



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS DIARÍLICOS
CONTENDO ÁTOMOS DE SELÊNIO OU ENXOFRE**

Ingrid Duarte Pereira

Orientador: Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos

Campo Grande - MS

2017



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS DIARÍLICOS CONTENDO ÁTOMOS DE SELÊNIO OU ENXOFRE

Ingrid Duarte Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química).

Orientador: Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos

Campo Grande - MS

2017



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO E DOUTORADO

TERMO DE DEFESA

(X) – Dissertação () – Tese () – Qualificação

ALUNO
Ingrid Duarte Pereira

TÍTULO DO TRABALHO
SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DIARIL COMPOSTOS CONTENDO ÁTOMOS DE SELÊNIO OU ENXOFRE.

Defesa de Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado e Doutorado (Resolução nº 114/2017) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para titulação no curso.

COMISSÃO EXAMINADORA		
NOME	INSTITUIÇÃO DE ENSINO	ASSINATURA
Edson dos Anjos dos Santos	UFMS	
Camila Santos Suniga Tozatti	CMCG	
Dênis Pires de Lima	UFMS	

Campo Grande, 03 de agosto de 2017.

Ao meu esposo e melhor amigo Renato Fernando dos Santos, pelo amor e companheirismo...

Aos meus pais por me permitirem sempre poder contar com seu apoio incondicional, dedico...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me trazer até aqui, me protegendo e presenteando com tantas maravilhas em minha vida.

Ao Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos pela oportunidade, confiança e exemplo de profissional que desempenha as suas muitas atividades com excelência. Sou muitíssimo grata pela paciência e persistência que teve em me ajudar a trilhar esses dois anos de mestrado.

À Profa. Dra. Camila Santos Suniga Tozatti por me incentivar a iniciar a pós-graduação, aceitar o convite para compor a banca de mestrado e exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. Dênis Pires de Lima por aceitar o convite para a banca, pelos ensinamentos tanto no laboratório quanto nas disciplinas que ministrou e por ser um exemplo de professor e pesquisador.

Aos professores Dr. Adilson Beatriz, Dra. Fernanda Garcez, Dr. Giuseppe Câmara e Dra. Denise Brentan pelo conhecimento compartilhado em suas disciplinas. Agradeço ainda ao Prof. Dr. Roberto Gomes e à Profa. Dra. Felicia Ito pela amizade e ensinamentos.

Ao Prof. Ernest Hamel do NCI-Frederick (EUA), pela realização dos ensaios antitubulílicos e de citotoxicidade; à Profa. Dra. Danielle Bogo (FACFAN-UFMS) e à mestranda Camilla Nantes por realizarem os testes de citotoxicidade dos compostos sintetizados.

A todos os funcionários do INQUI e da Bioquímica por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável e ajudarem os alunos com os desafios do dia-a-dia da pós-graduação.

Aos meus pais, Julia Duarte e Alcebíades Pereira por sempre me incentivarem a estudar e não medirem esforços para me ajudar a atingir meus objetivos.

Ao meu esposo e melhor amigo Renato Fernando dos Santos pelo companheirismo, paciência e amor.

À amiga, psicóloga, orientadora pessoal, dentre outras atribuições, Bruna Soares Bruno, por toda ajuda nesses dois anos, por me receber em sua casa e pelas terapias gratuitas. Sua amizade me ajudou nos piores momentos e seu riso me alegrou nos melhores.

Aos amigos e familiares que estiveram presentes em minha vida nesse período, me dando força e motivação para seguir em frente.

As muitas amizades conquistadas no INQUI, Marcia Coelho, Felipe Oliveira, Jeyciane Rosa, Murilo Kioshi, Amanda Dal Ongaro, Omar Lacerda, Arthur Montanholi , Angela Akimi, Agliane Lopes e Deisy. Agradeço especialmente aos amigos do LP4 Ytallo Azevedo, Neimar Vitor, Felipe Braga, Rosane Cezar, Aline Naujorks, Vinícius Cristani , Rosangela Lopes, Narendar Reddy Thatikonda, Naga Prasad Avvari, Bhaskar Reddy Manda, Cleverton Müller, Alisson Meza, Alisson Richard e Denilson Silva por compartilharam experiências e contribuíram com meu aprendizado.

Às amigas queridas Ingridhy Ostaciana, Tairine Pimentel, Suély Copini, Lyvia Moura, Paola Dias e Daiane Santana, pelos passeios, encontros e fugas do laboratório para ajudar a espairecer. Compartilhar esses momentos ao lado de todas me deixou muito feliz.

Um agradecimento especial à amiga Rejane Gonçalves Diniz Khodyuk por toda a ajuda, amizade e principalmente diversão que proporcionou durante as muitas noites de trabalho juntas, sua amizade foi um dos maiores presentes do mestrado.

À CAPES e à PROPP-UFMS pela bolsa concedida e apoio financeiro.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender. ”

Marie Curie (1867-1934)

RESUMO

O câncer é um grande problema mundial de saúde, especialmente entre os países em desenvolvimento. Um alvo terapêutico do tratamento são os microtúbulos, formados pela polimerização de dímeros de tubulina, que compõem o citoesqueleto celular. Um exemplo de composto que age nos microtúbulos é o produto natural combretastatina A-4 (CA-4), um dos mais poderosos inibidores da polimerização da tubulina, assim como os seus análogos contendo o átomo de enxofre e selênio. Desta maneira, este trabalho objetivou a síntese dos análogos selenados **5**, **6** e **7**, diaril dissulfetos **27**, **28**, **29**, **30** e **31** e dos diaril tiosulfonatos **32**, **33**, **34**, **35** e **36**. Para preparação dos análogos selenados foram utilizadas metodologias já descritas na literatura, onde a rota sintética se inicia com a preparação do disseleneto **11**. No entanto, nenhum dos experimentos realizados culminaram na obtenção do produto esperado, logo, a reação descontinuada. Já a síntese dos compostos sulfurados foi realizada por acoplamentos de tióis na presença de acetonitrila, HNO₃ como agente oxidante e o catalisador Al(H₂PO₄)₃; tal metodologia apresentou bons rendimentos. Dentre os compostos sintetizados, **27**, **28**, **29**, **32**, **33** e **34** foram submetidos à avaliação de atividade antitubulínica e atividade citotóxica em diferentes células cancerígenas. Todos os compostos testados apresentaram atividade antitubulínica significativa, sendo o composto **28** o mais ativo (IC₅₀= 1,4 ± 0,2 μM). Os testes de atividade citotóxica foram realizados em linhagens de células neoplásicas humanas MCF-7 (mama), HepG2 (fígado), B16 - F10 (melanoma murino), HT-29 (côlon), PC-3 (próstata), 786-0 (rim), MDA-MB (mama triplo resistente) e NCI-ADR (ovário com fenótipo de resistência). Nas três últimas linhagens o composto **33** apresentou a melhor atividade com GI₅₀ < 10μM. Todos os diaril dissulfetos pretendidos foram sintetizados, onde, a síntese do composto **31** ainda não foi descrita na literatura. Contudo, entre os cinco diaril tiosulfonatos desejados, os compostos **35** e **36** (inéditos) não foram identificados após as reações. Os resultados biológicos obtidos até o momento, sugerem que os diaril dissulfetos e diaril tiosulfonatos estudados se apresentam como novas classes de agentes antitubulínicos e contribuem de forma significativa para a elaboração de novos protótipos a fármacos.

Palavras-chave: diaril seleneto; diaril dissulfeto; diaril tiosulfonato; citotoxicidade; tubulina.

ABSTRACT

Cancer is a serious world health problem, especially in developing countries. Microtubules are some of this disease's therapeutic targets, formed by the polymerization of tubulin dimers, which form the cellular cytoskeleton. The natural product Combretastatin A-4 (CA-4) is a compound which acts on microtubules. It is one of the most powerful inhibitors of tubulin polymerization as well as its analogs containing sulfur and selenium atoms. Thus, this work aimed at the synthesis of the selenide analogs **5**, **6** and **7**, diaryl disulfides **27**, **28**, **29**, **30** and **31**, diaryl thiosulfonates **32**, **33**, **34**, **35** and **36**. In order to prepare the selenide analogs methodologies described in literature were used, where the synthetic route starts with the diselenide **11** synthesis. However, none of the experiments carried out obtained the expected product. Therefore, the reaction was discontinued. The synthesis of sulfureted compounds was carried out through attachments of thiols with acetonitrile, HNO₃ as oxidant agent and Al(H₂PO₄)₃ as catalyst; such methodology presented good yields. Among the synthesized compounds **27**, **28**, **29**, **32**, **33** and **34** were submitted to antitubulinic assay and cytotoxic assay in different cancer cells. All the tested compounds were significant antitubulinic activity with compound **28** as the most active (IC₅₀ = 1,4 ± 0,2 μM). The cytotoxic activity tests were carried out in human neoplastic cell lines MCF-7 (breast), HepG2 (liver), B16-F10 (murine melanoma), HT-29 (colon), PC-3 (prostate), 786-0 (kidney), MDA-MB (triple resistant breast) and NCI-ADR (ovary with resistance phenotype). In the three latter, compound **33** showed activity with GI₅₀ < 10 μM. All diaryl disulfides intended were synthesized, but the synthesis of compound **31**, has not been described in literature yet. Nevertheless, among the five aimed diaryl thiosulfonates, compounds **35** and **36** (unknowns) were not identified after the reactions. The biological results obtained so far suggest that the diaryl disulfides and diaryl thiosulfonates studied appear as new class of antitubulinic agents and significantly contribute to the elaboration of new pharmaceutical prototypes.

Keywords: diaryl selenide; diaryl disulfide; diaryl thiosulfonate; tubulin; cytotoxicity.

