 (d; 1H; $J = 1,7$ Hz; H6), 5,99-5,87 (m; 1H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5,11-5,03 (m; 2H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 4,08 (s; 2H; NH_2), 3,84 (s; 3H; OCH_3), 3,25 (d; 2H; $J = 6,7$ Hz; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 147,2 (C2), 138,5 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 133,8 (C5), 131,7 (C4), 131,2 (C1), 115,9 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 110,0 (C3), 102,4 (C6), 57,0 (OCH_3), 40,7 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$).

3.1.2.3.4 Dados de caracterização de 5-amino-2-metoxi-4-propilfenol (4d)



5-amino-2-metoxi-4-propilfenol

Sólido bege claro

F.F.: 82 - 84 °C

Massa obtida: 0,11 g (0,61 mmol, 19%)

F.M.: $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ **M.M.:** 181,2316 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 3370, 3306 (NH_2), 3016 (O-H), 2953 (C-H sp^3), 1514 (N-H), 1214 (C-O-C).

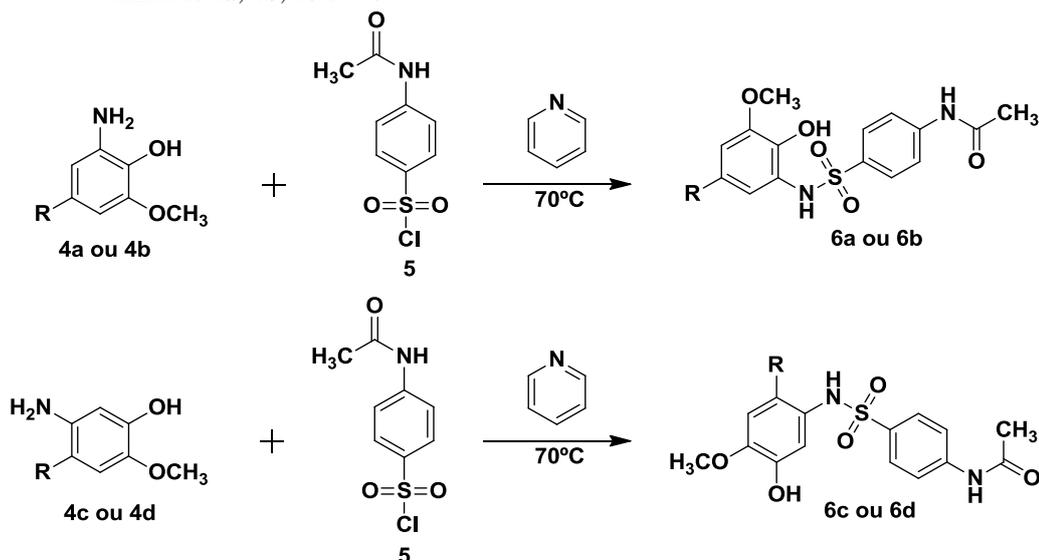
RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 6,24 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H3); 6,19 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H6), 3,84 (s; 3H; OCH_3), 2,44 (t; 2H; $J = 7,7$ Hz; $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1,66-1,53 (m; 2H; $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 0,93 (t; 3H; $J = 7,3$ Hz; $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 146,5 (C2), 134,4 (C5), 133,8 (C4), 130,9 (C1), 109,3 (C3), 101,8 (C6), 55,9 (OCH_3), 38,0 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 24,7 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 13,8 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

3.1.2.4 Obtenção dos derivados sulfonamídicos acetilados **6a**, **6b**, **6c** e **6d**

Os derivados **6a**, **6b**, **6c** e **6d** foram obtidos segundo o procedimento geral ilustrado na Figura 15 (SILVA et al., 2015).

Figura 15 - Reação de obtenção dos derivados sulfonamídicos a partir dos intermediários amínicos **4a**, **4b**, **4c** ou **4d**.



Fonte: Da autora.

Notas: **4a**, **4c**, **6a** e **6c**: $\text{R} = \text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{-}$; **4b**, **4d**, **6b** e **6d**: $\text{R} = \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 5 mL de piridina (62 mmol), foram adicionados as substâncias **4a**, **4b**, **4c** ou **4d** (1 eq.) e o cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila (substância **5**, 1 eq., marca SIGMA-ALDRICH[®]) (TABELA 4). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética vigorosa, em refluxo, por cerca de 3 horas. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila (6/4, v/v). Após o término, verteu-se a mistura reacional em béquer contendo água destilada e gelo. O pH da mistura reacional foi acidificado com ácido clorídrico concentrado. Após a acidificação do meio, a mistura reacional foi extraída com acetato de etila (5 x 50 mL de

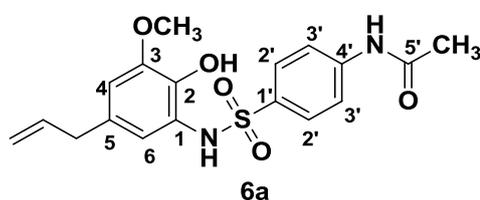
acetato de etila). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o sal separado por filtração simples. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório, obtendo-se o produto que foi purificado por CCS (acetato de etila/hexano, 6/4, v/v).

Tabela 4 - Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de obtenção dos derivados sulfonamídicos **6a**, **6b**, **6c** e **6d**.

Material de partida	Cloreto de <i>p</i> -acetamidobenzenossulfonila
4a (0,54 g; 3 mmol)	0,70 g (3 mmol)
4b (0,76 g; 4,20 mmol)	0,98 g (4,20 mmol)
4c (0,54 g; 3 mmol)	0,70 g (3 mmol)
4d (0,11 g; 0,61 mmol)	0,14 g (0,61 mmol)

Fonte: Da autora.

3.1.2.4.1 Dados de caracterização de *N*-(4-(*N*-(5-alil-2-hidroxi-3-metoxifenil)sulfamoil)fenil)acetamida (**6a**)



N-(4-(*N*-(5-alil-2-hidroxi-3-metoxifenil)sulfamoil)fenil)acetamida

Sólido amarelo claro

F.F.: 167 - 168 °C

Massa obtida: 0,45 g (1,20 mmol, 40%)

F.M.: C₁₈H₂₀N₂O₅S **M.M.:** 376,4268 g.mol⁻¹

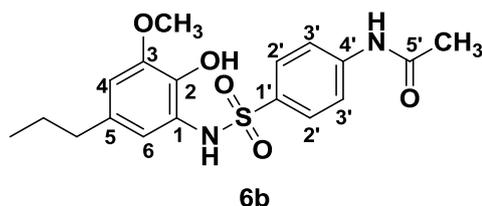
IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3307 (N-H), 1682 (C=O), 1590, 1515 (C=C), 1311, 1152 (S=O), 1256 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-*d*₆; 300 MHz): 10,29 (s; 1H; OH), 8,85 (sl; 2H; NH₂SO₂, NHCOCH₃), 7,64 (s; 4H; H₂', H₃'), 6,57 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H₄), 6,53 (d; 1H; *J* = 1,7 Hz; H₆), 5,87-5,78 (m; 1H; CH₂=CH-CH₂), 5,00-4,94 (m; 2H; CH₂=CH-CH₂), 3,68 (s; 3H; OCH₃), 3,16 (d; 2H; *J* = 6,5 Hz; CH₂=CH-CH₂), 2,05 (s; 3H; NHCOCH₃).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-*d*₆; 75 MHz): 169,3 (C₅'), 147,8 (C₃), 143,0 (C₄'), 137,8 (CH₂=CH-CH₂), 137,5 (C₁'), 134,1 (C₅), 129,8 (C₁), 128,1 (C₂'), 124,2 (C₂), 118,4 (C₃'), 116,1 (C₄), 115,7 (CH₂=CH-CH₂), 109,3 (C₆), 55,9 (OCH₃), 39,5 (CH₂=CH-CH₂), 24,2 (NHCOCH₃).

EM-IES (m/z): calculado para $C_{18}H_{20}N_2O_5S$ ($M + Na$)⁺: 399,0991; encontrado: 399,0985 (FIGURA 88, pág. 131).

3.1.2.4.2 *Dados de caracterização de N-(4-(N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)sulfamoil)fenil)acetamida (6b)*



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

Sólido bege

F.F.: 176 – 180 °C

Massa obtida: 0,26 g (0,69 mmol, 16%)

F.M.: $C_{18}H_{22}N_2O_5S$ **M.M.:** 378,4427 g.mol⁻¹

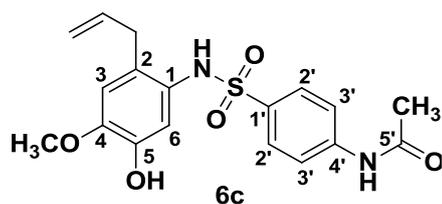
IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3537, 3364 (N-H), 3154 (O-H), 2923 (C-H), 1687 (C=O), 1589, 1512 (C=C), 1312, 1158 (S=O), 1256 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-*d*₆; 300 MHz): 10,26 (s; 1H; OH), 8,95 (s; 1H; NHSO₂), 8,56 (s; 1H; NHCOCH₃), 7,65 (s; 4H; H₂', H₃'), 6,58 (d; 1H; $J = 1,9$ Hz; H₄), 6,53 (d; 1H; $J = 1,9$ Hz; H₆), 3,69 (s; 3H; OCH₃), 2,36 (t; 2H; $J = 7,4$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 2,06 (s; 3H; NHCOCH₃), 1,52-1,40 (sex; 2H; CH₃-CH₂-CH₂), 0,80 (t; 3H; $J = 7,3$ Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

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

EM-IES (m/z): calculado para $C_{18}H_{22}N_2O_5S$ ($M + H$)⁺: 379,1328; encontrado: 379,1315 (FIGURA 89, pág. 131).

3.1.2.4.3 *Dados de caracterização de N-(4-(N-(2-alil-5-hidroxi-4-metoxifenil)sulfamoil)fenil)acetamida (6c)*



N-(4-(*N*-(2-alil-5-hidroxi-4-metoxifenil)sulfamoil)fenil)acetamida

Sólido amarelo

F.F.: 167 – 168 °C

Massa obtida: 0,49 g (1,30 mmol, 43%)

F.M.: $C_{18}H_{20}N_2O_5S$ **M.M.:** 376,4268 g.mol⁻¹

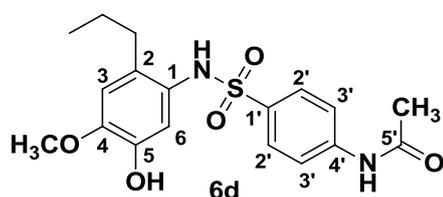
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3307 (N-H), 1682 (C=O), 1590, 1515 (C=C), 1311, 1152 (S=O), 1256 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 10,30 (s; 1H; OH), 8,84 (sl; 1H; NHSO_2), 7,64 (s; 4H; H2', H3'), 6,57 (d; 1H; $J = 1,9$ Hz; H3), 6,53 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H6), 5,86-5,75 (m; 1H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5,00-4,93 (m; 2H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 3,68 (s; 3H; OCH_3), 3,16 (d; 2H; $J = 6,6$ Hz; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 2,05 (s; 3H; NHCOCH_3).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 169,7 (C5'), 148,1 (C4'), 143,3 (C5), 138,2 (C4), 137,8 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 134,4 (C1'), 130,2 (C1), 128,4 (C2'), 124,9 (C2), 118,8 (C3'), 116,4 (C3), 116,1 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 109,6 (C6), 56,2 (OCH_3), 39,5 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 24,5 (NHCOCH_3).

EM-IES (m/z): calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 377,1172; encontrado: 377,1176 (FIGURA 90, pág. 132).

3.1.2.4.4 Dados de caracterização de *N*-(4-(*N*-(5-hidroxi-4-metoxi-2-propilfenil)sulfamoil)fenil)acetamida (**6d**)



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

Sólido amarelo claro

F.F.: 176 – 180 °C

Massa obtida: 0,42 g (1,11 mmol, 41%)

F.M.: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ **M.M.:** 378,4427 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3536, 3362 (N-), 3143 (O-H), 1687 (C=O), 1589, 1522 (C=C), 1313, 1158 (S=O), 1255 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 10,26 (s; 1H; OH), 8,74 (sl; 2H; NHSO_2 , NHCOCH_3), 7,65 (s; 4H; H2', H3'), 6,58 (d; 1H; $J = 1,7$ Hz; H3), 6,53 (d; 1H; $J = 1,7$ Hz; H6), 3,69 (s; 3H; OCH_3), 2,36 (t; 2H; $J = 7,4$ Hz; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 2,06 (s; 3H; NHCOCH_3), 1,53-1,40 (sex; 2H; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 0,81 (t; 3H; $J = 7,3$ Hz; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$).

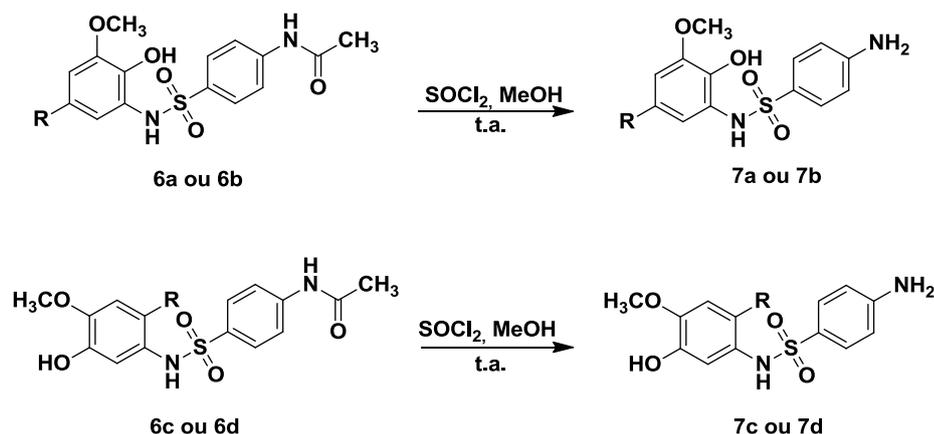
RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 169,0 (C5'), 147,5 (C4'), 142,9 (C5), 137,0 (C4), 133,9 (C1'), 132,0 (C1), 128,0 (C2'), 124,2 (C2), 118,2 (C3'), 115,8 (C3), 109,1 (C6), 55,7 (OCH_3), 36,9 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 24,1 (NHCOCH_3), 24,1 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 13,4 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$).

EM-IES (m/z): calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$: 401,1147; encontrado: 401,1128 (FIGURA 91, pág. 132).

3.1.2.5 Obtenção dos derivados sulfonamídicos desacetilados **7a**, **7b**, **7c** e **7d**

Os derivados **7a**, **7b**, **7c** e **7d** foram obtidos segundo o procedimento geral ilustrado na Figura 17 (WANG et al., 2012).

Figura 16 - Reação de desacetilação dos derivados **6a**, **6b**, **6c** e **6d**.



Fonte: Da autora.

Notas: **6a**, **6c**, **7a** e **7c**: R = $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$; **6b**, **6d**, **7b** e **7d**: R = $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$.

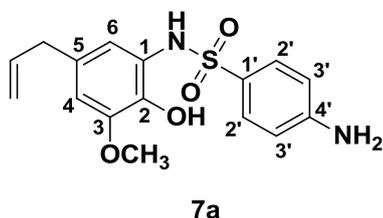
Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados as substâncias **6a**, **6b**, **6c** ou **6d** (1 eq.), SOCl_2 (5 eq.) e 10 mL de metanol (TABELA 5). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética vigorosa, em temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), por cerca de 24 horas. O término da reação foi acompanhado por CCD, utilizando como eluente clorofórmio e metanol (9/1, v/v). Após este período, a mistura reacional foi concentrada em evaporador rotatório e os produtos finais **7a**, **7b**, **7c** e **7d** purificados por CCD preparativa (clorofórmio/metanol, 9/1, v/v).

Tabela 5 - Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de desacetilação.

Material de partida	SOCl_2
6a (0,11 g; 0,29 mmol)	100 μL (1,45 mmol)
6b (0,09 g; 0,24 mmol)	90 μL (1,20 mmol)
6c (0,13 g; 0,35 mmol)	130 μL (1,75 mmol)
6d (0,09 g; 0,24 mmol)	90 μL (1,20 mmol)

Fonte: Da autora.

3.1.2.5.1 Dados de caracterização de *N*-(5-alil-2-hidroxi-3-metoxifenil)-4-aminobenzenossulfonamida (**7a**)



N-(5-alil-2-hidroxi-3-metoxifenil)-4-aminobenzenossulfonamida
Sólido avermelhado

F.F.: 133 - 136 °C

Massa obtida: 0,044 g (0,13 mmol, 45%)

F.M.: C₁₆H₁₈N₂O₄S **M.M.:** 334,3901 g.mol⁻¹

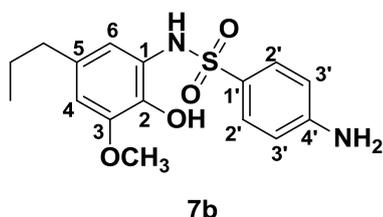
IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3484 (N-H), 3383, 3295 (NH₂), 1622, 1594, 1515 (C=C), 1315, 1132 (S=O), 1210 (C-O-C), 1085 (C-N).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-*d*₆; 300 MHz): 8,63 e 8,43 (sl; 2H; NH₂), 7,38-7,33 (m; 2H; H2'), 6,62 (d; 1H; *J* = 1,9 Hz; H4), 6,52-6,50 (m; 1H; H6), 6,49-6,47 (m; 2H; H3'), 5,91 (s; 2H; OH, NH₂SO₂), 5,88-5,79 (m; 1H; CH₂=CH-CH₂), 5,02-4,96 (m; 2H; CH₂=CH-CH₂), 3,69 (s; 3H; OCH₃), 3,17 (d; 2H; *J* = 6,7 Hz; CH₂=CH-CH₂).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-*d*₆; 75 MHz): 152,7 (C3), 147,6 (C4'), 137,8 (CH₂=CH-CH₂), 136,3 (C5), 129,7 (C1), 128,8 (C2'), 125,4 (C1'), 124,9 (C2), 115,5 (CH₂=CH-CH₂), 114,6 (C6), 112,4 (C3'), 108,5 (C4), 55,7 (OCH₃), 39,7 (CH₂=CH-CH₂).

EM-IES (*m/z*): calculado para C₁₆H₁₈N₂O₄S (M + H)⁺: 335,1066; encontrado: 335,1060 (FIGURA 92, pág. 133).

3.1.2.5.2 Dados de caracterização de 4-amino-*N*-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)benzenossulfonamida (**7b**)



4-amino-*N*-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)benzenossulfonamida
Óleo amarelo escuro

Massa obtida: 0,030 g (0,09 mmol, 33%)

F.M.: C₁₆H₂₀N₂O₄S **M.M.:** 336,4060 g.mol⁻¹

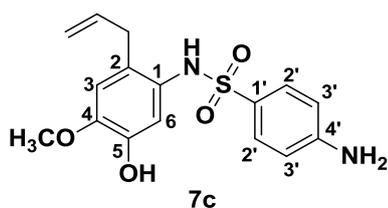
IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3472 (N-H), 3375 (NH₂), 1612, 1595, 1514 (C=C), 1314, 1152 (S=O), 1215 (C-O-C), 1088 (C-N).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 8,56 e 8,39 (s; 2H; NH_2), 7,36 (d; 2H; $J = 8,7$ Hz; H_2'), 6,61 (d; 1H; $J = 1,5$ Hz; H_4), 6,51-6,50 (m; 1H; H_6), 6,49-6,48 (m; 2H; H_3'), 5,91 (s; 1H; OH ou NHSO_2), 3,69 (s; 3H; OCH_3), 2,36 (t; 2H; $J = 7,4$ Hz; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,54-1,41 (m; 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 0,82 (t; 3H; $J = 7,3$ Hz; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 153,7 (C_3), 147,9 (C_4'), 136,4 (C_5), 132,5 (C_1), 129,2 (C_2'), 125,6 (C_1'), 125,3 (C_1'), 114,8 (C_6), 112,8 (C_3'), 108,8 (C_4), 56,1 (OCH_3), 37,5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 24,6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 13,9 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$).

EM-IES (m/z): calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 337,1223; encontrado: 337,1210 (FIGURA 93, pág. 133).

3.1.2.5.3 Dados de caracterização de *N*-(2-alil-5-hidroxi-4-metoxifenil)-4-aminobenzenossulfonamida (7c)



N-(2-alil-5-hidroxi-4-metoxifenil)-4-aminobenzenossulfonamida

Sólido amarelo claro

F.F.: 140 - 143 °C

Massa obtida: 0,047 g (0,14 mmol, 40%)

F.M.: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ **M.M.:** 334,39 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

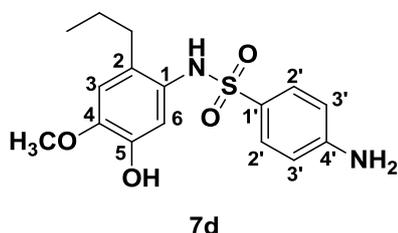
IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 3486 (N-H), 3383, 3294 (NH_2), 1622, 1595, 1516 (C=C), 1315, 1132 (S=O), 1210 (C-O-C), 1084 (C-N).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 8,63 e 8,43 (sl; 2H; NH_2), 7,38-7,34 (m; 2H; H_2'), 6,63 (d; 1H; $J = 1,9$ Hz; H_3), 6,52-6,51 (m; 1H; H_6), 6,50-6,47 (m; 2H; H_3'), 5,91 (s; 2H; OH , NHSO_2), 5,88-5,79 (m; 1H; $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2$), 5,02-4,96 (m; 2H; $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2$), 3,69 (s; 3H; OCH_3), 3,17 (d; 2H; $J = 6,6$ Hz; $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 152,8 (C_4'), 147,6 (C_5), 137,8 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2$), 136,3 (C_4), 129,7 (C_1), 128,8 (C_2'), 125,4 (C_1'), 124,9 (C_2), 115,5 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2$), 114,6 (C_3), 112,4 (C_3'), 108,5 (C_6), 55,7 (OCH_3), 39,7 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2$).

EM-IES (m/z): calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$: 357,0885; encontrado: 357,0886 (FIGURA 94, pág. 134).

3.1.2.5.4 Dados de caracterização de 4-amino-*N*-(5-hidroxi-4-metoxi-2-propilfenil)benzenossulfonamida (**7d**)



4-amino-*N*-(5-hidroxi-4-metoxi-2-propilfenil)benzenossulfonamida
Óleo amarelo escuro

Massa obtida: 0,028 g (0,08 mmol, 31%)

F.M.: C₁₆H₂₀N₂O₄S **M.M.:** 336,4060 g.mol⁻¹

IV (ATR, $\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3462 (N-H), 3375, 3248 (NH₂), 1612, 1595, 1514 (C=C), 1314, 1148 (S=O), 1217 (C-O-C), 1086 (C-N).

RMN de ¹H (δ; DMSO-*d*₆; 300 MHz): 8,56 e 8,39 (s; 2H; NH₂), 7,36 (d; 2H; *J* = 8,7 Hz; H2'), 6,61 (d; 1H; *J* = 1,7 Hz; H3), 6,51-6,50 (m; 1H; H6), 6,48-6,47 (m; 2H; H3'), 5,91 (s; 1H; OH ou NH₂SO₂), 3,69 (s; 3H; OCH₃), 2,36 (t; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH₂-CH₂-CH₃), 1,53-1,41 (m; 2H; CH₂-CH₂-CH₃), 0,81 (t; 3H; *J* = 7,3 Hz; CH₂-CH₂-CH₃).

RMN de ¹³C (δ; DMSO-*d*₆; 75 MHz): 152,5 (C4'), 147,2 (C5), 135,7 (C4), 131,8 (C1'), 128,6 (C2'), 124,9 (C1), 124,6 (C2), 114,1 (C3), 112,1 (C3'), 108,1 (C6), 55,5 (OCH₃), 36,8 (CH₂-CH₂-CH₃), 23,9 (CH₂-CH₂-CH₃), 13,2 (CH₂-CH₂-CH₃).

EM-IES (*m/z*): calculado para C₁₆H₂₀N₂O₄S (M + H)⁺: 337,1223; encontrado: 337,1210 (FIGURA 95, pág. 134).

3.3 AVALIAÇÕES DO POTENCIAL BIOLÓGICO *IN VITRO*

Foram avaliados o potencial antibacteriano, antifúngico, antiproliferativo e tripanocida dos protótipos (eugenol e diidroeuugenol), sulfanilamida e dos produtos sintéticos intermediários (**6a**, **6b**, **6c** e **6d**) e finais (**7a**, **7b**, **7c** e **7d**), bem como sua citotoxicidade frente às células normais.

3.3.1 Método de avaliação do potencial antibacteriano

O potencial antibacteriano foi avaliado no Laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG, com a supervisão da Ms. Taciane Maíra Magalhães Hipólito. A ação dos protótipos (eugenol e diidroeuugenol), sulfanilamida, produtos sintéticos intermediários (**6a**, **6b**, **6c** e **6d**) e finais (**7a**, **7b**, **7c** e **7d**) foi verificada sobre

cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 12228, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299). O ensaio foi realizado pelo método de microdiluição em Caldo Müeller Hinton (CMH) segundo o protocolo M07-A10 (CLSI, 2015).

Em microplaca de 96 poços foram distribuídos 50 µL de caldo Müeller-Hinton (em cada compartimento) e 50 µL dos produtos em teste, protótipos ou padrão cloranfenicol (controle positivo). As soluções destes foram inicialmente preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) para se obter a concentração de 1000 µg/mL. Posteriormente foram diluídas a 200 µg/mL, para atingir a concentração de 100 µg/mL nos poços aos quais foram pipetadas. Foram realizadas dez diluições na microplaca, atingindo as concentrações de 100 µg/mL (poço inicial com os 50 µL das soluções das substâncias), 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, 1,56 µg/mL, 0,78 µg/mL, 0,39 µg/mL e 0,19 µg/mL. Posteriormente, foram pipetados 50 µL de suspensão bacteriana em CMH (5×10^5 UFC/mL), inicialmente preparadas em solução salina 0,9%, segundo a escala de Mc Farland 0,5 (1 a 2×10^8 UFC/mL), por leitura espectrofotométrica. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35-37 °C por 16-20h, exceto para *Staphylococcus aureus* ATCC 12228, cujo tempo de incubação foi de 24h.

Os ensaios foram feitos em triplicata e o crescimento bacteriano foi identificado por leitura espectrofotométrica a 530 nm, em leitor de microplacas, sendo determinadas as concentrações capazes de inibir 50% (CI₅₀) e 90% (CI₉₀) do crescimento microbiano.

3.3.2 Método de avaliação do potencial antifúngico

O potencial antifúngico foi avaliado no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG, com a supervisão da Prof^a. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias e da Ms. Josidel Conceição Oliver. As avaliações/determinações dos valores de concentrações inibitórias foram realizadas segundo a metodologia de microdiluição para leveduras conforme proposto nos documentos M27-A3 (CLSI, 2008) e M27-S4 (CLSI, 2012) com modificações. O meio de cultura utilizado foi RPMI-1640 e os protótipos (eugenol e diidroeugenol), sulfanilamida e os produtos sintéticos intermediários (**6a**, **6b**, **6c** e **6d**) e finais (**7a**, **7b**, **7c** e **7d**) foram avaliados nas seguintes concentrações (µg/mL): 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95, por dissolução em DMSO. Os ensaios foram realizados sobre

leveduras padrões *American Type Culture Collection* (ATCC) do gênero *Candida* spp., sendo micro-organismos oportunistas e/ou patogênicos (*Candida albicans* ATCC 64548, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 90030 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019). O fármaco padrão utilizado como controle positivo no teste foi o antifúngico fungistático fluconazol, nas seguintes concentrações ($\mu\text{g/mL}$): 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25. O meio de cultura RPMI-1640 acrescido de DMSO nas mesmas concentrações finais propostas para os derivados foi utilizado como controle negativo.

A avaliação foi feita em placas de microdiluição e o resultado analisado com leitor ELISA. O ensaio foi feito em duplicata e os valores de CI_{50} e CI_{90} foram determinados.

3.3.3 Método de avaliação do potencial tripanocida

O potencial tripanocida foi avaliado no Laboratório de Parasitologia, Departamento de Patologia e Parasitologia Básica do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG, com a supervisão do Prof. Dr. Ivo Santana Caldas. Foi utilizada a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* para a avaliação do efeito antiepipimastigota dos protótipos (eugenol e diidroeuogenol) sulfanilamida e dos produtos sintéticos intermediários (**6a**, **6b**, **6c** e **6d**) e finais (**7a**, **7b**, **7c** e **7d**). As formas epimastigotas foram mantidas em laboratório em meio LIT (*Liver Infusion Triptose*) por intermédio de repiques semanais.

A quantificação da atividade de cada substância sobre o parasito foi realizada por meio da reação colorimétrica previamente padronizada. Após contagem em câmara de Neubauer, foi ajustado o número de parasitos para a concentração de $1,5 \times 10^6/\text{mL}$. Cem microlitros dessa suspensão foram adicionados a cada poço da microplaca de 96 poços, em duplicata. Logo após, concentrações decrescentes das substâncias, em um volume de 100 μL (diluições previamente preparadas), foram adicionadas aos poços contendo epimastigotas. Os produtos estudados foram avaliados nas seguintes concentrações ($\mu\text{g/mL}$): 300; 200; 133,33; 89; 59,26; 39,51; 26,34, por dissolução em DMSO. O fármaco padrão utilizado no teste foi o benznidazol nas seguintes concentrações ($\mu\text{g/mL}$): 200; 50; 12,5; 3,12; 0,78; 0,19; 0,04. O meio LIT acrescido de DMSO nas mesmas concentrações finais propostas para os derivados foi utilizado como controle negativo, e como controle positivo do teste foi utilizado o meio LIT acrescido da suspensão de epimastigotas. As microplacas foram incubadas em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), a 28°C, por 72 horas. Após esse período foram adicionados 20 μL do corante resazurina em cada poço e após 12 horas foi realizada a leitura

da reação a 570 nm e 600 nm em leitor de ELISA. A porcentagem de inibição da proliferação foi calculada a partir da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [A_{570} - (A_{600} \times R0)_{\text{Tratado}} / A_{570} - (A_{600} \times R0)_{\text{Controle +}}] \times 100$$

Nessa fórmula, A_{570} = absorvância a 570 nm, A_{600} = absorvância a 600nm e $R0$ é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorvância do controle negativo, ou seja, apenas meio de cultura acrescido de DMSO e resazurina na ausência de parasitos [$R0 = (A_{570} / A_{600})$]. A partir do percentual de inibição de cada concentração das substâncias foi calculada a CI_{50} , utilizando o programa CalcuSyn®. As curvas de dose-resposta foram construídas no GraphPad Prism 5®. Todos os experimentos com formas epimastigotas foram realizados em duplicata, com no mínimo duas repetições.

3.3.4 Método de avaliação da citotoxicidade frente à linhagem celular normal

A citotoxicidade foi avaliada no Laboratório de Vacinas do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG, com a supervisão do Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho. Os protótipos (eugenol, diidroeugenol e sulfanilamida) e os produtos sintéticos intermediários (**6a**, **6b**, **6c** e **6d**) e finais (**7a**, **7b**, **7c** e **7d**) foram avaliados quanto à citotoxicidade frente à linhagem BHK-21 (fibroblastos renais de hamster). Foi utilizado o método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), baseado na conversão enzimática por desidrogenases do sal tetrazólio em formazano (CORY et al., 1991). Volume de 90 μL de suspensão das células ($2,4 \times 10^6$ células/mL) foi distribuído em placas de microtitulação com 10 μL de cada produto avaliado, nas seguintes concentrações ($\mu\text{g/mL}$): 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 e incubados a 37 °C em estufa a 5% de CO_2 por 48h. Em seguida, foram adicionados 10 μL do corante tetrazólico (5 mg/mL) e as células foram incubadas novamente por um período de 4h. Após este período, o meio foi cuidadosamente removido e adicionado a 100 μL de DMSO para solubilização dos cristais de formazana. As microplacas foram então agitadas por 5 min e as absorvâncias para cada amostra medidas em um leitor tipo ELISA a 560 nm.

A porcentagem de citotoxicidade foi calculada pela relação $[(A-B)/A \times 100]$, onde A e B são os valores de absorvância do controle e das células tratadas, respectivamente. Os dados foram analisados usando regressão linear para gerar os valores de CC_{50} (concentração

citotóxica para 50%). Os índices de seletividade (IS) foram expressos como a razão CC_{50}/CI_{50} .

3.3.5 Método de avaliação do potencial antiproliferativo

O potencial antiproliferativo foi avaliado no Laboratório de Biologia Animal Integrativa do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG, com a supervisão da Prof^a. Dra. Marisa Ionta e do Ms. Guilherme Álvaro Ferreira da Silva.

3.3.5.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

A atividade antiproliferativa dos protótipos (eugenol e diidroeuogenol), sulfanilamida e dos produtos sintetizados foi avaliada frente às diferentes linhagens celulares derivadas de cânceres humanos: HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), MCF7 (adenocarcinoma de mama humana) e HT144 (melanoma humano). As células foram cultivadas em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma, MO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab, SP, Brasil). As culturas celulares foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO₂).

3.3.5.2 Viabilidade Celular - Ensaio Colorimétrico (Resazurina)

As células foram semeadas em placas de 96 poços e, após a aderência (24h), foram tratadas com os protótipos (eugenol e diidroeuogenol), sulfanilamida e os produtos sintéticos intermediários (**6a**, **6b**, **6c** e **6d**) e finais (**7a**, **7b**, **7c** e **7d**) por 48 horas nas seguintes concentrações (µM): 500; 250; 125; 62,5; 31,25. Ao término do tratamento, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico utilizando-se o corante resazurina. Este ensaio é baseado na conversão enzimática da resazurina a sua forma reduzida (resofurina). Os valores de absorvância obtidos nas amostras tratadas foram comparados com os valores de absorvância das amostras que não foram expostas aos produtos estudados, sendo que a taxa de absorvância é diretamente proporcional ao número de células vivas. O valor de CI_{50} foi determinado usando o programa GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

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

As células foram tratadas em concentrações ao redor do CI_{50} por 24 e 48h. Ao término do tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (*Trypsin-EDTA solution*/Sigma Aldrich LTDA, Brasil) e transferidas para tubos Falcon. Após centrifugação (5 minutos a 1000 rpm), o precipitado de células foi homogeneizado em PBSA (Tampão salina fosfato) e as células foram fixadas em etanol gelado (75%) por 30 minutos. As células foram tratadas com uma solução contendo: PBSA, RNase (10 mg/mL) e Iodeto de Propídio (300 μ g/mL) por 1 hora e analisadas no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, GE) utilizando o software GuavaSoft 2.7.

3.3.5.4 Avaliação da citotoxicidade frente à linhagem celular normal

A atividade citotóxica dos protótipos (eugenol e diidroeuogenol), sulfanilamida e dos produtos sintetizados com atividade antiproliferativa promissora (menor valor de CI_{50}) foi avaliada frente à linhagem celular normal de fibroblastos derivados de pele humana (CCD-SK1059). As células foram cultivadas em DMEM, suplementado com 10% de SFB. As culturas celulares foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO_2). As células foram semeadas em placas de 96 poços e, após a aderência (24h), foram tratadas com os produtos em estudo por 48 horas nas seguintes concentrações (μ M): 500; 250; 125; 62,5; 31,25. Ao término do tratamento, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico utilizando-se o corante resazurina. Os valores de absorvância obtidos nas amostras tratadas foram comparados com os valores de absorvância das amostras que não foram expostas aos produtos estudados, sendo que a taxa de absorvância é diretamente proporcional ao número de células vivas. O valor de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento) foi determinado usando o programa GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

3.3.5.5 Análise estatística

Os dados quantitativos foram apresentados como a média \pm desvio padrão (DP) de dois experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram determinadas de acordo com a análise de variância one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de

Tukey usando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

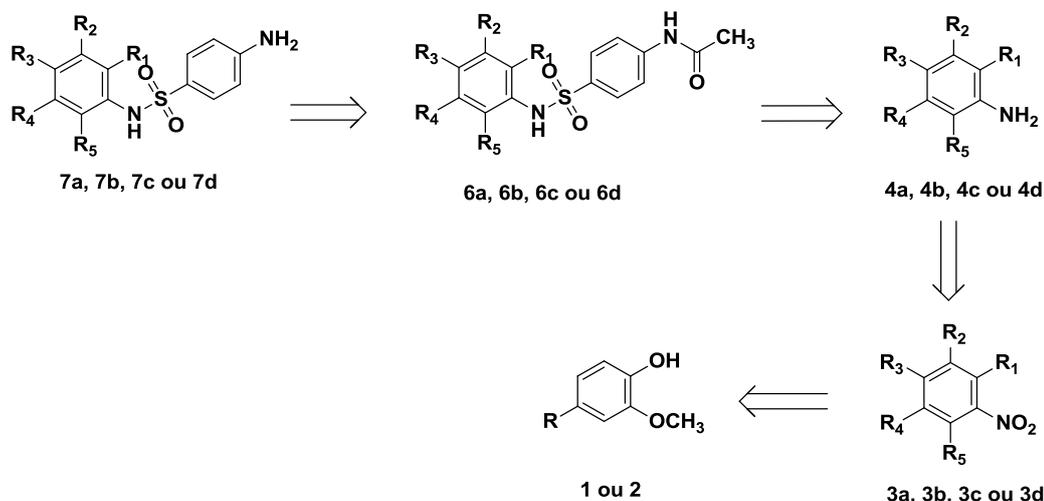
O planejamento, a síntese e a caracterização dos derivados sulfonamídicos híbridos do eugenol e diidroeuogenol propostos são descritos a seguir.

4.1 PLANEJAMENTO DOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS DO EUGENOL E DIIDROEUGENOL

Considerando-se as propriedades antimicrobianas, antiproliferativas e tripanocidas apresentadas pelo eugenol, bem como por sulfonamidas descritas na literatura foi proposta com este trabalho a obtenção, por meio da técnica de hibridação molecular, de derivados sulfonamídicos do eugenol e do seu análogo, diidroeuogenol. Dessa forma, poderiam ser reunidas em uma só molécula subunidades estruturais advindas do eugenol (ou de seu análogo, diidroeuogenol) e da sulfanilamida, com intuito de se obter uma substância com propriedades antimicrobianas, antiproliferativas e tripanocidas mais potentes que seus precursores. Além disso, os diferentes análogos propostos, que se diferenciam quanto à posição do grupo sulfonamida e o grau de saturação da cadeia lateral propenólica, poderiam demonstrar o papel de cada subunidade estrutural na ação biológica encontrada. Cabe ressaltar que, até o presente momento, ainda não foram relatados trabalhos envolvendo a síntese de derivados híbridos entre derivados sulfonamídicos e eugenol ou seu análogo, diidroeuogenol.

Os derivados sulfonamídicos finais (**7a**, **7b**, **7c** e **7d**) e intermediários (**6a**, **6b**, **6c** e **6d**) propostos neste trabalho foram obtidos a partir da condensação do cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila com os derivados *orto* e *meta*-aminofenóis (**4a**, **4b**, **4c** e **4d**), estes últimos resultantes da redução dos derivados *orto* e *meta*-nitrofenóis (**3a**, **3b**, **3c** e **3d**) do eugenol (**1**) e de seu análogo, diidroeuogenol (**2**), conforme ilustrado na Figura 17.

Figura 17 - Esquema da retróssíntese dos derivados sulfonamídicos híbridos do eugenol e diidroeugenol.



Fonte: Da autora.

Notas: **1**: R = CH₂=CH-CH₃; **2**: R = CH₂-CH₂-CH₃; **3a**, **3c**, **4a**, **4c**, **6a**, **6c**, **7a** e **7c**: R₁ = OH; R₂ = OCH₃; R₃, R₅ = H; R₄ = CH₂=CH-CH₃; **3b**, **3d**, **4b**, **4d**, **6b**, **6d**, **7b** e **7d**: R₁, R₄ = H; R₂ = OH; R₃ = OCH₃; R₅ = CH₂-CH₂-CH₃.

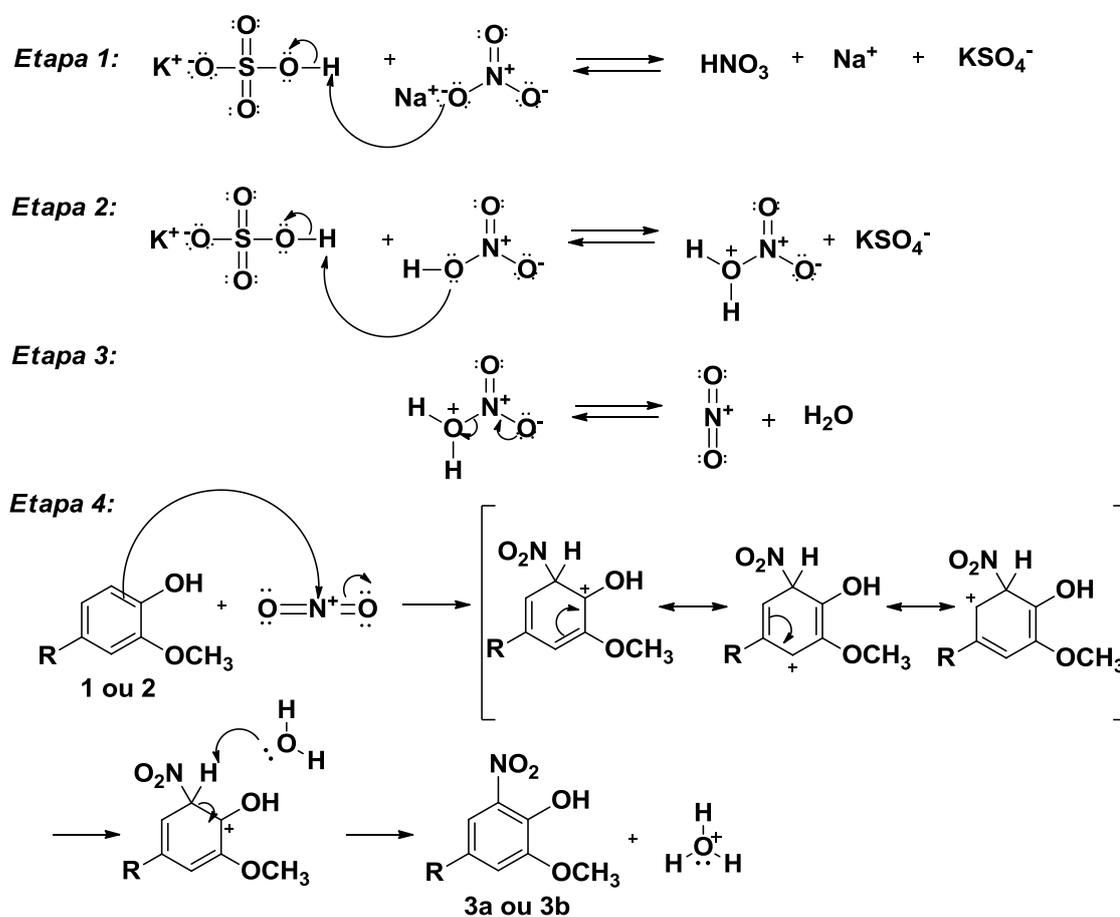
4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS SULFONAMÍDICOS DO EUGENOL E DIIDROEUGENOL

A reação de nitração aromática para a obtenção dos derivados **3a** e **3b** procedeu-se conforme descrito no trabalho de Zolfigol, Ghaemi e Madrakian (2001). Esta metodologia foi escolhida por apresentar especificidade para a introdução de grupos nitro (NO₂) na posição *orto* em relação à hidroxila fenólica, e também por a mesma ser realizada em condições mais brandas, ao contrário da clássica reação de nitração aromática que envolve o uso de uma mistura de ácidos concentrados, como o ácido sulfúrico e o ácido nítrico. O rendimento obtido para esta reação foi relativamente inferior ao que é descrito na literatura, porém foi satisfatório para a continuidade do trabalho.