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Rota sintética para a preparação dos análogos 5 e 7 . i) Mg, THF _(seco) , Δ, N ₂ , Se. ii) NaNO ₂ , H ₂ SO _{4(aq)} 6 %, 0 °C iii) 1) NaBH ₄ , THF _(aq) , 0 °C, 14 ou 15	28
Esquema 2: Rota sintética alternativa para a preparação do análogo selenado 5 . i) Mg, THF _(seco) , Se, Δ, N ₂ ; ii) NaNO ₂ , H ₂ SO _{4(aq)} , 0 °C; iii) NaBH ₄ , THF, 0 °C, sal de diazônio 19 .	29
Esquema 3: Rota sintética para a preparação do análogo selenado 6 . i) SnCl ₂ , HCl, AcOH, t.a.	29
Esquema 4: Rota sintética alternativa para a preparação dos análogos selenados 44 e 45 . i) Mg, THF _(seco) , Se, Δ, N ₂ ; ii) NaNO ₂ , H ₂ SO _{4(aq)} , 0 °C; iii) NaBH ₄ , THF, 0 °C, sal de diazônio 14 e 15	30
Esquema 5: Rota sintética alternativa para preparação dos análogos sulfurados. i) Al(H ₂ PO ₄) ₃ , HNO ₃ , ACN e Δ.....	33
Esquema 6: Proposta de esquema para a reação de acoplamento de tióis em diaril dissulfetos e oxidação destes em diaril tiosulfonatos (IRANPOOR et al., 2002).	34
Esquema 7: Rota sintética para a obtenção de 39 , 40 , 25 e 26 . i) 1) NaNO ₂ , HCl, H ₂ O, 0 °C, 1 h e 2) EtOCS ₂ K, H ₂ O, 45 °C, 2 h; ii) KOH(aq) 2 M, EtOH, 65 °C, 1 h; iii) Al(H ₂ PO ₄) ₃ , HNO ₃ , ACN e Δ.	34

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de 27	36
Espectro 2: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de 32	37
Espectro 3: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de 28	38
Espectro 4: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de 33	38
Espectro 5: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de 29	39
Espectro 6: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de 34	40
Espectro 7: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de 30	41
Espectro 8: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de 31	42
Espectro 9: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de 39	43
Espectro 10: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de 40	45
Espectro 11: Espectro de RMN de ^1H de 21 em CDCl_3	64
Espectro 12: Espectro de IV (KBr) de 32	65
Espectro 13: Espectro de RMN de ^1H de 32 em CDCl_3	66
Espectro 14: Espectro de RMN de ^{13}C de 32 em CDCl_3	67
Espectro 15: Espectro de IV (KBr) de 27	68
Espectro 16: Espectro de RMN de ^1H de 27 em CDCl_3	69
Espectro 17: Espectro de RMN de ^{13}C de 27 em CDCl_3	70
Espectro 18: Espectro de IV (KBr) de 33	71
Espectro 19: Espectro de RMN de ^1H de 33 em CDCl_3	72
Espectro 20: Espectro de RMN de ^{13}C de 33 em CDCl_3	73
Espectro 21: Espectro de IV (KBr) de 28	74
Espectro 22: Espectro de RMN de ^1H de 28 em CDCl_3	75
Espectro 23: Espectro de RMN de ^{13}C de 28 em CDCl_3	76
Espectro 24: Espectro de IV (KBr) de 29	77
Espectro 25: Espectro de RMN de ^1H de 29 em CDCl_3	78
Espectro 26: Espectro de RMN de ^{13}C de 29 em CDCl_3	79
Espectro 27: Espectro de IV (KBr) de 34	80
Espectro 28: Espectro de RMN de ^1H de 34 em CDCl_3	81
Espectro 29: Espectro de RMN de ^{13}C de 34 em CDCl_3	82
Espectro 30: Espectro de IV (KBr) de 39	83
Espectro 31: Espectro de RMN de ^1H de 39 em CDCl_3	84
Espectro 32: Espectro de RMN de ^{13}C de 39 em CDCl_3	85

Espectro 33: Espectro de IV (KBr) de 30	86
Espectro 34: Espectro de RMN de ^1H de 30 em CDCl_3	87
Espectro 35: Espectro de RMN de ^{13}C de 30 em CDCl_3	88
Espectro 36: Espectro de IV (KBr) de 31	89
Espectro 37: Espectro de RMN de ^1H de 31 em CDCl_3	90
Espectro 38: Espectro de RMN de ^{13}C de 31 em CDCl_3	91
Espectro 39: Espectro de IV (KBr) de 40	92
Espectro 40: Espectro de RMN de ^1H de 40 em CDCl_3	93
Espectro 41: Espectro de RMN de ^{13}C de 40 em CDCl_3	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da Combretastatina A-4, em destaque os grupos essenciais para atividade biológica, bem como partes susceptíveis a modificação estrutural.	20
Figura 2: Estruturas dos sulfetos 1, 2, 3 e 4 análogos a CA-4.	20
Figura 3: Estrutura do seleneto 4 , análogo a CA-4.....	21
Figura 4: Estruturas dos compostos 1, 3, 4, CA-4 e colchicina sobrepostas no local de ligação de colchicina. A tubulina está na cor azul, com seleção das cadeias laterais de aminoácidos em vara fina. Os átomos de carbono do resíduo das α -subunidades estão na cor castanha; carbonos da subunidade β estão na cor laranja. Os compostos 2, 3, 4, CA-4 e colchicina são descritos em bastão, com carbonos na cor magenta, trigo, verde, branco e rosa claro (semi-transparente), respectivamente. Ligações de hidrogênio são mostradas em linhas tracejadas em amarelo. Adaptada de Santos e colaboradores (2013)	21
Figura 5: Modificação estrutural na posição C-3' para a formação dos análogos 5, 6 e 7	22
Figura 6: Estruturas das classes dos diaril dissulfetos 8 e diaril tiosulfonatos 9	22
Figura 7: Formação de dissulfeto a partir da aliina.	23
Figura 8: Aplicação de derivados de tiosulfonato de mPEG (ZHAO et al., 2010).....	24
Figura 9: Tiosulfonato derivado da Triostina A (HATTORI et al., 2016).....	25
Figura 10: À esquerda reação antes da aparente formação do reagente de Grignard e à direita após possível formação deste.	32
Figura 11: Produto formado (21) por Esquema 1	32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Tentativas e alterações no procedimento de síntese dos disselenetos 11 e 42	31
Tabela 2: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para os compostos 27 e 32 obtidas dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 . O solvente deuterado foi usado como referência interna.....	36
Tabela 3: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para os compostos 28 e 33 obtidas dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 . O solvente deuterado foi usado como referência interna.....	37
Tabela 4: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para os compostos 29 e 34 obtidas dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 . O solvente deuterado foi usado como referência interna.....	39
Tabela 5: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para o composto 30 obtidas dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 . O solvente deuterado foi usado como referência interna.....	40
Tabela 6: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para o composto 31 obtidas dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 . O solvente deuterado foi usado como referência interna.....	41
Tabela 7: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para o composto 39 obtidas dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 . O solvente deuterado foi usado como referência interna.....	43
Tabela 8: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para o composto 40 obtidas dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 . O solvente deuterado foi usado como referência interna.....	44
Tabela 9: Avaliação biológica dos compostos 27 , 28 , 29 , 32 , 33 e 34	46
Tabela 10: Inibição de crescimento celular GI_{50} (μM) para os compostos 27 , 28 , 29 , 32 , 33 e 34	48
Tabela 11: Índice de Seletividade (IS) (GI_{50} NIH/3T3 / GI_{50} célula neoplásica) dos compostos 27 , 28 , 29 , 34 , 32 e 33	48

ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico em ppm
®	Marca registrada
α -Val 181	Resíduos de valina
α - Thr 179	Resíduos de treonina
β -Cys 241	Resíduos de cisteína
786-0	Linhagem de células neoplásicas humana de rim
ACN	Acetonitrila
A549	Linhagem de células neoplásicas humanas de pulmão
aq	Solução aquosa
Ar	Grupo aromático
B16-F10	Linhagem de células neoplásicas murina de melanoma
BBD	Broadband decoupled spectrum (Espectro com desacoplamento em banda larga)
CA-4	Combretastatina A-4
ccd	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo - Doxorubicina (Eurofarma)
conc.	Concentração
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium - meio de cultura
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
GI ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
GTP	Guanosina trifosfato
HepG2	Linhagem de células neoplásicas humana de fígado
HIF-1 α	hypoxia-inducible fator 1 α (Fator induzível por hipoxia 1 α)
HT-29	Linhagem de células neoplásicas humana de cólon

Hz	Hertz
HR-ESI-MS	High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry (Espectrometria de massas com ionização por "electrospray")
IC₅₀	Concentração inibitória em 50 %
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de seletividade
IV	Infra Vermelho
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
M+	Íon molecular
m-CPBA	Ácido meta-cloroperbenzóico
MHz	Megahertz
MCF-7	Linhagem de células neoplásicas humanas de mama
MDA-MB-231	Linhagem de células neoplásicas humanas de mama triplo resistente.
mPEG	Metoxi polietilenoglicol
mult	Multiplicidade
m/z	Razão massa/carga
NAC	N-acetil-L-cisteína
NCI	National Cancer Institute
NCI/ADR-RES	Linhagem de células neoplásicas humana de ovário expressando resistência a múltiplas drogas
NIH/3T3	Linhagem de células normais murina - fibroblasto
Nu⁻	Nucleófilo
Oxone	Peroximonosulfato de potássio
PC-3	Linhagem de células neoplásicas humana de próstata
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
QSAR	Quantitative structure-activity relationships
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Simpleto

SFB	Soro Fetal Bovino
sl	Simpleto largo
S_NAr	Substituição Nucleofílica Aromática
SRB	Sulforodamina B (corante)
t	Tripleto
T	Placa-teste - medida da absorvância das células tratadas
T0	Tempo zero - Controle do crescimento celular no dia da adição das amostras
t.a.	Temperatura ambiente
TCA	Tricloroacetic Acid (ácido tricloro acético)
THF	Tetraidrofurano
UV	Ultra Violeta
VDA	Vascular Disrupting Agents(agente de rompimento vascular)
WHCO1	Linhagem de células neoplásicas humanas de esôfago

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Câncer e alvos para o seu tratamento.....	19
1.2. Análogos a combretastatina A-4 contendo selênio ou enxofre.....	19
1.3. Dissulfetos e Tiosulfonatos.....	22
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivos gerais.....	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3 .1. Síntese dos análogos selenados	28
3.2. Síntese de diaril dissulfetos e diaril tiosulfonatos	33
3.3. Resultados Espectrais	35
3.3.1. Identificação dos compostos 27 e 32	36
3.3.2. Identificação dos compostos 28 e 33	37
3.3.3. Identificação dos compostos 29 e 34	39
3.3.4. Identificação do composto 30	40
3.3.5. Identificação do composto 31	41
3.3.6. Identificação do composto 39	42
3.3.7. Identificação do composto 40	44
3.4. Avaliação biológica	45
3.4.1. Ensaios antitubulínicos e de inibição competitiva pela ligação com a colchicina	45
3.4.2. Ensaio citotóxico sobre linhagens de células cancerígenas e Índice de Seletividade (IS) realizado na FACFAN-UFMS	47
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	50
4.1. Material e métodos	50
4.2. Procedimentos experimentais.....	50
4.2.1. Procedimento geral para síntese de 11 e 41 :.....	50
4.2.2. Procedimento geral para síntese de 42 e 43 :.....	51
4.2.3. Procedimento geral para síntese de 17 :.....	52
4.2.4. Procedimento geral para síntese de 27 a 36 :.....	53

4.2.5. Procedimento geral para síntese de 39 e 40	54
4.2.6. Procedimento geral para síntese de 39 e 40	54
4.3. Ensaio Biológicos	55
4.3.1. Ensaio antitubulínicos e de inibição competitiva pela ligação com a colchicina	55
4.3.2. Ensaio citotóxico sobre a linhagem MCF-7 (<i>National Cancer Institute</i>).....	55
4.3.3. Ensaio citotóxico sobre linhagens de células cancerígenas e Índice de Seletividade (IS) realizado na FACFAN-UFMS	56
5. CONCLUSÕES	58
6. REFERÊNCIAS.....	59
7. APÊNDICE A.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e alvos para o seu tratamento

No Brasil, segundo estudos realizados pelo Ministério da Saúde (2016), as estimativas para 2016 e 2017 são de aproximadamente 600.000 novos casos de câncer. Os estados que compreendem a região Sul e Sudeste são os que apresentam maiores taxas brutas de incidências de câncer no país, sendo as maiores incidências estimadas na região Sul no Rio Grande do Sul, seguido pelo Paraná (INCA, 2016).

A heterogeneidade genética de tumores avançados é um dos grandes desafios para as terapias anticâncer, devido ao aparecimento de resistência a tratamentos quimioterápicos. Terapias contra alvos específicos são atualmente o caminho mais promissor para promover a necrose de tumores das mais variadas etiologias. Existe uma vertente de estudos que busca agentes capazes de agir sobre vasos já consolidados, a essa classe de substâncias dá-se o nome de VDAs (do inglês: *Vascular Disrupting Agents*). Os VDAs causam a obstrução ou destroem seletivamente os vasos sanguíneos preexistentes que permeiam os tumores, causando a interrupção do fluxo de oxigênio e nutrientes (PILAT e LORUSSO, 2006).

Um dos alvos de ação dos VDAs são os microtúbulos, estruturas formadas pela polimerização de heterodímeros de α,β -tubulinas (DUMONTET e JORDAN, 2010). A inibição da formação de microtúbulos leva a interrupção da divisão mitótica celular e promove o rompimento vascular (PILAT e LORUSSO, 2006). Os microtúbulos são usados pelas células para formar uma estrutura dinâmica chamada de citoesqueleto, o qual dá forma à célula e determina a posição das organelas (CARVALHO; TIRNAUER; PELLMAN; 2003).

1.2. Análogos a combretastatina A-4 contendo selênio ou enxofre

O produto natural combretastatina A-4 (**Figura 1**) foi isolado da casca da árvore africana *Combretum caffrum* (Combretaceae). Apesar da baixa massa molar e simplicidade estrutural, a CA-4 é um dos mais poderosos inibidores da polimerização da tubulina, um potente VDA que se liga avidamente ao mesmo sítio de ligação da colchicina (**Figura 2**) na tubulina (LIN et al., 1988; PETTIT et al., 1989; PETTIT et al., 1995). Estudos extensivos têm sido conduzidos para examinar a relação estrutura-atividade (QSAR) da CA-4 e seus análogos (LI et al., 2011). As substituições trimetoxi no anel A foram relatadas como pré-requisitos para manter a atividade, enquanto o anel B é tolerante a modificações estruturais principalmente na posição C-3' (ZHANG et al., 2007) (**Figura 1**).

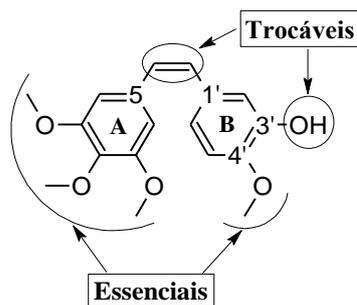


Figura 1: Estrutura da Combretastatina A-4, em destaque os grupos essenciais para atividade biológica, bem como partes susceptíveis a modificação estrutural.

Vários esforços foram direcionados para obtenção de análogos com diferentes grupos espaçadores entre os anéis aromáticos da CA-4 (substitutos à dupla ligação). Dentre eles, resultaram na preparação dos sulfetos (BARBOSA et al., 2009; SANTOS et al., 2013) mostrados na **Figura 2**. Os sulfetos **1**, **2** e **3** foram submetidos a ensaios com a proteína tubulina isolada, onde mostraram os seguintes resultados de inibição da polimerização da tubulina: IC₅₀ de $1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (BARBOSA et al., 2009), $2,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ e $0,74 \pm 0,04 \mu\text{M}$ (SANTOS et al., 2013), respectivamente. Esses resultados revelaram que análogos da CA-4 contendo o átomo de enxofre apresentam atividades muito semelhantes a CA-4 (IC₅₀ de $1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$) e melhores que a colchicina (**Figura 2**, IC₅₀ de $3,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$), que é um ligante padrão de análise do sítio ativo da tubulina (BARBOSA et al., 2009).

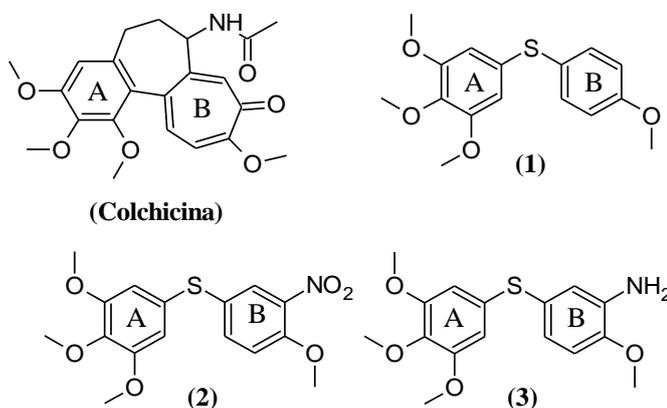


Figura 2: Estruturas dos sulfetos **1**, **2**, **3** e **4** análogos a CA-4.

A partir da síntese desses análogos contendo apenas um átomo entre os dois anéis aromáticos, foi também elaborado a síntese de um análogo da CA-4 com o átomo de selênio como grupo espaçador (composto **4**, **Figura 2**), cuja atividade antitubulínica (IC₅₀ = $0,62 \pm 0,08 \mu\text{M}$) foi a maior dentre os análogos já estudados, contendo apenas um átomo entre os anéis aromáticos (SANTOS et al., 2013).

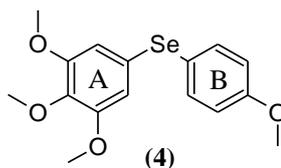


Figura 3: Estrutura do seleneto **4**, análogo a CA-4.

Estudos de *docking molecular* dos compostos **1**, **3**, **4**, CA-4 e colchicina com a tubulina foram realizados (**Figura 4**) (SANTOS et al., 2013). Em geral, esse estudo mostrou importantes interações através de ligações de hidrogênio dos substituintes metoxi (*para*, anel A com o resíduo de β -Cys 241 e *para*, anel B com um resíduo α -Val 181) para os compostos **1**, **3** e **4**. Mas quando se compara os resultados de inibição da tubulina o análogo mais ativo foi o selenoéter **4**, mesmo sem o grupo amina (*meta*, anel B) no tioéter **3** que mostra uma importante interação com o resíduo de α -Thr 179 (**Figura 4**) (SANTOS et al., 2013).

Santos e colaboradores (2013) mostraram que o ângulo da ligação tioéter entre os anéis A e B, em **1** é $104,35^\circ$, enquanto que o ângulo do selenoéter correspondente de **4** é $101,19^\circ$, sendo este mais acentuado, o que permite uma maior profundidade de ligação no local do receptor (**Figura 3**), assim como o volume atômico do átomo de selênio (maior) resultaria em um aumento da ocupação do receptor contra o composto **1** (SANTOS et al., 2013).