Trata-se de uma reação de Substituição Eletrofílica Aromática (SEAr), sendo que para a inserção do grupo NO₂ ao anel aromático, primeiramente, é necessário a formação de uma espécie eletrófila. Esta espécie, que neste caso trata-se do íon nitrônio, será formada a partir da reação do bissulfato de potássio com o nitrato de sódio. Desta interação haverá a formação de ácido nítrico que, após reagir com outra molécula de bissulfato de potássio, dissocia-se gerando a espécie eletrófila. Como este íon é altamente reativo, o mesmo sofre o ataque da ligação π C=C do anel aromático do eugenol (**1**) ou diidroeugenol (**2**), formando o íon arênio que é estabilizado por ressonância. A etapa de formação deste íon é lenta, devido à conversão

a um produto de menor estabilidade. Em seguida, uma base de Lewis presente no meio, provavelmente a água formada durante a dissociação do ácido nítrico, capta um próton do íon arênio, restaurando a aromaticidade do anel. Esta última etapa ocorre rapidamente, pois leva a formação de produtos mais estáveis, que neste caso tratam-se dos derivados nitrados **3a** e **3b**, obtidos a partir do eugenol e diidroeugenol, respectivamente (HUGHES; INGOLD; REED, 1950; ZOLFIGOL; GHAEMI; MADRAKIAN, 2001; SUDARMA et al., 2014). O mecanismo proposto para esta reação de nitração aromática está ilustrado na Figura 18.

Figura 18 - Mecanismo proposto para a reação de nitração das substâncias **3a** e **3b**.



Fonte: Da autora.

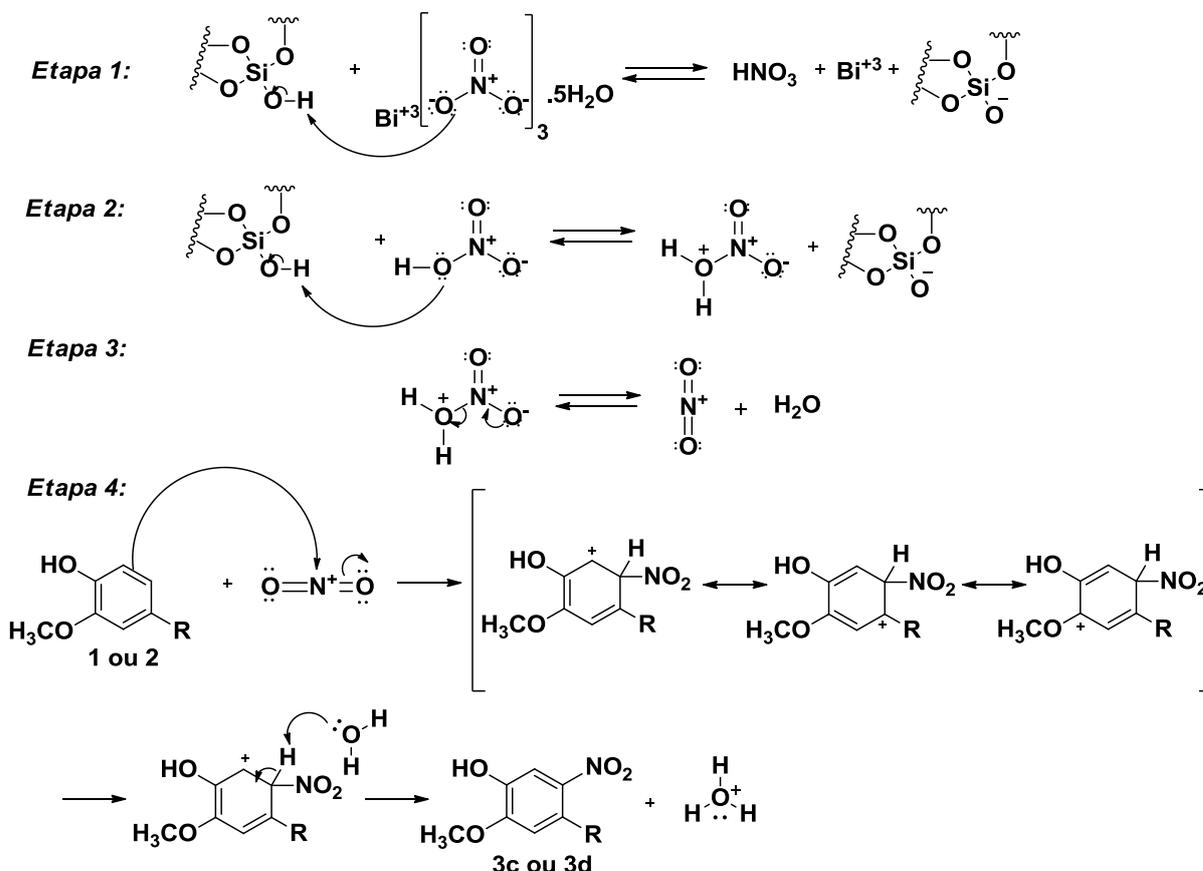
Notas: **1** ou **3a**: R = CH₂=CH-CH₂-; **2** ou **3b**: R = CH₃-CH₂-CH₂-.

Para a obtenção dos derivados nitrados **3c** e **3d**, a metodologia baseou-se conforme proposto no trabalho de Canales, Bandyopadhyay e Banik (2011). A especificidade pela posição *meta* à hidroxila fenólica, além das condições brandas de reação com o uso de reagentes de baixa periculosidade, foram os critérios de escolha do método a ser seguido. Altos rendimentos também foram descritos na literatura, porém os valores aqui obtidos foram

inferiores ao esperado, mas ainda considerados satisfatórios para a continuidade desse trabalho.

Assim como na reação de nitração mencionada anteriormente, esta também se trata de uma reação de SEAr. Os grupos silanóis (Si-OH), que compõem a estrutura da sílica gel, reagem com o nitrato de bismuto penta-hidratado, levando a formação da espécie eletrófila, o íon nitrônio. A ligação π C=C do anel aromático do eugenol (**1**) ou diidroeugenol (**2**) promove o ataque ao íon nitrônio, devido à alta reatividade do mesmo, ocorrendo perda da aromaticidade e formação do íon arênio, o qual é estabilizado por ressonância. Na última etapa, uma base de Lewis, provavelmente a água formada durante a reação, capta um próton do íon arênio, restaurando a aromaticidade e formando os derivados nitrados **3c** e **3d**, obtidos a partir do eugenol e diidroeugenol, respectivamente (BADGUJAR et al., 2008; CANALES; BANDYOPADHYAY; BANIK, 2011; HUGHES; INGOLD; REED, 1950; SHI; CUI, 2003). Na Figura 19 está ilustrado o mecanismo de nitração proposto para esta reação.

Figura 19 - Mecanismo proposto para a reação de nitração das substâncias **3c** e **3d**.



Fonte: Da autora.

Notas: **1** ou **3c**: R = CH₂=CH-CH₂-; **2** ou **3d**: R = CH₃-CH₂-CH₂-.

Dos dados fornecidos pela análise de espectroscopia de absorção na região do IV das substâncias **3a** (FIGURA 25, pág. 101), **3b** (FIGURA 26, pág. 101), **3c** (FIGURA 27, pág. 102) e **3d** (FIGURA 28, pág. 102), destacam-se as duas bandas fortes características do grupo NO₂ entre 1541 e 1440 cm⁻¹, referentes aos estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente. É possível observar também as bandas características do eugenol e diidroeugenol, como uma banda larga entre 3520 e 3200 cm⁻¹, referente ao estiramento da ligação O-H da hidroxila fenólica e uma banda forte entre 1270 e 1260 cm⁻¹, característica do estiramento C-O-C de éter que corresponde ao grupo metoxila.

Nos espectros de RMN de ¹H das substâncias **3a** (FIGURA 41, pág. 107) e **3c** (FIGURA 43, pág. 108), notam-se os sinais dos hidrogênios da cadeia alílica do eugenol, como um duplete a aproximadamente δ 3,36 (CH₂-HC=CH₂), e como dois multipletos entre δ 5,95-5,83 (CH₂-HC=CH₂) e δ 5,16-5,07 (CH₂-HC=CH₂). Observam-se também os dois dupletos correspondentes aos dois hidrogênios aromáticos de **3a** a δ 6,95 (H3) e a δ 7,48 (H5), e de **3c** a δ 6,97 (H3) e a δ 7,52 (H6). O grupo NO₂ exerce um efeito retirador de elétrons, desativando o anel aromático e, conseqüentemente, diminuindo a densidade eletrônica dos prótons próximos a ele. Sendo assim, dentre os dois hidrogênios aromáticos aquele que apresenta maior δ é o que está mais próximo do grupo NO₂ (H5 para **3a** e H6 para **3c**), pois estes hidrogênios apresentam maior capacidade de absorver a radiação incidida sobre eles (PAVIA et al., 2010). Os simpletos referentes aos hidrogênios dos grupos OCH₃ e OH aparecem em aproximadamente δ 3,90 e δ 10,65, respectivamente.

Nos espectros de RMN de ¹³C das substâncias **3a** (FIGURA 45, pág. 109) e **3c** (FIGURA 47, pág. 110), observa-se a δ 56,6 o sinal relativo ao carbono do grupo metoxila (OCH₃), assim como os sinais referentes aos carbonos hidrogenados da cadeia alílica a aproximadamente δ 39,5 (H₂C-CH=CH₂), 117,1 (H₂C-HC=CH₂) e 136,0 (H₂C-HC=CH₂). Os carbonos aromáticos hidrogenados são visualizados a δ 118,5 e 115,0, sendo o de maior δ correspondente ao carbono mais próximo ao grupo NO₂ (C5 para **3a** e C6 para **3c**). A δ 149,8, 145,0, 133,6 e 131,2 notam-se os carbonos aromáticos conectados aos grupos NO₂, OH, OCH₃ e a cadeia alílica, respectivamente. O subespectro DEPT-135 de **3a** (FIGURA 49, pág. 111) auxiliou nas atribuições feitas no espectro de ¹³C.

Nos espectros de RMN de ¹H das substâncias **3b** (FIGURA 42, pág. 107) e **3d** (FIGURA 44, pág. 108), observam-se os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia propílica do diidroeugenol que aparecem como tripletos a aproximadamente δ 2,57 (CH₃-CH₂-CH₂-) e a δ 0,96 (CH₃-CH₂-CH₂-), e como um sexteto centrado em δ 1,70-1,57 (CH₃-CH₂-CH₂-). Em δ 6,96 e 7,49 notam-se os dois dupletos referentes aos dois hidrogênios aromáticos, sendo que

o hidrogênio com maior δ é o que está mais próximo do grupo NO_2 (H5 para **3b** e H6 para **3d**), decorrente do efeito retirador de elétrons exercido por este grupo. Já os simpletos correspondentes aos hidrogênios dos grupos OCH_3 e OH encontram-se a δ 3,93 e a δ 10,62, respectivamente.

Nos espectros de ^{13}C das substâncias **3b** (FIGURA 46, pág. 109) e **3d** (FIGURA 48, pág. 110) é possível notar os sinais referentes aos carbonos da cadeia propílica a aproximadamente δ 37,5 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), δ 24,3 ($\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2$ -) e a δ 13,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ -), assim como o sinal correspondente ao carbono do grupo metoxila ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$) a δ 56,7. Os sinais relativos aos carbonos aromáticos hidrogenados são visualizados a aproximadamente δ 118,8 e 115,0, sendo o de maior δ correspondente ao carbono mais próximo ao grupo retirador de elétrons (NO_2) (C5 para **3b** e C6 para **3d**). Em δ 149,7, 144,5, 133,8 e 133,6 encontram-se os sinais referentes aos carbonos conectados aos grupos NO_2 , OH , OCH_3 e a cadeia propílica, respectivamente. Nos subespectros DEPT-135 de **3b** (FIGURA 50, pág. 111) e **3d** (FIGURA 51, pág. 112), destacam-se os sinais de carbono metilênico a δ 37,3 e a δ 24,2.

Os derivados nitrados **3a**, **3b**, **3c** e **3d** foram, em seguida, submetidos a reação de nitro-redução, levando aos derivados amínicos **4a**, **4b**, **4c** e **4d**. A reação de nitro-redução procedeu-se conforme descrito no trabalho de Bellamy e Ou (1984), e foi escolhida por ser específica e seletiva para a redução de grupos NO_2 de derivados aromáticos, sem que outros grupos susceptíveis à redução possam ser alterados. Na literatura são descritos altos rendimentos, independentemente dos grupos substituintes presentes no anel aromático e a posição dos mesmos. Todavia, os rendimentos aqui obtidos apresentaram valores inferiores, porém satisfatórios ao propósito desse trabalho.

A nitro-redução trata-se de uma reação radicalar, onde a espécie denominada de radical apresenta elétrons desemparelhados que são transferidos para outra molécula, promovendo a redução da mesma. Neste caso, o cloreto de estanho di-hidratado, por apresentar elétrons desemparelhados, fornecerá tanto os elétrons quanto os prótons necessários para que ocorra a redução do grupo NO_2 ao grupo NH_2 . Durante a reação, os elétrons desemparelhados do átomo de estanho são transferidos para o átomo de nitrogênio do grupo NO_2 , com protonação do ânion-radical e eliminação de íons hidroxila. No decorrer da reação, há formação de derivados como o nitrosobenzeno, hidroxilaminobenzeno, azoxibenzeno, azobenzeno e, finalmente, aminobenzeno, como ilustrado na Figura 20 (JAYASHANKARA, 2005; KUMAR; RAI, 2012; PASHA; GAMBLE et al., 2007).

hidrogênios aromáticos dos derivados amínicos **4a**, **4b**, **4c** e **4d**, que aparecem como dois dupletos a aproximadamente δ 6,20 e a δ 6,25. Estes valores de δ são menores em relação aos espectros de RMN de ^1H dos derivados nitrados **3a**, **3b**, **3c** e **3d**, devido ao efeito doador de elétrons exercido pelo grupo NH_2 , que ativa o anel aromático e, conseqüentemente, aumenta a densidade eletrônica dos prótons próximos a ele (PAVIA et al., 2010). Sendo assim, o hidrogênio aromático que apresenta maior δ é o que está mais distante deste grupo, portanto aquele em posição *para* (H5 para **4a** e **4b**) ou *meta* (H3 para **4c** e **4d**) em relação ao grupo NH_2 . O hidrogênio aromático em posição *orto*, para ambos os derivados amínicos, absorve uma menor quantidade de radiação, devido à blindagem promovida pelo grupo doador de elétrons (NH_2).

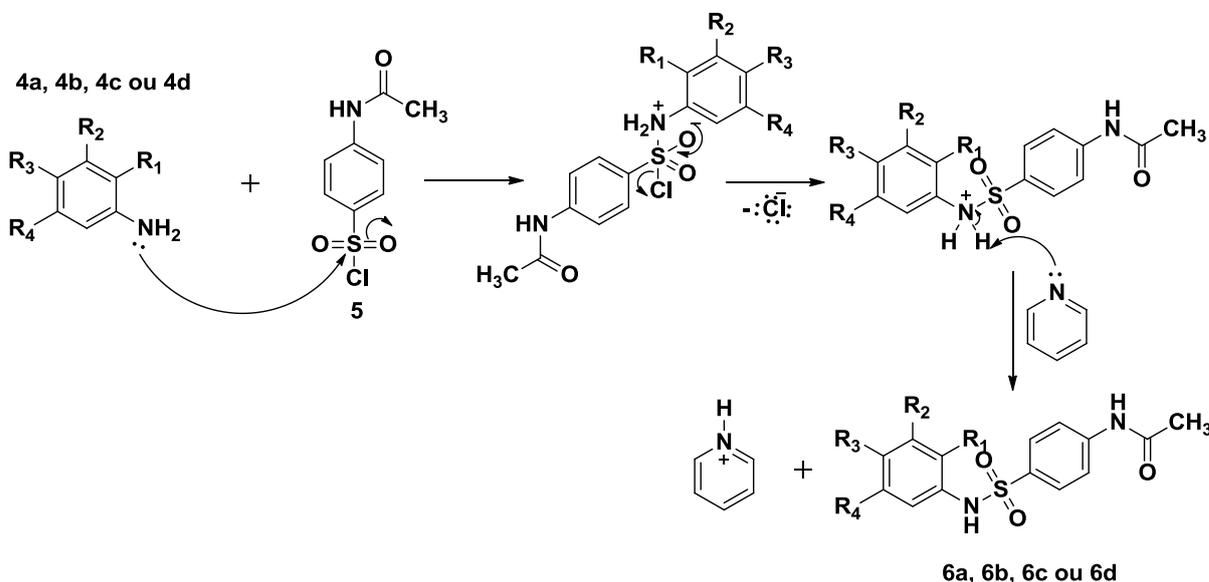
Nos espectros de RMN de ^{13}C das substâncias **4a** (FIGURA 56, pág. 114), **4b** (FIGURA 57, pág. 115), **4c** (FIGURA 58, pág. 115) e **4d** (FIGURA 59, pág. 116), pode-se observar o sinal relativo ao carbono da metoxila, bem como os sinais referentes aos carbonos da cadeia alílica e propílica. Os sinais correspondentes aos carbonos aromáticos hidrogenados são notados a aproximadamente δ 110,0 e 102,0. Tais valores de δ também são menores em comparação aos valores obtidos a partir dos espectros de ^{13}C das substâncias nitradas pelo efeito doador de elétrons exercido pelo grupo NH_2 . Dentre os carbonos aromáticos hidrogenados aquele com maior δ corresponde ao carbono mais distante do grupo NH_2 , portanto ao carbono em posição *para* (C5 para **4a** e **4b**) ou *meta* (C3 para **4c** e **4d**) em relação ao grupo ativante. Também é possível visualizar em ambos os espectros de RMN de ^{13}C os sinais dos carbonos aromáticos conectados aos grupos OCH_3 (δ 147,0), NH_2 (δ 134,0), cadeia alílica (δ 132,0) ou propílica (δ 133,8) e OH (δ 131,0).

Pelos subespectros DEPT-135 dos derivados amínicos **4a** (FIGURA 60, pág. 116), **4b** (FIGURA 61, pág. 117), **4c** (FIGURA 62, pág. 117) e **4d** (FIGURA 63, pág. 118), pode-se confirmar parte das atribuições feitas nos espectros de ^{13}C destas substâncias.

A reação de obtenção dos derivados sulfonamídicos acetilados **6a**, **6b**, **6c** e **6d** ocorrem por meio de uma reação de adição nucleofílica do derivado amínico ao átomo de enxofre do cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila, seguida de eliminação do grupo abandonador. Durante a reação, o par de elétrons não ligante do nitrogênio do grupo NH_2 dos derivados amínicos **4a**, **4b**, **4c** ou **4d** é adicionado ao átomo de enxofre do cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila (substância **5**); a ligação π S=O é deslocada como um par de elétrons para o átomo de oxigênio e quando retorna há a eliminação do grupo abandonador na forma de íons cloreto. A base de Lewis presente no meio, que neste caso trata-se da piridina, capta um próton do nitrogênio carregado positivamente, sendo formados os derivados

sulfonamídicos acetilados do eugenol (**6a** e **6c**) e diidroeugenol (**6b** e **6d**). O mecanismo proposto para a reação de obtenção das substâncias **6a**, **6b**, **6c** e **6d** é ilustrado na Figura 21.

Figura 21 - Mecanismo proposto para a reação de obtenção das sulfonamidas acetiladas **6a**, **6b**, **6c** e **6d**.



Fonte: Da autora.

Notas: **4a**, **4c**, **6a** e **6c**: $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{H}$; $R_4 = \text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$; **4b**, **4d**, **6b** e **6d**: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$.

Após o término da reação torna-se necessário a acidificação do pH reacional com ácido clorídrico concentrado, a fim de que a piridina torne-se protonada e apresente afinidade pela fase aquosa durante a extração líquido-líquido, enquanto que os derivados sulfonamídicos **6a**, **6b**, **6c** e **6d** permaneçam na fase orgânica, sendo obtidos após a etapa de extração. As substâncias **6a**, **6b**, **6c** e **6d** tiveram suas identidades estruturais confirmadas por meio da análise em espectroscopia de absorção na região do IV, por RMN de ^1H e ^{13}C e por EM, conforme é discutido a seguir.

Dos dados fornecidos pela análise de espectroscopia de absorção na região do IV das substâncias **6a** (FIGURA 33, pág. 104), **6b** (FIGURA 34, pág. 104), **6c** (FIGURA 35, pág. 104) e **6d** (FIGURA 36, pág. 105), destacam-se as bandas correspondentes aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação $\text{S}=\text{O}$ do grupo sulfonamida em 1313 e 1152 cm^{-1} , respectivamente. Entre 3537 e 3307 cm^{-1} , nota-se a banda referente ao estiramento da ligação $\text{N}-\text{H}$ de amida secundária, que se refere ao grupo acetamida. A banda correspondente ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ do grupo acetamida aparece entre 1687 e 1682 cm^{-1} . Observam-se também as bandas características do eugenol e diidroeugenol, como uma banda entre 3154

e 3143 cm^{-1} (ν O-H), outra a aproximadamente 1590 cm^{-1} (ν C=C do anel aromático) e a 1256 cm^{-1} (ν C-O-C do grupo metoxila).

Nos espectros de RMN de ^1H das substâncias **6a** (FIGURA 64, pág. 118) e **6c** (FIGURA 66, pág. 119), notam-se os sinais relativos aos hidrogênios da cadeia alílica, e nos espectros de RMN de ^1H de **6b** (FIGURA 65, pág. 119) e **6d** (FIGURA 67, pág. 120) os sinais dos hidrogênios da cadeia propílica. Os simpletos correspondentes aos hidrogênios do grupo OCH_3 e OH também são observados em ambos os espectros. Destaca-se em aproximadamente δ 2,05 o simpleto relativo aos hidrogênios do grupo metila da acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) e entre δ 8,95-8,84 o simpleto referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo sulfonamida ($-\text{NH}_2\text{SO}_2$). Este hidrogênio encontra-se na região de maior δ devido ao efeito indutivo retirador de elétrons da ligação π S=O, tornando-o mais desblindado, o que faz com que o mesmo absorva maior quantidade da radiação incidente. Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos derivados do eugenol e diidroeuogenol são observados como dois dupletos a aproximadamente δ 6,57 e 6,53, sendo o de menor δ correspondente ao hidrogênio mais próximo do grupo sulfonamida (H6 para ambas as substâncias). Tal fato deve-se ao efeito doador de elétrons exercido pelo grupo sulfonamida ($-\text{NH}_2\text{SO}_2$), pois o nitrogênio sulfonamídico encontra-se ligado ao carbono aromático (C1) do anel aromático derivado do eugenol ou diidroeuogenol. Sendo assim, a densidade eletrônica dos prótons vizinhos a este grupo aumenta e, conseqüentemente, a capacidade dos mesmos de absorverem a radiação incidida sobre eles é reduzida, apresentando valores de deslocamento químico menores. Os quatro hidrogênios aromáticos das posições 2' e 3' aparecem como um simpleto a aproximadamente δ 7,64.

Nos espectros de RMN de ^{13}C das substâncias **6a** (FIGURA 68, pág. 120), **6b** (FIGURA 69, pág. 121), **6c** (FIGURA 70, pág. 121) e **6d** (FIGURA 71, pág. 122), pode-se observar o sinal relativo ao carbono da metoxila, bem como os sinais referentes aos carbonos da cadeia alílica e propílica. Os sinais relativos aos carbonos aromáticos hidrogenados derivados do eugenol e diidroeuogenol são visualizados a aproximadamente δ 109,0 e a δ 116,0, sendo o de maior δ referente ao carbono em posição *para* (C4 para **6a** e **6b**) ou *meta* (C3 para **6c** e **6d**) e o de menor δ em posição *orto* (C6 para ambas as substâncias) em relação ao grupo sulfonamida. Já os sinais dos quatro carbonos aromáticos hidrogenados derivados do cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila (substância **5**) são notados a aproximadamente δ 118,0 e 128,0, sendo o de maior δ correspondente aos carbonos em posição *meta* (C2') e o de menor δ aos carbonos em posição *orto* (C3') em relação ao grupo acetamida. Destaca-se a δ 169,5 o sinal referente ao carbono carbonílico e a δ 24,2 o sinal correspondente ao carbono do

grupo metila da acetamida (-NHCOCH₃). Em ambos os espectros de RMN de ¹³C também são visualizados os sinais relativos aos carbonos aromáticos conectados aos grupos OCH₃ (δ 147,8 para **6a** e **6b** ou δ 138,0 para **6c** e **6d**), acetamida (δ 143,0 para **6a** e **6b** ou δ 148,0 para **6c** e **6d**), sulfonamida (C1': δ 138,0 para **6a** e **6b** ou δ 134,0 para **6c** e **6d**; C1: δ 130,0 para **6a** e **6b** ou δ 132,0 para **6c** e **6d**), cadeia alílica (δ 134,1 para **6a** e δ 124,9 para **6c**) ou propílica (δ 134,0 para **6b** e δ 124,2 para **6d**) e OH (δ 124,2 para **6a** e **6b** ou δ 143,0 para **6c** e **6d**).

As atribuições feitas em ambos os espectros de ¹³C das substâncias **6a**, **6b**, **6c** e **6d** foram confirmadas por meio da análise dos subespectros DEPT-135 destas substâncias (FIGURAS 72, pág. 122, 73, pág. 123, 74, pág. 123 e 75, pág. 124, respectivamente).

A hidrólise de derivados amídicos aos respectivos amínicos requer condições mais drásticas, como altas temperaturas, excesso de reagentes e longos tempos reacionais (WANG et al., 2012). Os derivados **6a**, **6b**, **6c** e **6d**, inicialmente foram submetidos a reação de desacetilação em meio fortemente básico, utilizando para isso solução aquosa de NaOH, conforme metodologia apresentada no trabalho de Talagadadevi e colaboradores (2012). Entretanto, ao fim da reação obtiveram-se produtos que, após purificação em CCS e análise por espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C, observou-se não se tratar dos produtos finais propostos. Então, alterou-se as condições para a realização em meio ácido, usando-se solução aquosa de HCl, como consta no trabalho de Lahtinen e colaboradores (2014), a qual também não foi satisfatória, pois ao analisar a reação final por CCD, esta apresentava-se com padrão similar ao da reação de hidrólise básica anteriormente realizada.

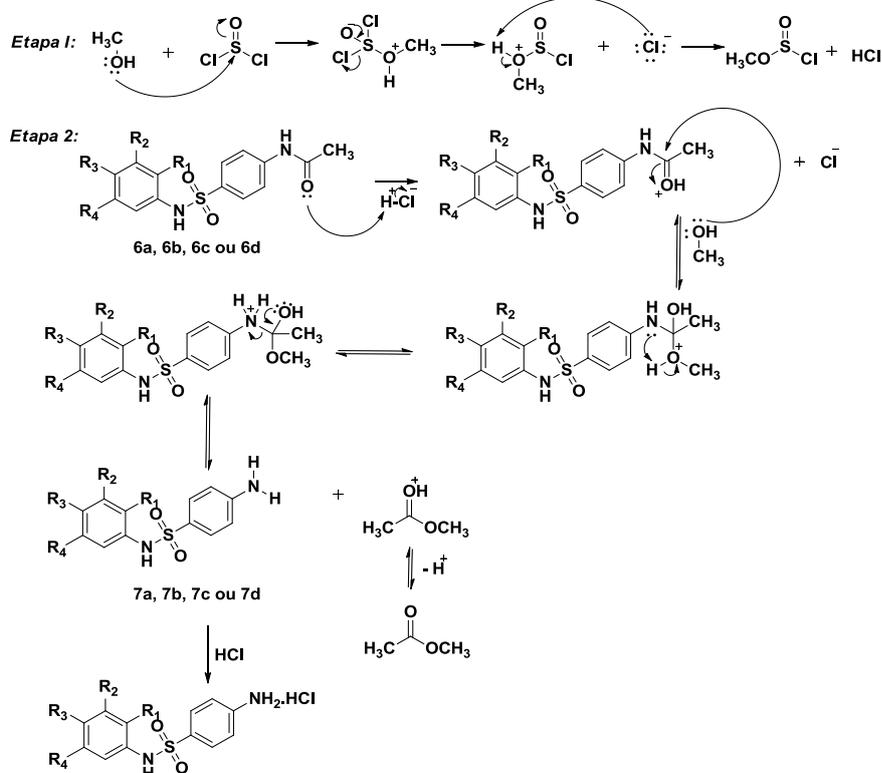
Com o insucesso das reações clássicas de hidrólise, em meio básico e ácido, empregou-se uma metodologia alternativa baseada no trabalho de Wang e colaboradores (2012), que se trata de uma reação de alcoólise catalisada por cloreto de tionila (SOCl₂). Esta abordagem sintética apresenta vantagens em relação às metodologias de hidrólise mais usuais, como a realização em temperatura ambiente e, em alguns casos, curtos tempos de reação. Segundo os autores, esta reação apresenta alta seletividade para a desacetilação de diversos derivados *N*-arilacetamídicos, incluindo *N*-arilsulfonamídicos, sem que houvesse alteração de outros grupos funcionais existentes na molécula, obtendo-se os produtos de interesse com altos rendimentos.

A partir desta metodologia alternativa foi possível obter os produtos finais desacetilados **7a**, **7b**, **7c** e **7d**, sendo que ambos tiveram suas estruturas caracterizadas por meio de espectroscopia de absorção na região do IV, por RMN ¹H e ¹³C e por EM, conforme será discutido adiante. As substâncias **7b** e **7d**, até o presente momento passaram por três diferentes procedimentos de purificação (CCS - hexano/acetato, 1:1, v/v; CCD preparativa -

clorofórmio/metanol, 9:1, v/v e CCS - hexano/acetato, 6:4, v/v), os quais não foram eficientes, apresentando traços de impurezas nos espectros de RMN de ^1H destas substâncias. Os rendimentos obtidos para os derivados finais **7a**, **7b**, **7c** e **7d** apresentaram valores inferiores aos relatados na literatura, no entanto satisfatórios ao propósito desse trabalho.

Em um primeiro momento da reação de obtenção dos derivados sulfonamídicos desacetilados **7a**, **7b**, **7c** e **7d** ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons do oxigênio do metanol ao átomo de enxofre do cloreto de tionila, seguido da eliminação do grupo abandonador na forma de íons cloreto que, após captar um próton, gera ácido clorídrico. Em um segundo momento, há a protonação do oxigênio da ligação π C=O seguido do ataque nucleofílico do par de elétrons do oxigênio do metanol à mesma e concomitante transferência de prótons intramolecular, com eliminação do grupo abandonador na forma de acetato de metila. Por fim, tem-se a formação dos derivados desacetilados **7a**, **7b**, **7c** e **7d** e seus cloridratos correspondentes (WANG et al., 2012). O mecanismo para a reação de obtenção dos produtos finais **7a**, **7b**, **7c** e **7d** é ilustrado na Figura 22.

Figura 22 - Mecanismo proposto para a reação de obtenção dos derivados sulfonamídicos desacetilados **7a**, **7b**, **7c** e **7d**.



Fonte: Adaptado de WANG et al., 2012.

Notas: **6a**, **6c**, **7a** e **7c**: $\text{R}_1 = \text{OH}$; $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$; $\text{R}_3 = \text{H}$; $\text{R}_4 = \text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$; **6b**, **6d**, **7b** e **7d**: $\text{R}_1 = \text{H}$; $\text{R}_2 = \text{OH}$; $\text{R}_3 = \text{OCH}_3$; $\text{R}_4 = \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$.

Dos dados fornecidos pela análise de espectroscopia de absorção na região do IV das substâncias **7a** (FIGURA 37, pág. 105), **7b** (FIGURA 38, pág. 105), **7c** (FIGURA 39, pág. 106) e **7d** (FIGURA 40, pág. 106), observam-se entre 3486 e 3250 cm^{-1} as bandas referentes aos estiramentos da ligação N-H do grupo sulfonamida e amino. Destacam-se as bandas correspondentes aos estiramentos da ligação S=O do grupo sulfonamida, como o estiramento assimétrico entre 1315 e 1314 cm^{-1} e o simétrico entre 1152 e 1132 cm^{-1} . Observam-se também as bandas características do eugenol e diidroeugenol, como bandas a aproximadamente 1622 e 1594 cm^{-1} (ν C=C do anel aromático); uma banda em 1515 cm^{-1} (ν C=C de alcenos); uma banda entre 1217 e 1210 cm^{-1} (ν C-O-C, referente ao grupo metoxila) e outra banda entre 1088 e 1085 cm^{-1} (ν C-N).

Nos espectros de RMN de ^1H das substâncias **7a** (FIGURA 76, pág. 124) e **7c** (FIGURA 78, pág. 125), notam-se os sinais relativos aos hidrogênios da cadeia alílica e em **7b** (FIGURA 77, pág. 125) e **7d** (FIGURA 79, pág. 126) os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia propílica. Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos derivados do eugenol e diidroeugenol são observados como um duplete a aproximadamente δ 6,62 (H4 para **7a** e **7b** e H3 para **7c** e **7d**) e como um multiplete a δ 6,51-6,50 (H6 para **7a**, **7b**, **7c** e **7d**). Os quatro hidrogênios aromáticos das substâncias **7a** e **7c** aparecem como dois multipletos a δ 7,38-7,33 (H2') e a δ 6,49-6,47 (H3'). Já para os derivados **7b** e **7d** apresentam-se como um duplete a δ 7,35 (H2') e como um multiplete a δ 6,48-6,47 (H3'). Entre δ 8,63 e 8,38 notam-se dois simpletos relacionados aos hidrogênios do grupo NH_2 . Os sinais dos hidrogênios do grupo OCH_3 , OH e sulfonamídico (NH_2SO_2) aparecem como um simpleto a δ 3,69 e δ 5,91, respectivamente. No intervalo entre δ 2,00 a 0,75 nos espectros de **7a** e **7c** observam-se os sinais que correspondem a traços de impurezas. Nos espectros de **7b** e **7d** há um simpleto em aproximadamente δ 2,08, além de outros sinais que também se tratam de traços de impurezas, possivelmente dos solventes utilizados durante as etapas de purificação. Estas impurezas dificultaram a integração de alguns sinais durante a análise espectral para estes derivados.

Nos espectros de RMN de ^{13}C das substâncias **7a** (FIGURA 80, pág. 126), **7b** (FIGURA 81, pág. 127), **7c** (FIGURA 82, pág. 127) e **7d** (FIGURA 83, pág. 128), observam-se os sinais referentes aos carbonos da cadeia alílica ou propílica, bem como o sinal do carbono do grupo metoxila. Os sinais relativos aos carbonos aromáticos hidrogenados derivados do eugenol ou diidroeugenol são visualizados a aproximadamente δ 109,0 e a δ 115,0, sendo o de maior δ referente ao carbono em posição *orto* (C6 para **7a** e **7b**) ou *meta* (C3 para **7c** e **7d**) em relação ao grupo sulfonamida. Já os sinais dos quatro carbonos aromáticos hidrogenados derivados do cloreto de *p*-acetamidobenzenossulfonila são notados a

aproximadamente δ 112,5 e 128,8, sendo o de maior δ correspondente aos carbonos em posição *meta* (C2') e o de menor δ aos carbonos em posição *orto* (C3') em relação ao grupo amino. A aproximadamente δ 153,0 (para **7c** e **7d**) ou δ 148,0 (para **7a** e **7b**) observa-se o sinal relativo ao carbono aromático conectado ao grupo NH₂. Os demais sinais dos carbonos aromáticos conectados aos grupos OCH₃, OH, acetamida, sulfonamida e a cadeia alílica ou propílica estão preservados em ambos os espectros de ¹³C das substâncias **7a**, **7b**, **7c** e **7d**. Com ajuda dos subspectros DEPT-135 de ambos os derivados finais **7a**, **7b**, **7c** e **7d** (FIGURAS 84, pág. 128, 85, pág. 129, 86, pág. 129, 87, pág. 130, respectivamente) foi possível localizar os sinais referentes aos carbonos aromáticos hidrogenados.

4.3 RESULTADOS DAS AVALIAÇÕES DO POTENCIAL BIOLÓGICO *IN VITRO*

Os oito derivados sulfonamídicos sintetizados (**6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **7a**, **7b**, **7c** e **7d**) bem como o eugenol, diidroeugenol e a sulfanilamida foram avaliados quanto ao potencial antibacteriano, antifúngico, antiproliferativo e tripanocida. Também foi avaliada a citotoxicidade dessas substâncias frente às células normais.

4.3.1 Resultados das avaliações do potencial antibacteriano, antifúngico e tripanocida

A ação dos protótipos (eugenol e diidroeugenol), sulfanilamida, produtos sintéticos intermediários (**6a**, **6b**, **6c** e **6d**) e finais (**7a**, **7b**, **7c** e **7d**) foram avaliados quanto ao potencial antibacteriano e antifúngico sobre cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) tanto de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 12228, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299), como também sobre leveduras do gênero *Candida* spp. (*Candida albicans* ATCC 64548, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida parapsilosis* ATCC 22019). Já o potencial tripanocida foi avaliado sobre formas epimastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.

Na avaliação do potencial antibacteriano e antifúngico, os produtos considerados ativos foram aqueles que promoveram a inibição do crescimento das espécies microbianas testadas em concentrações até 100 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto que na avaliação do potencial tripanocida, os produtos ativos foram aqueles que promoveram a inibição do crescimento do parasito em concentrações até 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Isso não implica necessariamente

que os demais produtos sejam desprovidos de atividade, mas sim que, se forem capazes de inibir o crescimento das espécies analisadas, essa inibição ocorre em concentrações acima de 100, 250 ou 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Tais concentrações não foram testadas por diferir muito das concentrações encontradas para as substâncias de referência em seu uso clínico, portanto, sem utilidade prática à primeira vista.

Os resultados das avaliações do potencial antibacteriano, antifúngico e tripanocida encontram-se reunidos na Tabela 6 (pág. 78). Nos três ensaios foram utilizados como controle positivo dos mesmos, os fármacos referência (cloranfenicol, fluconazol e benznidazol), sendo obrigatória a sua análise juntamente com os produtos de interesse, mesmo que não se objetive a comparação da atividade dos produtos avaliados com estes fármacos controle. Incluíram-se nestas avaliações, além da sulfanilamida, os protótipos eugenol e diidroeuogenol empregados na obtenção dos derivados sulfonamídicos, com o intuito de comparar a atividade biológica em função das modificações realizadas.

De acordo com os resultados obtidos no teste antibacteriano (TABELA 6), observou-se que dentre os oito derivados sulfonamídicos, aqueles que se mostraram ativos foram os derivados **7a**, **7b** e **7c**. Os derivados **7a** e **7b** foram ativos apenas contra *Bacillus cereus* (CI_{50} de 299,40 e 297,62 μM , respectivamente), sendo que **7c**, além da ação contra esta cepa (CI_{50} de 299,40 μM), também exibiu atividade contra *Staphylococcus aureus* (CI_{50} de 299,40 μM).

Dos protótipos analisados (eugenol e diidroeuogenol), nenhum foi capaz de inibir o crescimento microbiano nas concentrações avaliadas. Em um trabalho recente conduzido por Martins e colaboradores (2016), observou-se que a concentração inibitória do eugenol frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foi de 3,05 mM, e para *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* acima de 3,05 mM. Os autores Kalemba e Kunicka (2003), avaliando as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais, relataram a concentração inibitória de 3,05 mM do eugenol contra *Salmonella typhimurium*.

A sulfanilamida exibiu atividade contra *Escherichia coli* (CI_{50} de 581,40 μM), *Pseudomonas aeruginosa* (CI_{50} de 581,40 μM), *Staphylococcus aureus* (CI_{50} de 581,40 μM) e *Enterococcus faecalis* (CI_{50} de 290,70 μM), contudo a atividade do derivado **7c** contra *Staphylococcus aureus* foi superior. Cabe ressaltar que a sulfanilamida não apresentou atividade contra *Bacillus cereus*, diferentemente dos derivados **7a**, **7b** e **7c**.

Foram propostas nesse trabalho as trocas da cadeia lateral alílica do eugenol por uma cadeia propílica, e a posição do grupo sulfonamida, para avaliar como esses grupos e suas posições relativas afetariam a atividade biológica e a citotoxicidade. Pelos dados apresentados na avaliação do potencial antibacteriano, nota-se a importância do grupo amino aromático

livre, já que os derivados sulfonamídicos acetilados não inibiram o crescimento das espécies microbianas nas concentrações avaliadas. Isso corrobora os dados de relação estrutura-atividade para sulfas antibacterianas, discutido anteriormente (SEYDEL, 1968).

Com relação aos resultados encontrados no teste antifúngico (TABELA 6, pág. 78), pode-se notar que os derivados sulfonamídicos ativos foram **6a**, **6c**, **7a**, **7b**, **7c** e **7d**. Todos estes derivados inibiram o crescimento de *Candida glabrata* (CI₅₀ entre 664,89 e 748,50 µM), sendo os mais ativos os derivados sulfonamídicos acetilados do eugenol (**6a** e **6c**, CI₅₀ de 664,89 µM para ambos). Com exceção de **6a**, os outros cinco derivados também inibiram o crescimento de *Candida parapsilosis* (CI₅₀ entre 664,89 e 748,50 µM), tendo **6c** a melhor atividade (CI₅₀ de 664,89 µM). Além da inibição contra essas duas cepas de *Candida*, os derivados desacetilados **7c** e **7d** também exibiram atividade contra *Candida albicans* (CI₅₀ de 748,50 µM) e *Candida krusei* (CI₅₀ de 744,05 µM), respectivamente. Este é um dado importante, pois a *Candida krusei* apresenta resistência intrínseca ao fármaco referência (fluconazol), o qual foi observado na literatura tanto nos ensaios *in vitro*, como *in vivo* (OROZCO et al., 1998; GUINEA et al., 2006). Neste ensaio o valor de CI₅₀ do fluconazol contra esta cepa foi de 104,58 µM, valor acima do que foi encontrado para as outras espécies de *Candida* utilizadas no teste, confirmando o que é relatado na literatura.

O diidroeugenol exibiu melhor atividade antifúngica em relação ao eugenol frente *Candida albicans* (CI₅₀ de 753,01 µM) e *Candida parapsilosis* (CI₅₀ de 753,01 µM). Além disso, este fenilpropanoide exibiu atividade contra todas as cepas analisadas no teste, enquanto que o eugenol não inibiu o crescimento apenas da *Candida tropicalis*, o qual também foi observado com a sulfanilamida. No trabalho de Ahmad e colaboradores (2010), o valor encontrado da concentração inibitória do eugenol frente *Candida tropicalis* foi de 2,96 mM. A sulfanilamida apresentou melhor atividade antifúngica contra *Candida albicans* (CI₅₀ de 726,74 µM), *Candida krusei* (CI₅₀ de 180,23 µM), *Candida glabrata* (CI₅₀ de 726,74 µM) e *Candida parapsilosis* (CI₅₀ de 360,47 µM), quando comparado às atividades dos protótipos (eugenol e diidroeugenol) e dos derivados sulfonamídicos.