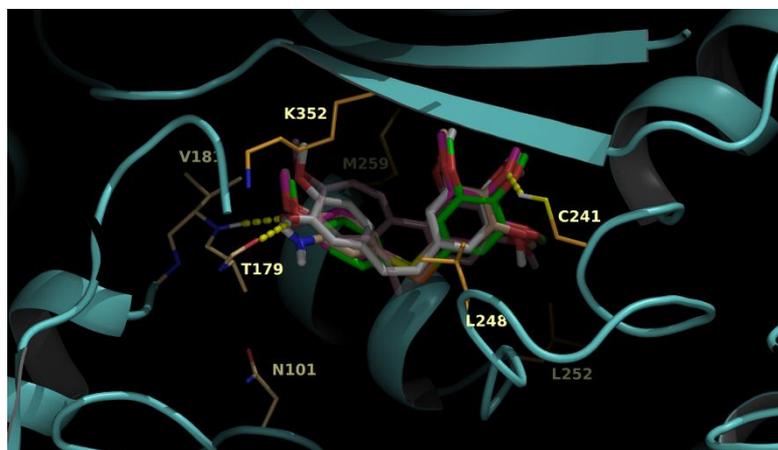


Figura 4: Estruturas dos compostos **1**, **3**, **4**, CA-4 e colchicina sobrepostas no local de ligação de colchicina. A tubulina está na cor azul, com seleção das cadeias laterais de aminoácidos em vara fina. Os átomos de carbono do resíduo das α -subunidades estão na cor castanha; carbonos da subunidade β estão na cor laranja. Os compostos **2**, **3**, **4**, CA-4 e colchicina são descritos em bastão, com carbonos na cor magenta, trigo, verde, branco e rosa claro (semi-transparente), respectivamente. Ligações de hidrogênio são mostradas em linhas tracejadas em amarelo. Adaptada de Santos e colaboradores (2013)

Estudos envolvendo modificações estruturais, a fim de melhorar a interação da substância com o sítio ativo da tubulina são ainda necessários, bem como a inserção de grupos NO_2 , NH_2 e OH (**Figura 5**) na posição 3' do anel B, conforme já observado em outros estudos (ZHANG et al., 2007).

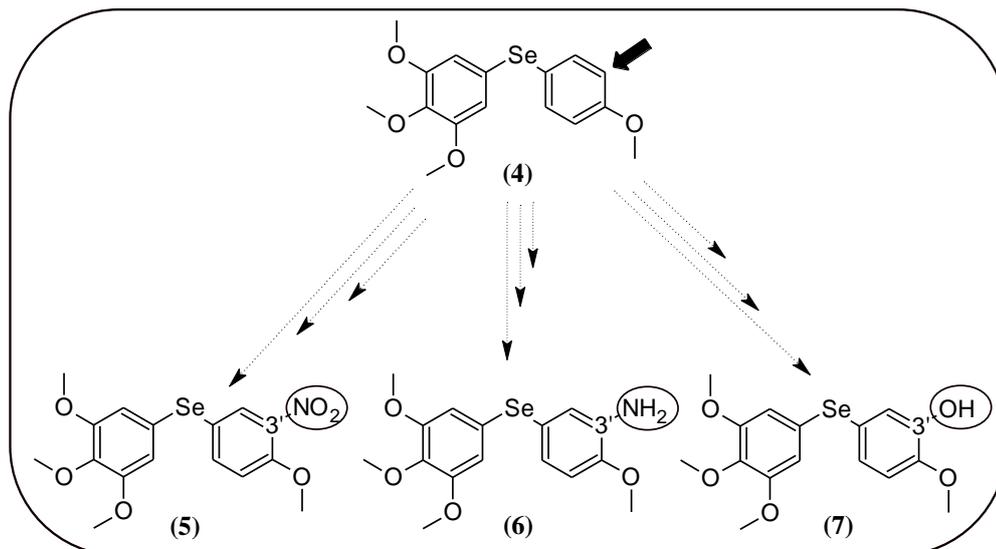


Figura 5: Modificação estrutural na posição C-3' para a formação dos análogos **5**, **6** e **7**.

1.3. Dissulfetos e Tiosulfonatos

Outra classe de compostos que são potenciais alternativas para a síntese de compostos com similaridades estruturais com a CA-4 são as classes dos diaril dissulfetos **8** e diaril tiosulfonatos **9** (SANTOS et al., 2012).

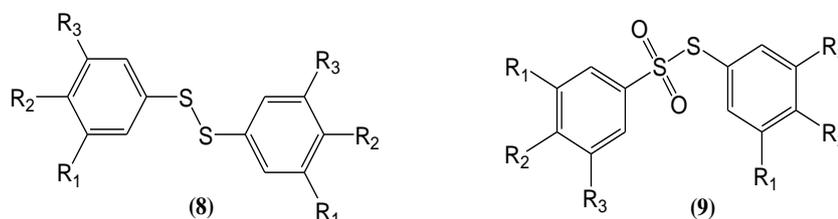


Figura 6: Estruturas das classes dos diaril dissulfetos **8** e diaril tiosulfonatos **9**.

As ligações dissulfeto desempenham um papel importante na manutenção das estruturas de algumas proteínas. São estas que estabilizam a conformação proteica mantendo porções da proteína ligadas. Exemplos de aminoácidos que contêm enxofre em sua estrutura são a metionina e a cisteína, esta última é facilmente oxidada formando a cistina, um aminoácido dimérico, no qual duas moléculas de cisteína são unidas por uma ligação dissulfeto (NELSON e COX, 2002).

Um exemplo de dissulfeto orgânico é o composto dialil dissulfeto, obtido naturalmente a partir do alho (**Figura 7**). É formado quando as células deste são esmagadas, havendo liberação da enzima aliinase (alliinase, ou alliin lyase) que converte a substância aliína (um

sulfóxido) em alicina (sulfóxido ligado a S). Essa substância é altamente oxidante, podendo reagir com muitos tipos de moléculas convertendo-se no dissulfeto (CONSTANTINO, 2008).

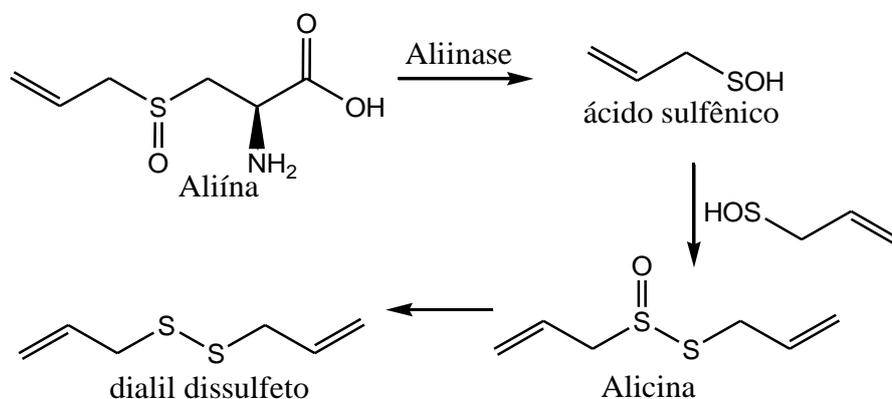


Figura 7: Formação de dissulfeto a partir da aliína.

Existem diversas propostas para obtenção de dissulfetos orgânicos (OAE, 1991; CREMLYN, 1996; CABRERA et al., 2012; ABBASI, MOHAMMADIZADEH, SAEEDI, 2016; WILD et al., 2016). A literatura demonstra que a desprotonação de tióis para formação de dissulfetos é uma técnica utilizada há algum tempo (OAE, 1991). O mecanismo dessa reação compreende a transferência de elétrons do tiolato, o que resulta na formação de radicais e dimerização destes tendo como produto o dissulfeto. O tiol e o dissulfeto permutam entre si por meio de substituição nucleofílica. Esta seria uma forma de equilíbrio, mas também pode ser haver oxidação do grupo tiol R'SH. É possível encontrar uma gama de tióis comercialmente disponíveis para que possam ser utilizados reações de conversão para dissulfetos. Cabrera e colaboradores (2012) relatam síntese de dissulfetos a partir do acoplamento de tióis, na presença de Na_2CO_3 , glicerol como solvente e irradiação da mistura em reator de microondas por 15 minutos a 120°C , uma técnica considerada limpa pela utilização e recuperação do solvente além de rendimentos que variam de 81 a 93%. Outra metodologia (ABBASI, MOHAMMADIZADEH, SAEEDI, 2016) descreve a síntese de dissulfetos simétricos por reação de halogenetos orgânicos na presença de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e DMSO, também apresentando bons rendimentos. Wild e colaboradores (2016) relatam os resultados da reação de acoplamento desidrogenativo de tióis por ativação de ligação σ com 1^{2+} , onde a reação, decorrida em ACN (solvente) a 35°C , necessitou de pouco tempo para formação do produto dissulfeto com alto rendimento (WILD et al., 2016).

A classe dos tiosulfonatos por sua vez, é uma classe de compostos estudada há muito tempo com trabalhos datando do início do século (TROEGER e VOLKMER, 1904). A literatura traz diversos trabalhos relacionados à atividade biológica destes compostos, como

avaliação da atividade antitrombótica dos tiosulfonatos aromáticos em plaquetas humanas, onde foram apontados como um inibidor muito efetivo da agregação plaquetária (MACDONALD, MARCHAND, LANGLER, 2004). Zhao e colaboradores (2010) sintetizaram derivados do Metoxi polietilenoglicol (mPEG) por uma S-alkilação em uma etapa de haleto de mPEG com o tiosulfonato, demonstrando que a modificação conferiu atividades biológicas elevadas, pois os derivados de tiosulfonatos de PEG puderam modificar nanopartículas com grupos tiol em sua superfície (Figura 8) para formar nanocarreadores estericamente estabilizados (ZHAO et al., 2010).

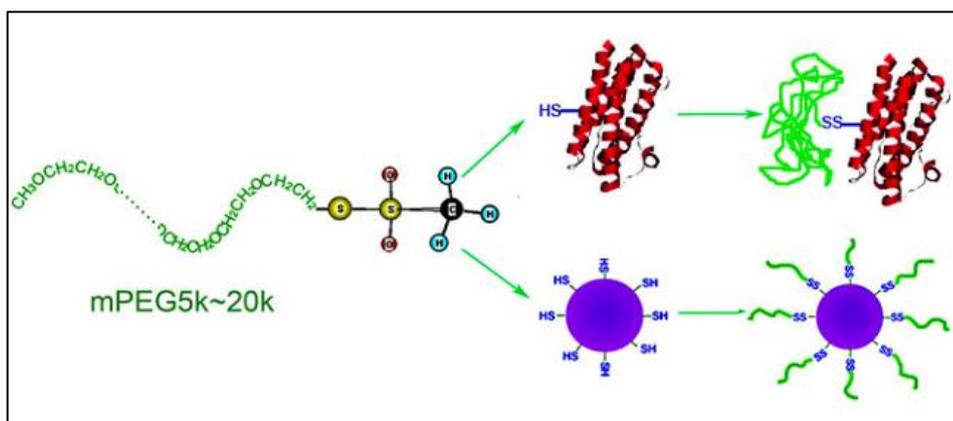


Figura 8: Aplicação de derivados de tiosulfonato de mPEG (ZHAO et al., 2010).

Existem ainda relatos sobre o potencial fungicida (LANGLER et al., 2001), nematocida e bactericida (TADA et al., 1988), acaricida (LEE et al., 1997), antiviral (RICE et al., 1996) e citotóxico (WANG et al., 2001) dos tiosulfonatos.

Os métodos de síntese comumente implementados na obtenção de tiosulfonatos “simétricos”, ou seja, que possuem os mesmos ligantes nos enxofres, são a oxidação dos dissulfetos correspondentes. A oxidação por ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) prossegue sob condições suaves formando produto com rendimento muito elevado (até 95%) (ZEFIROV et al., 1993). Também há proposta de síntese por acoplamento de tióis na presença de cloretos de ácidos arilssulfônicos em condições brandas (BANDGAR e PANDIT, 2004). Metodologias recentes (NATARAJAN, 2015) descrevem a oxidação de dissulfetos para tiosulfonatos usando oxone em combinação com cloretos e brometos de metais alcalinos e ACN à temperatura ambiente. Gao e colaboradores (2011) sintetizaram tiosulfonatos a partir de tiofenóis e cloreto cianúrico ativado com dimetilsulfóxido, incorporando um grupo SCD₃ de dimetilsulfóxido-*d*₆, realizando a primeira síntese de tiosulfonatos deuterados (GAO et al., 2011).

A consulta do estado da arte para essa classe de compostos, revelou a existência de poucos trabalhos sobre a investigação da atividade citotóxica e nenhum sobre atividade

antitubulínica dos tiosulfonatos. Gao e colaboradores (2011) relataram pela primeira vez a citotoxicidade dos tiosulfonatos para linhagens de células neoplásicas humanas MDA-MB-231 (câncer de mama) e A549 (câncer de pulmão) com resultados considerados moderados (GAO et al., 2011).

Frente a pesquisas que comprovam os efeitos citotóxicos, em células cancerosas, da alicina e compostos alifáticos de enxofre relacionados ao alho (HERMAN-ANTOSIEWICZ, POWOLNY, SINGH, 2007; SHUKLA E KALRA, 2007), Smith e colaboradores (2016) sintetizaram diversos compostos de dissulfeto de R-propilo e R-tiosulfonato com o intuito de investigar a importância da tiólise e, da geração de ROS na citotoxicidade de compostos relacionados ao alho em linhagens de células WHCO1 (câncer de esôfago). Concluíram que a tiolação celular, com dissulfeto relacionado ao alho, parece ser a causa da citotoxicidade nas células WHCO1 enquanto à geração de ROS parece desempenhar papel secundário. Verificaram ainda que o inibidor de ROS, *N*-acetil-L-cisteína (NAC) interfere no ensaio, tendo relação entre a produção de ROS e a citotoxicidade de compostos dissulfeto e tiosulfonato nas células WHCO1 (SMITH et al., 2016).

Hattori e colaboradores (2016) investigaram a citotoxicidade em linhagens de células MCF-7 (câncer de mama) e a inibição da atividade transcricional de HIF-1 α (do inglês: *hypoxia-inducible fator 1 α*), de tiosulfonatos derivados da Triostina A (**Figura 9**). No entanto, estes não apresentaram efeito inibitório de HIF-1 α e nem efeito citotóxico em MCF-7, podendo este resultado estar relacionado a baixíssima hidrofobicidade do composto impedindo que fossem incorporados nas membranas celulares (HATTORI et al., 2016).

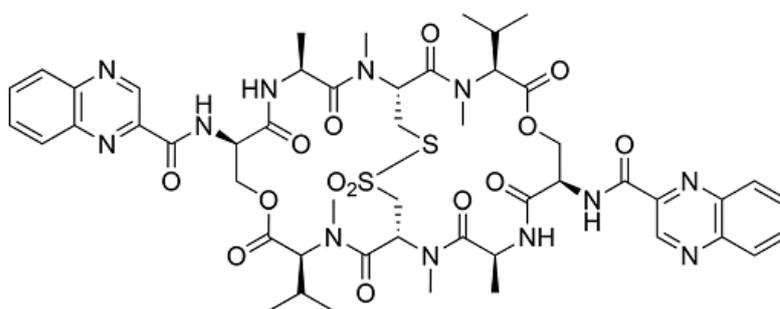


Figura 9: Tiosulfonato derivado da Triostina A (HATTORI et al., 2016).

O grupo de pesquisa SINTMOL vem realizando pesquisas com resultados importantes quanto à síntese de ariltiosulfonatos (SANTOS et al., 2012; KHODYUK, 2013), utilizando como metodologia acoplamento oxidativo de tióis empregando AgNO_3 , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ou $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ na presença de HNO_3 em ACN anidra, apresentando bons rendimentos. Os

resultados de atividade inseticida frente à larva de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) também se mostraram promissores (SANTOS et al., 2012).

Essa pesquisa propõe a síntese e a investigação quanto a atividade citotóxica e antitubulínica de diaril selenetos, diaril dissulfetos e diaril tiosulfonatos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Preparar compostos contendo similaridade estrutural com a CA-4, contendo os átomos de selênio ou enxofre e submeter os compostos sintetizados à avaliação da atividade biológica.

2.2. Objetivos específicos

Sintetizar selenetos, dissulfetos e tiosulfonatos diarílicos.

Investigar se os compostos apresentam atividade antitubulínica e inibem a ligação da colchicina na tubulina.

Avaliar se os compostos apresentam atividade citotóxica em células neoplásicas.

Determinar a seletividade dos compostos para células neoplásicas em relação a uma linhagem de células normais.

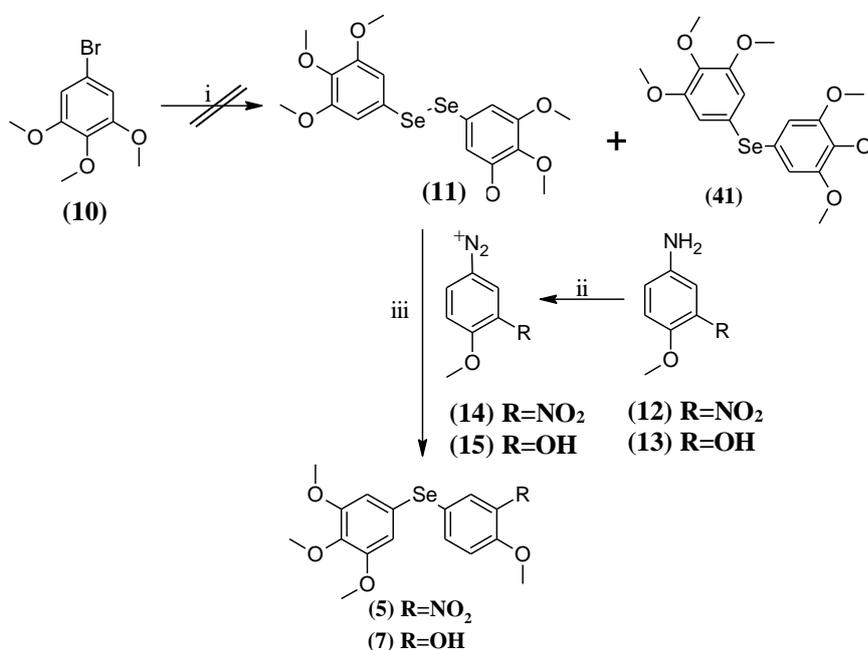
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentadas as rotas sintéticas para a síntese dos análogos da combretastatina A-4 contendo selênio ou enxofre. Os resultados estão divididos em dois tópicos. Os espectros dos compostos sintetizados encontram-se no Apêndice A.

3.1. Síntese dos análogos selenados

A proposta de síntese para os análogos selenados fundamentou-se em metodologias empregadas anteriormente pelo grupo de pesquisa SINTMOL (SANTOS et al., 2013). O fator que motivou a proposta de síntese dos compostos **5**, **6** e **7** foi à falta de trabalhos correlatos para estas estruturas, havendo apenas um trabalho (ZHANG et al., 2013) que menciona a síntese e atividade biológica destes compostos.

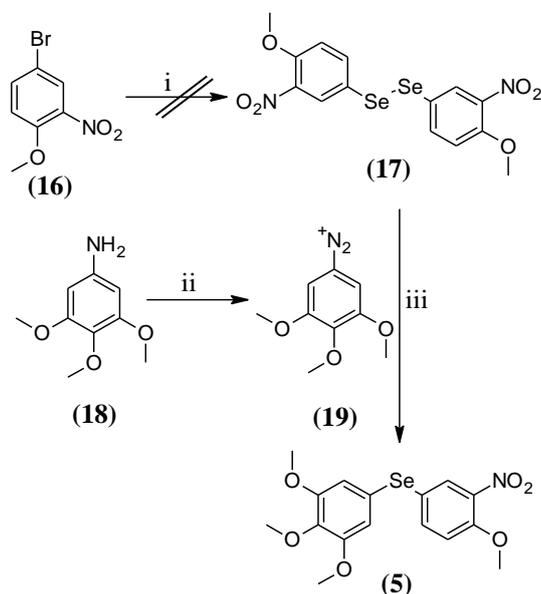
A rota sintética proposta para a obtenção dos análogos selenados iniciou-se com uma preparação do reagente de Grignard a partir de **10** (substância comercial), utilizando para tal Mg metálico em THF anidro seguido da adição de selênio elementar (SANTOS et al., 2013), conforme **Esquema 1**. O próximo passo seria a redução de **11** com NaBH₄ formando o selenol (Nu⁻) (NAKANISHI et al., 2001) que atacaria o sal de diazônio (**14** ou **15**), formado pela reação da amina (**12** ou **13**) (BANWELL et al., 2006) formando os compostos **5** e **7**.