O derivado **7c** apresentou maior atividade frente *Candida albicans* (CI₅₀ de 748,50 µM) em relação ao protótipo eugenol (CI₅₀ de 1524,4 µM). O mesmo também foi observado com o derivado **7d**, o qual apresentou maior atividade antifúngica contra *Candida krusei* (CI₅₀ de 744,05 µM) que seu precursor, diidroeugenol (CI₅₀ de 1506 µM). Outro dado interessante é que todos os derivados sulfonamídicos que foram ativos contra *Candida glabrata* (**6a**, **6c**, **7a**, **7b**, **7c** e **7d**) apresentaram melhor atividade antifúngica quando comparado à atividade dos seus precursores (eugenol ou diidroeugenol) frente a essa cepa. Tais valores de CI₅₀ para estes

derivados encontram-se cerca de duas vezes menores em relação ao encontrado para as moléculas precursoras. Observou-se também que os valores de CI_{50} dos derivados sulfonamídicos desacetilados do diidroeugenol **7b** e **7d** (CI_{50} de 744,05 μ M) contra *Candida parapsilosis* foram próximos a do diidroeugenol (CI_{50} de 753,01 μ M).

Por meio dos resultados encontrados para a avaliação do potencial antifúngico, pode-se notar a importância da natureza da cadeia lateral alílica na atividade dos derivados acetilados (**6a**, **6b**, **6c** e **6d**), pois aqueles que inibiram o crescimento microbiano foram os derivados obtidos a partir do eugenol (**6a** e **6c**). Já com relação à estrutura-atividade dos derivados desacetilados (**7a**, **7b**, **7c** e **7d**), todos eles exibiram atividade sobre duas ou mais cepas de *Candida* spp. Contudo, os valores de CI_{50} encontrados foram próximos, o que não mostra uma relação clara entre a natureza da cadeia lateral ou a posição do grupo sulfonamida. Ao se comparar a atividade dos derivados acetilados com a dos derivados desacetilados, observa-se a influência do grupo acetila, uma vez que os derivados ativos (**6a** e **6c**) apresentaram melhores valores de CI_{50} .

Na Tabela 6 (pág. 78), encontram-se também os resultados da avaliação do potencial tripanocida e, ao contrário dos testes antimicrobianos comentados anteriormente, neste ensaio todos os derivados sulfonamídicos exibiram ação sobre a inibição do crescimento do parasito nas concentrações avaliadas. Ao comparar a atividade dos derivados acetilados (**6a**, **6b**, **6c** e **6d**), nota-se que o derivado **6b** apresentou melhor atividade (CI_{50} de 219,58 μ M), e para os derivados desacetilados (**7a**, **7b**, **7c** e **7d**), foi o derivado **7b** (CI_{50} de 217,26 μ M) o mais ativo. Curiosamente, ambos os derivados **6b** e **7b** apresentam a cadeia lateral propílica e o grupo sulfonamida em posição *orto* à hidroxila fenólica. O grupo acetila e amino não influenciaram na atividade tripanocida destes derivados, pois os valores de CI_{50} encontrados foram próximos. Todavia, nos derivados **6a** e **7a**, **6c** e **7c**, **6d** e **7d**, estes grupos contribuíram na atividade observada, nos quais notou-se que o grupo amino aromático livre influenciou positivamente na ação dos derivados **7a** (CI_{50} de 266,47 μ M) e **7c** (CI_{50} de 278,44 μ M), e o grupo acetila na ação do derivado **6d** (CI_{50} de 246,03 μ M).

Os derivados sulfonamídicos obtidos a partir do eugenol (**6a**, **6c**, **7a** e **7c**) exibiram maior atividade em relação ao protótipo. O mesmo também foi observado com os derivados sulfonamídicos obtidos a partir do diidroeugenol (**6b**, **6d**, **7b** e **7d**). Neste ensaio, a sulfanilamida mostrou-se muito menos ativa que as outras substâncias analisadas.

Tabela 6 - Resultados das avaliações do potencial antibacteriano, antifúngico e tripanocida *in vitro* dos derivados sulfonamídicos e de seus precursores (CI₅₀ e CI₉₀ em µM).

(continuação)

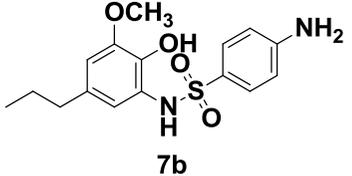
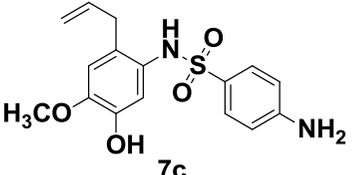
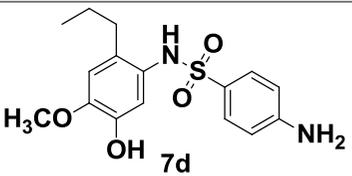
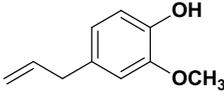
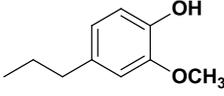
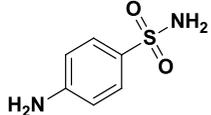
Substância		Ec ATCC 8739	St ATCC 14028	Pa ATCC 9027	Sa ATCC 12228	Bc ATCC 11778	Ef ATCC 51299	Ca ATCC 64548	Ct ATCC 750	Ck ATCC 6258	Cg ATCC 90030	Cp ATCC 22019	Tc Cepa Y
 7b	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	297,62	I ^a	I ^b	I ^b	I ^b	744,05	744,05	217,26
	CI ₉₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^b	I ^b	I ^b	I ^b	I ^b	NA
 7c	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	299,40	299,40	I ^a	748,50	I ^b	I ^b	748,50	748,50	278,44
	CI ₉₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	299,40	I ^a	I ^b	I ^b	I ^b	I ^b	I ^b	NA
 7d	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^b	I ^b	744,05	744,05	744,05	342,26
	CI ₉₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^b	I ^b	I ^b	I ^b	I ^b	NA
 Eugenol	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	1524,4	I ^b	1524,4	1524,4	I ^b	512,20
	CI ₉₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^b	I ^b	I ^b	I ^b	1524,4	NA
 Diidroeugenol	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	753,01	1506	1506	1506	753,01	403,61
	CI ₉₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	1506	I ^b	I ^b	I ^b	1506	NA

Tabela 6 - Resultados das avaliações do potencial antibacteriano, antifúngico e tripanocida *in vitro* dos derivados sulfonamídicos e de seus precursores (CI₅₀ e CI₉₀ em µM).

Substância	(conclusão)												
	Ec ATCC 8739	St ATCC 14028	Pa ATCC 9027	Sa ATCC 12228	Bc ATCC 11778	Ef ATCC 51299	Ca ATCC 64548	Ct ATCC 750	Ck ATCC 6258	Cg ATCC 90030	Cp ATCC 22019	Tc Cepa Y	
 Sulfanilamida	CI ₅₀	581,40	I ^a	581,40	581,40	I ^a	290,70	726,74	I ^b	180,23	726,74	360,47	> 1744,2
	CI ₉₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	1453,5	1453,5	360,47	I ^b	726,74	NA
Cloranfenicol	CI ₅₀	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	18,58	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CI ₉₀	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	77,40	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fluconazol	CI ₅₀	NA	NA	NA	NA	NA	NA	< 0,1	3,32	104,58	52,29	3,32	NA
Benznidazol	CI ₅₀	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	38,46

Fonte: Da autora.

Notas: Ec: *Escherichia coli*; St: *Salmonella typhimurium*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Bc: *Bacillus cereus*; Ef: *Enterococcus faecalis*; Ca: *Candida albicans*; Ct: *Candida tropicalis*; Ck: *Candida krusei*; Cg: *Candida glabrata*; Cp: *Candida parapsilosi*; Tc: *Trypanosoma cruzi*.

I^a: inativo até 100 µg.mL⁻¹; I^b: inativo até 250 µg.mL⁻¹; NA: não avaliado.

4.3.2 Resultado da avaliação do potencial de citotoxicidade sobre linhagem celular normal

A ação dos protótipos (eugenol e diidroeugenol), sulfanilamida, produtos sintéticos intermediários (**6a**, **6b**, **6c** e **6d**) e finais (**7a**, **7b**, **7c** e **7d**) foram avaliados quanto ao potencial citotóxico frente à linhagem celular normal de fibroblasto renal de hamster (BHK-21). A partir destes dados, pode-se calcular o Índice de Seletividade (IS) de cada substância, o que traduz sua toxicidade seletiva. Na Tabela 7 (pág. 82) encontram-se os resultados obtidos nesse experimento.

Analisando-se o índice de seletividade dos derivados sulfonamídicos em relação à atividade antibacteriana, verifica-se que os valores de CC_{50} e IS mais promissores foram observados com o derivado **7c** frente à *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (CC_{50} de 371,26 μ M e IS de 1,24). Para a sulfanilamida, o melhor valor de IS encontrado foi contra *Enterococcus faecalis* (IS de 2,12). A atividade dessas moléculas contra estas diferentes cepas se destaca por apresentar uma concentração inibitória (CI_{50}) menor que a concentração citotóxica (CC_{50}).

Em relação à atividade antifúngica, o perfil de toxicidade seletiva para as substâncias testadas foi semelhante, apresentando valores de IS muito próximos. Os valores de CI_{50} encontrados contra as espécies fúngicas testadas foram superiores ao CC_{50} , indicando que tanto os derivados sulfonamídicos quanto os protótipos, eugenol e diidroeugenol, foram mais tóxicos. Já a sulfanilamida apresenta a menor toxicidade e, conseqüentemente, os melhores valores de IS, que foram observados frente às espécies *Candida krusei* (IS de 3,42) e *Candida glabrata* (IS de 1,77).

Frente à atividade antiepipimastigota, nota-se que o derivado **7c** apresenta, quando comparado aos outros derivados sulfonamídicos e ao seu precursor, eugenol, o melhor índice de seletividade (IS de 1,33) sendo, desse modo, menos tóxico que as outras substâncias analisadas.

Por fim, conclui-se que a hibridação molecular de eugenol ou diidroeugenol e uma subunidade sulfonamídica é interessante, pois resultou, em alguns casos, em produtos menos tóxicos que seu precursor, e com maior atividade antimicrobiana e tripanocida, apesar de os valores de CI_{50} encontrados serem maiores que aqueles obtidos para os fármacos referência. Outras modificações estruturais podem ser feitas nas substâncias obtidas, a fim de se obter produtos com maior potência e menor toxicidade.

Tabela 7 - Resultados da avaliação do potencial citotóxico *in vitro* dos derivados sulfonamídicos e de seus precursores sobre a linhagem celular normal de fibroblasto renal de hamster (BHK-21) (CI₅₀ e CC₅₀ em µM).

(continua)

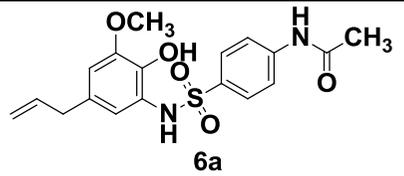
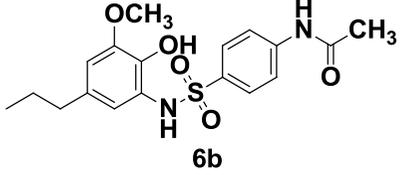
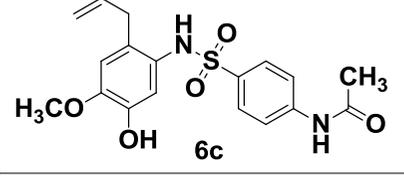
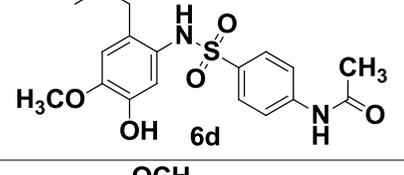
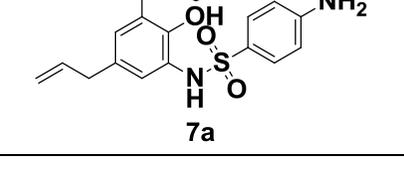
Substância	Ec ATCC 8739	St ATCC 14028	Pa ATCC 9027	Sa ATCC 12228	Bc ATCC 11778	Ef ATCC 51299	Ca ATCC 64548	Ct ATCC 750	Ck ATCC 6258	Cg ATCC 90030	Cp ATCC 22019	Tc Cepa Y	CC ₅₀
 6a	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^b	I ^b	I ^b	664,89	I ^b	361,70	212,77
	IS	-	-	-	-	-	-	-	-	0,32	-	0,59	
 6b	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^b	I ^b	I ^b	I ^b	I ^b	219,58	198,41
	IS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,90	
 6c	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^b	I ^b	I ^b	664,89	664,89	420,21	263,30
	IS	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	0,40	0,63	
 6d	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	I ^b	I ^b	I ^b	I ^b	I ^b	246,03	195,77
	IS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,80	
 7a	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	299,40	I ^b	I ^b	I ^b	748,50	748,50	266,47	197,60
	IS	-	-	-	-	0,66	-	-	-	0,26	0,26	0,74	

Tabela 7 - Resultados da avaliação do potencial citotóxico *in vitro* dos derivados sulfonamídicos e de seus precursores sobre a linhagem celular normal de fibroblasto renal de hamster (BHK-21) (CI₅₀ e CC₅₀ em µM).

(continuação)

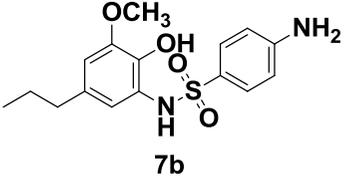
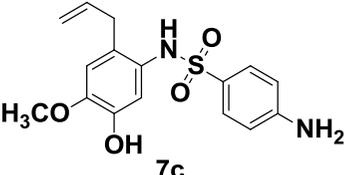
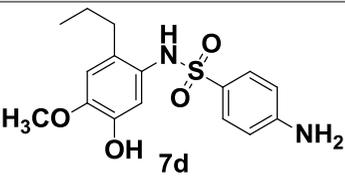
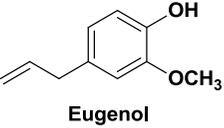
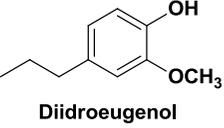
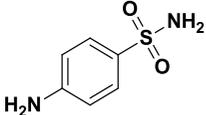
Substância	CI ₅₀	Ec	St	Pa	Sa	Bc	Ef	Ca	Ct	Ck	Cg	Cp	Tc	CC ₅₀
		ATCC 8739	ATCC 14028	ATCC 9027	ATCC 12228	ATCC 11778	ATCC 51299	ATCC 64548	ATCC 750	ATCC 6258	ATCC 90030	ATCC 22019	Cepa Y	
 7b	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	I ^a	297,62	I ^a	I ^b	I ^b	I ^b	744,05	744,05	217,26	151,79
	IS	-	-	-	-	0,51	-	-	-	-	0,20	0,20	0,70	
 7c	CI ₅₀	I ^a	I ^a	I ^a	299,40	299,40	I ^a	748,50	I ^b	I ^b	748,50	748,50	278,44	371,26
	IS	-	-	-	1,24	1,24	-	0,50	-	-	0,50	0,50	1,33	
 7d	CI ₅₀	I ^a	I ^b	I ^b	744,05	744,05	744,05	342,26	238,10					
	IS	-	-	-	-	-	-	-	-	0,32	0,32	0,32	0,70	
 Eugenol	CI ₅₀	I ^a	1524,4	I ^b	1524,4	1524,4	I ^b	512,20	359,76					
	IS	-	-	-	-	-	-	0,24	-	0,24	0,24	-	0,70	
 Diidroeugenol	CI ₅₀	I ^a	753,01	1506	1506	1506	753,01	403,61	361,45					
	IS	-	-	-	-	-	-	0,48	0,24	0,24	0,24	0,48	0,90	

Tabela 7 - Resultados da avaliação do potencial citotóxico *in vitro* dos derivados sulfonamídicos e de seus precursores sobre a linhagem celular normal de fibroblasto renal de hamster (BHK-21) (CI₅₀ e CC₅₀ em µM).

Substância													(conclusão)
	Ec ATCC 8739	St ATCC 14028	Pa ATCC 9027	Sa ATCC 12228	Bc ATCC 11778	Ef ATCC 51299	Ca ATCC 64548	Ct ATCC 750	Ck ATCC 6258	Cg ATCC 90030	Cp ATCC 22019	Tc Cepa Y	CC ₅₀
 Sulfanilamida	CI ₅₀ 581,40	I ^a	581,40	581,40	I ^a	290,70	726,74	I ^b	180,23	726,74	360,47	>1744,2	616,28
	IS 1,06	-	1,06	1,06	-	2,12	0,85	-	3,42	0,85	1,71	< 0,35	

Fonte: Da autora.

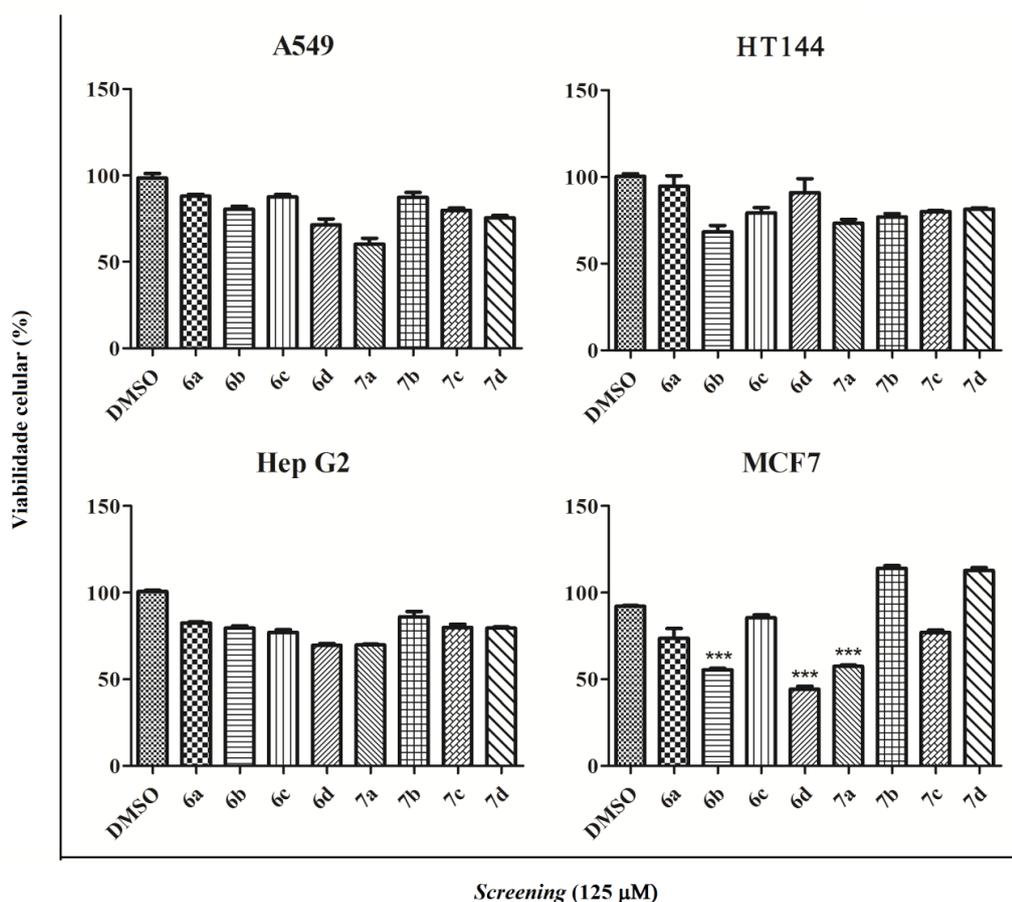
Notas: Ec: *Escherichia coli*; St: *Salmonella typhimurium*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Bc: *Bacillus cereus*; Ef: *Enterococcus faecalis*; Ca: *Candida albicans*; Ct: *Candida tropicalis*; Ck: *Candida krusei*; Cg: *Candida glabrata*; Cp: *Candida parapsilosi*; Tc: *Trypanosoma cruzi*.

I^a: inativo até 100 µg.mL⁻¹; I^b: inativo até 250 µg.mL⁻¹; IS: Índice de Seletividade, dado pela razão CC₅₀/CI₅₀.

4.3.3 Resultado da avaliação do potencial antiproliferativo

Inicialmente, os derivados sulfonamídicos do eugenol (**6a**, **6c**, **7a** e **7c**) e diidroeuugenol (**6b**, **6d**, **7b** e **7d**) foram avaliados frente às linhagens tumorais A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), HT144 (melanoma humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MCF7 (adenocarcinoma de mama humano). Nesta varredura inicial, as culturas foram tratadas com as substâncias na concentração de 125 μM por 48 horas. O resultado demonstrou que os derivados sulfonamídicos acetilados do diidroeuugenol, **6b** e **6d**, e desacetilado do eugenol, **7a**, foram efetivos em reduzir a viabilidade das culturas de MCF7, após as 48 horas de tratamento (FIGURA 23). Frente à linhagem MCF7 o tratamento com os derivados **6b**, **6d** e **7a** ocasionou 45, 56 e 43% de inibição da viabilidade, respectivamente.

Figura 23 - Viabilidade celular determinada por ensaio de Resazurina, após 48h de tratamento com os derivados sulfonamídicos do eugenol e diidroeuugenol na concentração de 125 μM .



Fonte: Da autora.

Nota: *** Estatisticamente diferente ($p < 0,001$) do grupo controle de acordo com análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Considerando os resultados mais promissores, curvas dose-resposta foram realizadas com o objetivo de se identificar o valor de CI_{50} , que equivale à concentração que inibe 50% do crescimento celular. Para isso as culturas de MCF7 foram tratadas com diferentes concentrações (31,25; 62,50; 125; 250 e 500 μM) de **6b**, **6d** e **7a** e os valores de CI_{50} obtidos corresponderam à $133,80 \pm 2,36$, $116,60 \pm 1,83$ e $164,90 \pm 6,13$ μM , respectivamente (TABELA 8). No presente trabalho, também foi avaliada a possível influência dos precursores (eugenol, diidroeuogenol e sulfanilamida) sobre a viabilidade de células MCF7, para comparação. Os valores de CI_{50} obtidos foram superiores a 1500 μM para eugenol e diidroeuogenol e superior a 1000 μM para sulfanilamida. Os dados demonstram que os derivados sulfonamídicos **6b**, **6d** e **7a** são mais eficientes em reduzir a viabilidade de células MCF7 quando comparado aos seus precursores.

Tabela 8 - Valores de $CI_{50} \pm DP$ (μM) determinados a partir dos resultados obtidos no ensaio de Resazurina para a linhagem MCF7.

Substância	MCF7
6b	$133,80 \pm 2,36$
6d	$116,60 \pm 1,83$
7a	$164,90 \pm 6,13$
Eugenol	> 1500,00
Diidroeuogenol	> 1500,00
Sulfanilamida	> 1000,00

Fonte: Da autora.

O efeito sobre a viabilidade celular dos derivados **6b**, **6d** e **7a** também foi avaliado sobre a linhagem CCD-1059Sk, derivada de fibroblastos normais de pele humana. De acordo com os valores de CI_{50} obtidos (TABELA 9), nota-se que a citotoxicidade é menor na célula normal utilizada no estudo quando comparado à célula tumoral. Os resultados obtidos a partir do cálculo do índice de seletividade (IS) demonstram que o derivado **6b** possui alta seletividade para células tumorais (IS de 2,11). Segundo Suffness, Pezzuto, Hostettmann (1991), o IS é um indicativo da potencial utilização da substância em ensaios clínicos. Por conseguinte, um valor maior que 2,0 é indicativo de alta seletividade da substância para células tumorais.

Tabela 9 - Índices de seletividade calculados com base nos valores de CI_{50} obtidos por ensaio de Resazurina para as linhagens MCF7 e CCD-1059Sk.

Substância	MCF7	CCD-1059Sk	IS
6b	133,80	282,80	2,11
6d	116,60	185,90	1,59
7a	164,90	215,80	1,31

Fonte: Da autora.

Nota: IS - Índice de Seletividade, dado pela razão $CI_{50}CCD-1059Sk / CI_{50}MCF7$.

A cinética de progressão do ciclo celular também foi avaliada. Assim sendo, as culturas de MCF7 foram tratadas por 48 horas com os derivados **6b**, **6d** e **7a**, nas concentrações 133, 116 e 164 mM, respectivamente, que correspondem ao valor de IC_{50} . Os resultados obtidos por citometria de fluxo estão apresentados na Tabela 10 e na Figura 24. Nas culturas tratadas com o derivado **6b** houve aumento significativo do número de células em G0/G1 com concomitante redução das populações S e G2/M. O tratamento com **6d** e **7a** também alterou o perfil de distribuição de células MCF7 nas diferentes fases do ciclo celular, com acúmulo de células em G0/G1. Os resultados indicam, portanto, que o tratamento com os derivados sulfonamídicos em estudo, induziu bloqueio da transição G1/S em células MCF7.

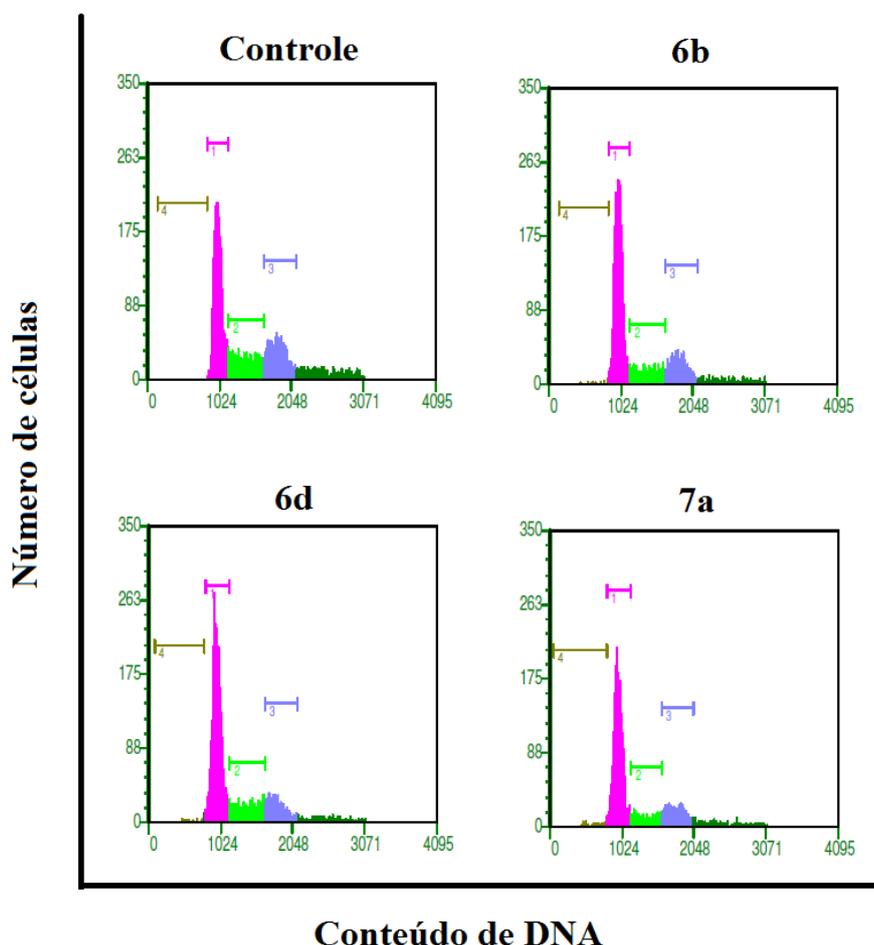
Tabela 10 – Porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular após 48 horas de tratamento com as substâncias **6b**, **6d** e **7a** à 133, 116 e 164 μ M, respectivamente.

Substância	SubG1	G0/G1	S	G2/M
Controle (DMSO 0,1%)	0,23 \pm 0,11	54,20 \pm 4,37	20,53 \pm 2,71	26,82 \pm 1,78
6b	1,35 \pm 0,26	61,90 \pm 0,22***	16,64 \pm 0,39*	20,11 \pm 0,09*
6d	1,24 \pm 0,17	64,87 \pm 0,82***	17,15 \pm 1,84	16,73 \pm 0,85**
7a	1,74 \pm 0,31*	64,89 \pm 0,83***	12,16 \pm 0,29*	20,14 \pm 0,82*

Fonte: Da autora.

Nota: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 24 - Histogramas da distribuição celular da linhagem MCF7 quando exposta ao tratamento com as substâncias **6b**, **6d** e **7a** por 48h.



Fonte: Da autora.

Diante dos estudos preliminares, os derivados **6b**, **6d** e **7a** apresentaram atividade antiproliferativa promissora frente células derivadas de adenocarcinoma de mama, considerando que a atividade observada foi em média 10 vezes maior em relação aos seus precursores. Ainda, os resultados indicaram bloqueio da transição G1/S, considerado um momento crítico para a proliferação celular (DURONIO; XIONG, 2013). De acordo com Malumbres, Barbacid (2009), moléculas que agem sobre o comportamento proliferativo das células influenciando as transições de fase são consideradas potenciais agentes antitumorais. Neste contexto, os derivados sulfonamídicos aqui estudados representam moléculas promissoras que comportam estudos futuros para elucidar os mecanismos envolvidos com a atividade antiproliferativa observada frente células derivadas de diferentes linhagens de câncer de mama, além de servirem de protótipos para estudos de otimização estrutural.

5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram planejados e sintetizados oito derivados sulfonamídicos inéditos, a partir da técnica de hibridação molecular, envolvendo o eugenol ou seu análogo, diidroeuogenol. A identidade estrutural destes derivados foi confirmada através dos métodos espectroscópicos usuais de IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM.

Na avaliação antibacteriana, os análogos desacetilados **7a**, **7b** e **7c** exibiram atividade frente *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, com valores de CI_{50} menores que o da sulfanilamida. Nesta avaliação tanto eugenol como diidroeuogenol não foram ativos nas concentrações testadas. Notou-se a importância do grupo amino aromático livre neste ensaio, já que os derivados sulfonamídicos acetilados não inibiram o crescimento das espécies microbianas nas concentrações avaliadas.

Na avaliação antifúngica, os derivados **6a**, **6c**, **7a**, **7b**, **7c** e **7d** foram ativos frente a uma ou mais cepas patogênicas ou oportunistas de *Candida* spp. e os valores de CI_{50} encontrados foram, em alguns casos, superiores ao de seus precursores. Observou-se, neste ensaio, a importância do grupo acetila e da natureza da cadeia lateral alílica na atividade, pois aqueles que inibiram o crescimento microbiano com os melhores valores de CI_{50} foram os derivados acetilados obtidos a partir do eugenol (**6a** e **6c**).

Na avaliação tripanocida, todos os oito derivados sulfonamídicos exibiram atividade superior ao da molécula precursora, destacando os análogos **6b** e **7b** que obtiveram os melhores valores de CI_{50} neste ensaio. Esses análogos eram derivados do diidroeuogenol e o grupo sulfonamida encontrava-se em posição *orto* à hidroxila fenólica.

Na avaliação antiproliferativa, os derivados **6b**, **6d** e **7a** foram cerca de dez vezes mais ativos que seus precursores frente a linhagem de adenocarcinoma de mama humano (MCF7). Os resultados encontrados indicam que estes análogos parecem induzir bloqueio da transição G1/S.

Na avaliação da citotoxicidade em células normais, o derivado **7c** mostrou-se menos tóxico nos testes antibacteriano e tripanocida, em relação aos outros derivados sulfonamídicos e aos precursores. O mesmo foi observado no teste antiproliferativo com o derivado **6b**, o qual exibiu maior seletividade à célula tumoral em relação à célula normal.

Assim sendo, através dos resultados apresentados neste estudo, a técnica de hibridação molecular envolvendo a subunidade sulfonamídica com o eugenol ou diidroeuogenol mostrou-se vantajosa em relação à atividade encontrada para os precursores, considerando os resultados obtidos com a avaliação do potencial antiproliferativo dos análogos **6b**, **6d** e **7a**,

que apresentaram valores de CI_{50} , em média, dez vezes menores que os valores encontrados para eugenol, diidroeugenol e sulfanilamida. Baseado nisto, essas moléculas servem de protótipos para otimização estrutural, com o objetivo de melhorar o seu potencial biológico.

REFERÊNCIAS

- ADDLA, D. et al. Design, synthesis and antimicrobial evaluation of novel 1-benzyl 2-butyl-4-chloroimidazole embodied 4-azafluorenones via molecular hybridization approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 7475–7480, 2012.
- AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1397-1421, 2006.
- AGRAWAL, V. K. et al. QSAR study on carbonic anhydrase inhibitors: aromatic/heterocyclic sulfonamides containing 8-quinoline-sulfonyl moieties, with topical activity as antiglaucoma agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 593-600, 2004.
- AHMAD, A. et al. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 1, p. 35-41, 2010a.
- AHMAD, A. et al. *In vitro* synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 1178-1184, 2010b.
- AHMAD, A. et al. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1157–1162, dez. 2010c.
- AHMAD, A. et al. *In vitro* synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 1178-1184, 2010.
- ARAÚJO, C. R. M. et al. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder®. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 868-873, 2015.
- ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. **Toxicology In Vitro**, v. 19, n. 8, p. 1025-1033, 2005.
- BADGUJAR, D. M. et al. Novel synthesis of biologically active nitro heterocyclic compounds. **Journal Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 54-57, 2008.
- BAHRAMI, K.; KHODAEI, M. M.; SOHEILIZAD, M. Direct conversion of thiols to sulfonyl chlorides and sulfonamides. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 24, p. 9287-9291, 2009.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, J. D. et al. Structure-activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 68, n. 11, p. 1478-1483, 2012.

BARBOSA, M. L. C. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of N-phenyl-acetamide sulfonamides designed as novel non-hepatotoxic analgesic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 3612-3620, 2009.

BARBOSA, T. P. et al. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 4250–4256, 2011.

BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2 ed. Ed.: Artmed, Porto Alegre, 2008.

BASKARAN, Y.; PERIYASAMY, V.; VENKATRAMAN, A. C. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicology**, v. 268, p. 204-212, 2010.

BELLAMY, F. D; OU, K. Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 8, p. 839–842, 1984.

BENENCIA, F.; COURRGES, M. C. *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol on human herpes virus. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 495–500, 2000.

BOCANEGRA-GARCIA, V. et al. Synthesis and biological evaluation of new sulfonamide derivatives as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 1039-1044, 2012.

BONK, J. D.; AMOS, D. T.; OLSON, S. J. Convenient one-pot synthesis of sulfonamides from thiols using trichloroisocyanuric acid. **Synthetic Communications**, v. 37, n. 12, p. 2039-2050, 2007.

BORGES, A. D. L. et al. Síntese de sulfadiazina e sulfadiazina de prata em escala semi-micro: prática experimental em síntese de fármacos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p.727-731, 2005.

BOUFAS, W. et al. Synthesis and antibacterial activity of sulfonamides. SAR and DFT studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1074, p. 180-185, 2014.

BOUCHAIN, G. et al. Development of potential antitumor agents. Synthesis and biological evaluation of a new set of sulfonamide derivatives as histone deacetylase inhibitors. **The Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 820-830, 2003.

BOYD, A. E. Sulfonylurea receptors, ion channels, and fruit flies. **Diabetes**, v. 37, p. 847-850, 1988.

BROWN, G. M. The Biosynthesis of Folic Acid - II. Inhibition of Sulfonamides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 2, 1962.

CAMARGO-ORDEÑEZ, A. et al. Efficient synthesis of sulfonamide derivatives on solid supports catalyzed using solvent-free and microwave-assisted methods. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 787-791, 2011.

CANALES L.; BANDYOPADHYAY, D.; BANIK, B. K. Bismuth nitrate pentahydrate-induced novel nitration of eugenol. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, n. 9, 2011.

CAPASSO, C.; SUPURAN, C. T. Sulfa and trimethoprim-like drugs – antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 379-387, 2014.

CARRASCO, H. et al. Antifungal activity of eugenol analogues. Influence of different substituents and studies on mechanism of action. **Molecules**, v. 17, p. 1002-1024, 2012.

CASTRO, J. L. et al. Synthesis and biological activity of 3-[2-(dimethylamino)ethyl]-5-[(1,1-dioxo-5-methyl-1,2,5-thiadiazolidin-2-yl)-methyl]-*1H*-indole and analogues: agonists for the 5-HT_{ID} receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 3023-3032, 1994.

CHAUDHARY, V. et al. Scaffold-hopping and hybridization based design and building block strategic synthesis of pyridineannulated purines: discovery of novel apoptotic anticancer agents. **RSC Advances**, v. 5, p. 26051–26060, 2015.

CHENG, X. C. et al. Role of sulfonamide group in matrix metalloproteinase inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 368-373, 2008.

CHEN, Q-H.; RAO, P. N. P.; KNAUS, E. E. Design, synthesis, and biological evaluation of *N*-acetyl-2-carboxybenzenesulfonamides: a novel class of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 2459-2468, 2005.

CHEN, T-C. et al. Structure-based hybridization, synthesis and biological evaluation of novel tetracyclic heterocyclic azathioxanthone analogues as potential antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 103, p. 615-627, 2015.

CHIBALE, K. et al. Antiprotozoal and cytotoxicity evaluation of sulfonamide and urea analogues of quinacrine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 2655-2657, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Third Edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility testes for bacteria that grow aerobically. Approved Standard-Tenth Edition. M07-A10. Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 90-96, 2014.

CORY, A. H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Commun**, v. 3, p. 207-212, 1991.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CREMLYN, R. J. **Chlorosulfonic Acid: A Versatile Reagent**. The Royal Society of Chemistry, 2002.

DANIEL, A. N. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 212-217, 2009.

DAS, B. et al. Eugenol provokes ROS-mediated membrane damage associated antibacterial activity against clinically isolated multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 9, p. 11-19, 2016.

DE LUCA, L.; GIACOMELLI, G. An easy microwave-assisted synthesis of sulfonamides directly from sulfonic acids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 3967-3969, 2008.

DEEB, O. et al. Effect of the electronic and physicochemical parameters on the carcinogenesis activity of some sulfa drugs using QSAR analysis based on genetic-MLR and genetic-PLS. **Chemosphere**, v. 67, p. 2122-2130, 2007.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107-115, 2010.

DIAS, K. S. et al. Semisynthesis and antimicrobial activity of novel guttiferone-A derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 2713-2720, 2012.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2745-2749, 2006.

DOMAGK, G. A contribution to the chemotherapy of bacterial infections. **Deutsche medizinische Wochenschrift.**, v. 61, p. 250-253, 1935.

DOMÍNGUEZ, J. N. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. **Il Farmaco**, v. 60, p. 307-311, 2005.

DURONIO, R. J.; XIONG, Y. Signaling pathways that control cell proliferation. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, v. 5, n. 3, 2013.

FACCHINETTI, V. et al. Evaluation of (2*S*,3*R*)-2-(amino)-[4-(*N*-benzylarenesulfonamido)-3-hydroxy-1-phenylbutane derivatives: a promising class of anticancer agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, p. 533-542, 2014.

- FORTIN, S. et al. Substituted phenyl 4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)benzenesulfonamides as antimitotics. Antiproliferative, antiangiogenic and antitumoral activity, and quantitative structure-activity relationships. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5327-5342, 2011.
- FUNAHASHI, Y. et al. Sulfonamide derivative, E7820, is a unique angiogenesis inhibitor suppressing an expression of integrin $\alpha 2$ subunit on endothelium. **Cancer Research**, v. 62, p. 6116-6123, 2002.
- GAMBLE, A. B. et al. Aryl nitro reduction with iron powder or stannous chloride under ultrasonic irradiation. **Synthetic Communications**, v. 37, n. 16, p. 2777-2786, 2007.
- GILBERT, E. E. et al. Sulfonation and Sulfation with Sulfur Trioxide. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 2065-2072, 1953.
- GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 1-9, 2006.
- GITTO, R. et al. Identification of 3,4-dihydroisoquinoline-2(1H)-sulfonamides as potent carbonic anhydrase inhibitors: synthesis, biological evaluation, and enzyme-ligand x-ray studies. **The Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 2401-2408, 2010.
- GREENE, T. W.; HUTS, P. G. M. **Greene's Protective Groups in Organic Synthesis**. 4 ed. Ed. John Wiley & Sons, New Jersey, 2007.
- GUINEA, J. et al. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: The contribution of efflux-pumps. **Medical Mycology**, v. 44, p. 575-578, 2006.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of eugenol: a structure-activity relationship study. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 9, p. 975-985, 2011.
- HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v. 16, p. 997-1005, 2009.
- HUGHES, E. D.; INGOLD, C. K.; REED, R. I. Kinetics and Mechanism of Aromatic Nitration. Part II. **Journal of the Chemical Society**, p. 2400-2440, 1950.
- IBRAHIM, H. S. et al. Improvement of antibacterial activity of some sulfa drugs through linkage to certain phthalazin-1-(2H)-one scaffolds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 480-486, 2014.
- JEONG, K. J. et al. Effects of eugenol on hepatic glucose production and AMPK signaling pathway in hepatocytes and C57BL/6J mice. **Fitoterapia**, v. 93, p. 150-162, 2014.
- JÚNIOR, P. L. S. et al. Apoptotic effect of eugenol involves G2/M phase abrogation accompanied by mitochondrial damage and clastogenic effect on cancer cell *in vitro*. **Phytomedicine**, v. 23, p. 725-735, 2016.

KABUTO, H.; TADA, M.; KOHNO, M. Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 423–427, 2007.

KALARIA, P. N. et al. Design, synthesis and molecular docking of novel bipyrazolyl thiazolone scaffold as a new class of antibacterial agents. **Medicinal Chemistry Communication**, v. 5, p. 1555-1562, 2014.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 813-829, 2003.

KANDA, Y. et al. Synthesis and structure-activity relationships of potent and orally active sulfonamide ET_B selective antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 897-907, 2001.

KAMAL, A. et al. Synthesis and apoptosis inducing ability of new anilino substituted pyrimidine sulfonamides as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5817-5824, 2011.

KAMAL, A. et al. Synthesis, biological evaluation of new oxazolidino-sulfonamides as potential antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 661-669, 2013.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol - From the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6953–6981, 2012.

KARTHIKEYAN, C. et al. Design, synthesis and biological evaluation of some isatin-linked chalcones as novel anti-breast cancer agents: A molecular hybridization approach. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, p. 325-330, 2013.

KAUFMAN, T. S. The multiple faces of Eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1055-1085, 2015.

KHAN, M. O. Trypanothione reductase: a viable chemotherapeutic target for antitrypanosomal and antileishmanial drug design. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 129-146, 2007.

KORNFELD, O.; NICHOLS, B. P. Vitamin B3 confers resistance to sulfa drugs in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 137-141, 2005.

KWON, Y. et al. Design, synthesis, and biological activity of sulfonamide analogues of antofine and cryptopleurine as potent and orally active antitumor agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 7749-7762, 2015.

KUMAR, P. S.; RAI, K. M. L. Reduction of aromatic nitro compounds to amines using zinc and aqueous chelating ethers: Mild and efficient method for zinc activation. **Chemical Papers**, v. 66, n. 8, p. 772–778, 2012.