Esquema 1: Rota sintética para a preparação dos análogos **5** e **7**. i) Mg, THF (seco), Δ , N₂, Se. ii) NaNO₂, H₂SO_{4(aq)} 6 %, 0 °C iii) 1) NaBH₄, THF(aq), 0 °C, **14** ou **15**.

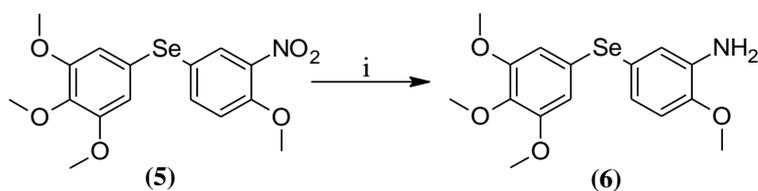
Alternativamente, o composto **5** poderia ser obtido através da rota sintética descrita no **Esquema 2**. Primeiramente, seria realizada preparação do disselenado **17**, através de uma

reação de Grignard utilizando **16** (NAKANISHI et al., 2001). A etapa final seria a reação de **17** com o sal de diazônio **19** em meio redutor para a preparação do composto **5** (BANWELL et al., 2006).



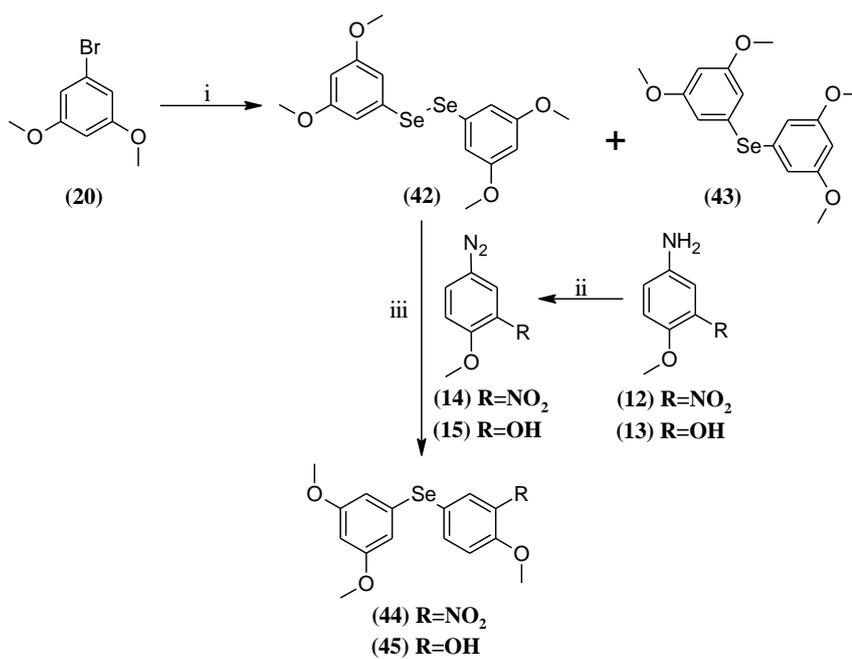
Esquema 2: Rota sintética alternativa para a preparação do análogo selenado **5**. i) Mg, THF_(seco), Se, Δ, N₂; ii) NaNO₂, H₂SO_{4(aq)}, 0 °C; iii) NaBH₄, THF, 0 °C, sal de diazônio **19**.

O composto **5** seria submetido a uma redução utilizando cloreto de estanho (GROZINGER et al., 2000) para a produção do análogo **6** (**Esquema 3**).



Esquema 3: Rota sintética para a preparação do análogo selenado **6**. i) SnCl₂, HCl, AcOH, t.a.

A primeira etapa da rota sintética do **Esquema 1** é a formação do composto **11**, por meio de um reagente de Grignard, partindo do composto **10**. Entretanto todos os experimentos realizados objetivando a síntese deste não culminaram no produto esperado. As tentativas e alterações no experimento encontram-se descritas na **Tabela 1**. Parte das reações foram testadas com o 1-bromo-3,5-dimetoxibenzeno **20**, haja vista a pequena quantidade disponível do composto **10**.



Esquema 4: Rota sintética alternativa para a preparação dos análogos selenados **44** e **45**. i) Mg, THF_(seco), Se, Δ , N₂; ii) NaNO₂, H₂SO_{4(aq)}, 0 °C; iii) NaBH₄, THF, 0 °C, sal de diazônio **14** e **15**.

Tabela 1: Tentativas e alterações no procedimento de síntese dos disselenetos **11** e **42**.

Método	Material de Partida	Tratamento do THF	Tratamento do Mg	Secagem da vidraria	Resultado
1	(10)	Hidreto de cálcio.	Lavado com ácido sulfúrico concentrado.	Estufa de secagem	Não houve formação do reagente de Grignard
2	(10)	Hidreto de cálcio e peneira molecular.	Lavado com ácido sulfúrico concentrado.	Estufa de secagem	Não houve formação do reagente de Grignard
3	(10)	Hidreto de cálcio, destilação diretamente para reação.	Lavado com ácido sulfúrico concentrado.	Estufa de secagem	Não houve formação do reagente de Grignard
4	(20)	Hidreto de cálcio, destilação diretamente para reação.	Lavado com ácido sulfúrico concentrado	Estufa de secagem	Não houve formação do reagente de Grignard
5	(20)	Hidreto de cálcio, destilação diretamente para reação.	Lavado com ácido sulfúrico concentrado e etanol.	Estufa de secagem	Não houve formação do reagente de Grignard
6	(20)	Sódio metálico sob atmosfera de nitrogênio. Destilação diretamente para reação.	Lavado com ácido sulfúrico concentrado e etanol.	Estufa de secagem	Não houve formação do reagente de Grignard
7	(10)	Sódio metálico sob atmosfera de nitrogênio. Destilação diretamente para reação.	Lavado com ácido sulfúrico 20%, água, etanol e acetona.	Chama do bico de Bunsen	Possível formação do reagente de Grignard e substituição de Br por H.

A **Figura 10** demonstra a modificação da turbidez da reação, passando de translúcida para turva após a aparente formação do reagente de Grignard. O selênio foi então adicionado e a reação prosseguiu em agitação e refluxo por mais 3 horas, sendo posteriormente extraída sua fase orgânica e purificada através de placa preparativa utilizando sílica gel 60. Após submeter as amostras purificadas à análise de RMN de ^1H foi possível observar a formação do produto **21**.

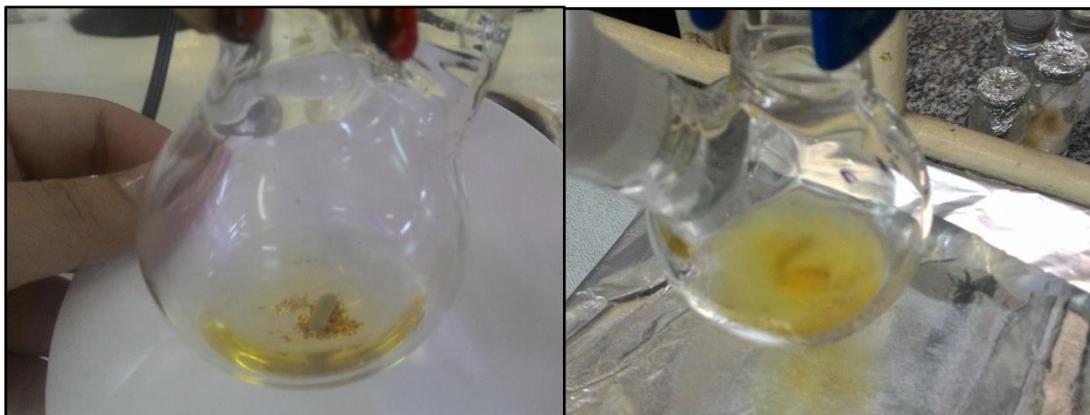


Figura 10: À esquerda reação antes da aparente formação do reagente de Grignard e à direita após possível formação deste.

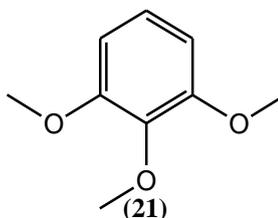


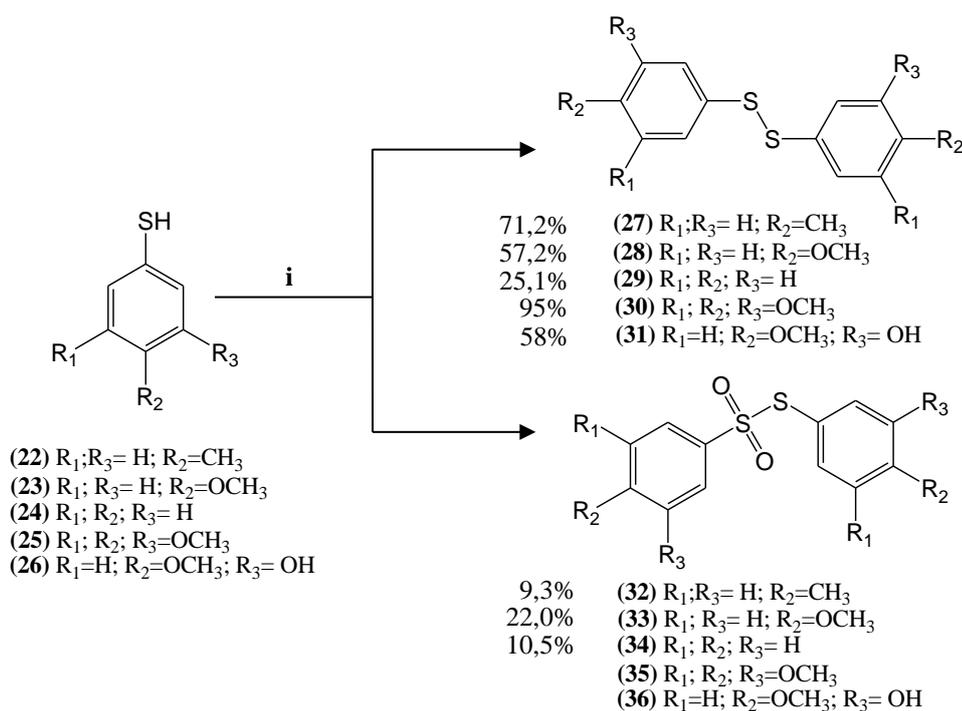
Figura 11: Produto formado (21) por **Esquema 1**.

O **Espectro 1**, RMN de ^1H mostrou um tripleto em δ 6,97 (1H) com $J = 8,55$ Hz indicando um acoplamento *orto* entre hidrogênios. Conhecendo os sinais de deslocamento químico dos hidrogênios de **10** no espectro de RMN, foi possível sugerir que houve modificação no material de partida sendo o composto **21** o produto obtido.

Frente ao insucesso quanto a síntese do composto **11**, realizou-se a rota sintética alternativa (**Esquema 2**) para obtenção do composto **16**. Esta rota por sua vez, não possibilitou nem mesmo a formação do reagente de Grignard. Após diversas tentativas de síntese sem obtenção do composto esperado, as reações foram descontinuadas e deu-se início as reações utilizando enxofre como grupo espaçador.

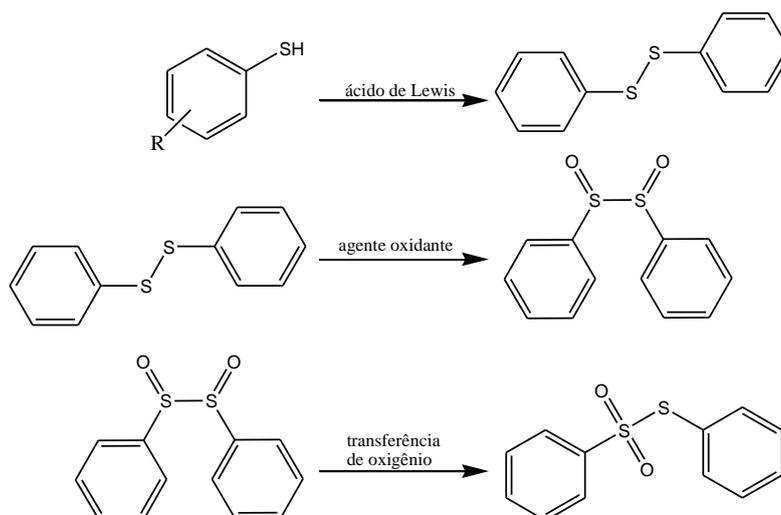
3.2. Síntese de diaril dissulfetos e diaril tiosulfonatos

A síntese dos diaril compostos contendo enxofre, teve como referência metodologias já descritas na literatura (SANTOS et al., 2012; KHODYUK, 2013) as quais foram empregadas primeiramente pelo grupo de pesquisa SINTMOL (CNPq), apresentando produtos com alto rendimento. A rota sintética inicia-se a partir dos tióis (**Esquema 5**), que ao acoplarem formam os diaril dissulfetos e, posteriormente podem sofrer oxidação conduzindo aos diaril tiosulfonatos.



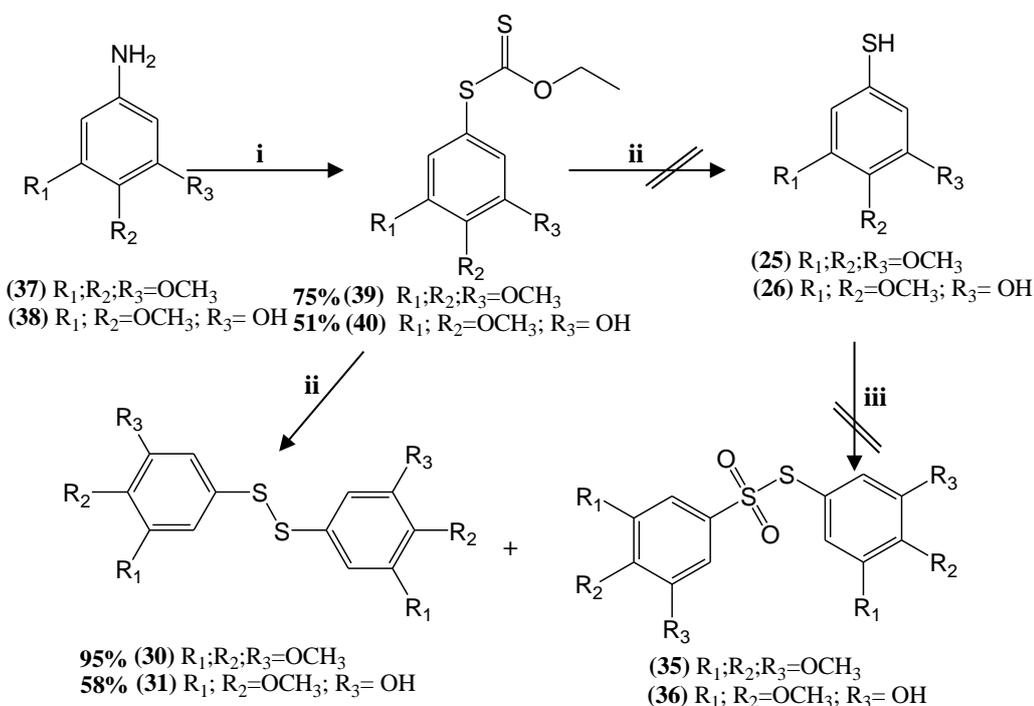
Esquema 5: Rota sintética alternativa para preparação dos análogos sulfurados. i) $Al(H_2PO_4)_3$, HNO_3 , ACN e Δ .

O **Esquema 6** foi proposto na busca de explicar como os tiosulfonatos são sintetizados a partir do acoplamento direto de tióis. Estas reações levariam à formação do intermediário dissulfeto por meio da ação do catalisador, um ácido de Lewis (BF_3 ou $Al(H_2PO_4)_3$), seguido de sua oxidação com $AgNO_3$ ou HNO_3 para formar α -dissulfóxidos instáveis. A etapa seguinte seria a transferência de oxigênio para formar os tiosulfonatos (IRANPOOR et al., 2002).



Esquema 6: Proposta de esquema para a reação de acoplamento de tióis em diaril dissulfetos e oxidação destes em diaril tiosulfonatos (IRANPOOR et al., 2002).

Para síntese dos tióis **25** e **26** realizou-se uma reação de Leuckart com **37** e **38**, que se fundamenta na formação do sal de diazônio e uma S_NAr para a inserção do grupo xantato (LLAUGER et al., 2005), obtendo-se **39** e **40**. Posteriormente foi realizada a hidrólise do xantato (**39** e **40**), conforme **Esquema 7**, a fim de obter os compostos **25** e **26**, que seriam posteriormente submetidos a reações de acoplamento resultando nos compostos **30**, **31**, **35** e **36**.



Esquema 7: Rota sintética para a obtenção de **39**, **40**, **25** e **26**. i) 1) $NaNO_2$, HCl , H_2O , $0^\circ C$, 1 h e 2) $EtOCS_2K$, H_2O , $45^\circ C$, 2 h; ii) $KOH(aq)$ 2 M, $EtOH$, $65^\circ C$, 1 h; iii) $Al(H_2PO_4)_3$, HNO_3 , ACN e Δ .

No entanto, a etapa **ii** do **Esquema 6** não culminou nos produtos **25** e **26**, mas sim nos diaril dissulfetos **30** e **31** apresentando os respectivos rendimentos de 95% e 58%; não há relatos na literatura da síntese do composto **31** sendo este considerado inédito.

Como demonstrado anteriormente, diversos trabalhos descrevem a síntese de tiosulfonatos utilizando dissulfetos como material de partida (ZEFIROV et al., 1993; NATARAJAN, 2015). Com o intuito de testar a metodologia sintética do grupo de pesquisa, utilizando dissulfetos como material de partida, e pretendendo obter os diaril tiosulfonatos, os produtos **30** e **31** foram submetidos a metodologia de síntese proposta (SANTOS et al., 2012), **Esquema 5**. Contudo, não foram identificados os compostos **35** e **36** após purificação da fase orgânica através de placa preparativa utilizando sílica gel 60.

3.3. Resultados Espectrais

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e infravermelho (IV) estão em **Apêndice A** sendo a identificação e os cálculos dos deslocamentos químicos foram comparados aos da literatura (PAVIA, KRIZ, ENGEL, 2015; EWING, 1979; SILVERSTEIN et al., 2014). Nesta seção serão apresentados apenas os deslocamentos químicos (RMN) dos compostos sintetizados nas **Tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8**. Serão apresentados ainda os espectros de massas de alta resolução para os compostos sintetizados.

A confirmação do grupo sulfona pode ser observada pelo estiramento S=O assimétrico (forte) que ocorre próximo a 1300 cm^{-1} e estiramento simétrico (forte) próximo a 1150 cm^{-1} nos espectros de IV. Para os dissulfetos obtém-se pouca informação útil, fazendo-se assim a confirmação pela ausência do grupo sulfona (PAVIA, KRIZ, ENGEL, 2015).

Todos os compostos sintetizados foram submetidos ao experimento de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (HR-ESI-MS), realizado no Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM-UFMS).