- LAL, J. et al. Biological activity, design, synthesis and structure activity relationship of some novel derivatives of curcumin containing sulfonamides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 579-588, 2013.
- LAHTINEN, M. et al. Synthesis, characterization, thermal and antimicrobial studies of *N*-substituted sulfanilamide derivatives. **Journal Molecular Structure**, v. 1060, p. 280-290, 2014.
- LAYEK, K. et al. Nanocrystalline magnesium oxide stabilized palladium(0): An efficient reusable catalyst for room temperature selective aerobic oxidation of alcohols. **Journal Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 4, p. 606-616, 2011.
- LAZAR, C. et al. Drug evolution concept in drug design: 1. Hybridization Method. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 27, p. 6973-6982, 2004.
- LI, W. et al. Influence of surfactant and oil composition on the stability and antibacterial activity of eugenol nanoemulsions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 39-47, 2015.
- LI, X.; ZHANG, Y. One pot preparation of amides from azo compounds by Sm/TiCl₄. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 52, n. 6, p. 1219-1222, 2005.
- MACHADO, M. et al. Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 4, p. 732-739, 2011.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.
- MARTINS, R. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic evaluation of eugenol derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, p. 2360-2367, 2016.
- MASTROLORENZO, A.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Antifungal activity of silver and zinc complexes of sulfadruug derivatives incorporating arylsulfonylureido moieties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 99-107, 2000.
- NAIK, S. et al. Mild and eco-friendly chemoselective acylation of amines in aqueous medium. **ARKIVOC**, p. 55-63, 2004.
- NAM, H.; KIM, M. Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 106-112, 2013.
- NEFF, K. M.; NAWARSKAS, J. J. Hydrochlorothiazide *versus* Chlorthalidone in the management of hypertension. **Cardiology in Review**, v. 18, n. 1, p. 51-56, 2010.
- NOBEL LECTURE. **Gerhard Domagk - Further progress in chemotherapy of bacterial infections**. 12 de dezembro de 1947.
- OROZCO, A. S. et al. Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2645-2649, 1998.

- PARKER, M. H. et al. Novel, broad-spectrum anticonvulsants containing a sulfamide group: advancement of *N*-((Benzo[*b*]thien-3-yl)methyl)sulfamide (JNJ-26990990) into human clinical studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 7528-7536, 2009.
- PARODI, T. V. et al. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology (Part C)**, v. 155, p. 462-468, 2012.
- PASHA, M. A.; JAYASHANKARA, V. P. Reduction of aryl nitro compounds to azoarenes and/or arylamines by Al/NaOH in methanol under ultrasonic conditions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, p. 433-435, 2005.
- PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy**. 4 ed. Cengage Learning, Washington, 2010.
- PORCAL, W. et al. New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 6995–7004, 2008.
- RANE, R. A.; TELVEKAR, V. N. Synthesis and evaluation of novel chloropyrrole molecules designed by molecular hybridization of common pharmacophores as potential antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 5681-5685, 2010.
- RENAULT, S. et al. The use of Eugenol and electro-narcosis as anaesthetics: Transcriptional impacts on the European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p. 1573-1577, 2011.
- RICHEY, D. P.; BROWN, G. M. The Biosynthesis of Folic Acid – IX. Purification and properties of the enzymes required for the formation of dihydropteroic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 6, p. 1582-1592, 1969.
- SELBIE, F. R. The inhibition of the action of sulphanilamide in mice by *p*-aminobenzoic acid. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 21, p. 90-93, 1940.
- SEYDEL, J. K. Sulfonamides, structure-activity relationship, and mode of action. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 9, p. 1455-1478, 1968.
- SEYEDI, S. M. et al. Design, synthesis and SAR studies of 4-allyloxyaniline amides as potent 15-lipoxygenase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 1614-1622, 2009.
- SHI, M.; CUI, S. A new method for nitration of phenolic compounds. **Journal of Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 345, p. 1197-1202, 2003.
- SLAMENŇOVÁ, D. et al. Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. **Mutation Research**, v. 677, p. 46-52, 2009.

SILVA, C. R. et al. Genotoxic, cytotoxic, antigenotoxic, and anticytotoxic effects of sulfonamide chalcone using the Ames Test and the mouse bone marrow micronucleus test. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015.

SMITH, K.; EL-HITI, G. A. Regioselective Control of Electrophilic Aromatic Substitution Reactions. **Current Organic Synthesis**, v. 1, p. 253-274, 2004.

SOLTANI RAD, M. N. et al. One-pot synthesis of sulfonamides from primary and secondary amine derived sulfonate salts using cyanuric chloride. **Synthesis**, n. 23, p. 3983-3988, 2009.

STORK, W. Prontosil. **Chemical & Engineering News**, v. 83, n. 25, 2005.

STRANIX, B. R. et al. Lysine sulfonamides as novel HIV-protease inhibitors: N ϵ -Acyl aromatic α -amino acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 3459-3462, 2006.

SUDARMA, I. M. et al. An efficient method on nitration of eugenol using NH₄NO₃ and KHSO₄. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 173-175, 2014.

SUDARMA, I. M.; ULFA, M.; SARKONO, S. Synthesis of 4-allyl-2-methoxy-6-aminophenol from natural eugenol. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 9, n.1, p. 84-88, 2009.

SUFFNESS, M., PEZZUTO, J. M.; HOSTETTMANN, K. Assays for Bioactivity in Methods in Plant Biochemistry. **Academic Press**, v. 6, p. 71-134, 1991.

SUPURAN, C. T. et al. Antiviral sulfonamide derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 189-200, 2004.

TAKAHASHI, K. et al. Novel Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase Inhibitor: indoline-based sulfamide derivatives with low lipophilicity and protein binding ratio. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1057-1065, 2010.

TALAGADADEEVI, G. B. et al. Synthesis of N-[4-({4-[(5-methyl-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl)sulfamoyl] phenyl}sulfamoyl)phenyl]amine: An impurity in the antibacterial drug sulfamethizole. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 4, n. 2, p. 134-136, 2012.

TITE, T. et al. Synthesis of N-aryl spiro-sulfamides as potential glycogen phosphorylase inhibitors. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 959-961, 2012.

TOLIKA, E. P.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. An Overview of Chromatographic Analysis of Sulfonamides in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 198-212, 2010.

TRÉFOUËL, J. et al. Activité du p-aminophénysulfamide sur les infections streptococciques. Expérimentales de la souris et du lapin. **Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales**, v. 120, p. 756-758, 1935.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99-105, 2011.

VIEGAS-JUNIOR, C. et al. Molecular Hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1829-1852, 2007.

WANG, X.; WAN, K.; ZHOU, C. Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4631-4639, 2010.

WANG, G. et al. A facile and efficient method for the selective deacylation of N arylacetamides and 2 chloro-Narylacetamides catalyzed by SOCl₂. **Research on Chemical Intermediates**, v. 38, p. 77-89, 2012.

WALSH, J. J.; BELL, A. Hybrid drugs for malaria. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 25, p. 2970-2985, 2009.

WILDEN, J. D. et al. Trichlorophenol (TCP) sulfonate esters: A selective alternative to pentafluorophenol (PFP) esters and sulfonyl chlorides for the preparation of sulfonamides. **Chemical Communications**, v. 10, p. 1074-1076, 2007.

WOODS, D. D. The relation of *p*-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphaniilamide. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 21, p. 74-90, 1940.

WRIGHT, S. W.; HALLSTROM, K. N. A convenient preparation of heteroaryl sulfonamides and sulfonyl fluorides from heteroaryl thiols. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 3, p. 1080-1084, 2006.

XU, J-G. et al. Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 21, p. 1194, 2016.

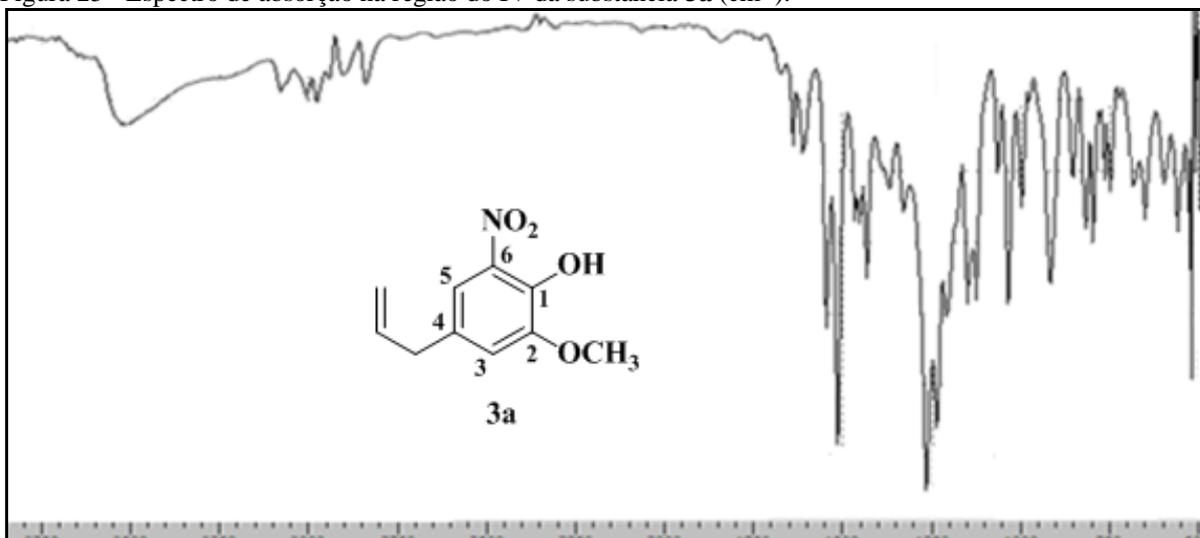
YEMPALA, T. et al. Molecular hybridization of bioactives: Synthesis and antitubercular evaluation of novel dibenzofuran embodied homoisoflavonoids via Baylis–Hillman reaction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 7426–7430, 2012.

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

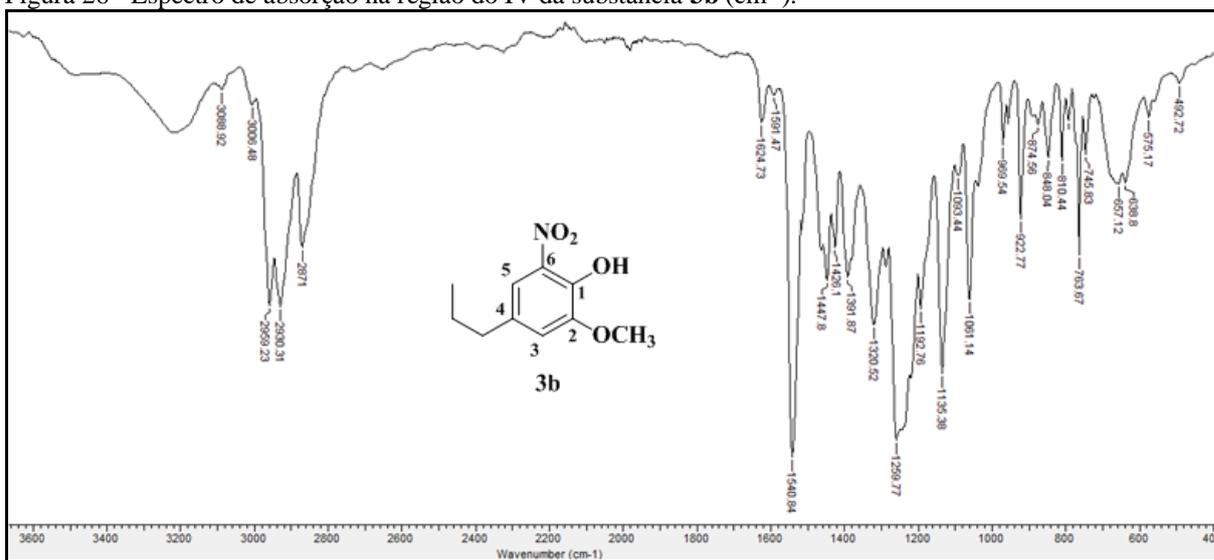
ZHANG, H. et al. Synthesis of novel sulfonamide azoles via C-N cleavage of sulfonamides by azole ring and relational antimicrobial study. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 7, p. 5776-5796, 2015.

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

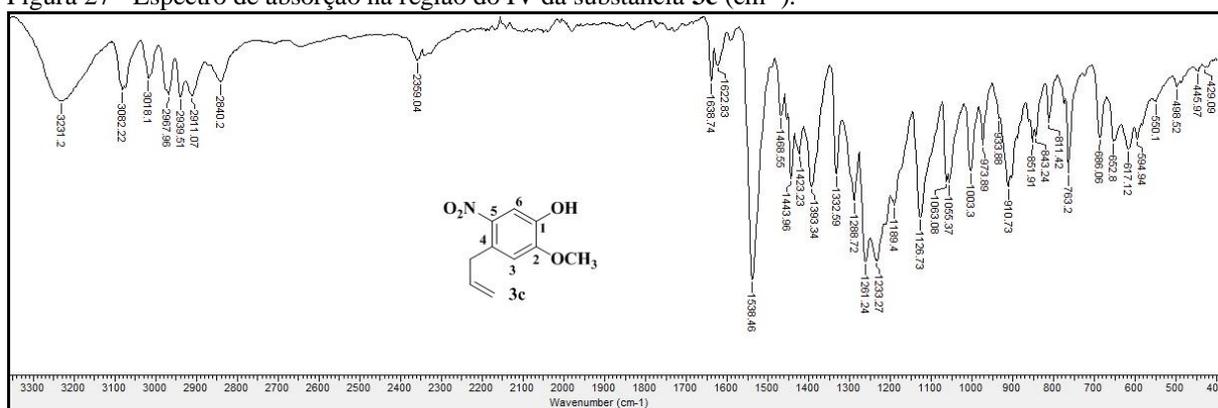
APÊNDICE

Figura 25 - Espectro de absorção na região do IV da substância **3a** (cm^{-1}).

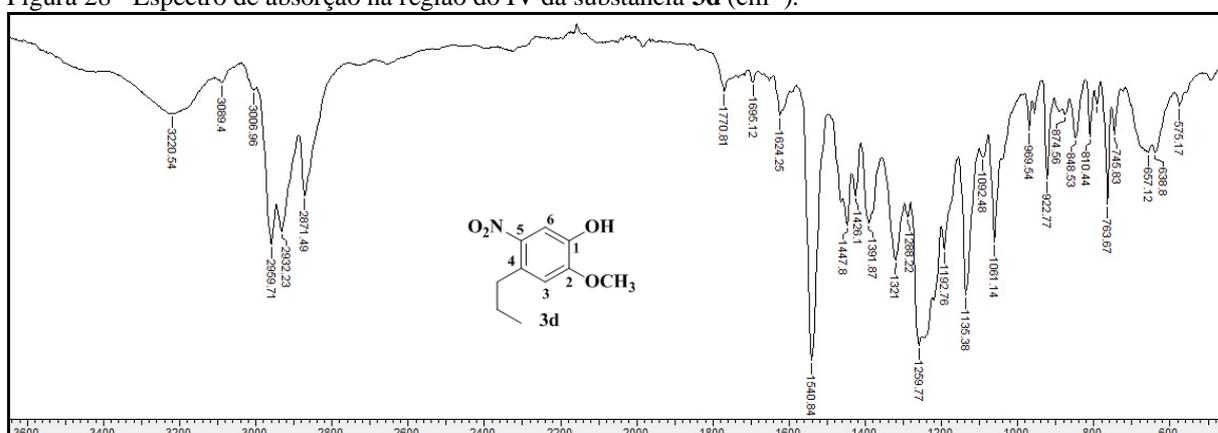
Fonte: Da autora.

Figura 26 - Espectro de absorção na região do IV da substância **3b** (cm^{-1}).

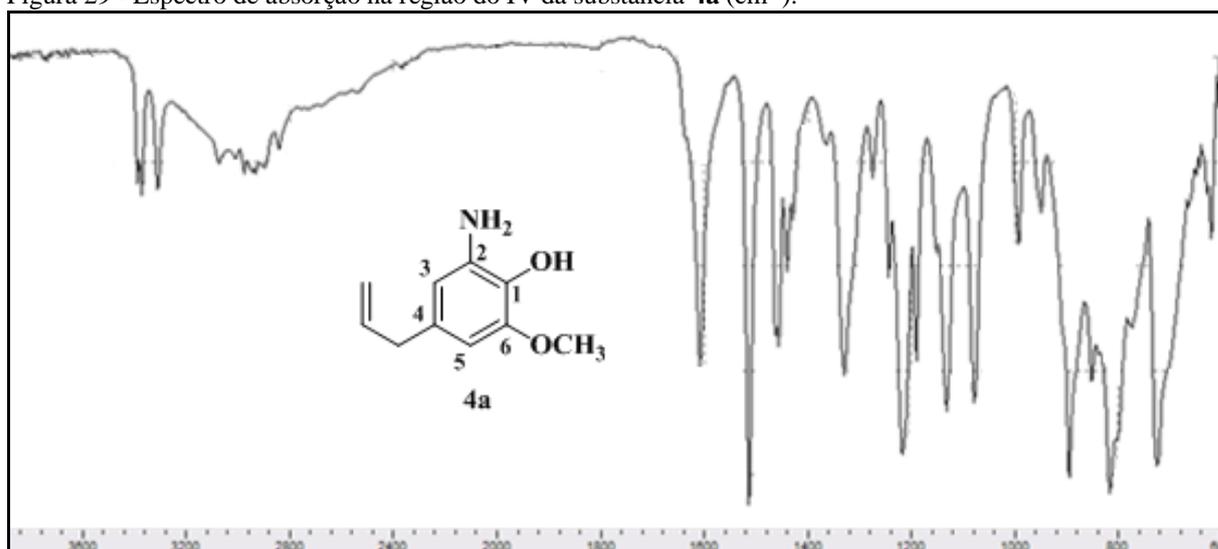
Fonte: Da autora.

Figura 27 - Espectro de absorção na região do IV da substância **3c** (cm⁻¹).

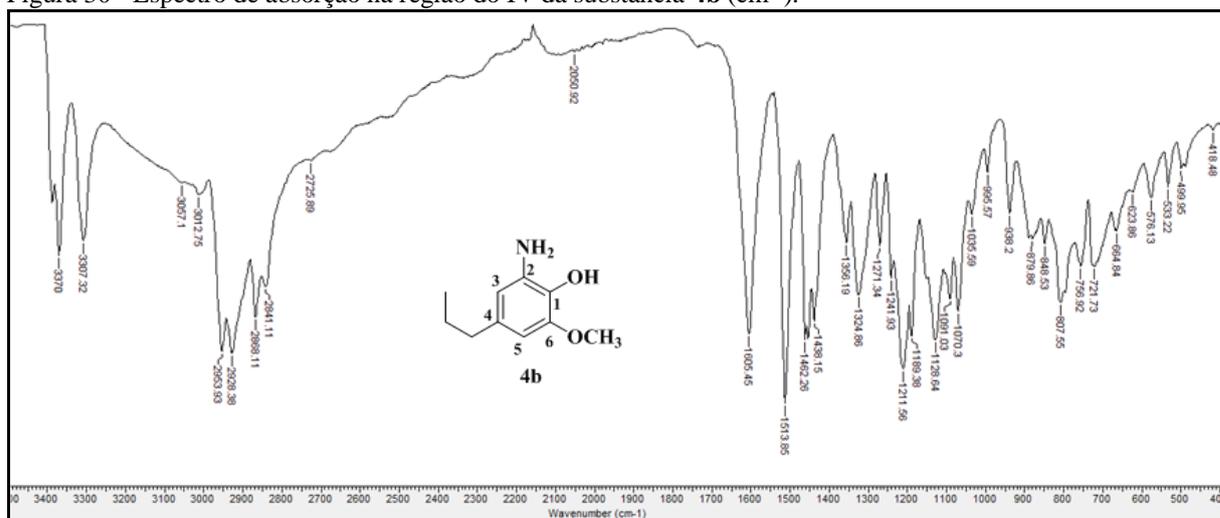
Fonte: Da autora.

Figura 28 - Espectro de absorção na região do IV da substância **3d** (cm⁻¹).

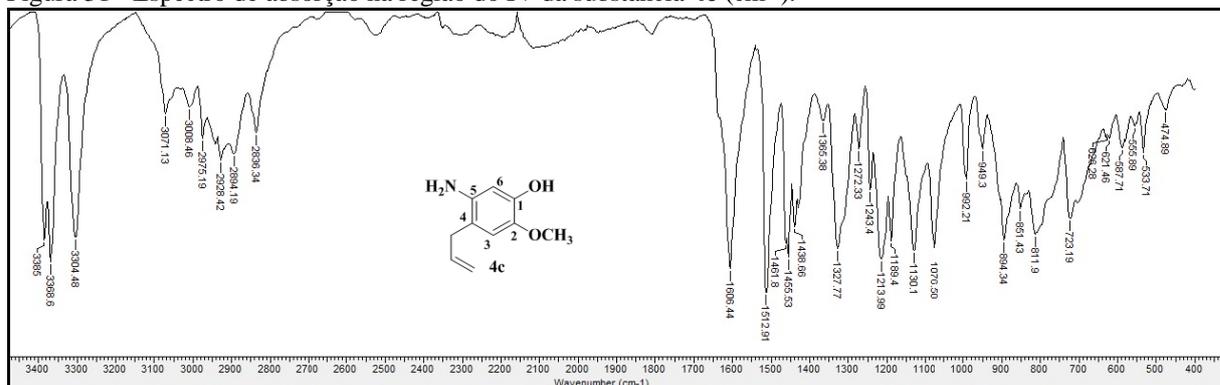
Fonte: Da autora.

Figura 29 - Espectro de absorção na região do IV da substância **4a** (cm⁻¹).

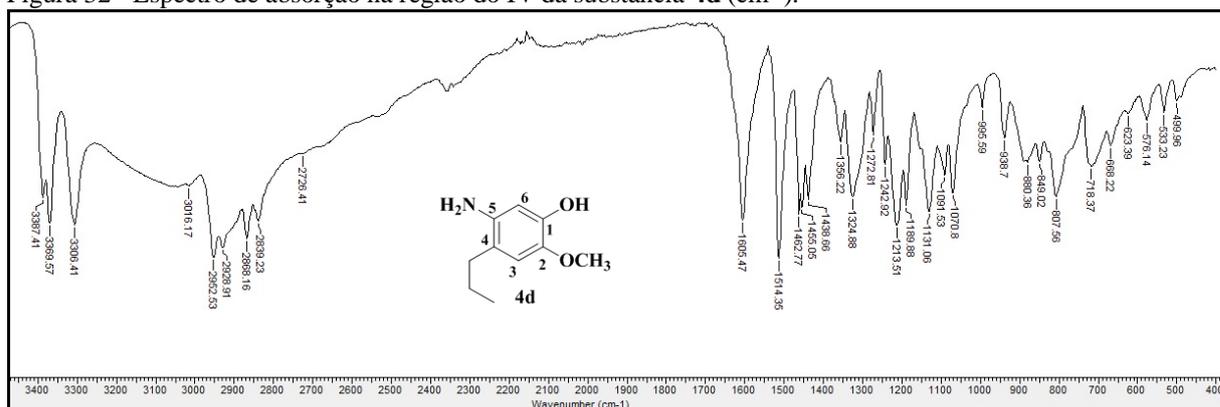
Fonte: Da autora.

Figura 30 - Espectro de absorção na região do IV da substância **4b** (cm^{-1}).

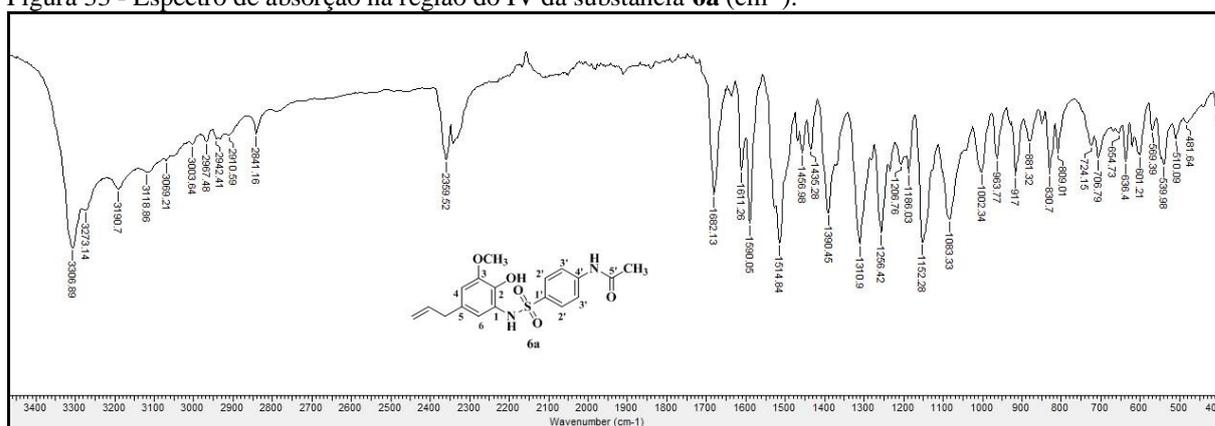
Fonte: Da autora.

Figura 31 - Espectro de absorção na região do IV da substância **4c** (cm^{-1}).

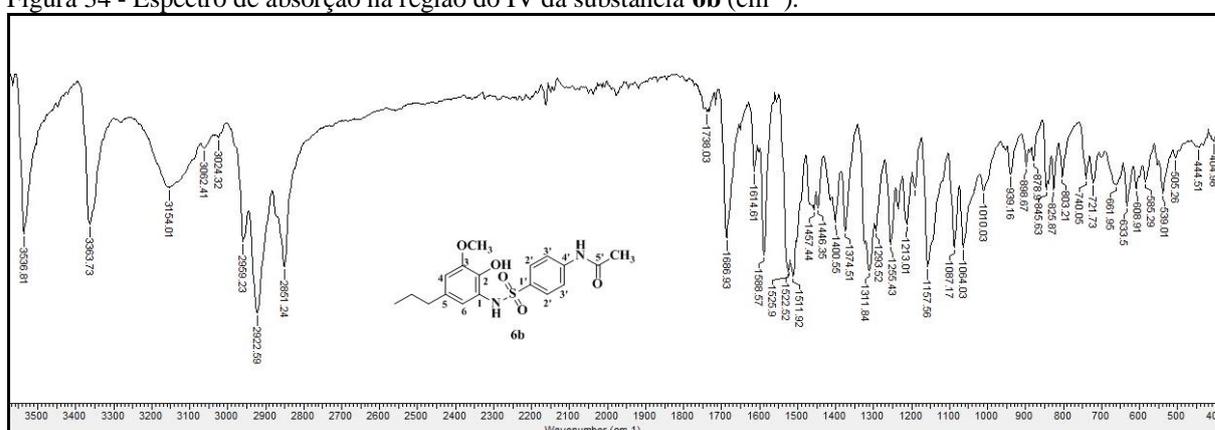
Fonte: Da autora.

Figura 32 - Espectro de absorção na região do IV da substância **4d** (cm^{-1}).

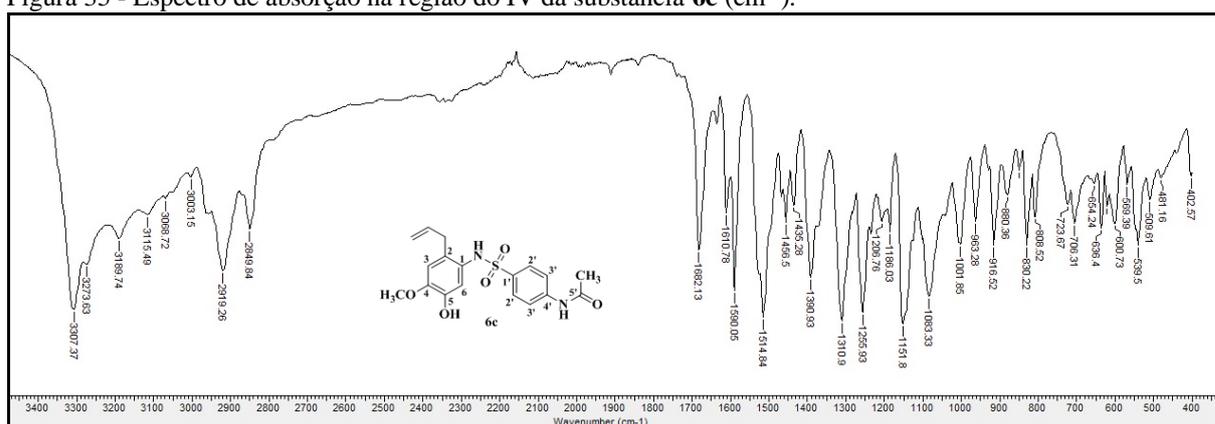
Fonte: Da autora.

Figura 33 - Espectro de absorção na região do IV da substância **6a** (cm^{-1}).

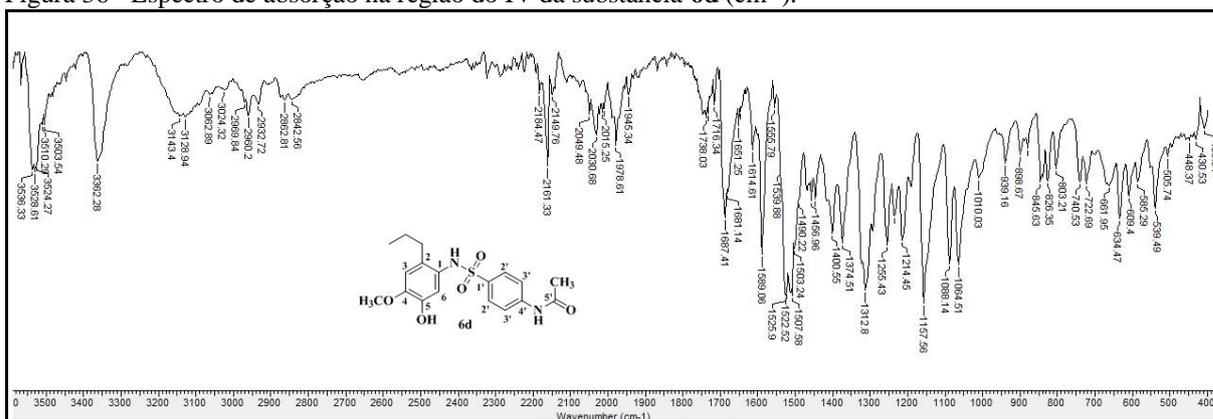
Fonte: Da autora.

Figura 34 - Espectro de absorção na região do IV da substância **6b** (cm^{-1}).

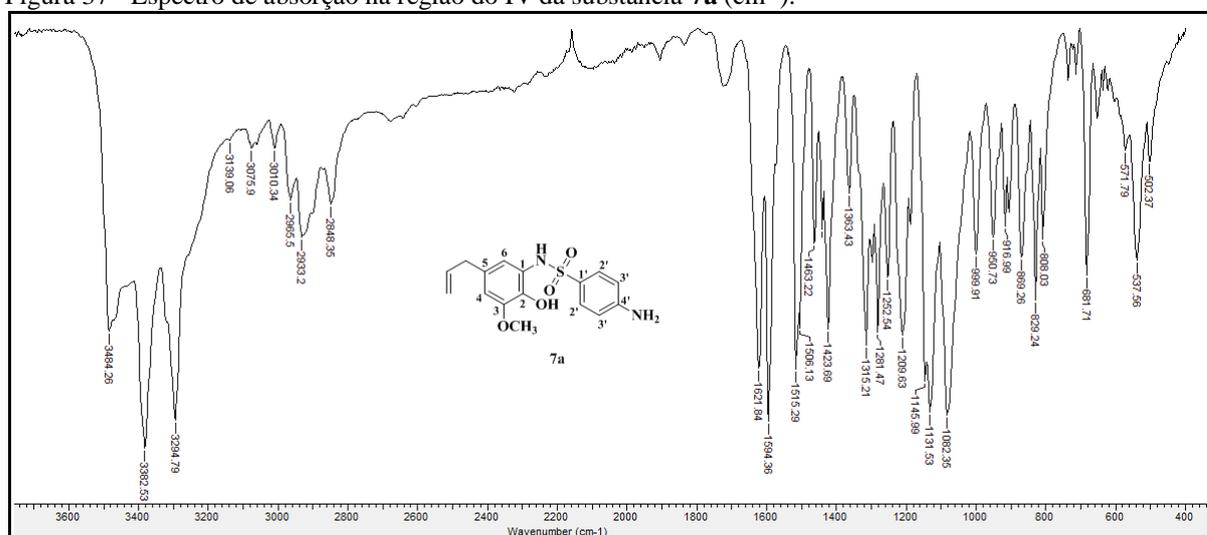
Fonte: Da autora.

Figura 35 - Espectro de absorção na região do IV da substância **6c** (cm^{-1}).

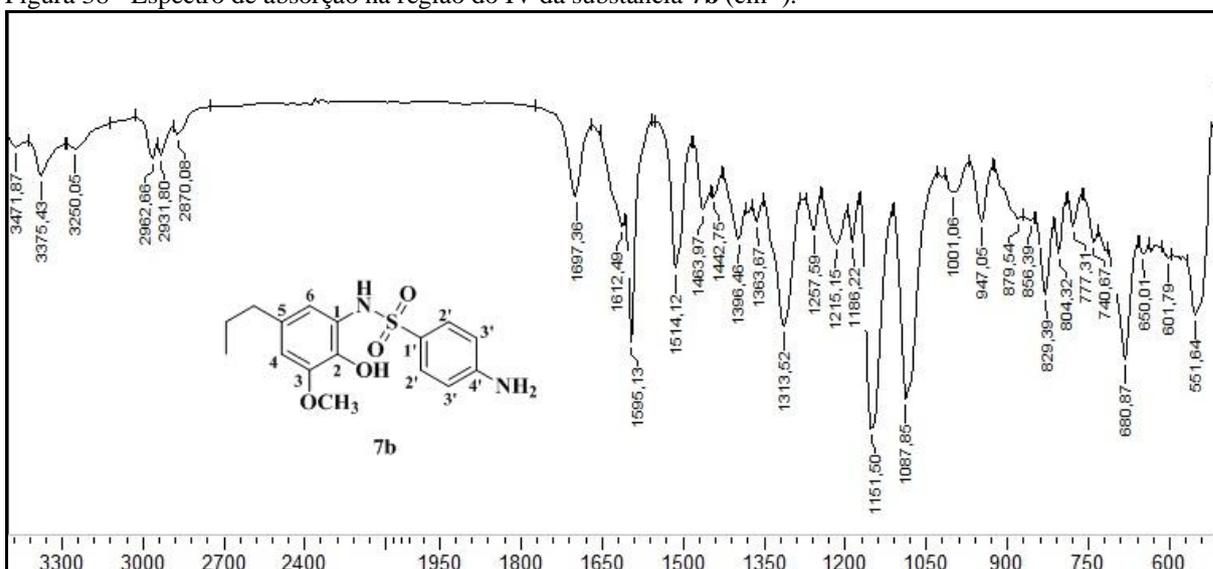
Fonte: Da autora.

Figura 36 - Espectro de absorção na região do IV da substância **6d** (cm⁻¹).

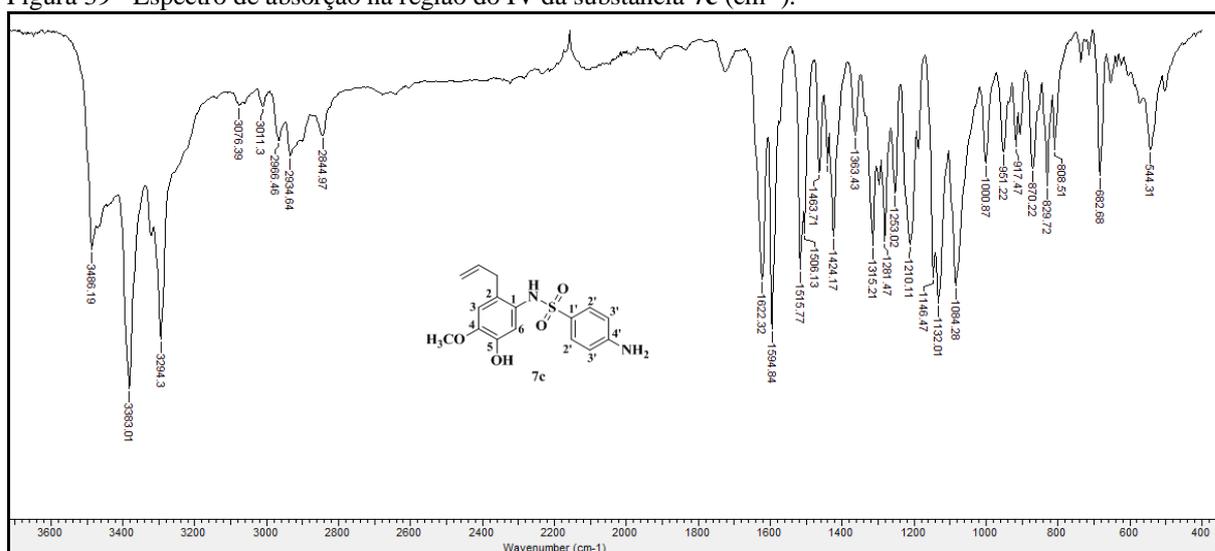
Fonte: Da autora.

Figura 37 - Espectro de absorção na região do IV da substância **7a** (cm⁻¹).

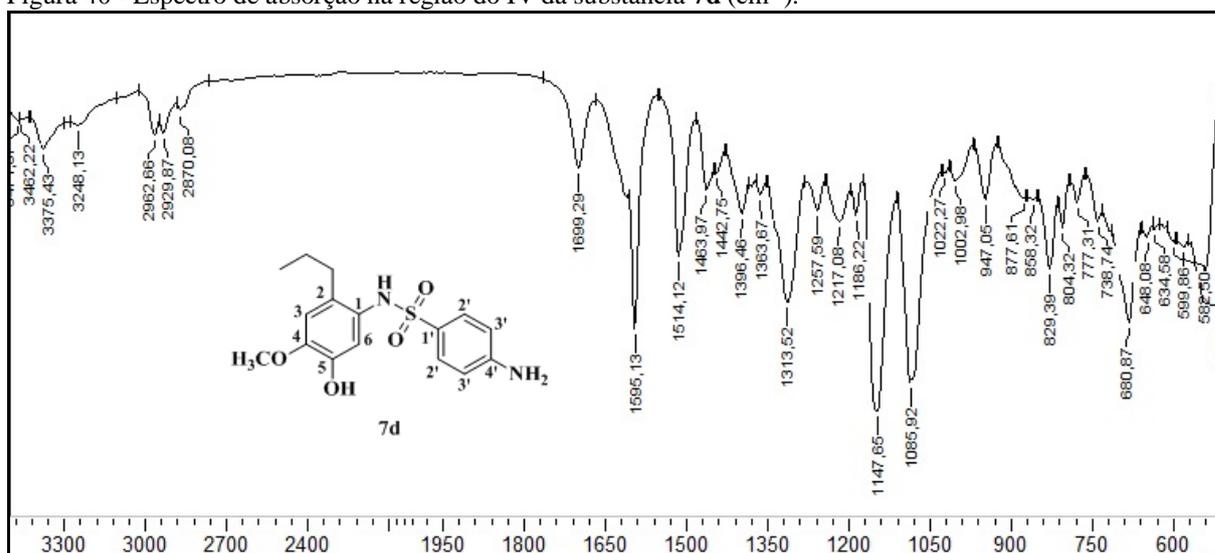
Fonte: Da autora.

Figura 38 - Espectro de absorção na região do IV da substância **7b** (cm⁻¹).

Fonte: Da autora.

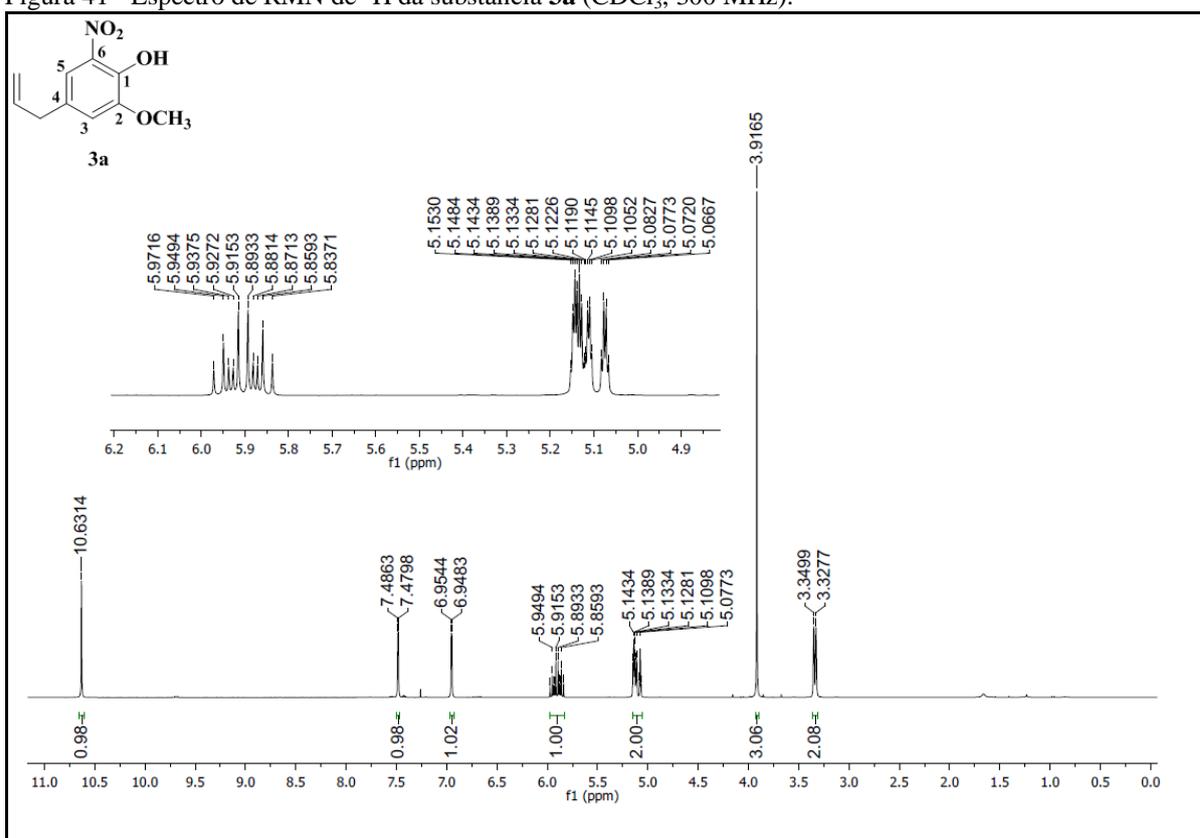
Figura 39 - Espectro de absorção na região do IV da substância **7c** (cm^{-1}).

Fonte: Da autora.

Figura 40 - Espectro de absorção na região do IV da substância **7d** (cm^{-1}).

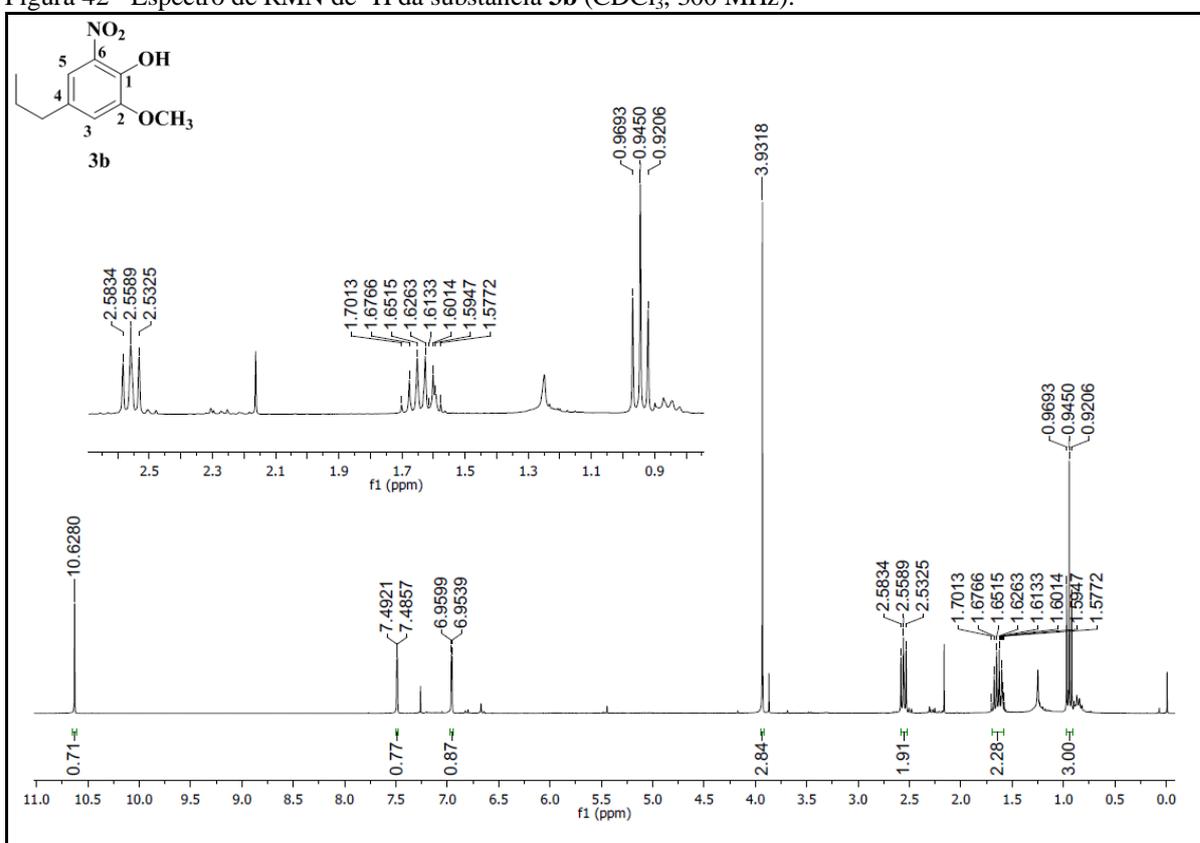
Fonte: Da autora.

Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H da substância **3a** (CDCl_3 , 300 MHz).

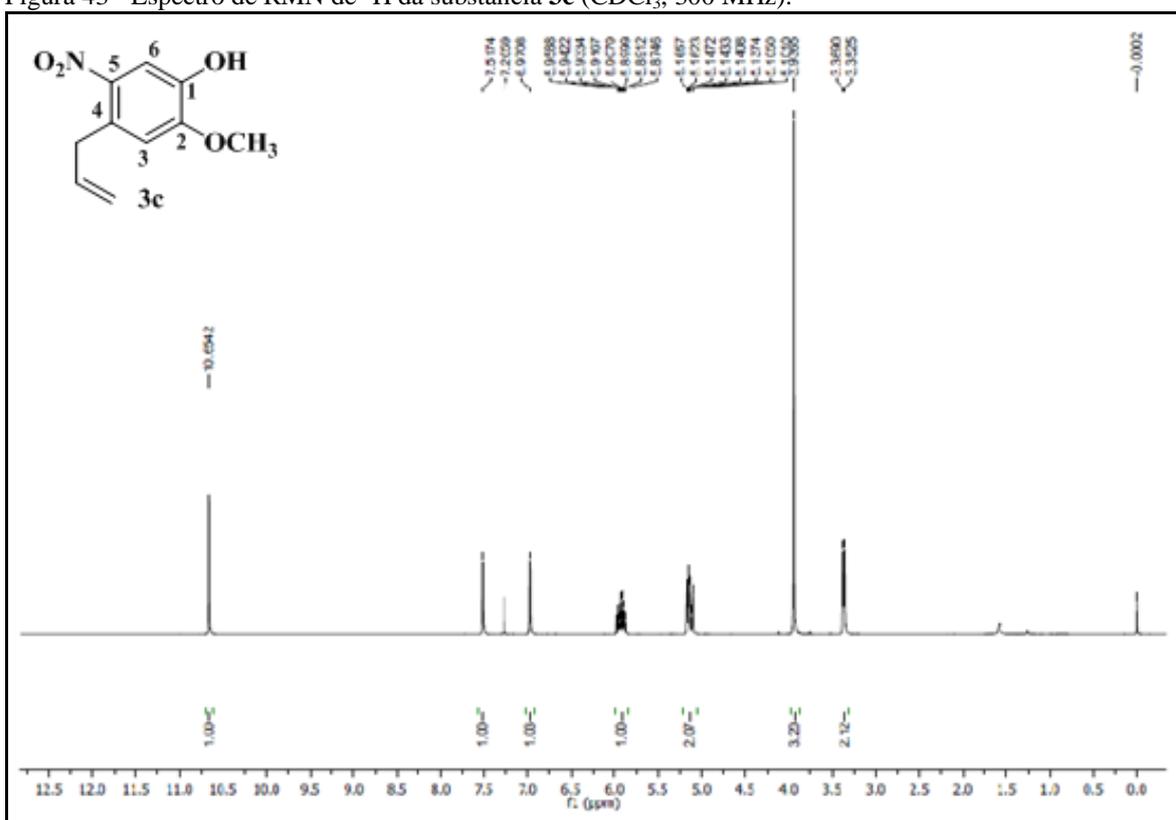


Fonte: Da autora.

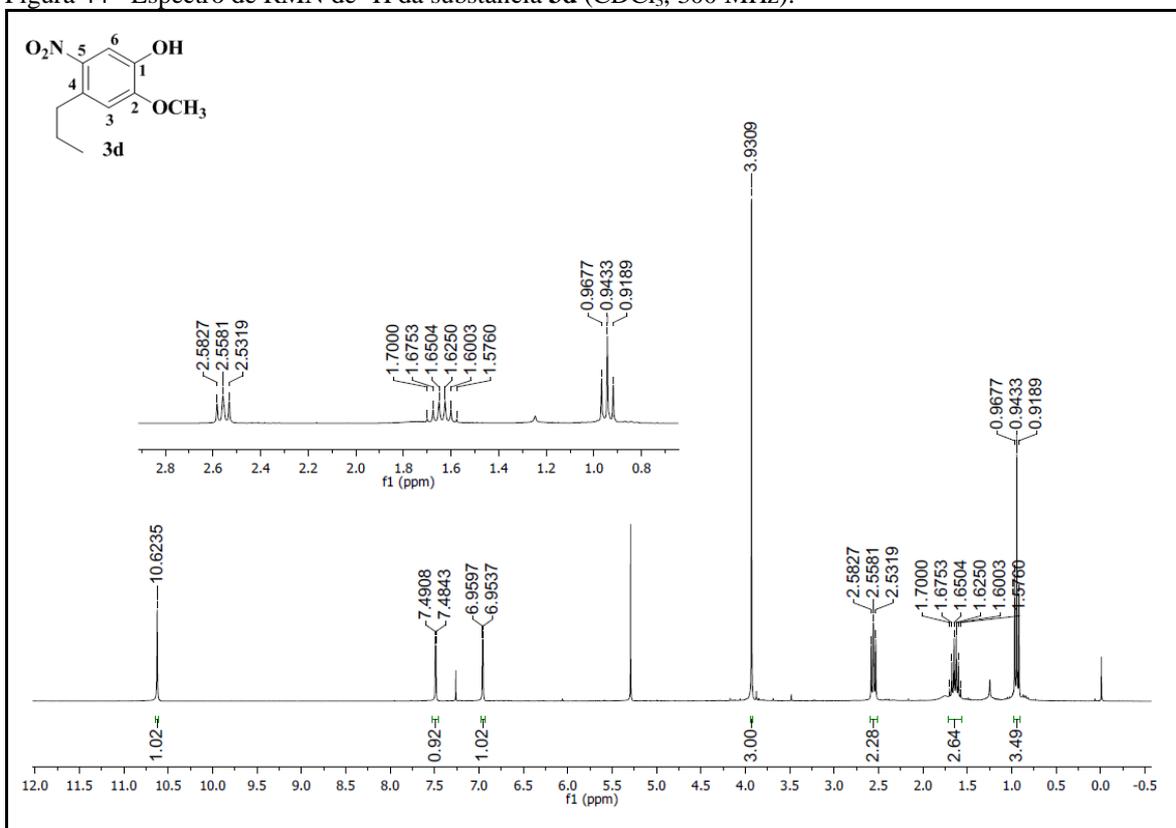
Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H da substância **3b** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

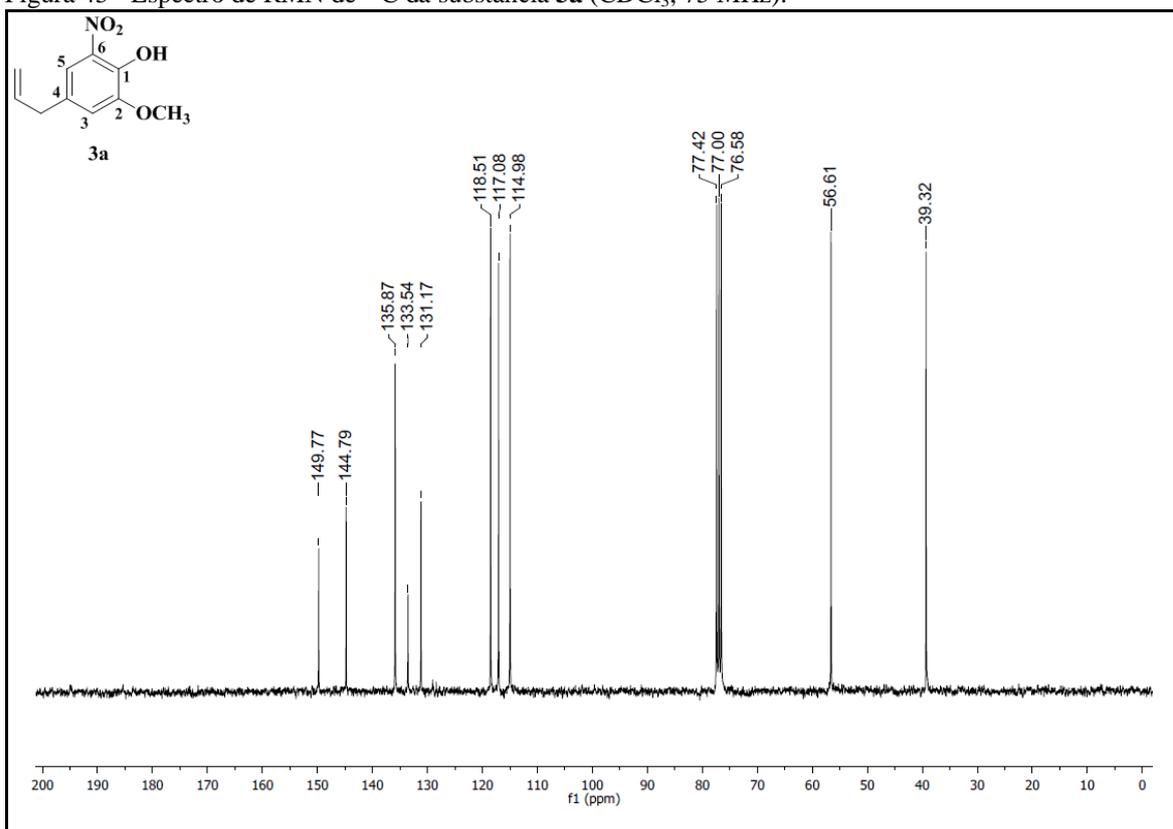
Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H da substância **3c** (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H da substância **3d** (CDCl_3 , 300 MHz).

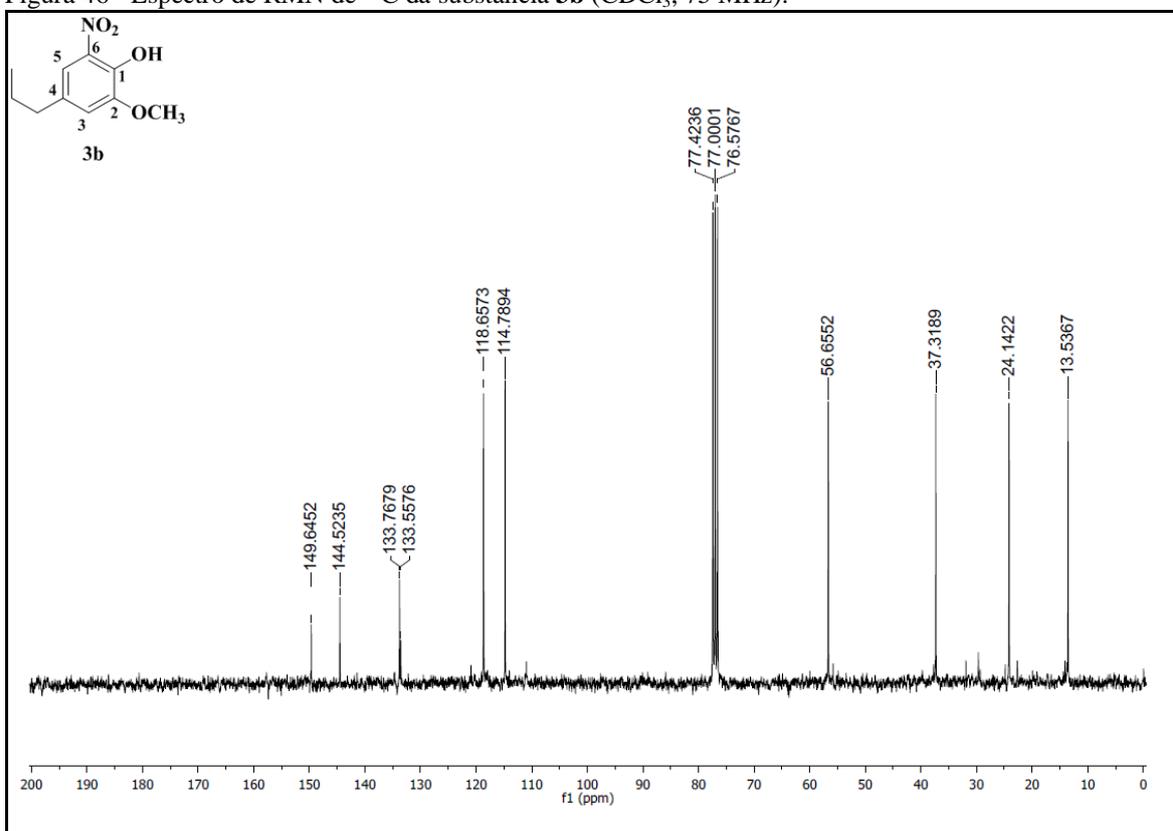
Fonte: Da autora.

Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **3a** (CDCl_3 , 75 MHz).



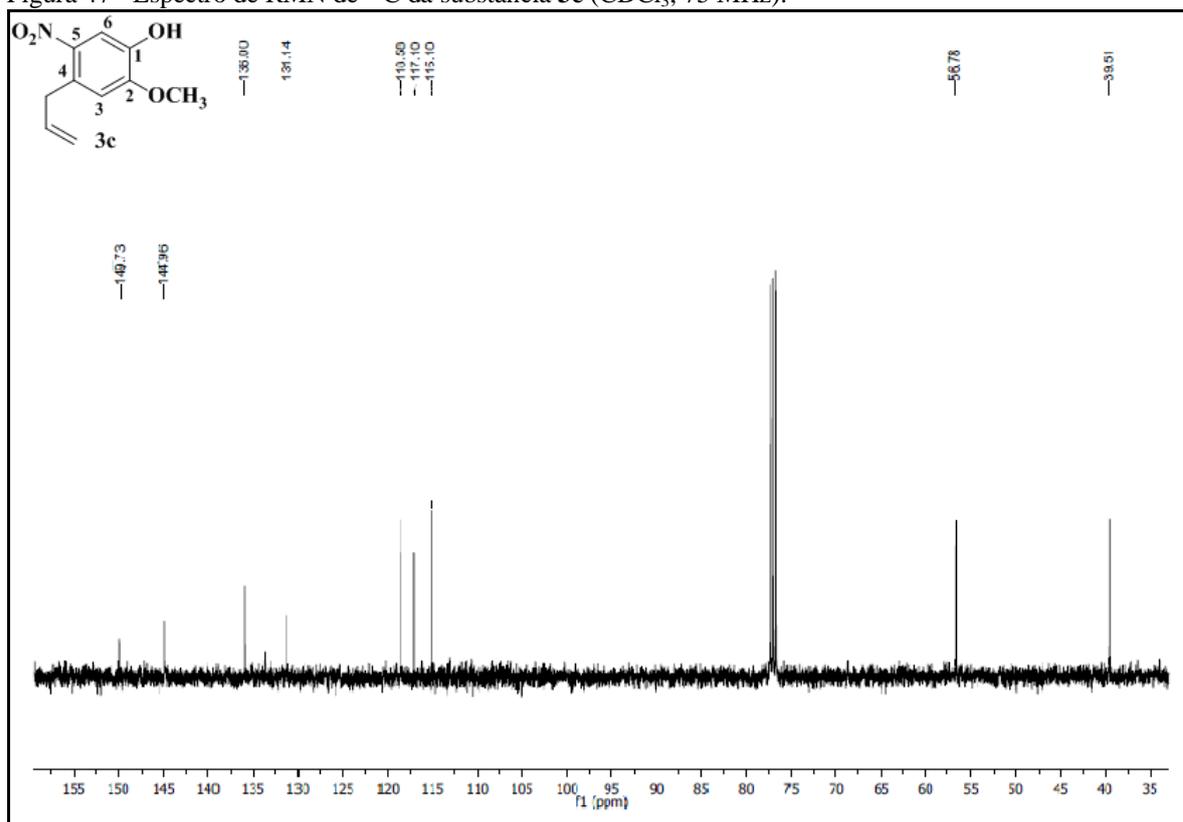
Fonte: Da autora.

Figura 46 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **3b** (CDCl_3 , 75 MHz).



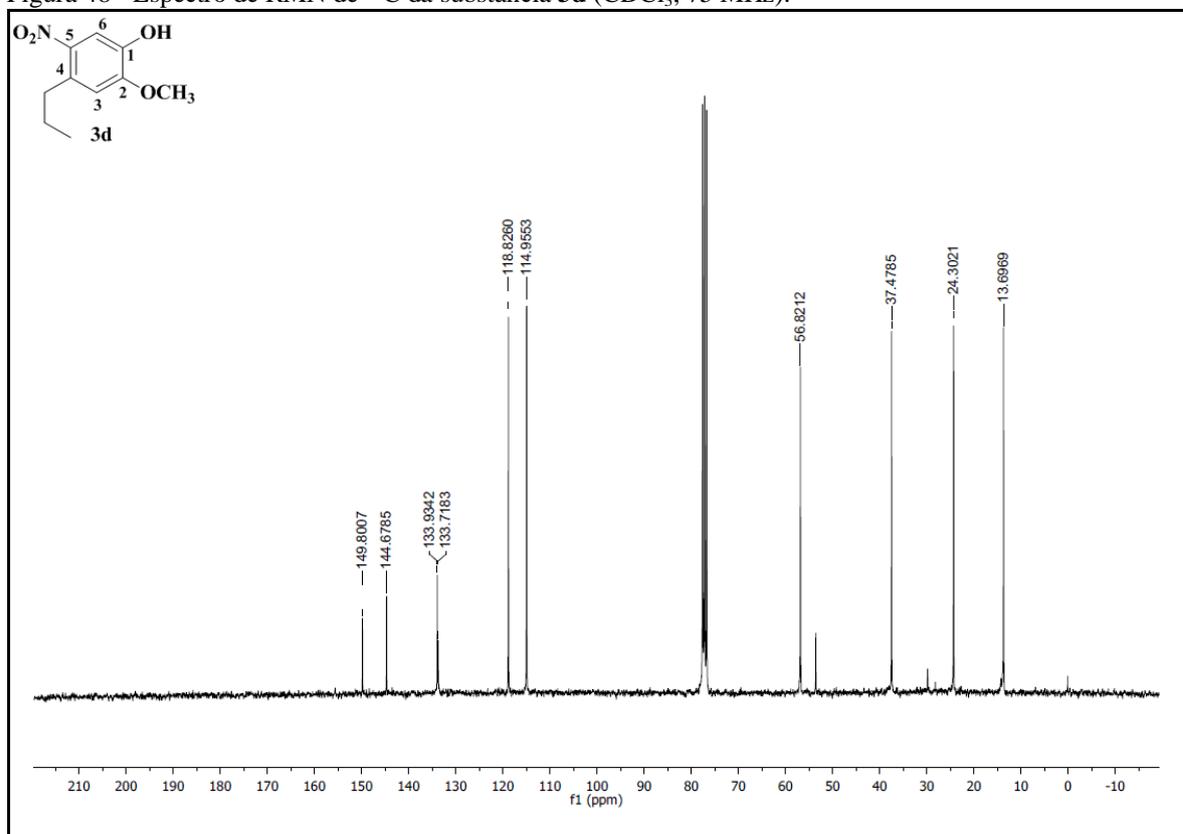
Fonte: Da autora.

Figura 47 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **3c** (CDCl_3 , 75 MHz).

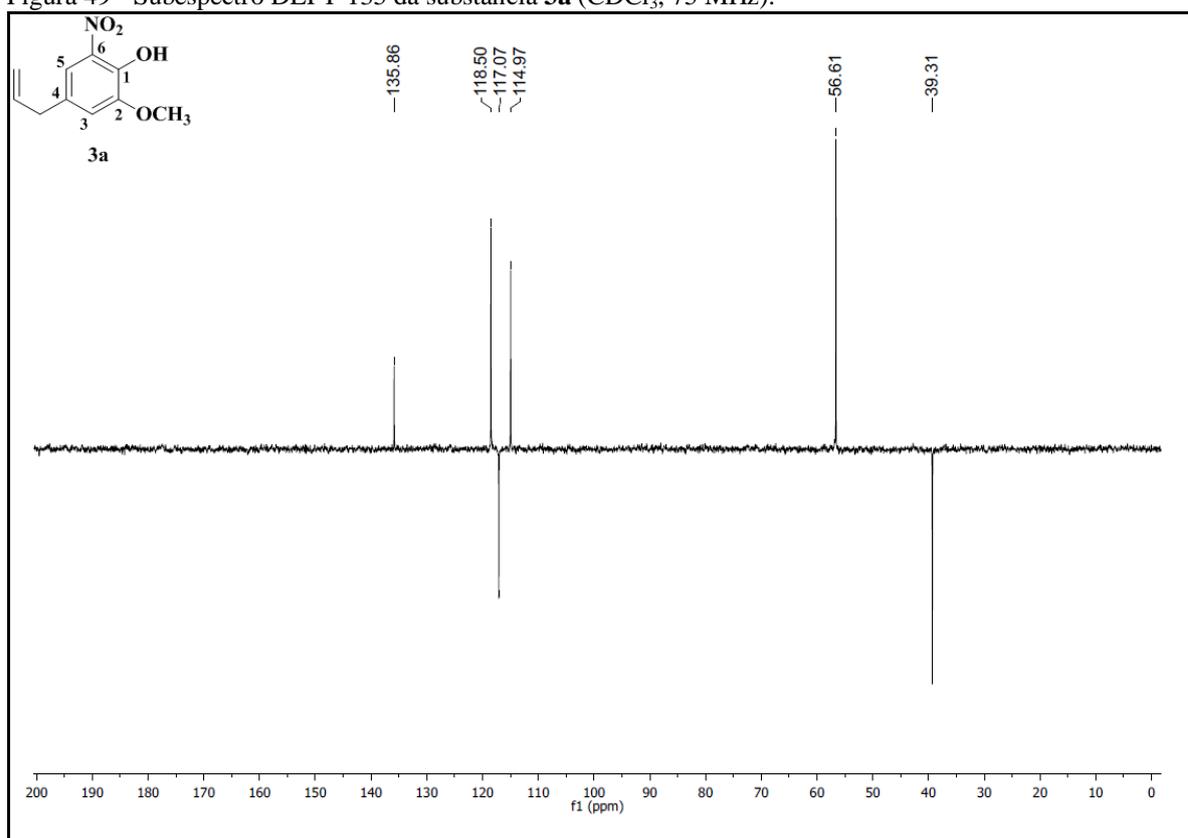


Fonte: Da autora.

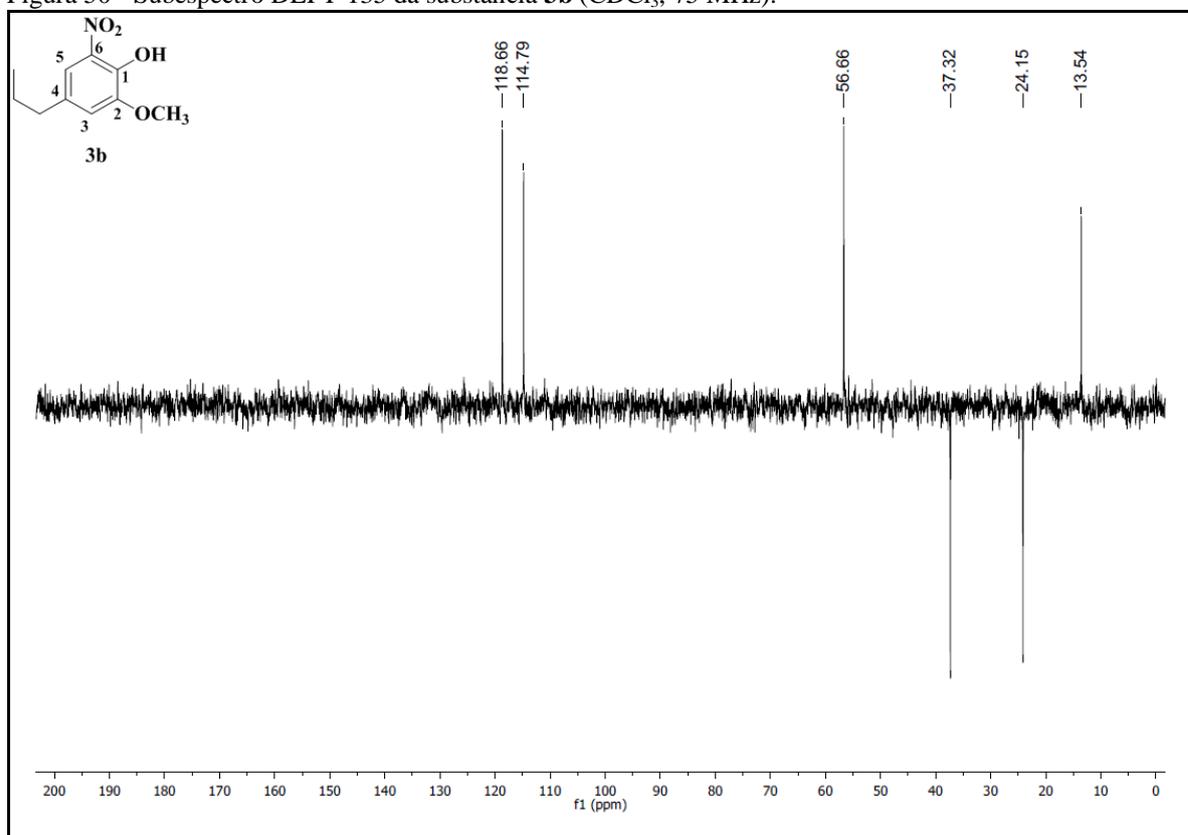
Figura 48 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **3d** (CDCl_3 , 75 MHz).



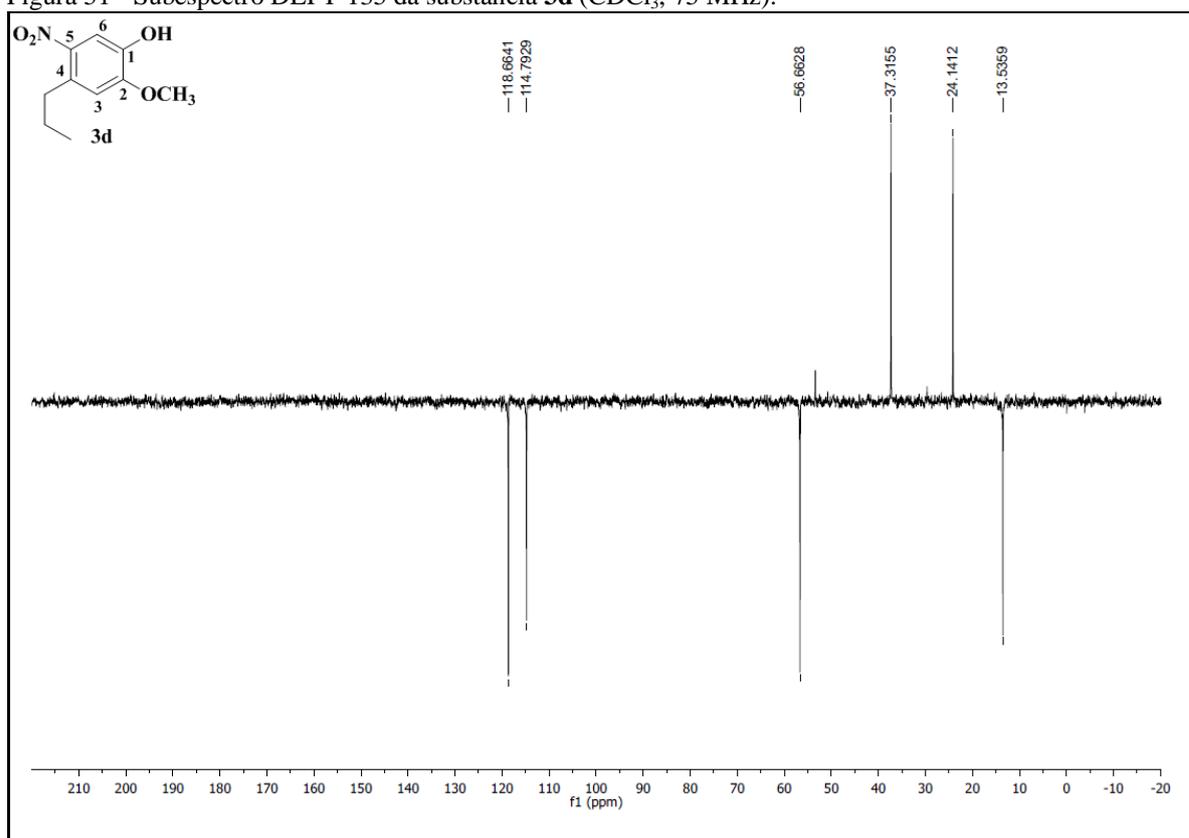
Fonte: Da autora.

Figura 49 - Subespectro DEPT-135 da substância **3a** (CDCl₃, 75 MHz).

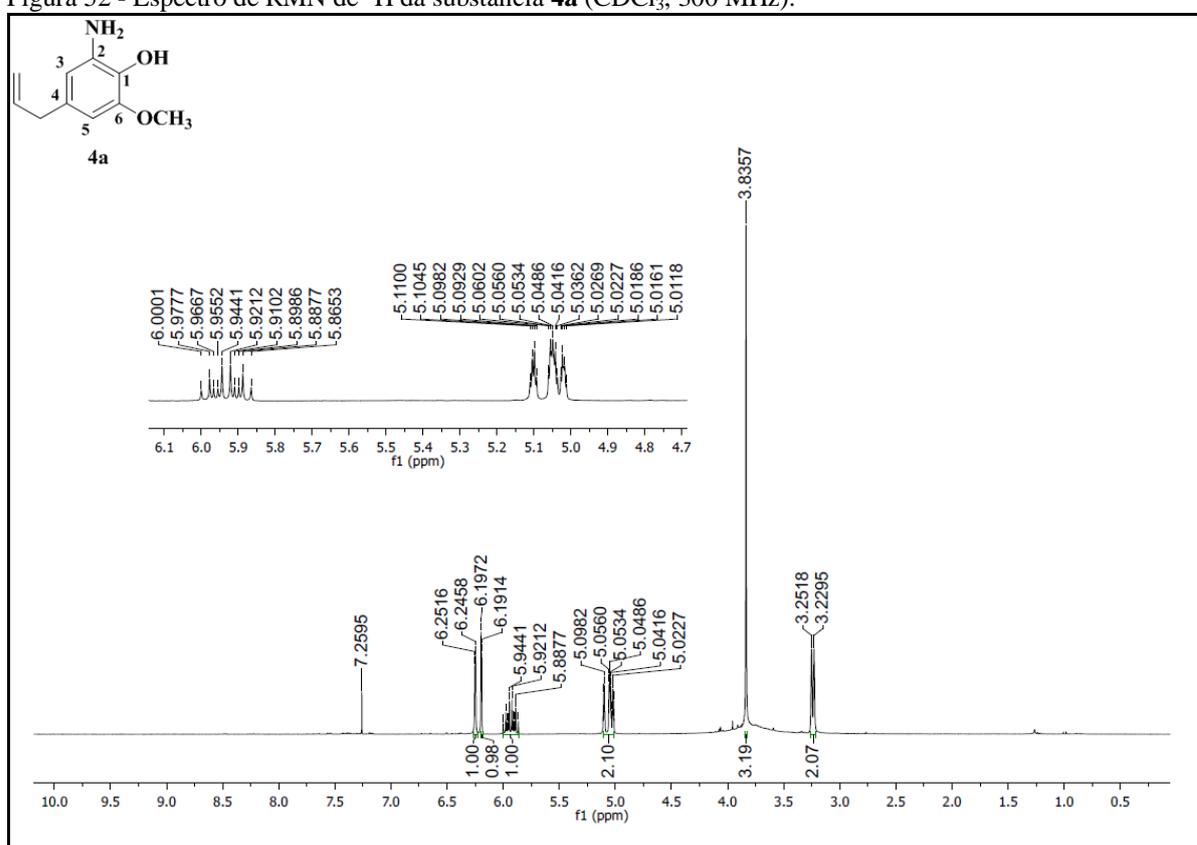
Fonte: Da autora.

Figura 50 - Subespectro DEPT-135 da substância **3b** (CDCl₃, 75 MHz).

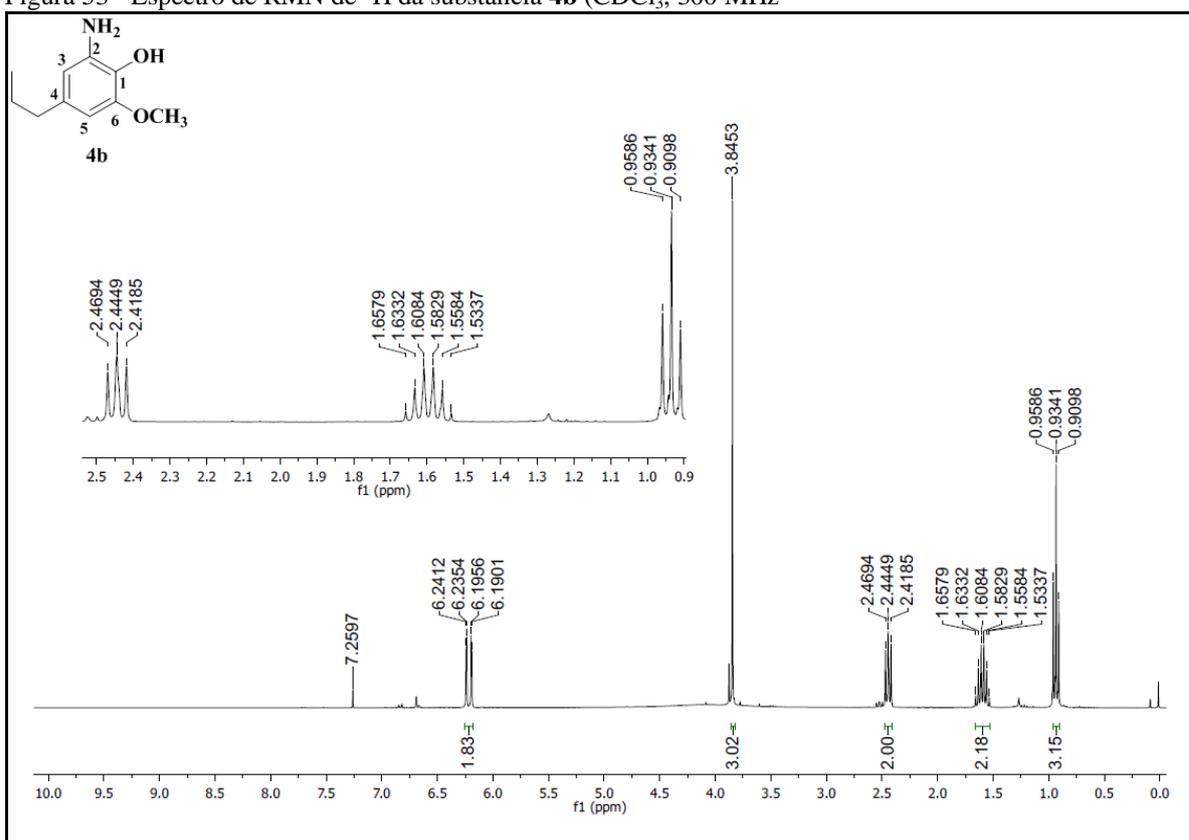
Fonte: Da autora.

Figura 51 - Subespectro DEPT-135 da substância **3d** (CDCl₃, 75 MHz).

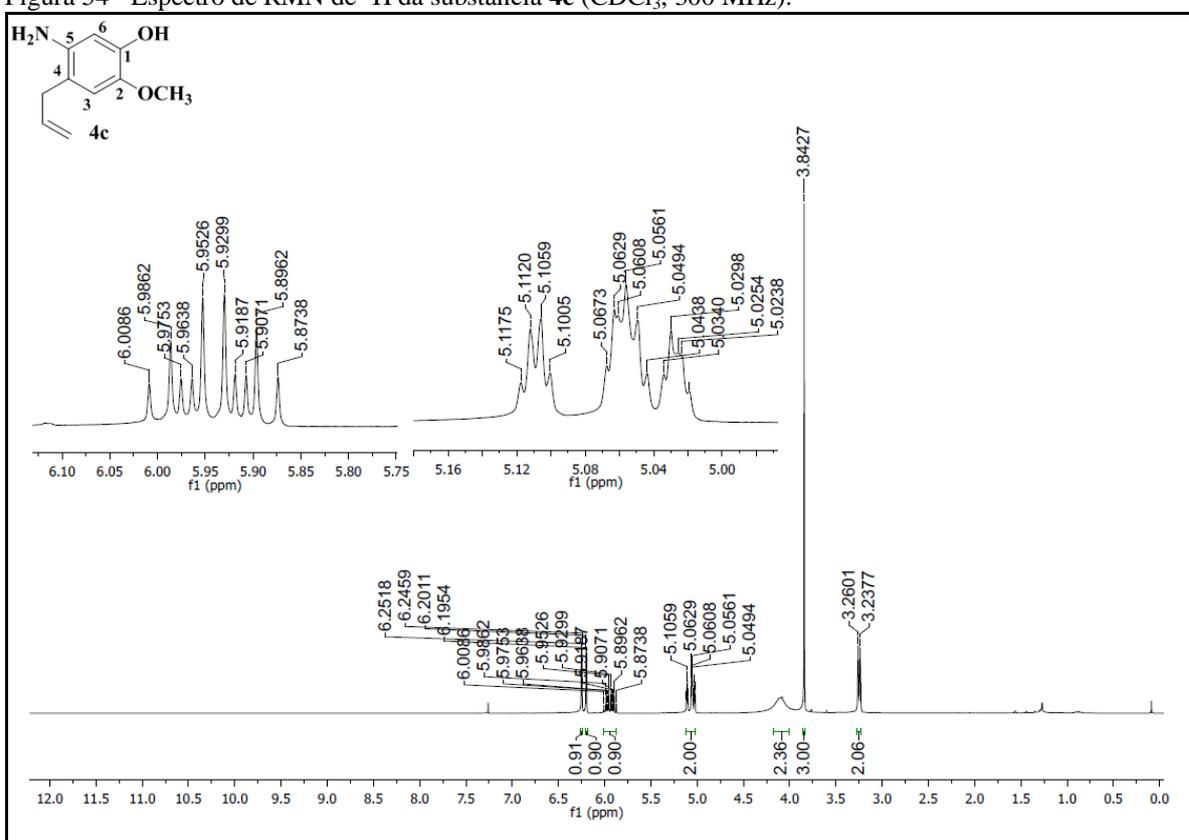
Fonte: Da autora.

Figura 52 - Espectro de RMN de ¹H da substância **4a** (CDCl₃, 300 MHz).

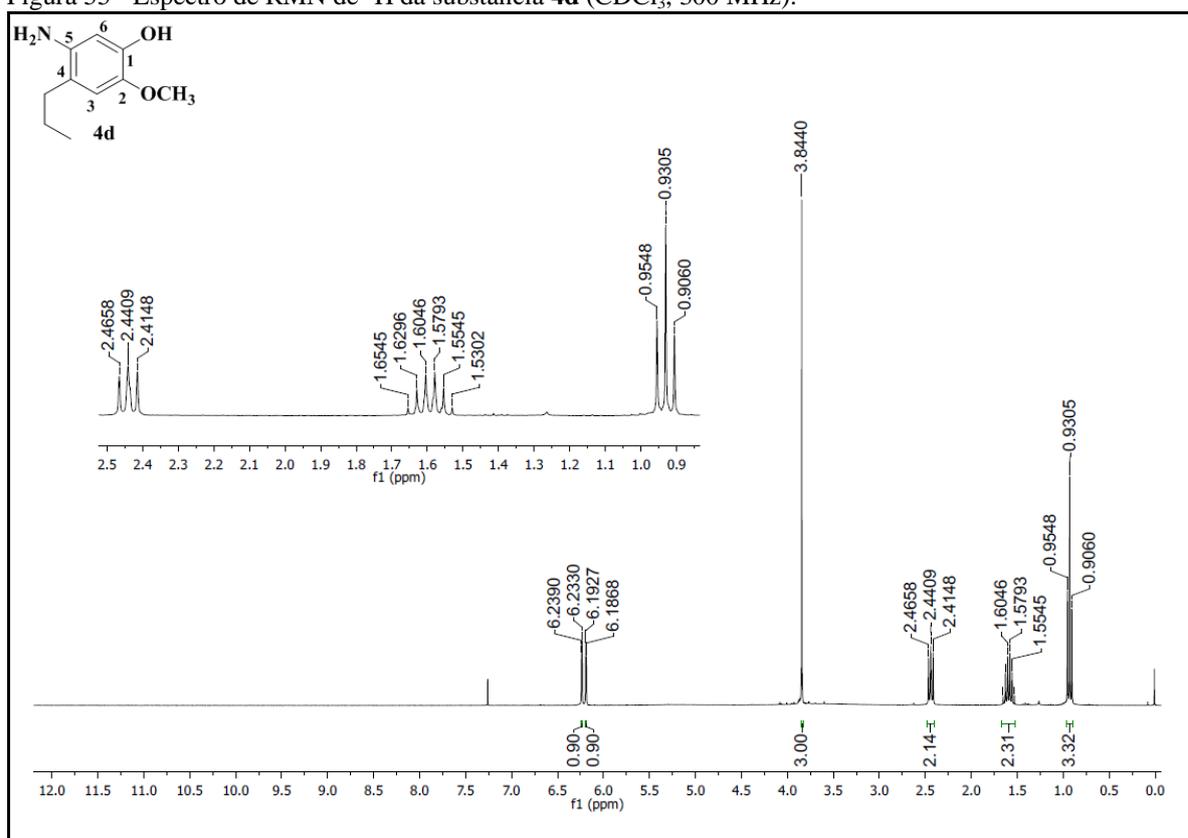
Fonte: Da autora.

Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H da substância **4b** (CDCl_3 , 300 MHz)

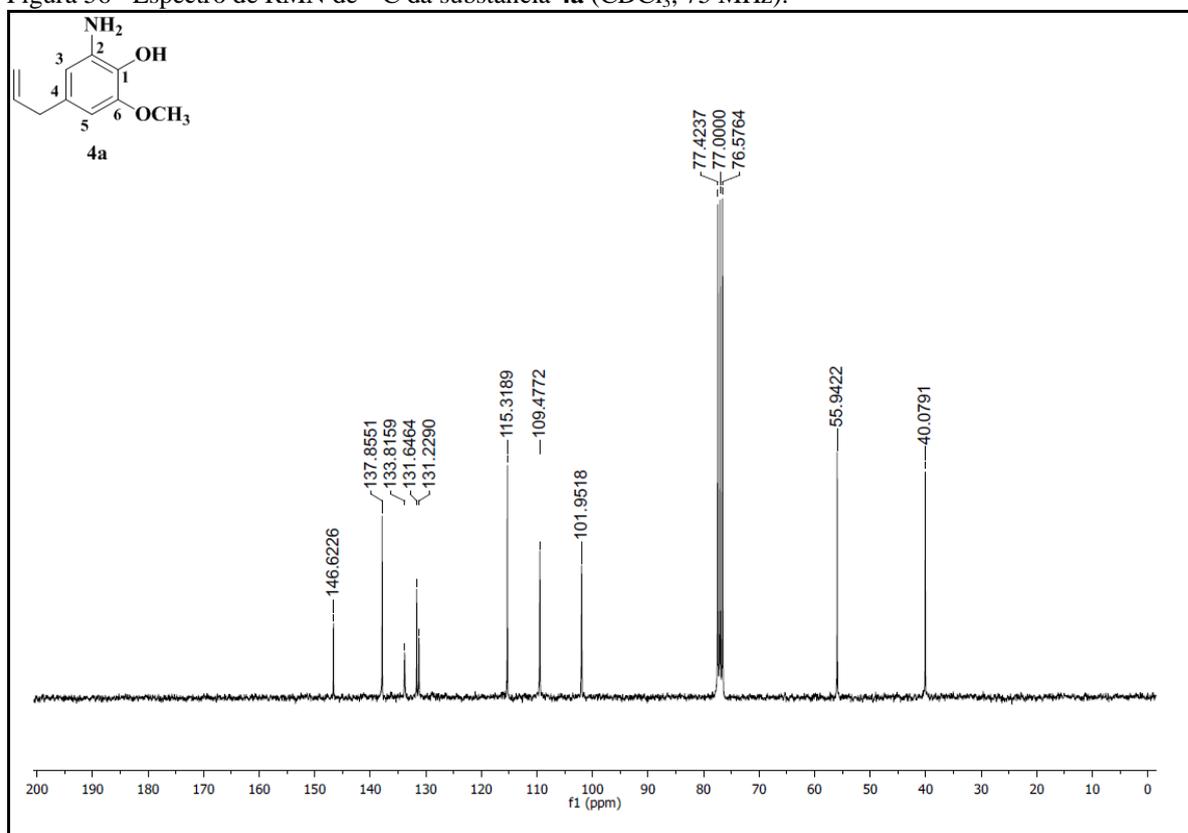
Fonte: Da autora.

Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H da substância **4c** (CDCl_3 , 300 MHz).

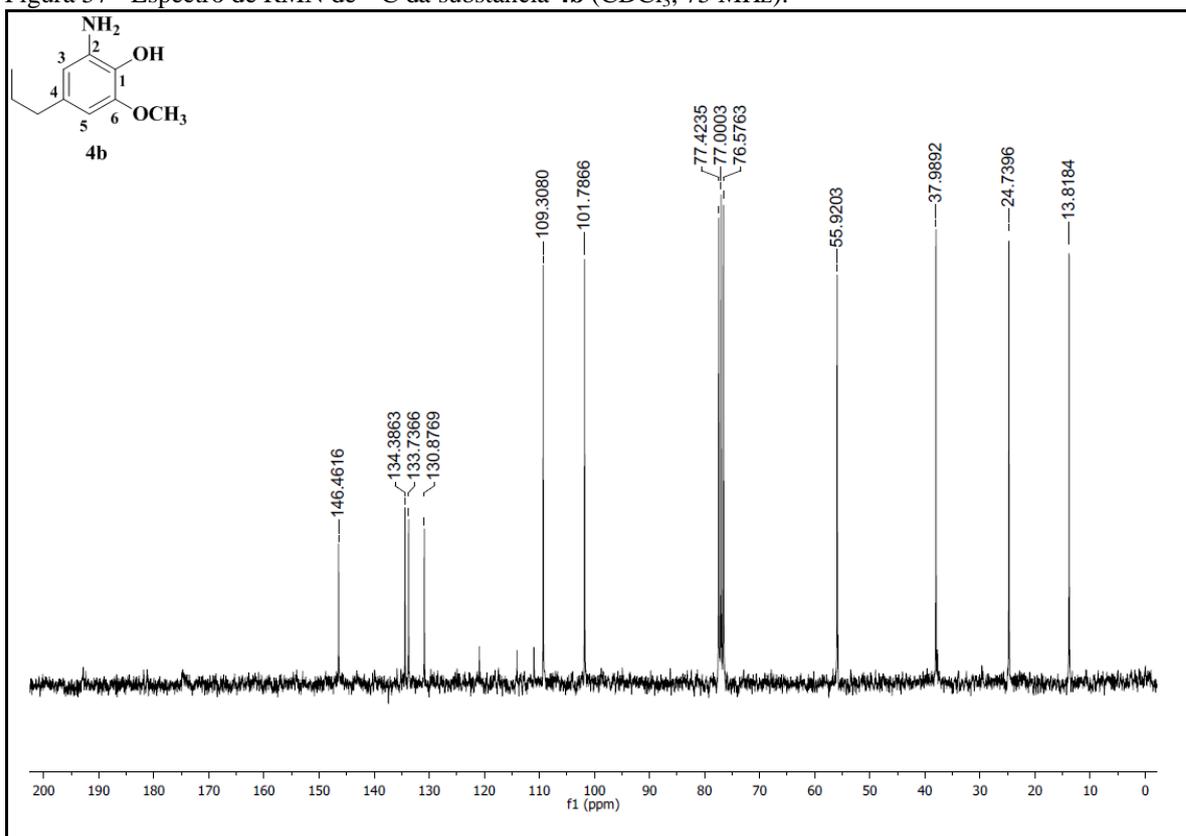
Fonte: Da autora.

Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H da substância **4d** (CDCl_3 , 300 MHz).

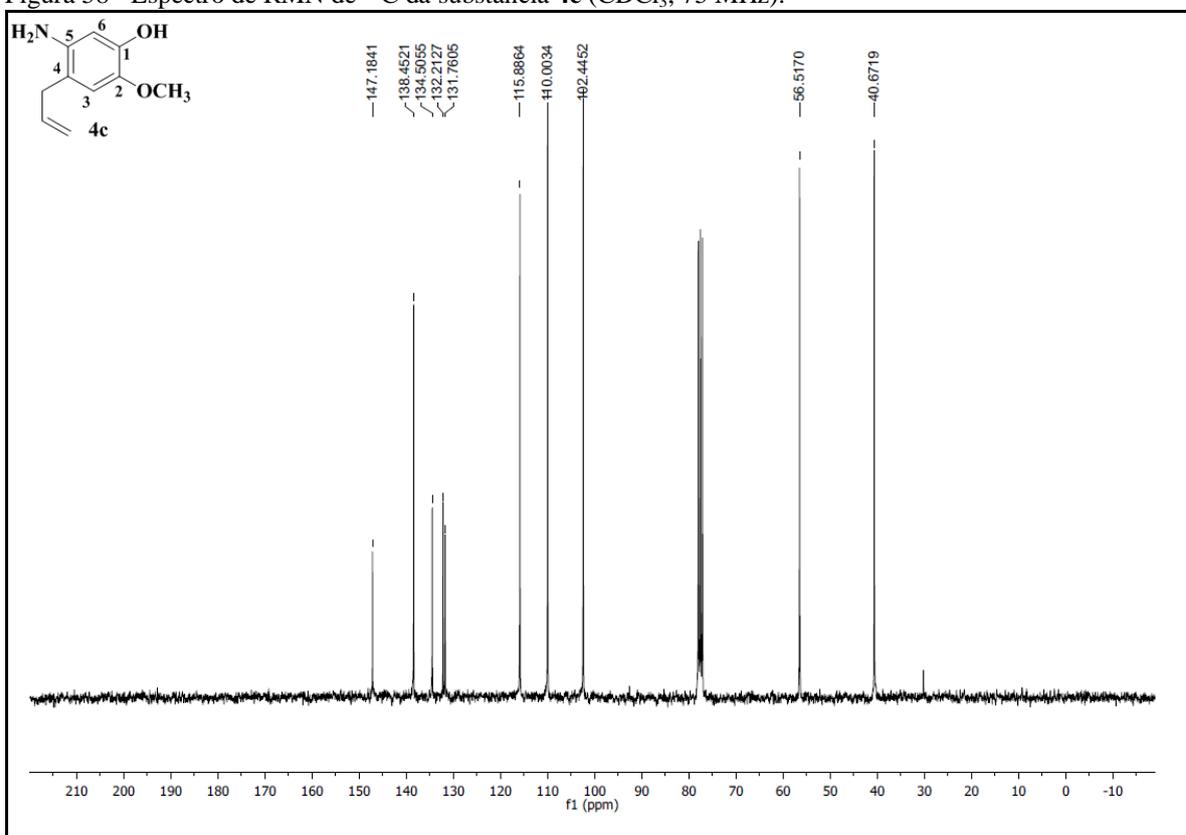
Fonte: Da autora.

Figura 56 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **4a** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

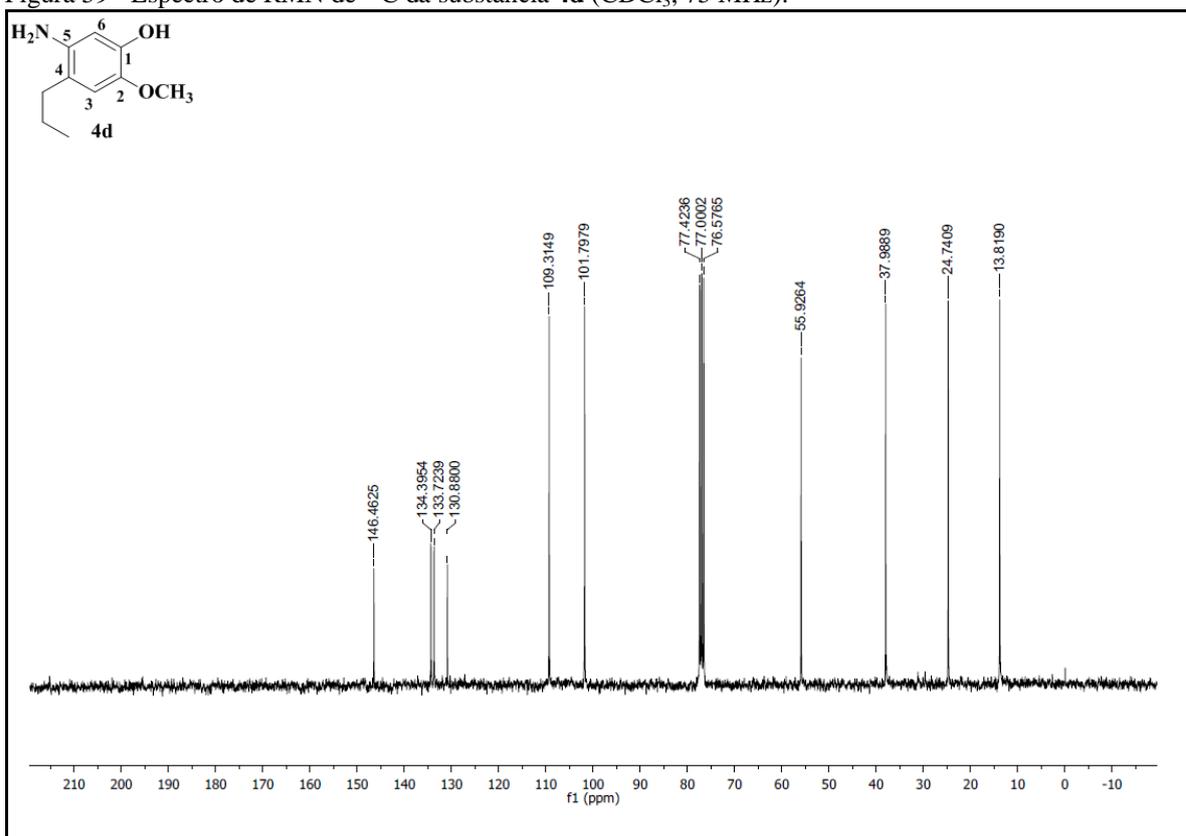
Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **4b** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 58 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **4c** (CDCl_3 , 75 MHz).

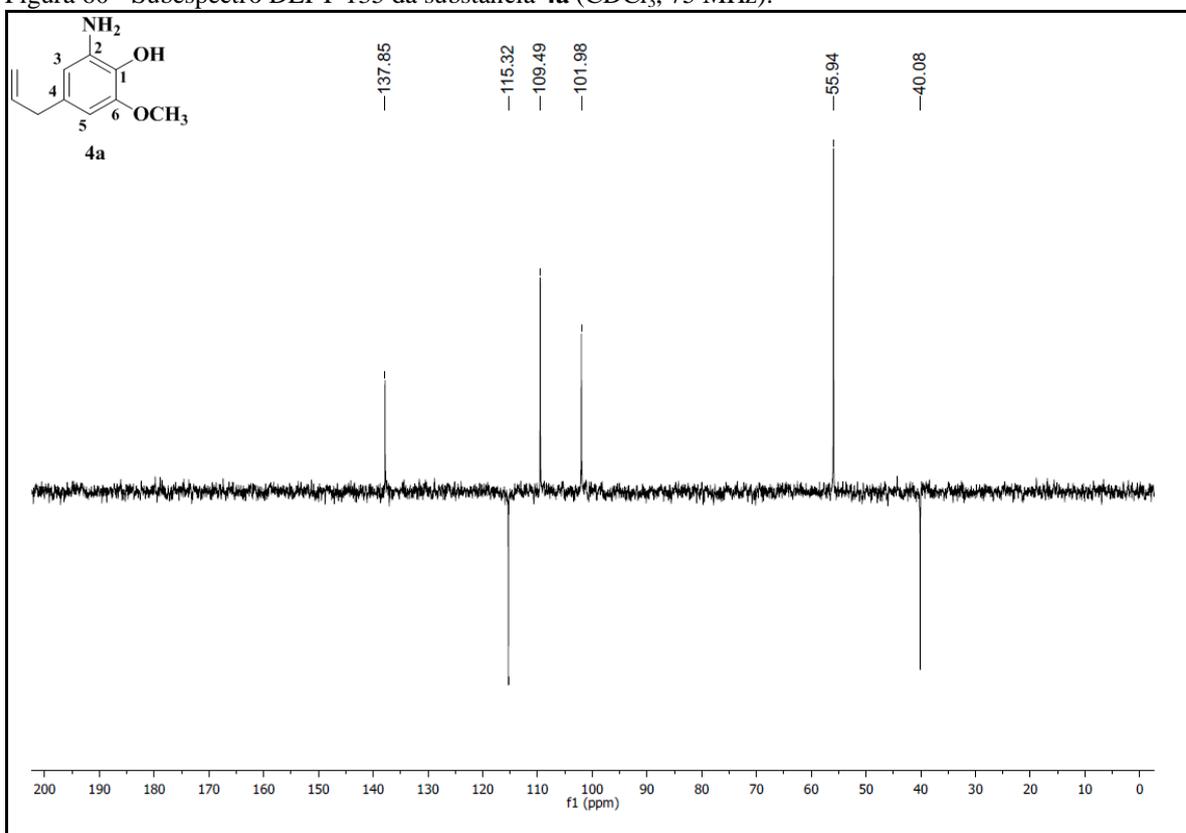
Fonte: Da autora.

Figura 59 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **4d** (CDCl_3 , 75 MHz).

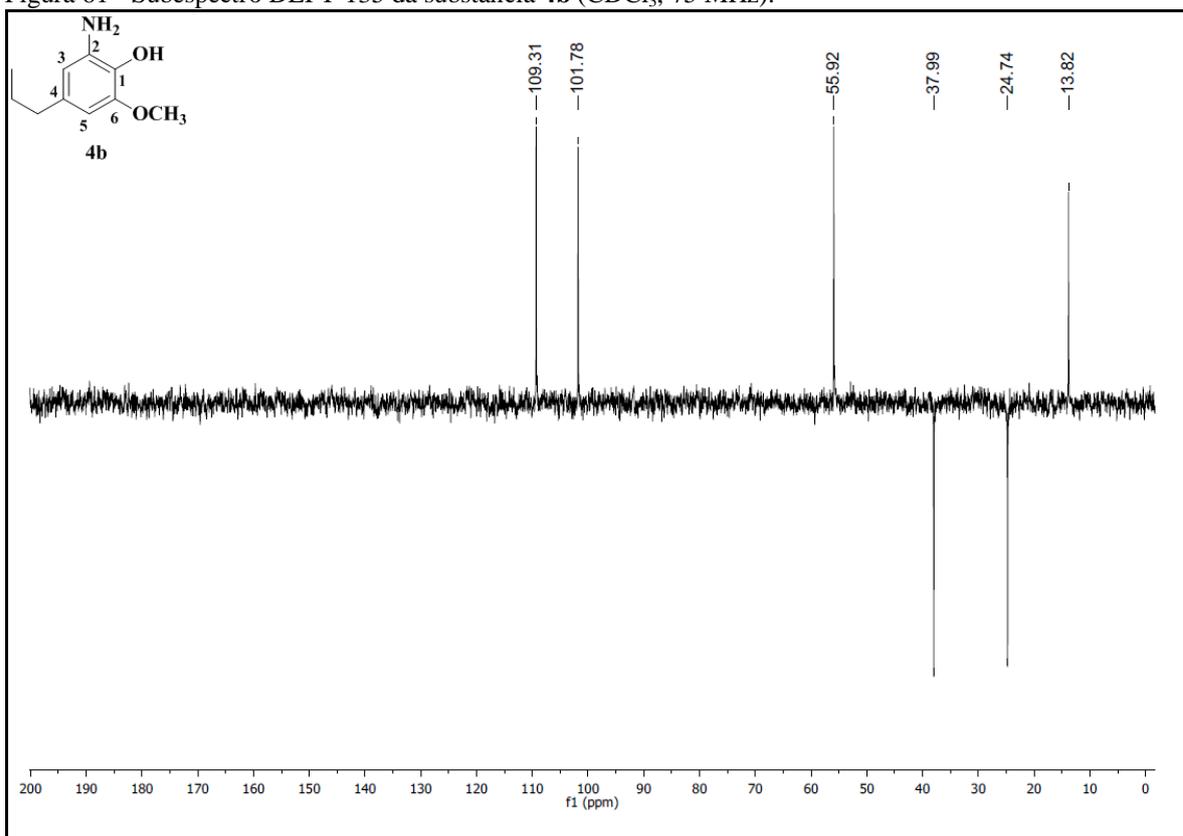


Fonte: Da autora.

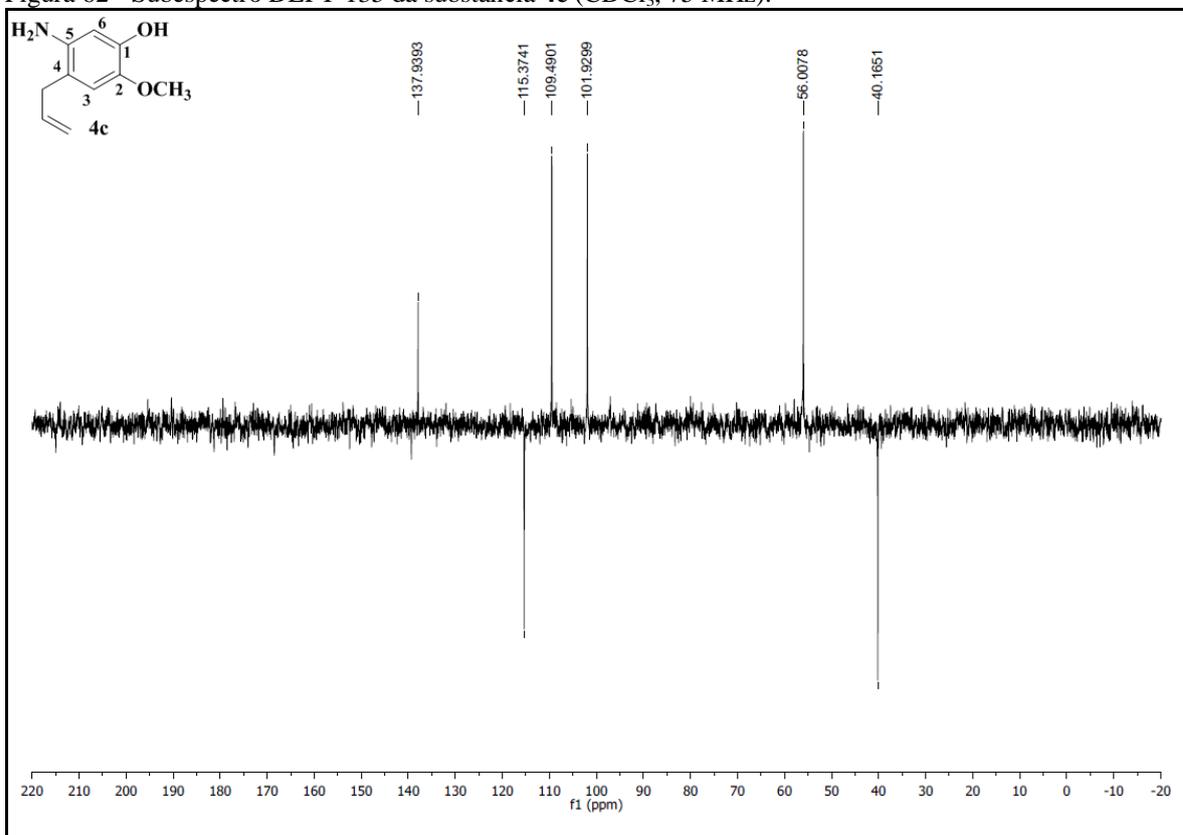
Figura 60 - Subespectro DEPT-135 da substância **4a** (CDCl_3 , 75 MHz).



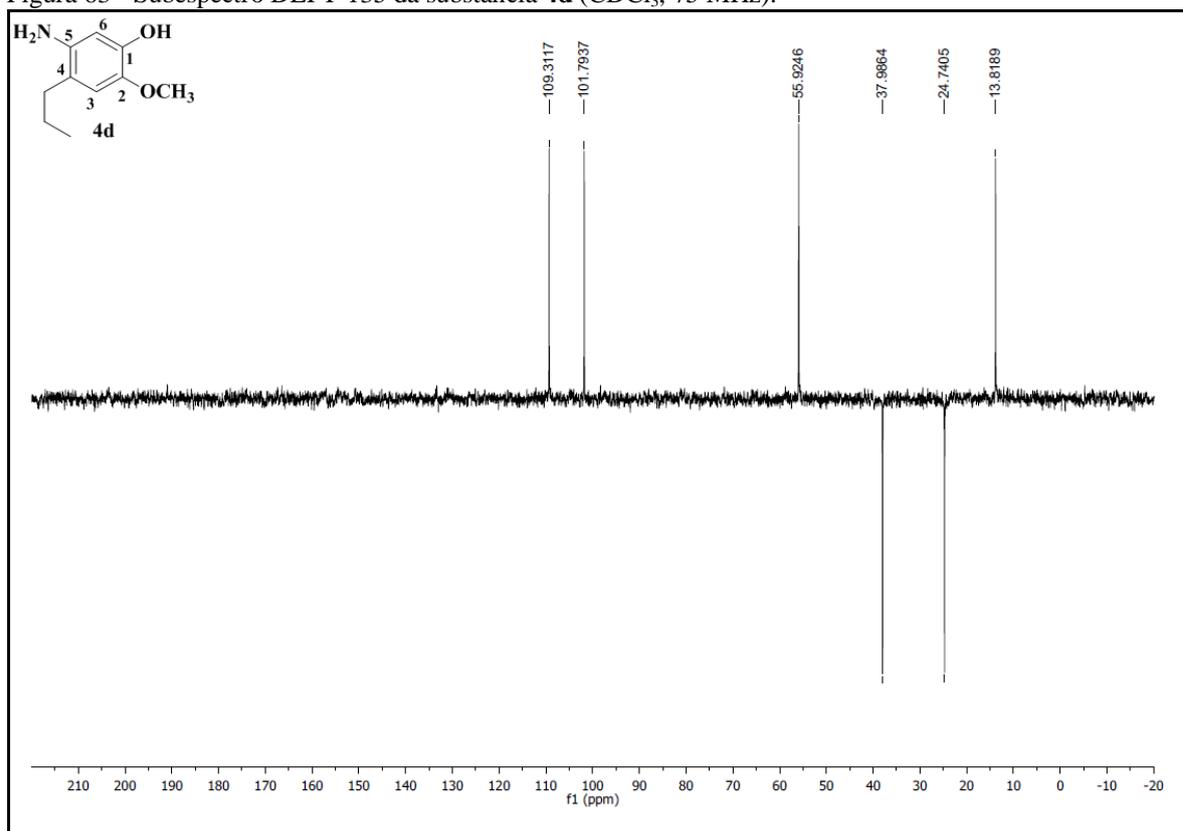
Fonte: Da autora.

Figura 61 - Subespectro DEPT-135 da substância **4b** (CDCl₃, 75 MHz).

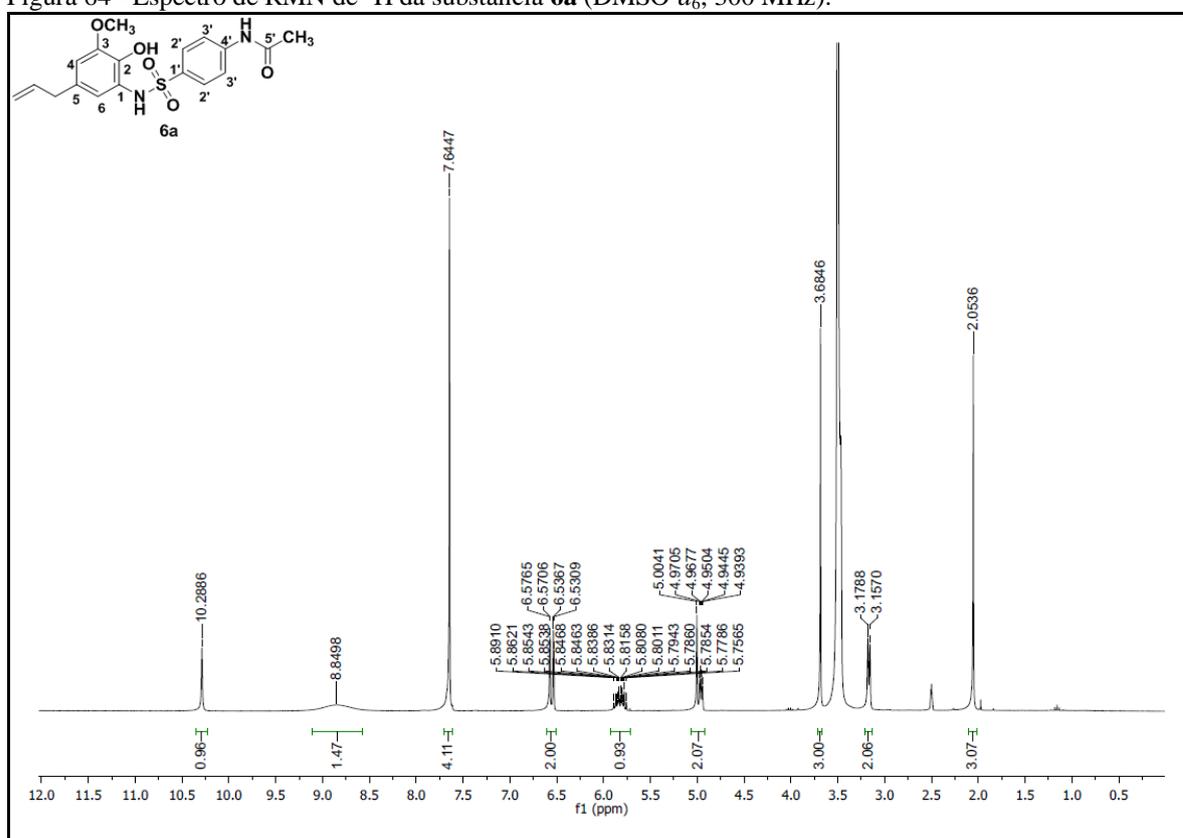
Fonte: Da autora.

Figura 62 - Subespectro DEPT-135 da substância **4c** (CDCl₃, 75 MHz).

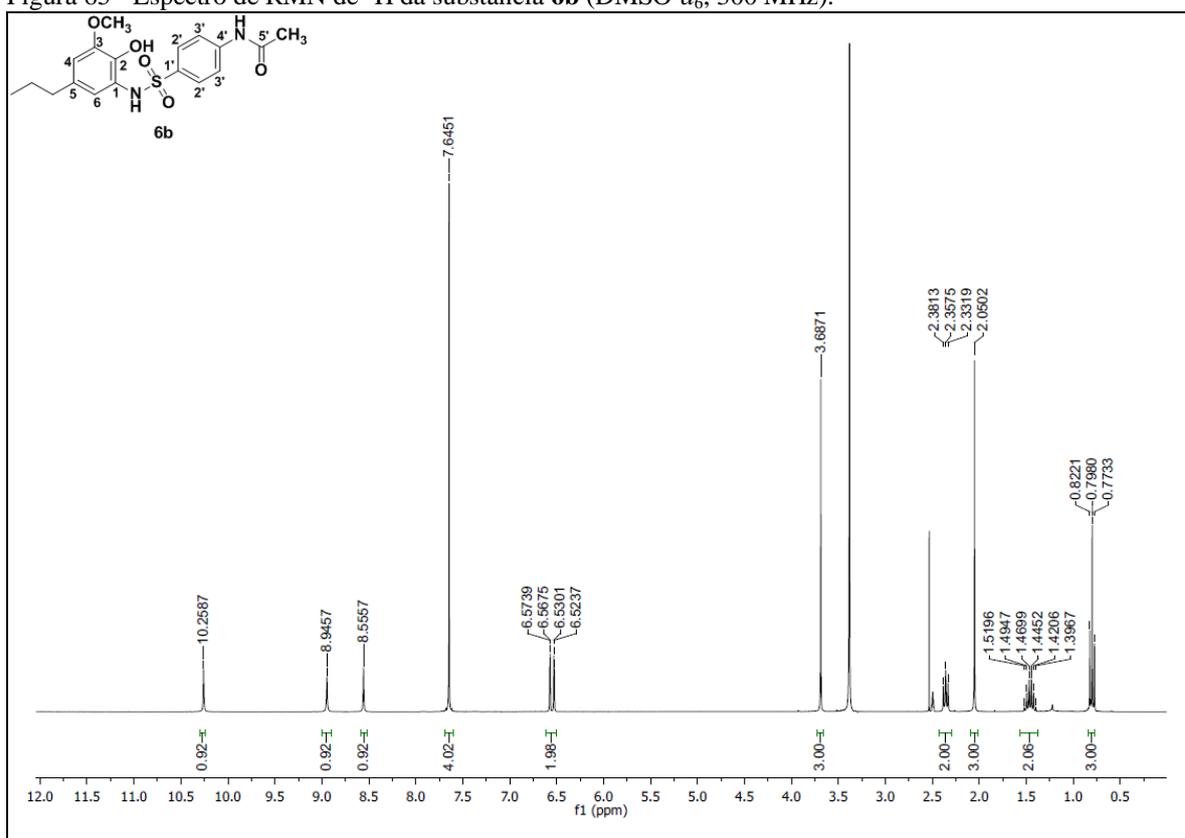
Fonte: Da autora.

Figura 63 - Subespectro DEPT-135 da substância **4d** (CDCl₃, 75 MHz).

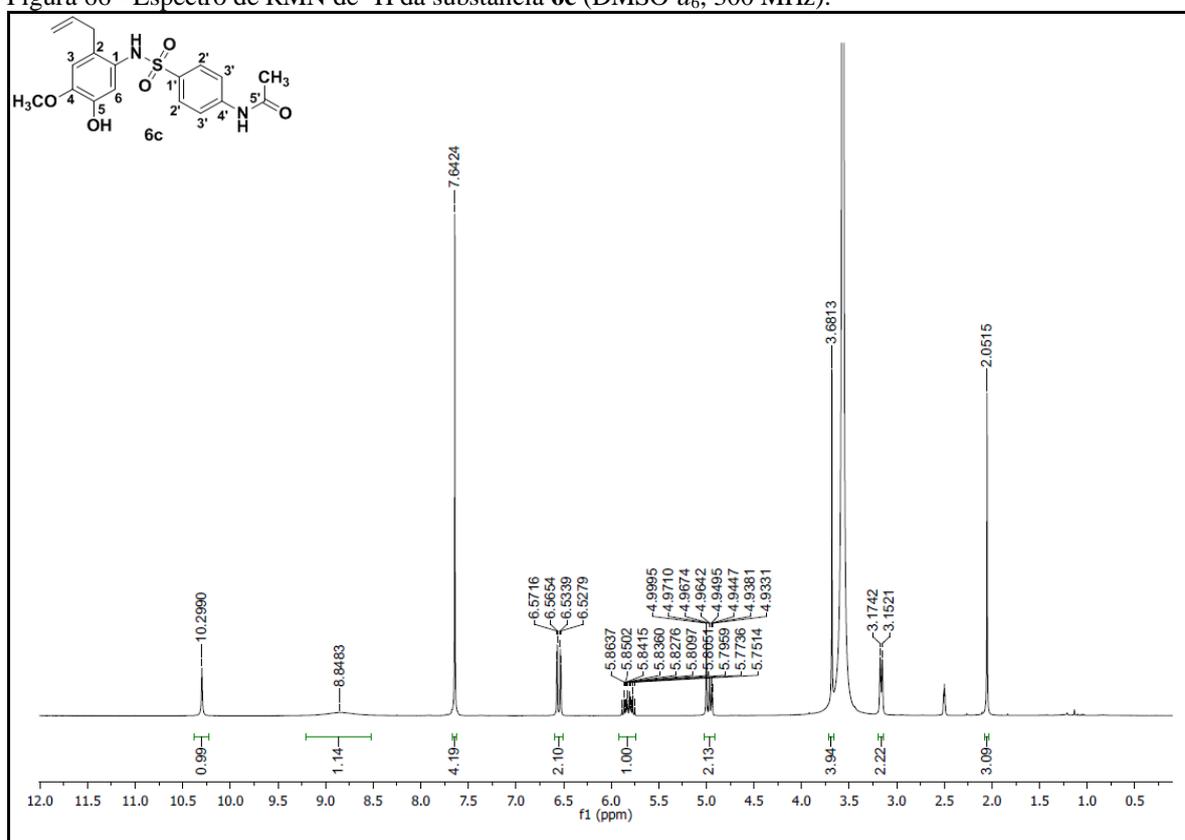
Fonte: Da autora.

Figura 64 - Espectro de RMN de ¹H da substância **6a** (DMSO-*d*₆, 300 MHz).

Fonte: Da autora.

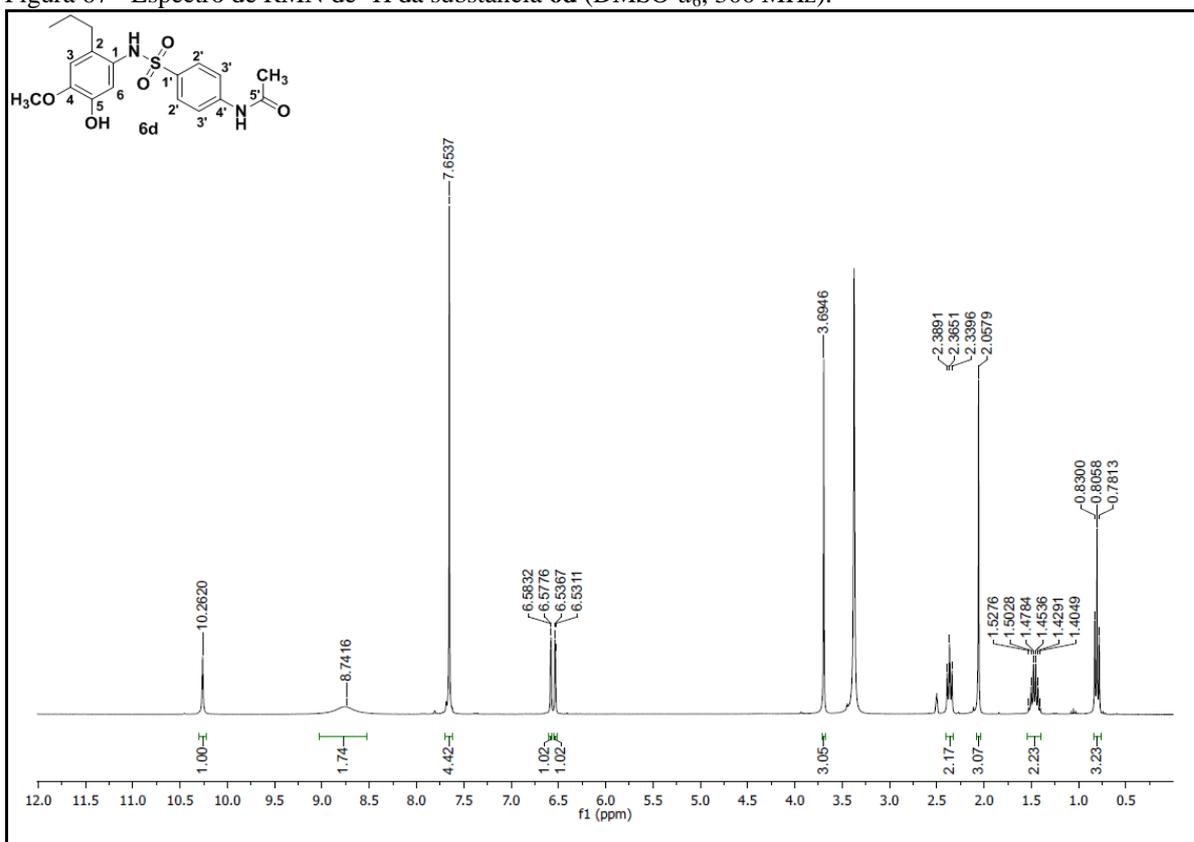
Figura 65 - Espectro de RMN de ^1H da substância **6b** (DMSO- d_6 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 66 - Espectro de RMN de ^1H da substância **6c** (DMSO- d_6 , 300 MHz).

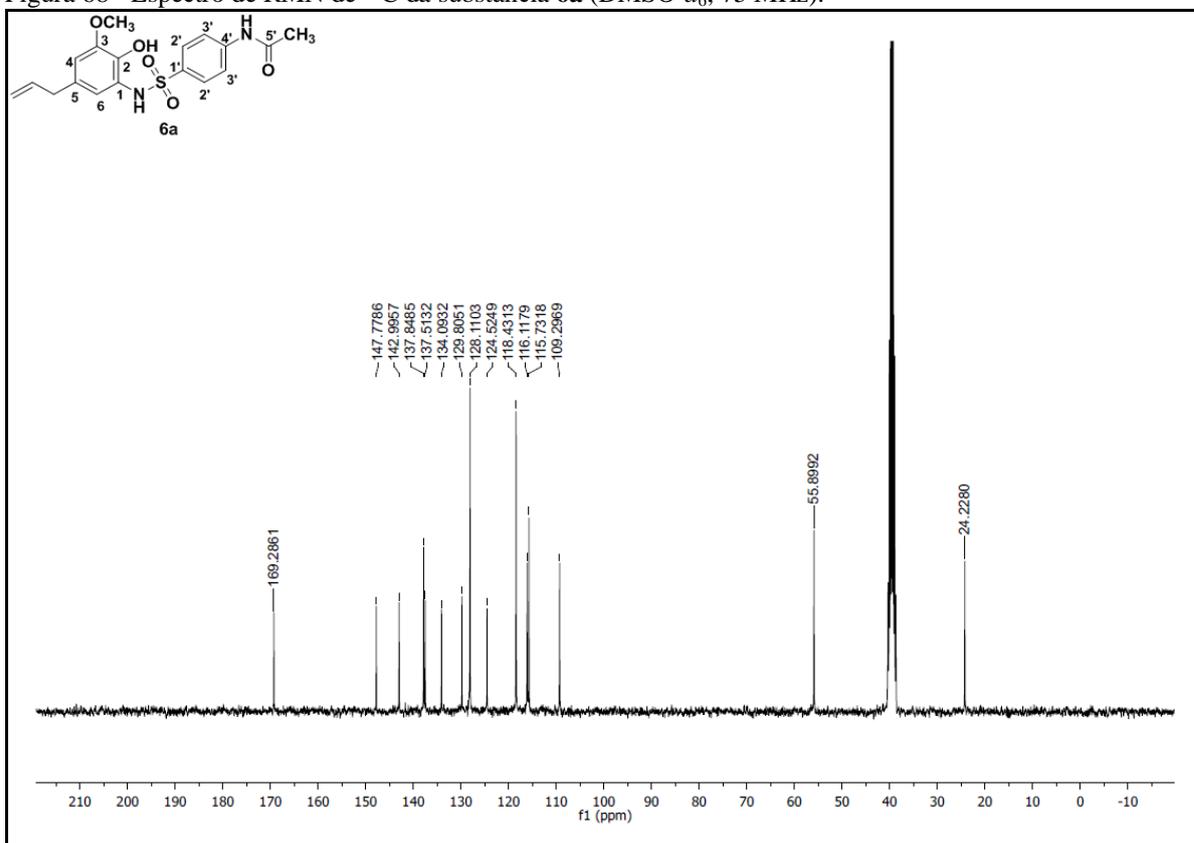
Fonte: Da autora.

Figura 67 - Espectro de RMN de ^1H da substância **6d** (DMSO- d_6 , 300 MHz).



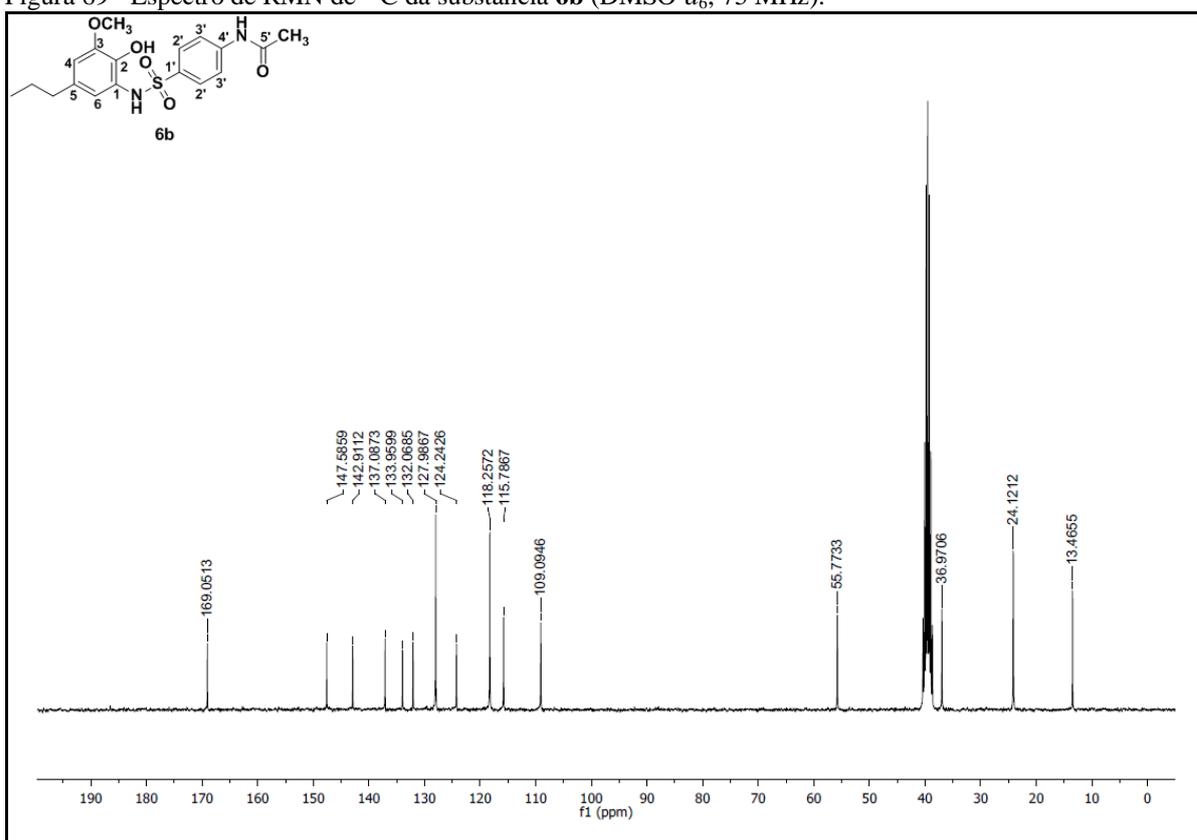
Fonte: Da autora.

Figura 68 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **6a** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



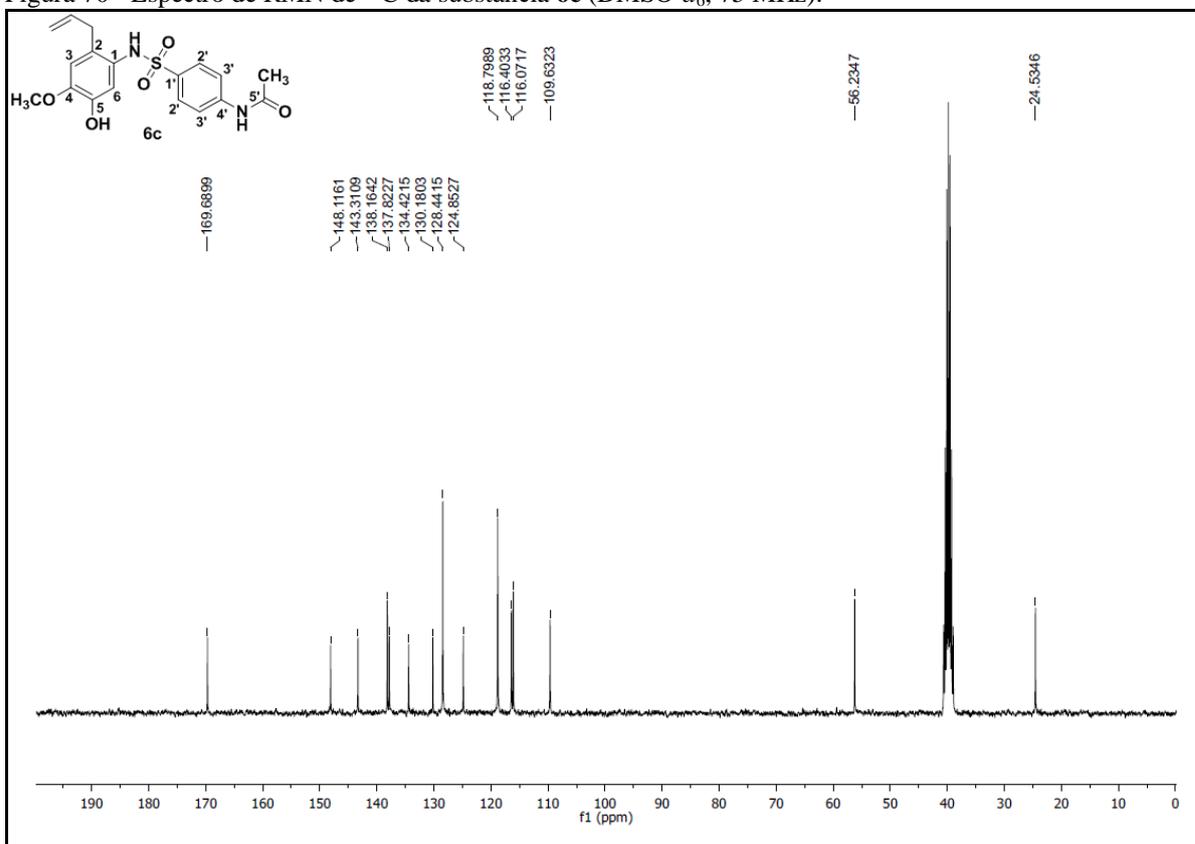
Fonte: Da autora.

Figura 69 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **6b** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



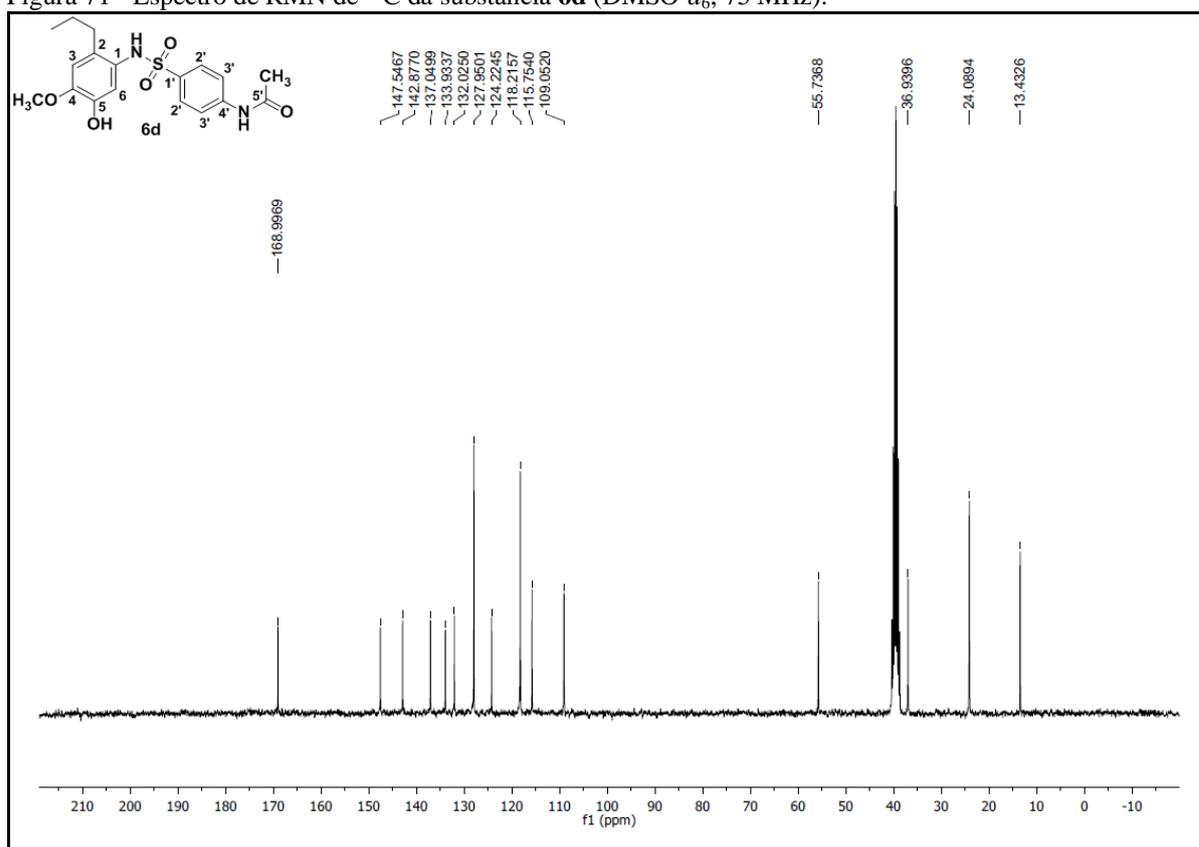
Fonte: Da autora.

Figura 70 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **6c** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



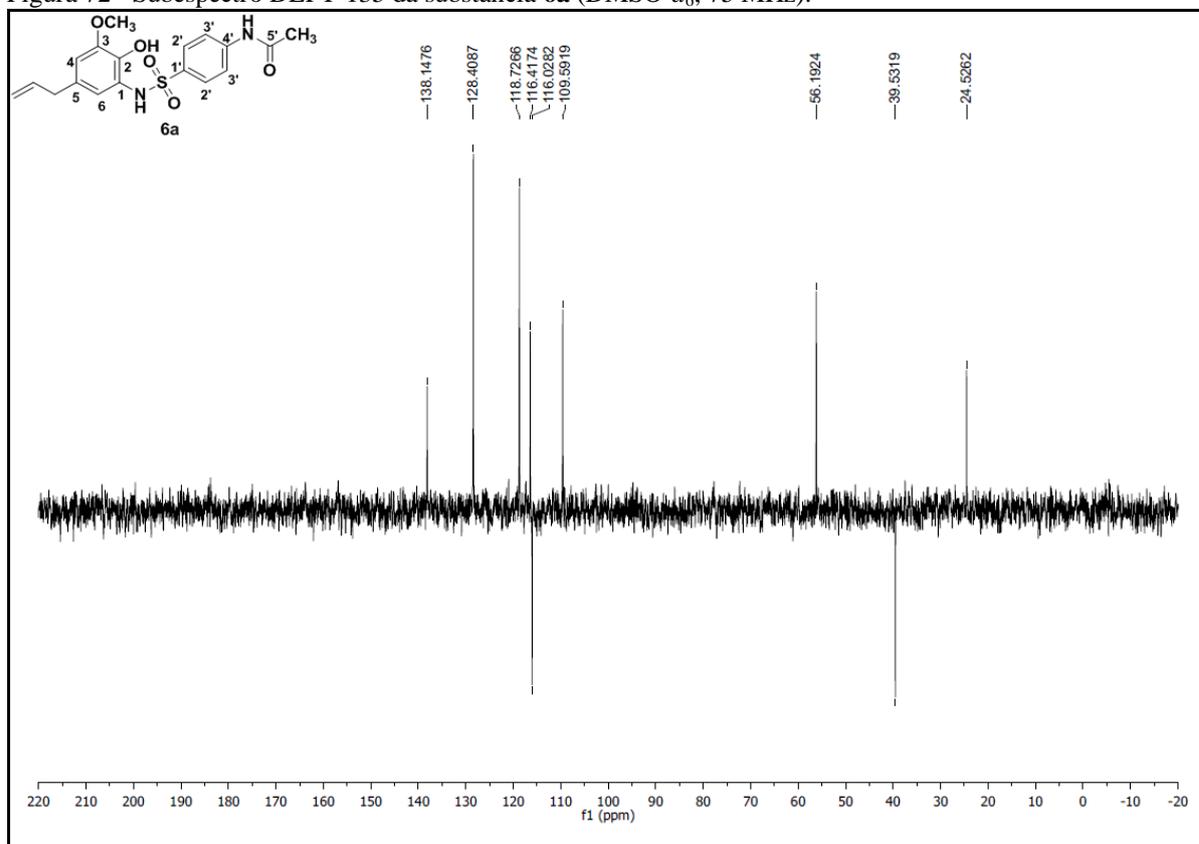
Fonte: Da autora.

Figura 71 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **6d** (DMSO- d_6 , 75 MHz).

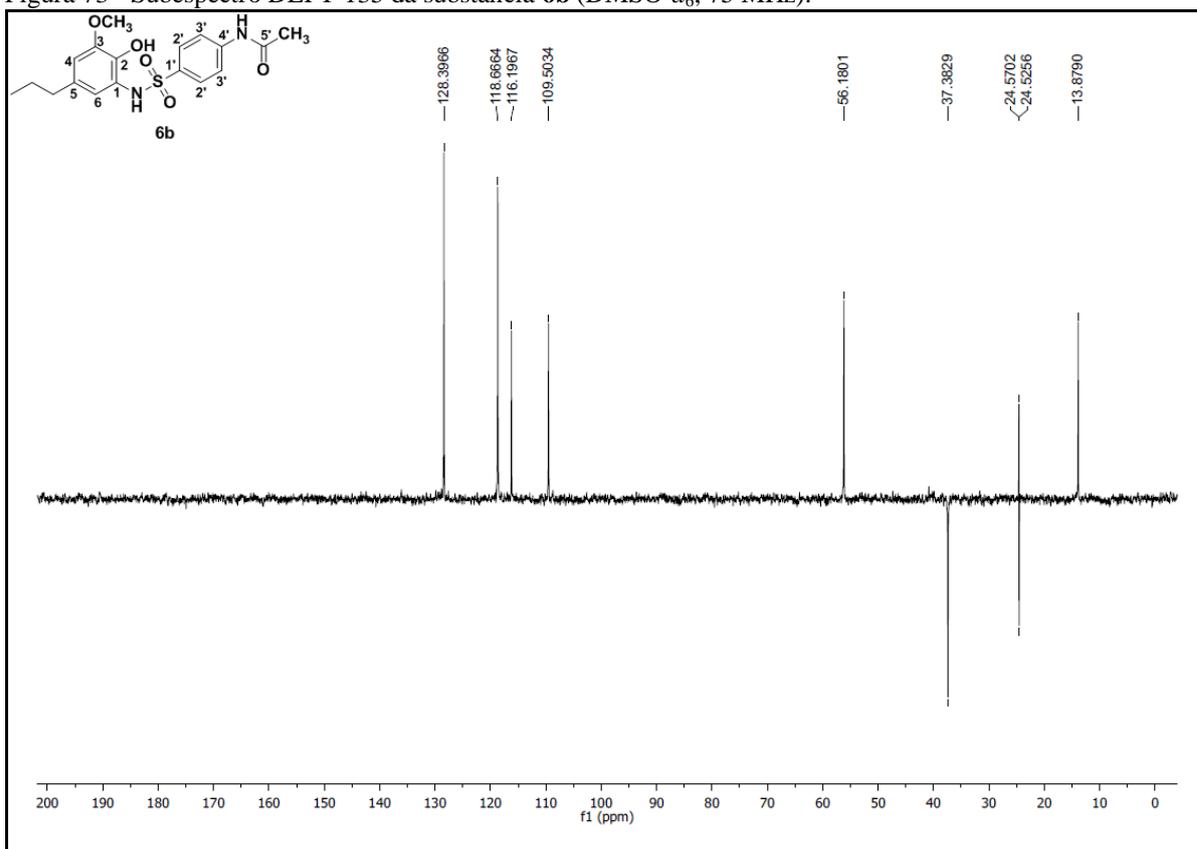


Fonte: Da autora.

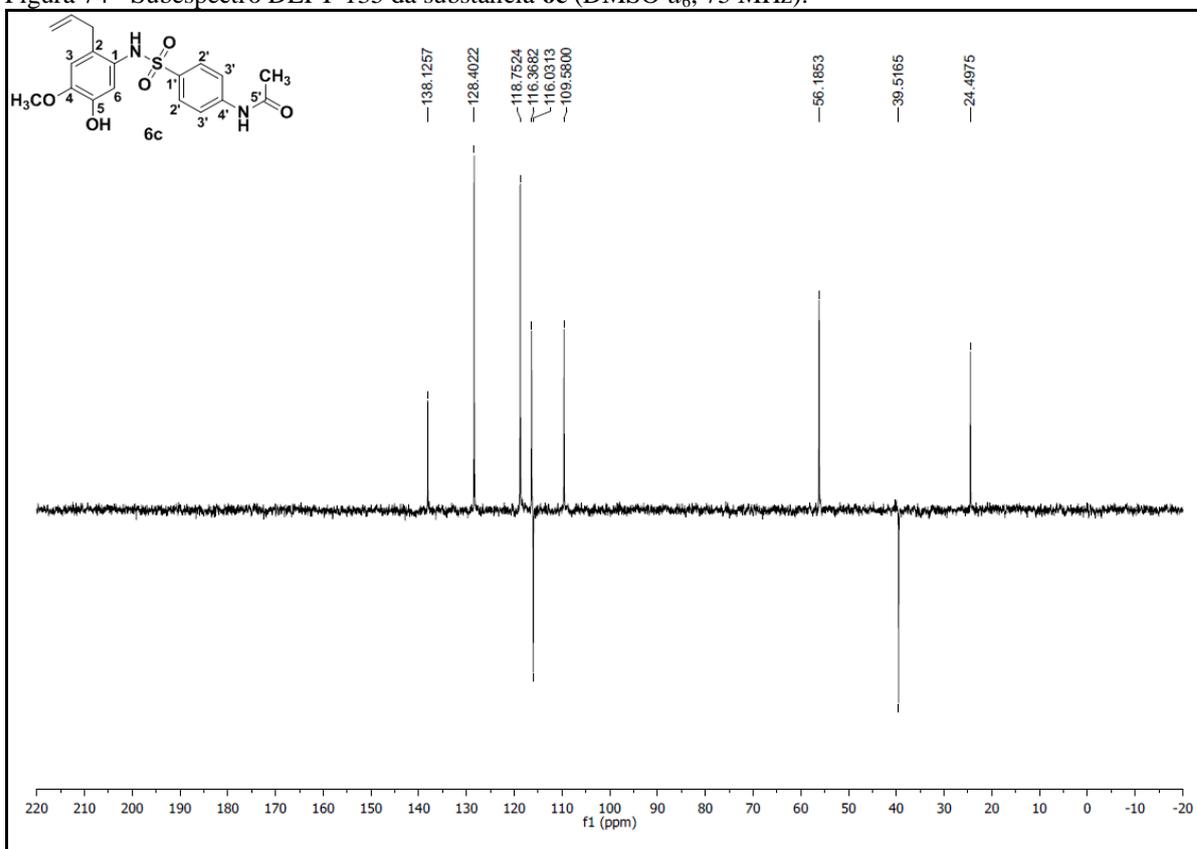
Figura 72 - Subespectro DEPT-135 da substância **6a** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



Fonte: Da autora.

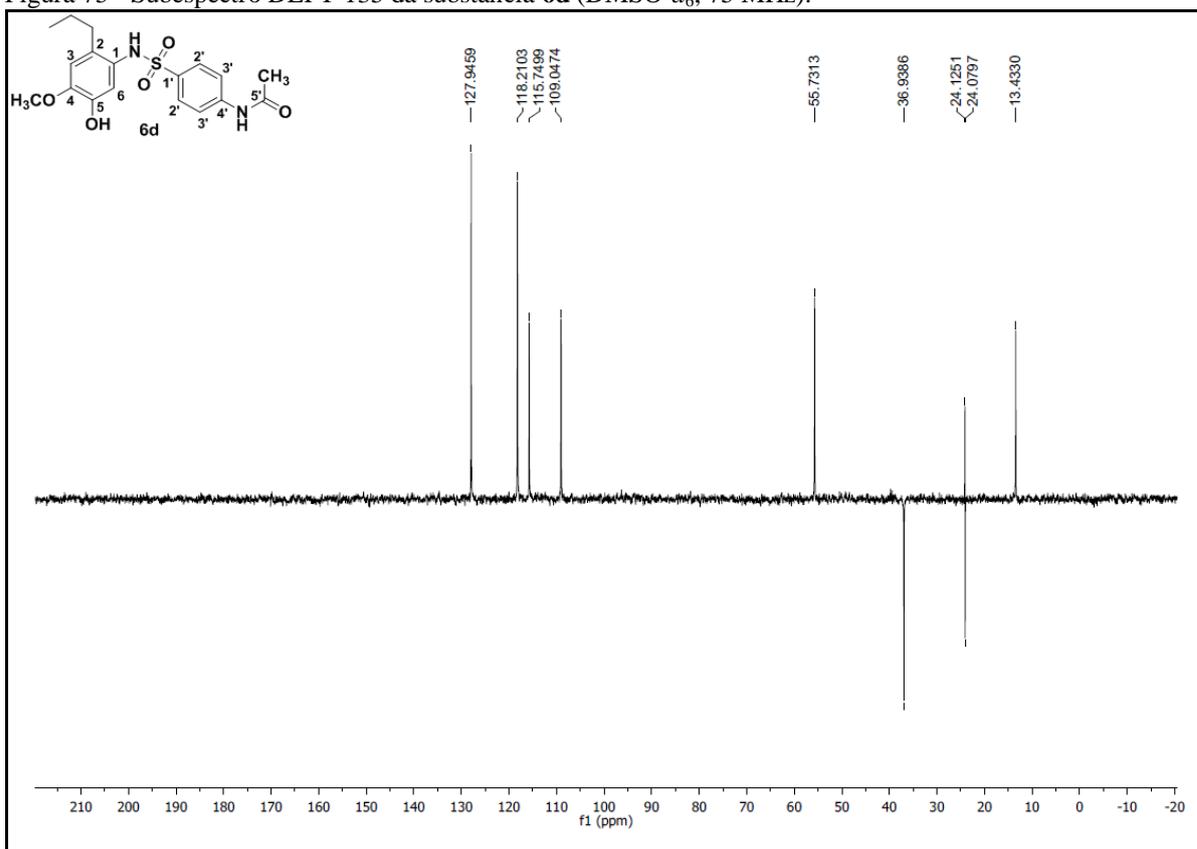
Figura 73 - Subespectro DEPT-135 da substância **6b** (DMSO-*d*₆, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 74 - Subespectro DEPT-135 da substância **6c** (DMSO-*d*₆, 75 MHz).

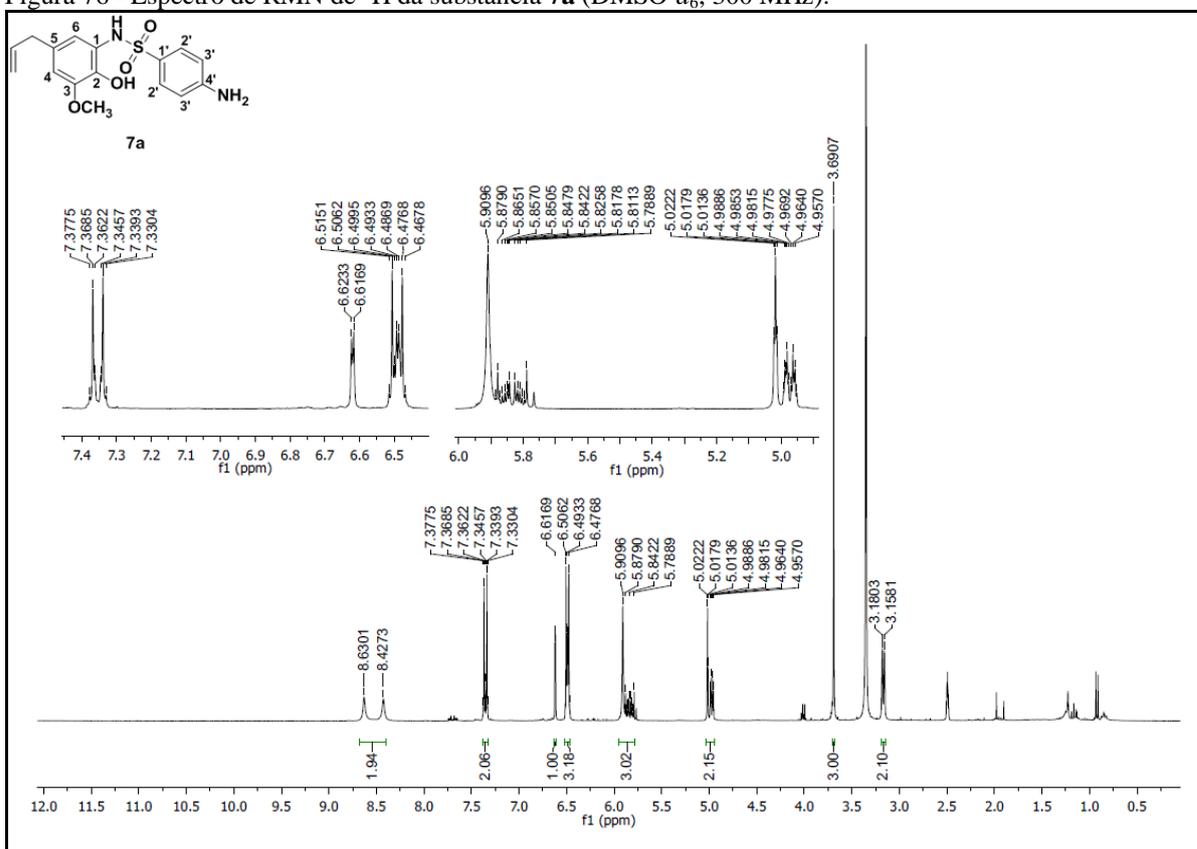
Fonte: Da autora.

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

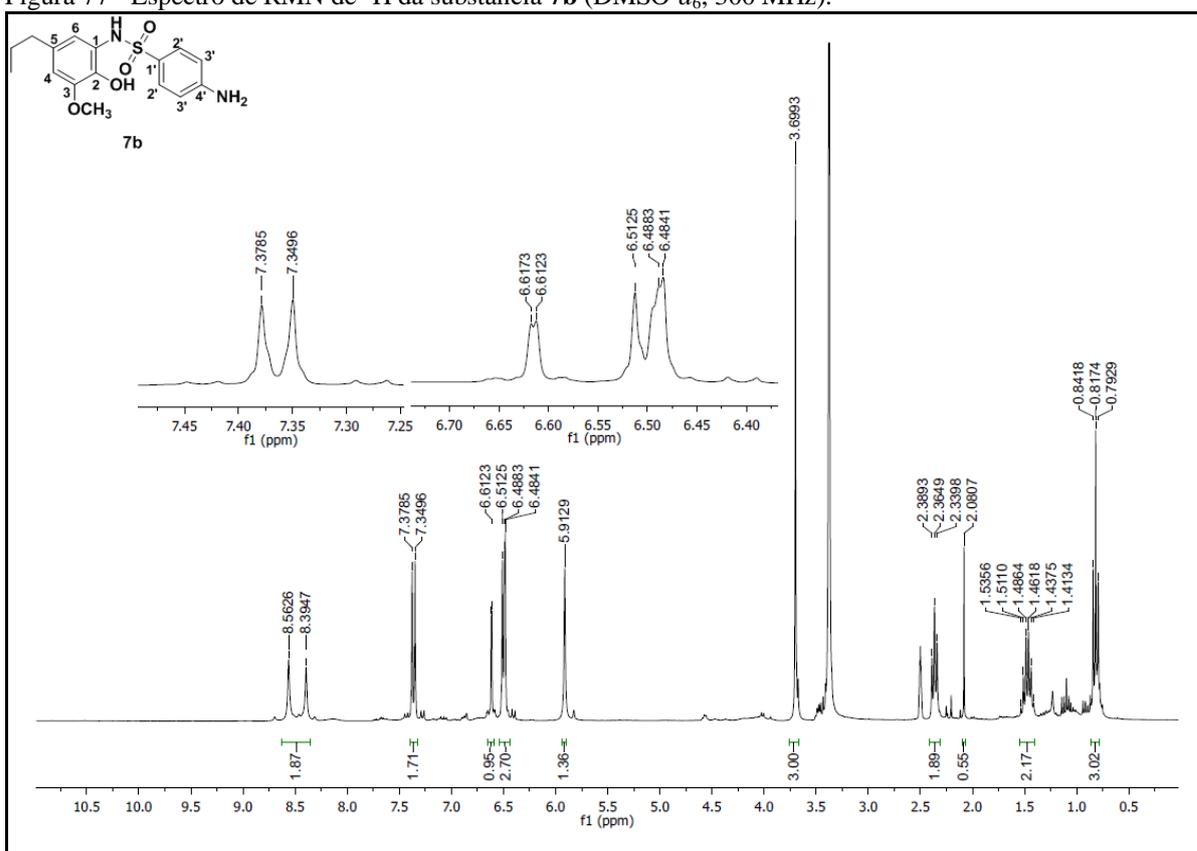


Fonte: Da autora.

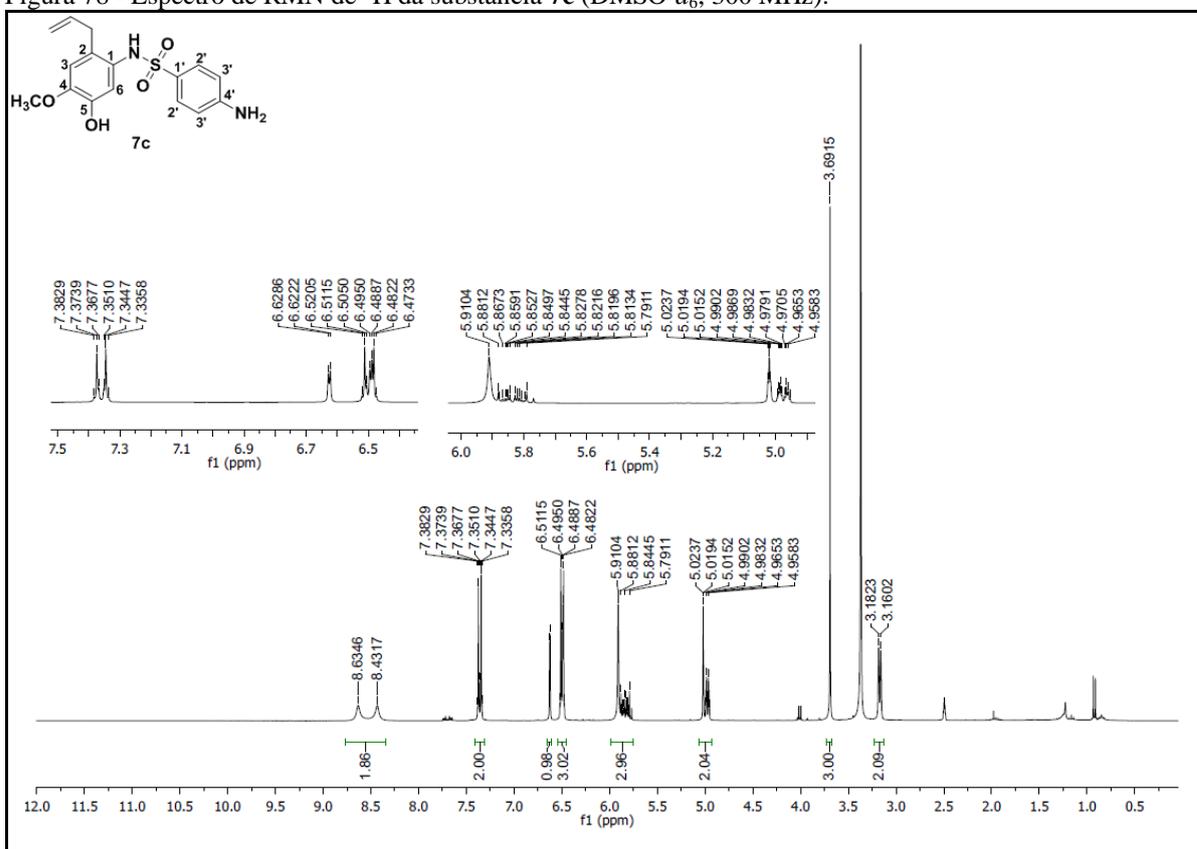
Figura 76 - Espectro de RMN de ¹H da substância **7a** (DMSO-*d*₆, 300 MHz).



Fonte: Da autora.

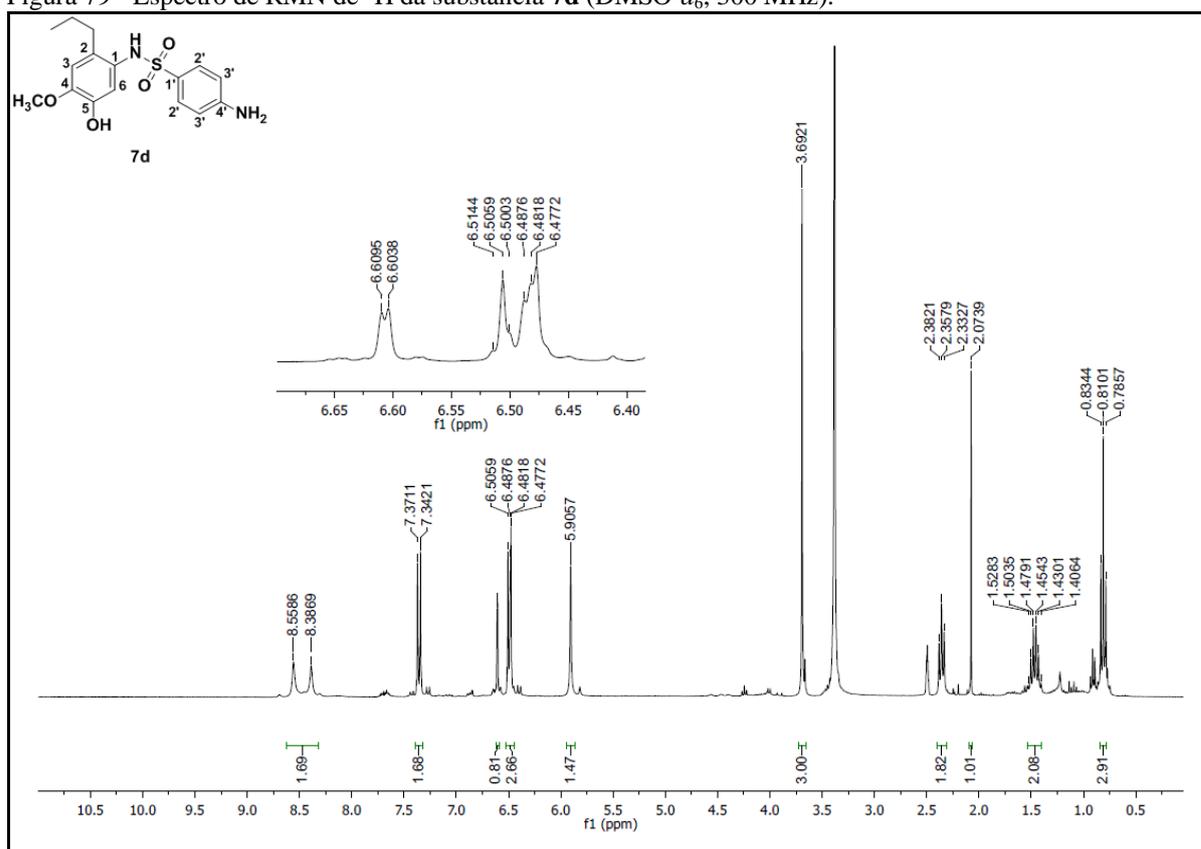
Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H da substância **7b** (DMSO- d_6 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 78 - Espectro de RMN de ^1H da substância **7c** (DMSO- d_6 , 300 MHz).

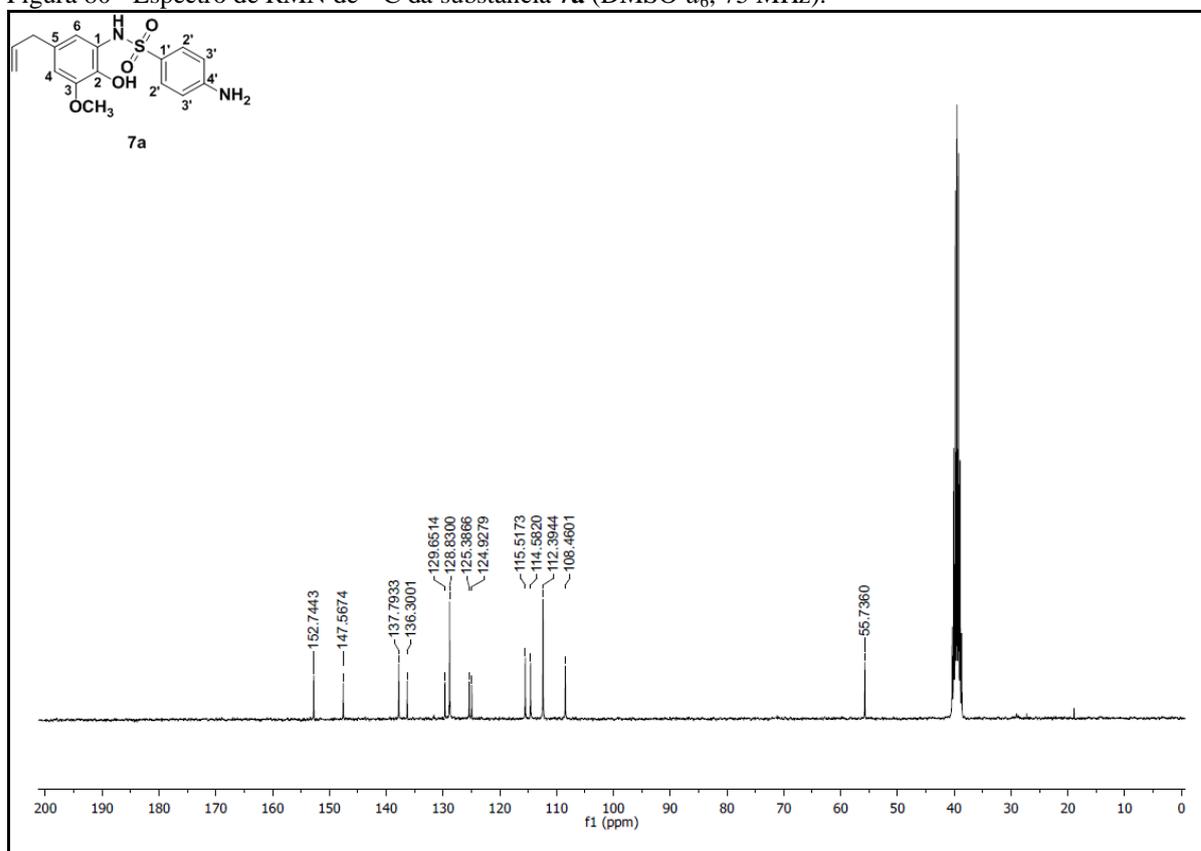
Fonte: Da autora.

Figura 79 - Espectro de RMN de ^1H da substância **7d** (DMSO- d_6 , 300 MHz).



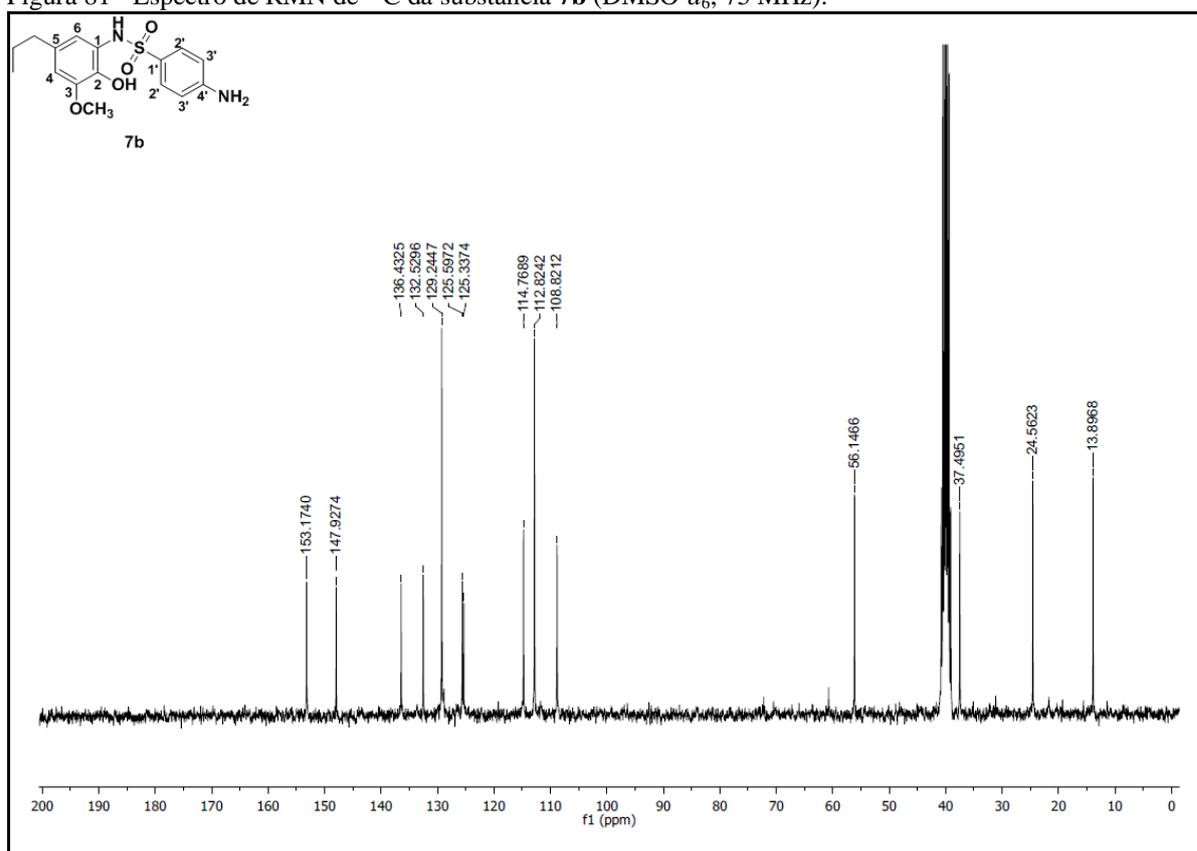
Fonte: Da autora.

Figura 80 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7a** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



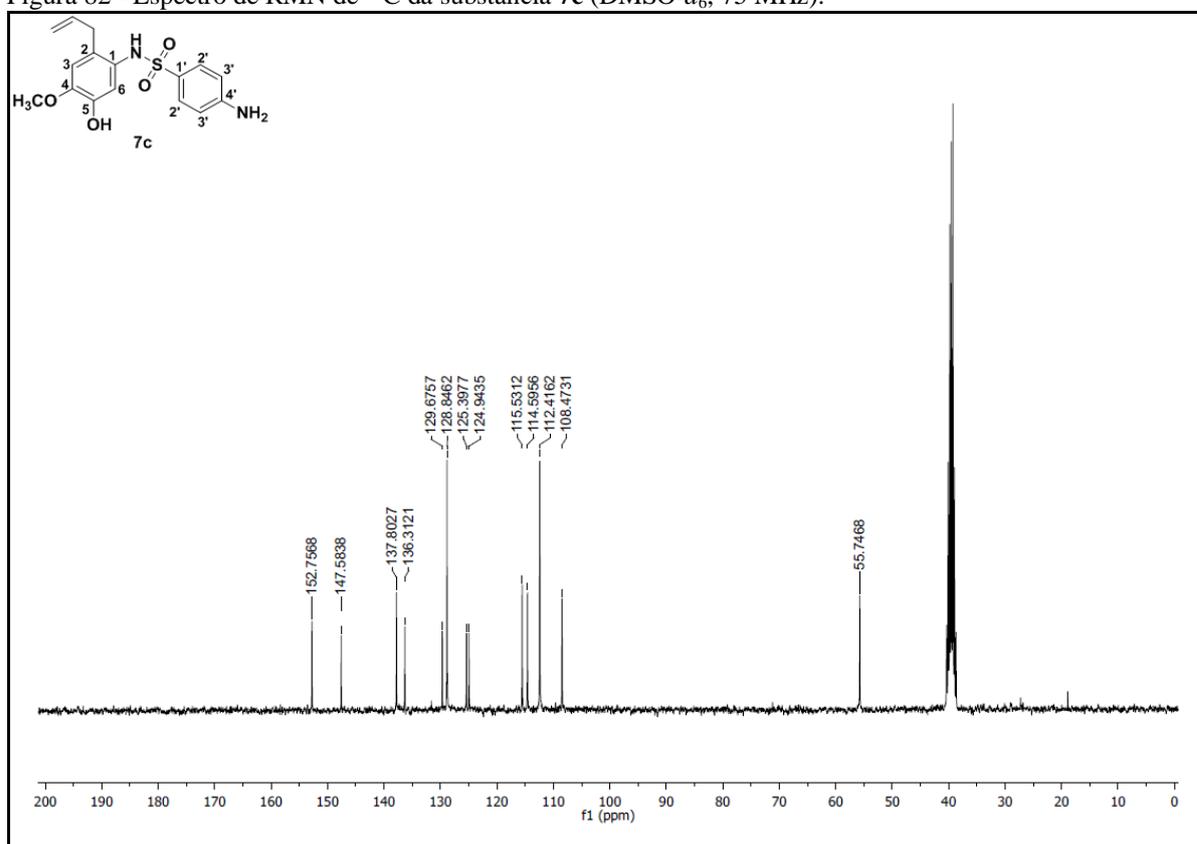
Fonte: Da autora.

Figura 81 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7b** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



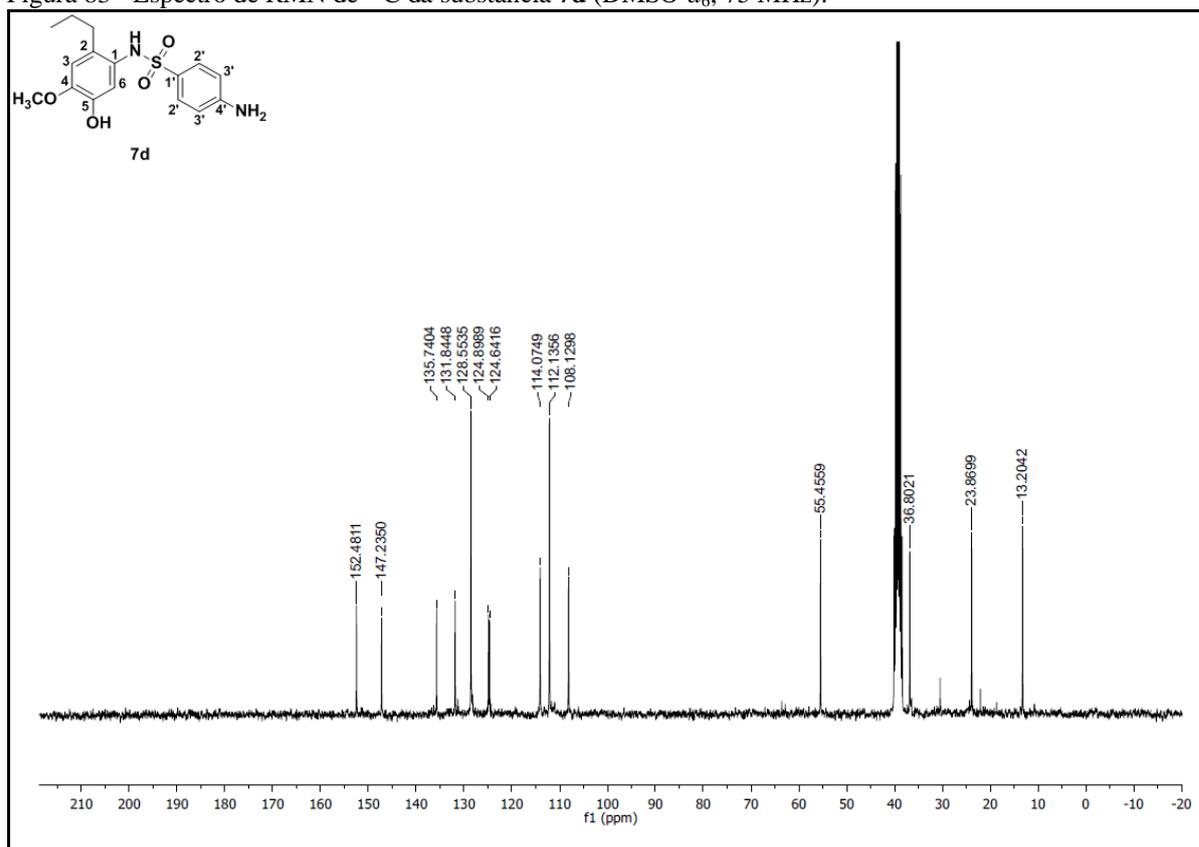
Fonte: Da autora.

Figura 82 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7c** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



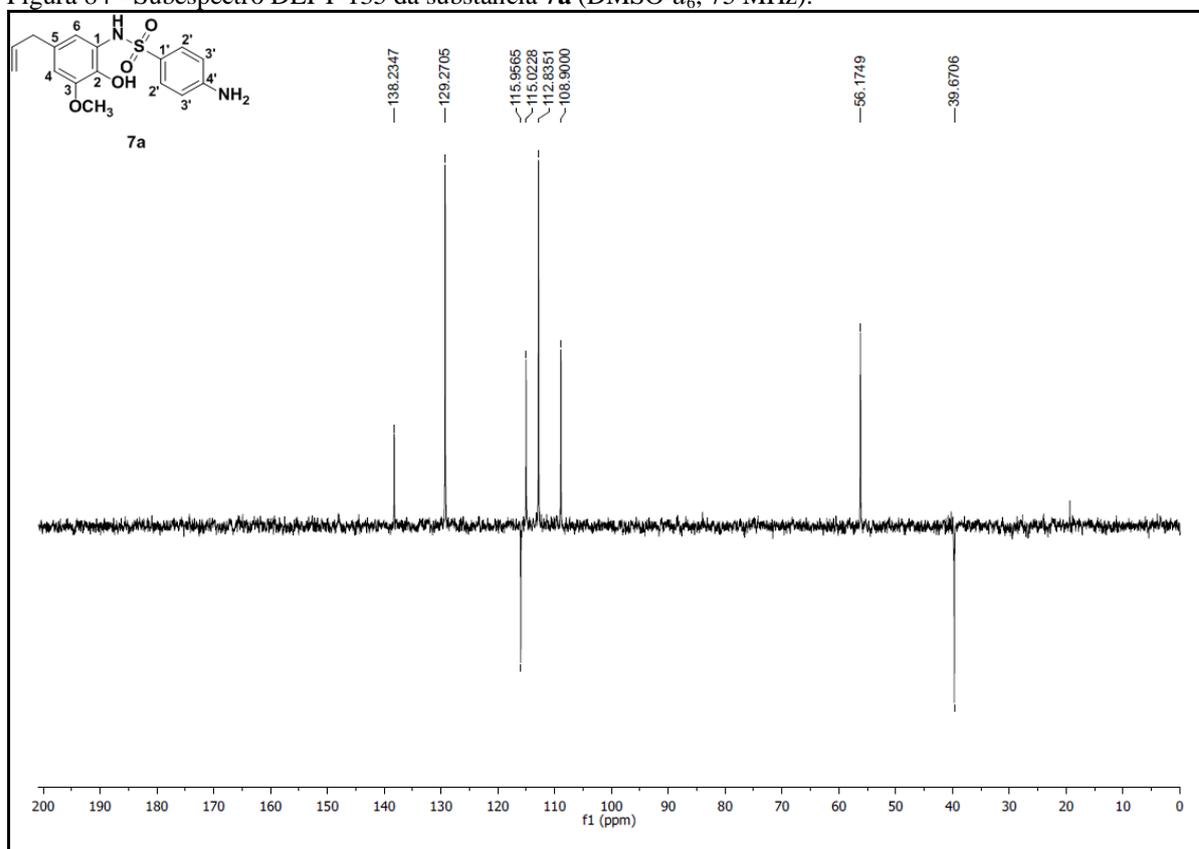
Fonte: Da autora.

Figura 83 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7d** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



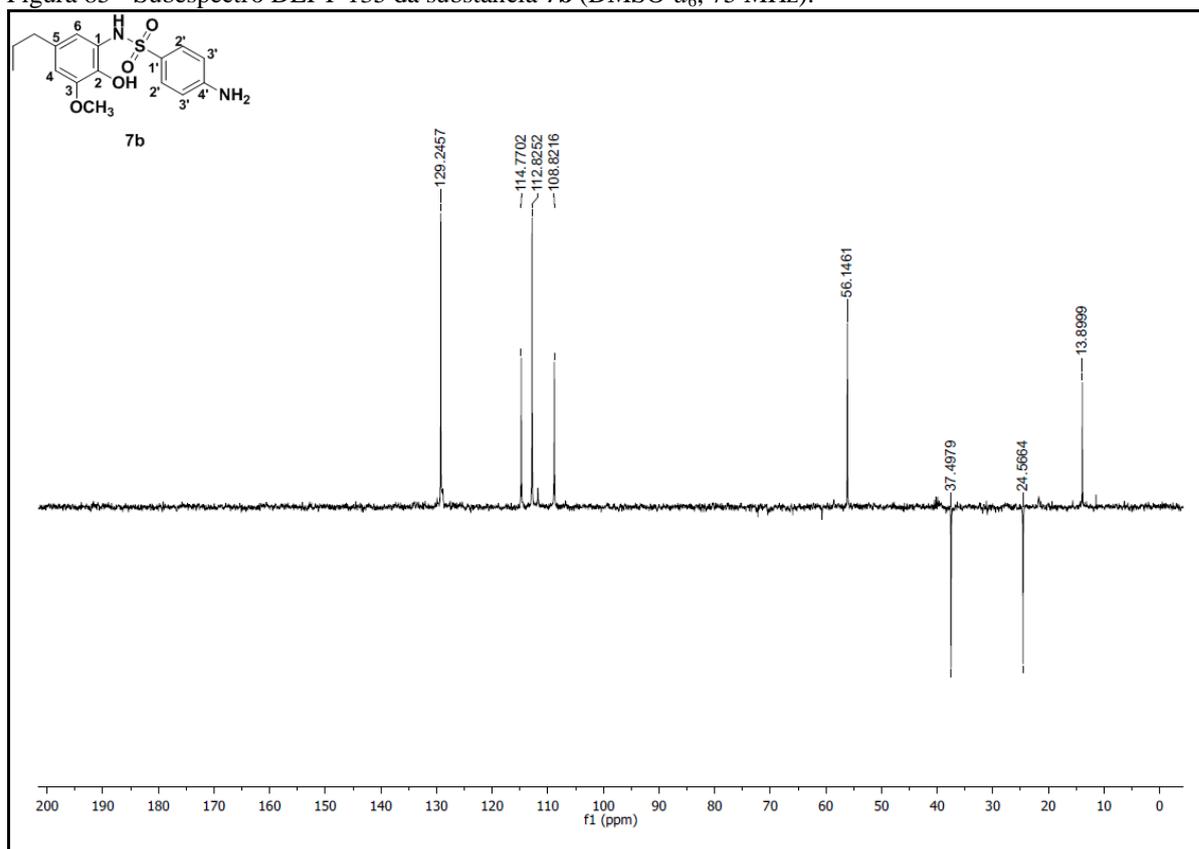
Fonte: Da autora.

Figura 84 - Subespectro DEPT-135 da substância **7a** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



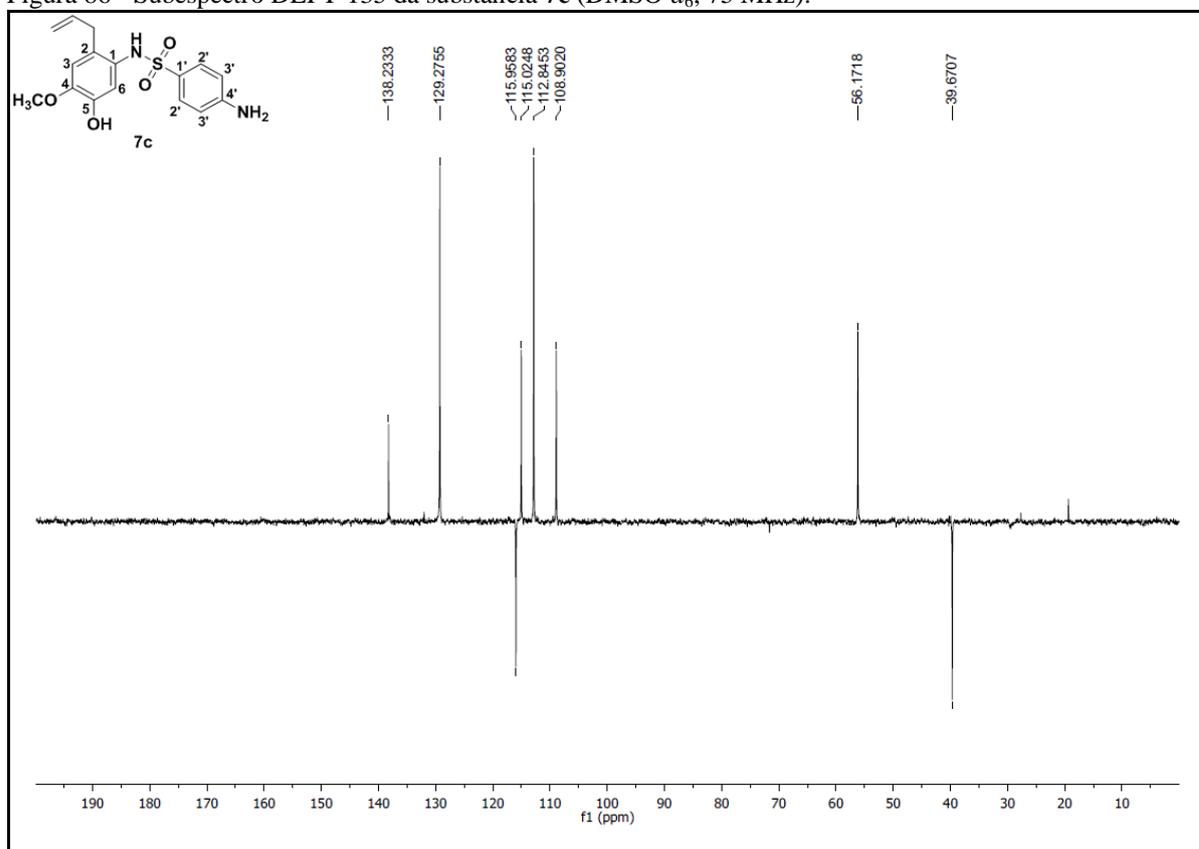
Fonte: Da autora.

Figura 85 - Subespectro DEPT-135 da substância **7b** (DMSO-*d*₆, 75 MHz).

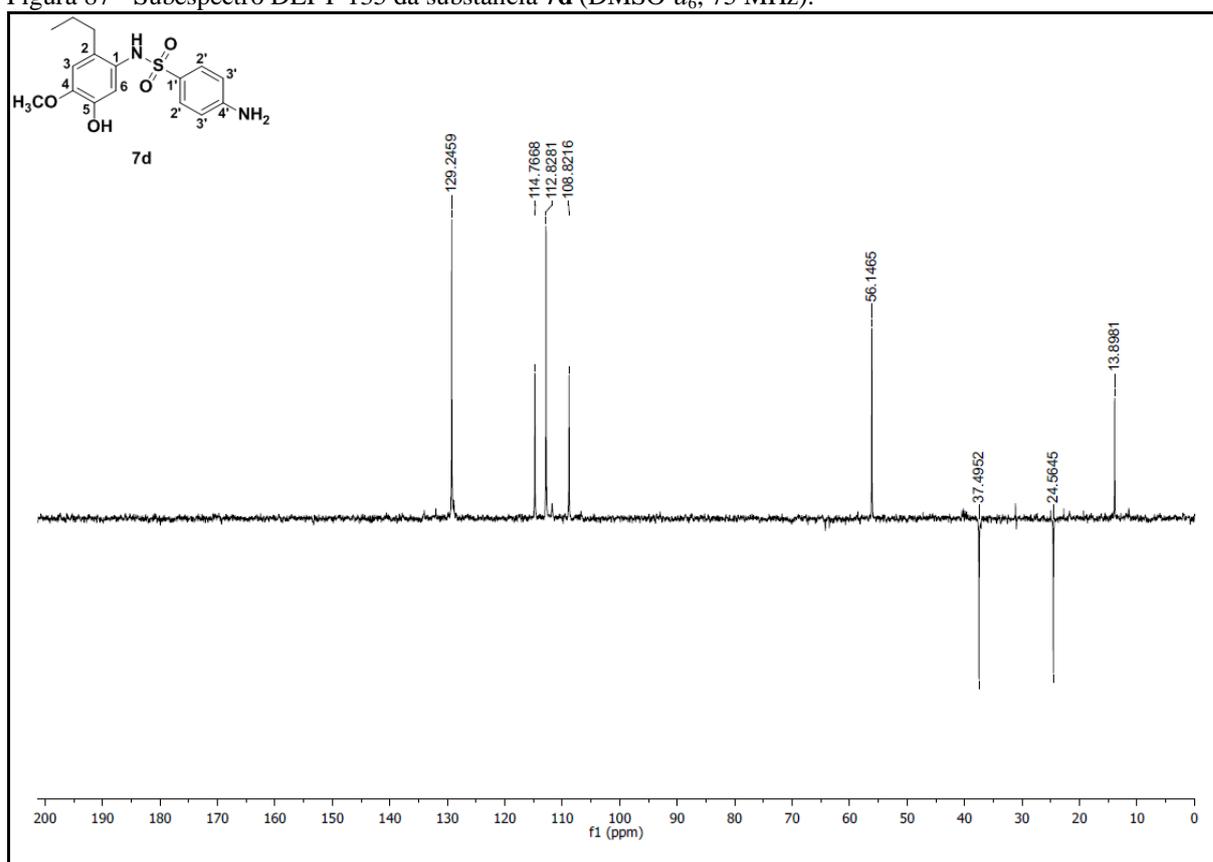


Fonte: Da autora.

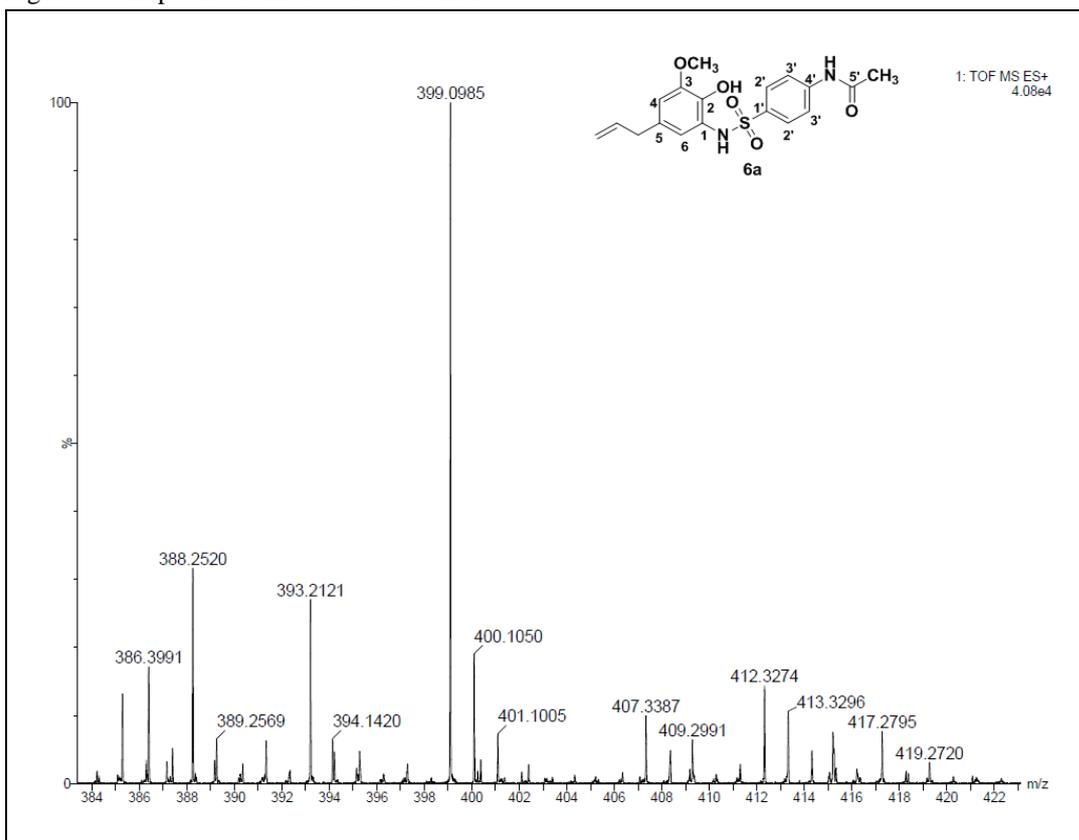
Figura 86 - Subespectro DEPT-135 da substância **7c** (DMSO-*d*₆, 75 MHz).



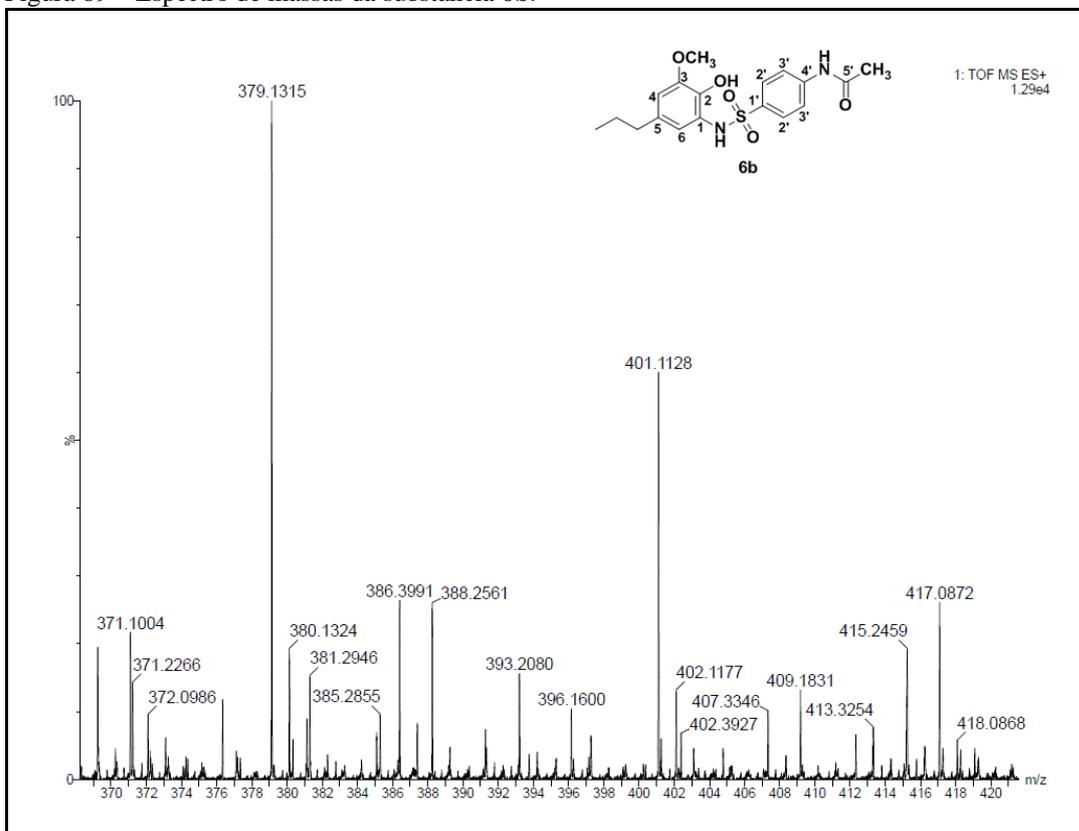
Fonte: Da autora.

Figura 87 - Subespectro DEPT-135 da substância **7d** (DMSO-*d*₆, 75 MHz).

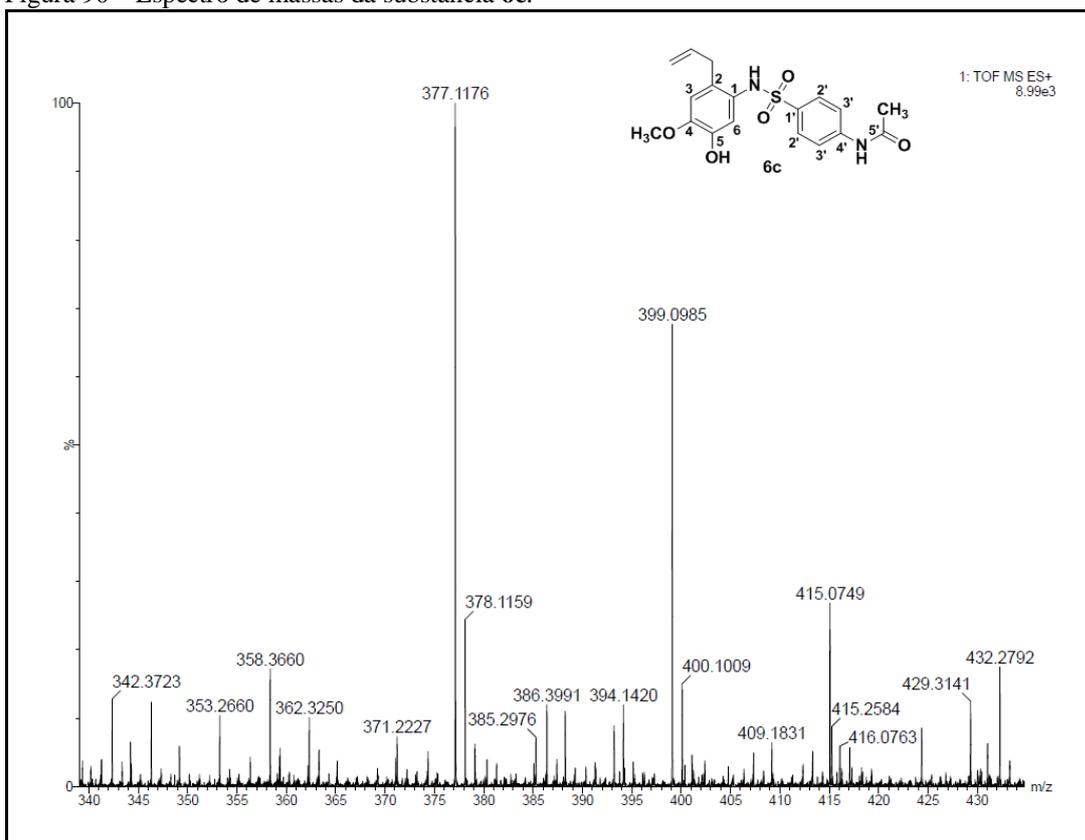
Fonte: Da autora.

Figura 88 - Espectro de massas da substância **6a**.

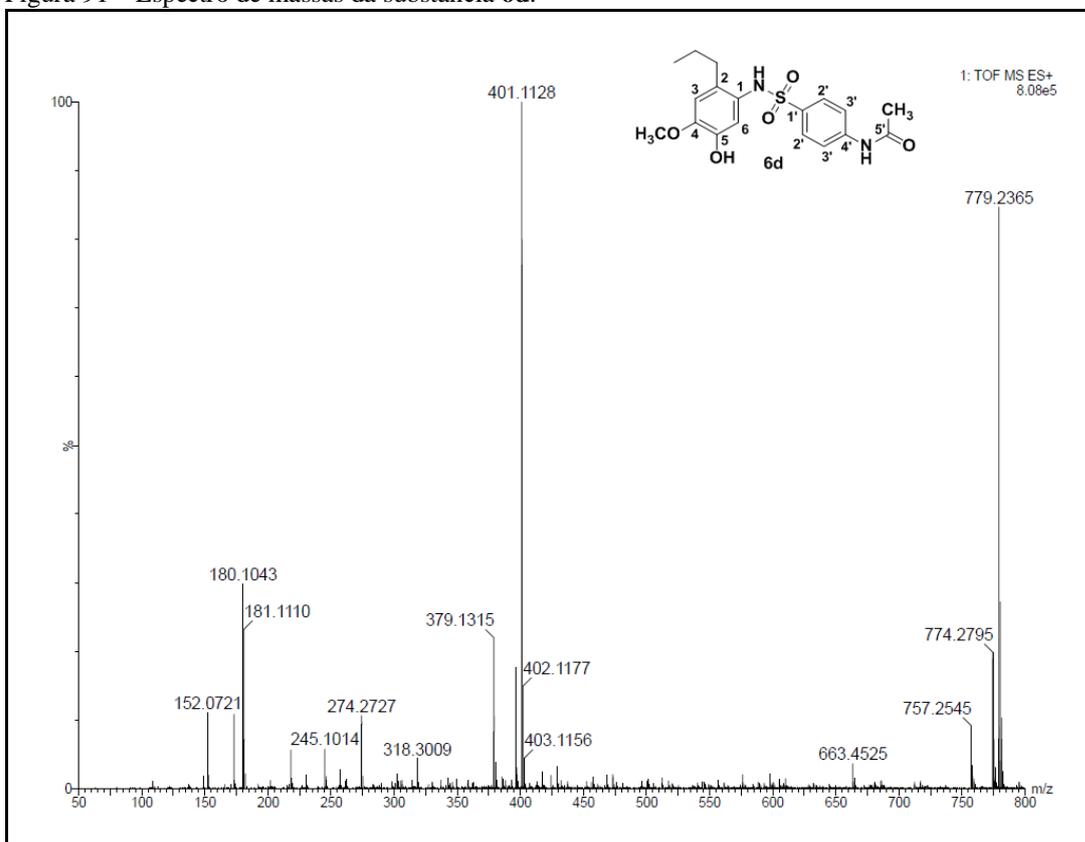
Fonte: Da autora.

Figura 89 – Espectro de massas da substância **6b**.

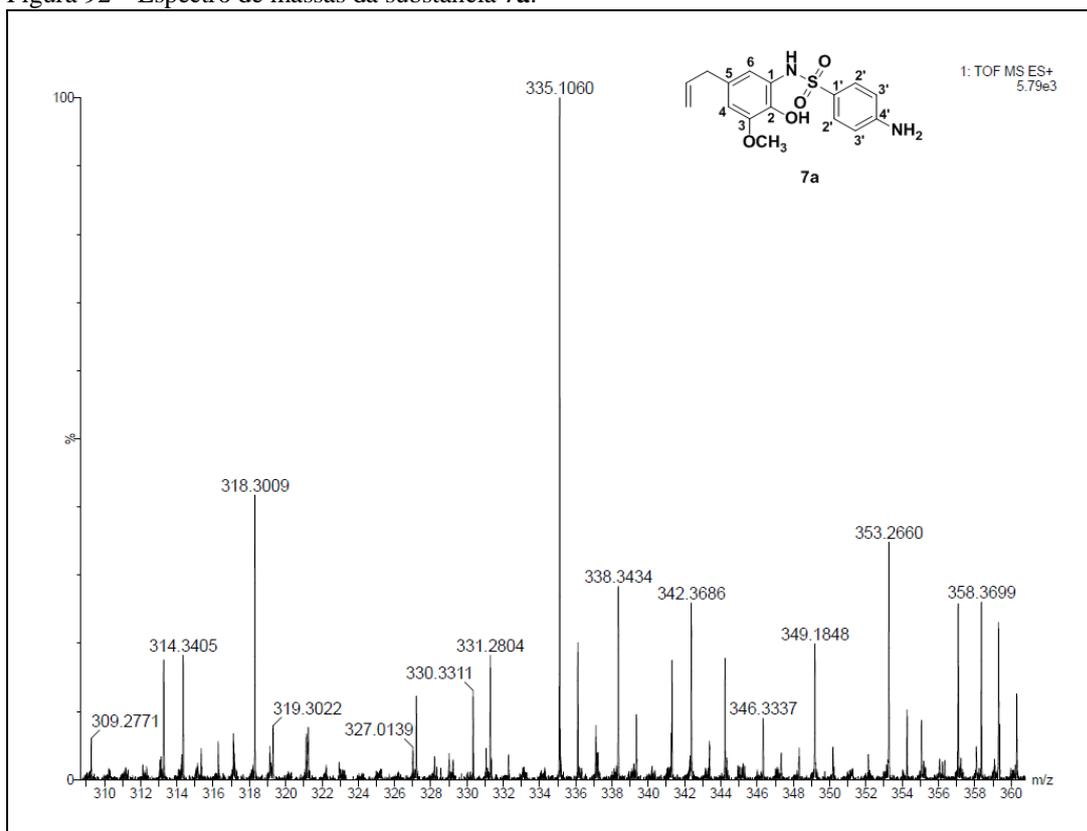
Fonte: Da autora.

Figura 90 – Espectro de massas da substância **6c**.

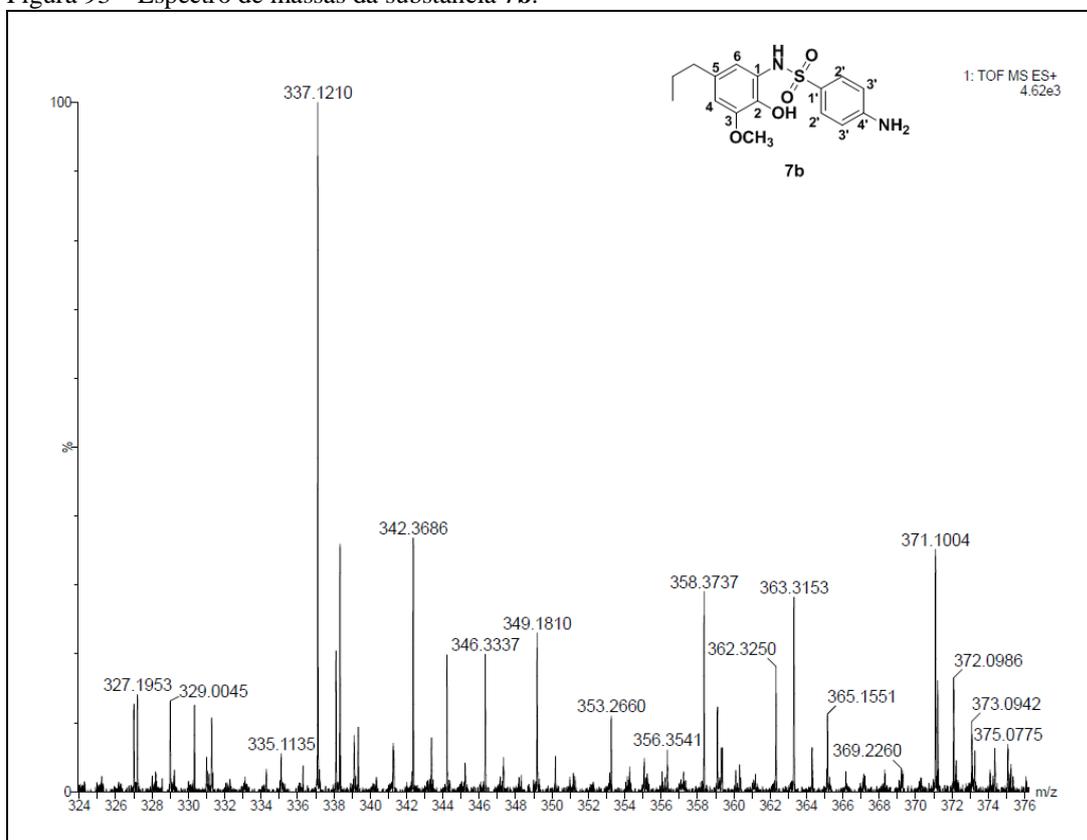
Fonte: Da autora.

Figura 91 – Espectro de massas da substância **6d**.

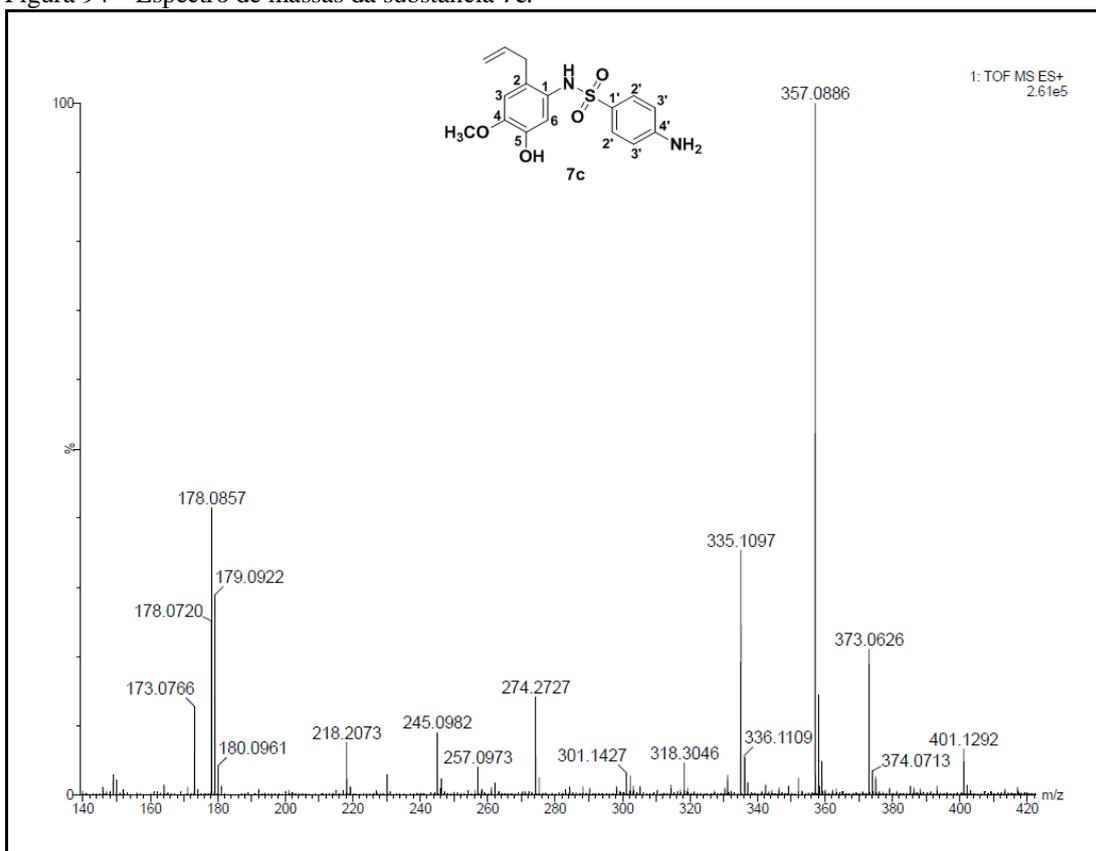
Fonte: Da autora.

Figura 92 – Espectro de massas da substância **7a**.

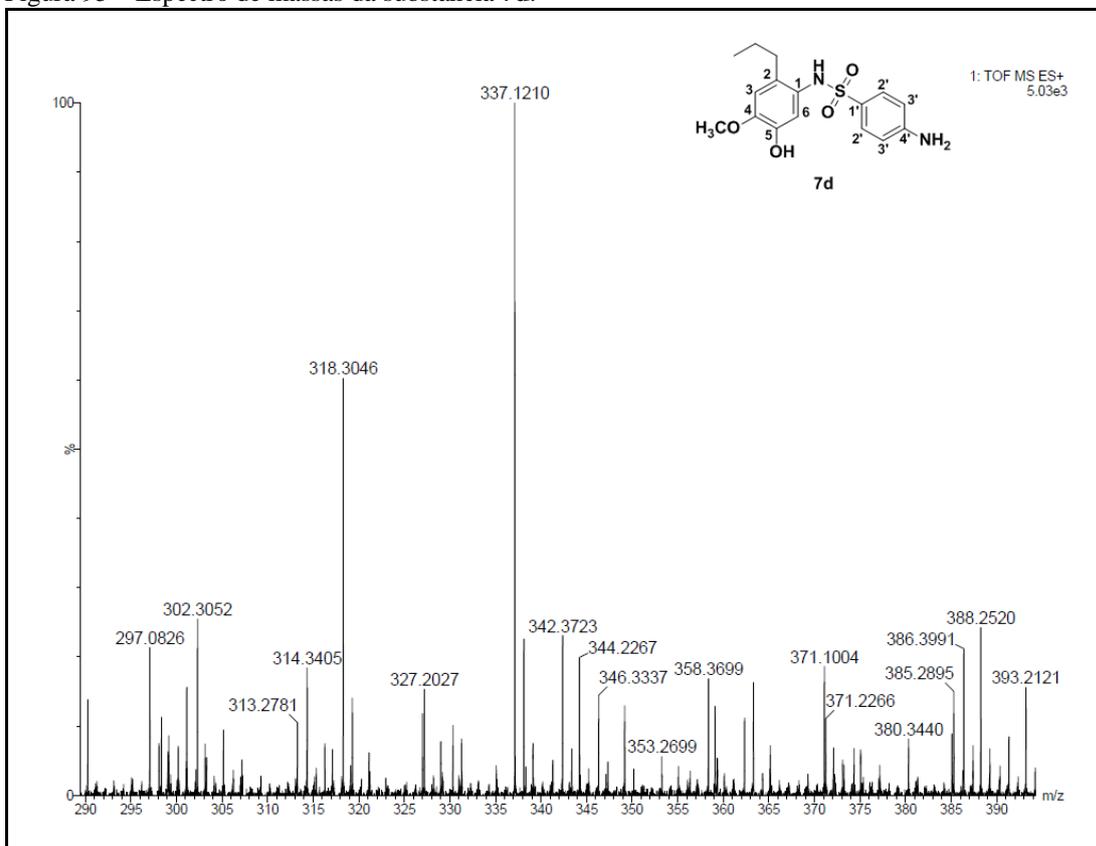
Fonte: Da autora.

Figura 93 – Espectro de massas da substância **7b**.

Fonte: Da autora.

Figura 94 – Espectro de massas da substância **7c**.

Fonte: Da autora.

Figura 95 – Espectro de massas da substância **7d**.

Fonte: Da autora.