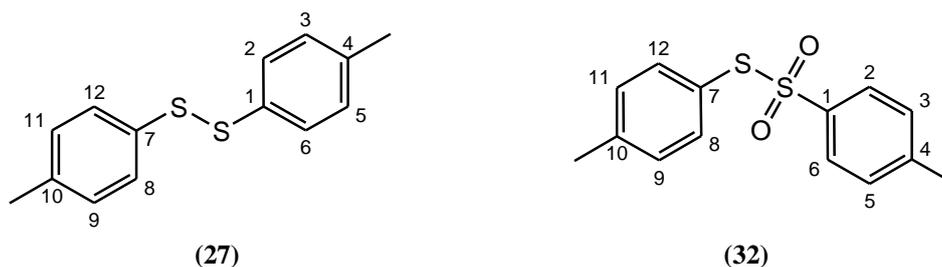
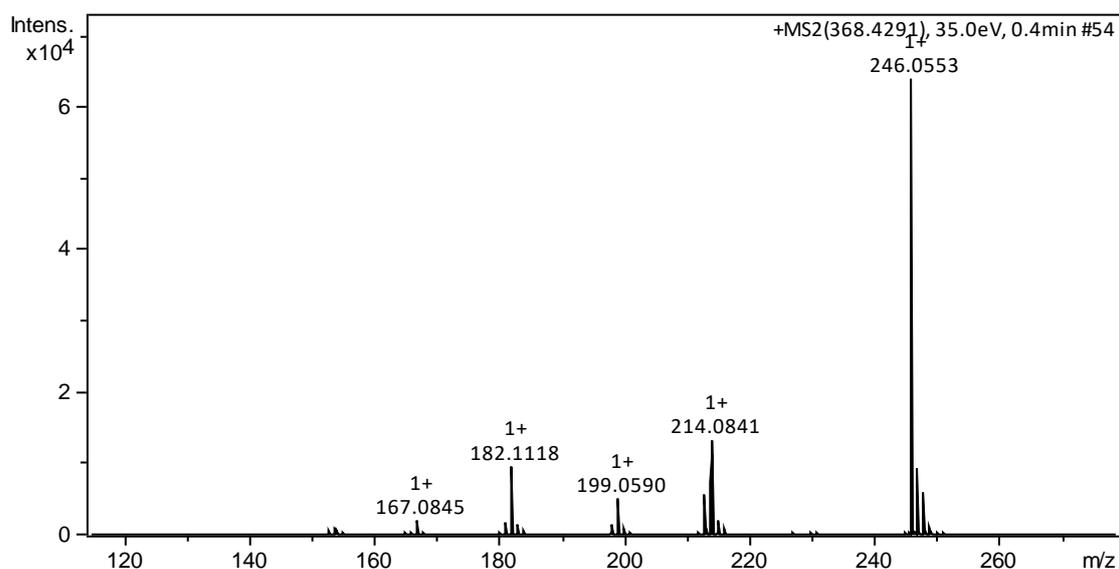
3.3.1. Identificação dos compostos **27** e **32**

Tabela 2: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para os compostos **27** e **32** obtidas dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 . O solvente deuterado foi usado como referência interna.

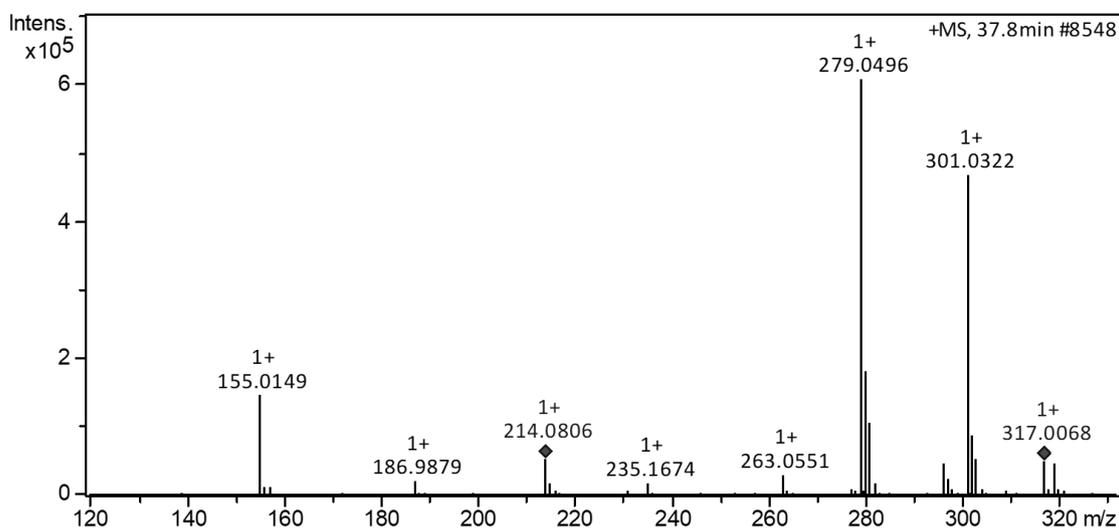
Posição (Tipo C)	Composto 27		Composto 32	
	δ_{C}	δ_{H} ; mult (int); J (Hz)	δ_{C}	δ_{H} ; mult (int); J (Hz)
4 (C)	137,4	-	144,5	-
10 (C)	137,4	-	142,0	-
1 (C)	133,8	-	140,4	-
3,5 (CH)	128,5	7,10; d (2H) $J = 7,9$ Hz	136,5	7,12; d (2H) $J = 8,0$ Hz
8,12 (CH)	129,7	7,38; d (2H) $J = 8,0$ Hz	130,1	7,44; d (2H) $J = 8,1$ Hz
9,11 (CH)	128,6	7,10; d (2H) $J = 7,9$ Hz	129,3	7,19; d (2H) $J = 8,7$ Hz
2,6 (CH)	129,7	7,38; d (2H) $J = 8,0$ Hz	127,6	7,22; d (2H) $J = 8,3$ Hz
7 (C)	133,8	-	124,5	-
10 - (CH_3)	21,0	2,32; s (3H)	21,6	2,40; s (3H)
4 - (CH_3)	21,0	2,32; s (3H)	21,6	2,36; s (3H)

Principal íon observado para o composto **27** no **Espectro 1**: ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{S}_2$) [M^+] 246,0553 sendo o valor calculado [M^+]: 246,0531.



Espectro 1: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de **27**.

Principais íons observados para o composto **32** no **Espectro 2**: (C₁₄H₁₄O₂S₂) M+H]: 279,0496; [M+Na]: 301,0322; [M+K]: 317,0068 sendo os valores calculados [M+H]: 279,0507; [M+Na]: 301,0321; [M+K]: 317,0061.



Espectro 2: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de **32**.

3.3.2. Identificação dos compostos **28** e **33**

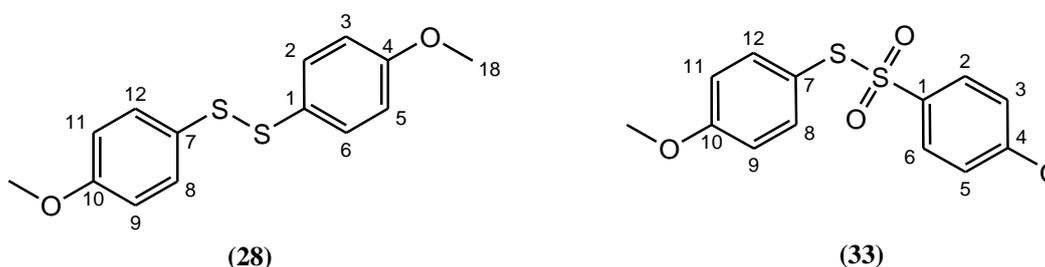
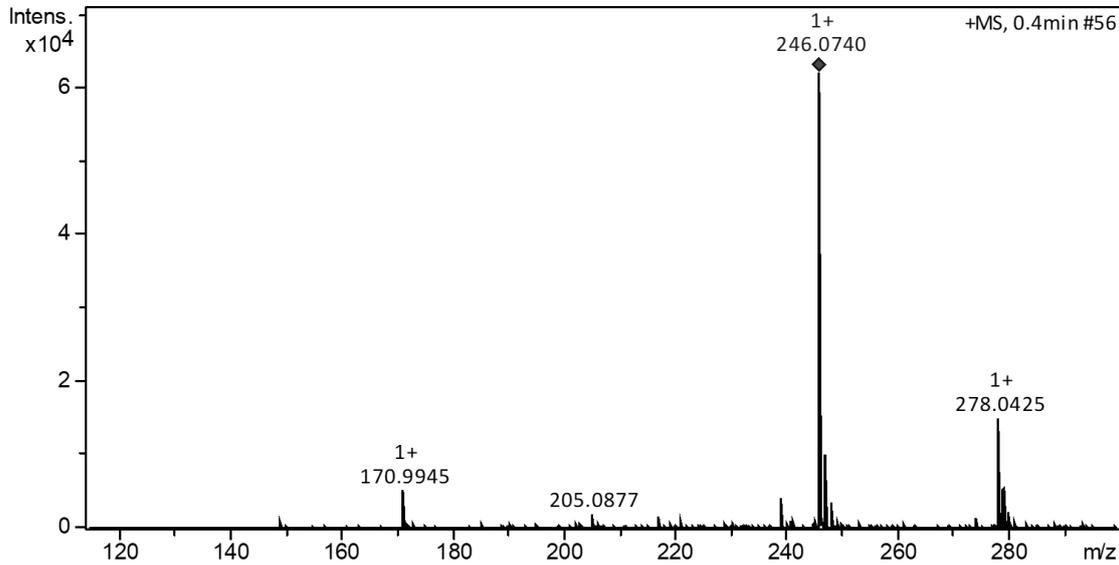


Tabela 3: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para os compostos **28** e **33** obtidas dos experimentos de RMN de ¹H e ¹³C, em CDCl₃. O solvente deuterado foi usado como referência interna.

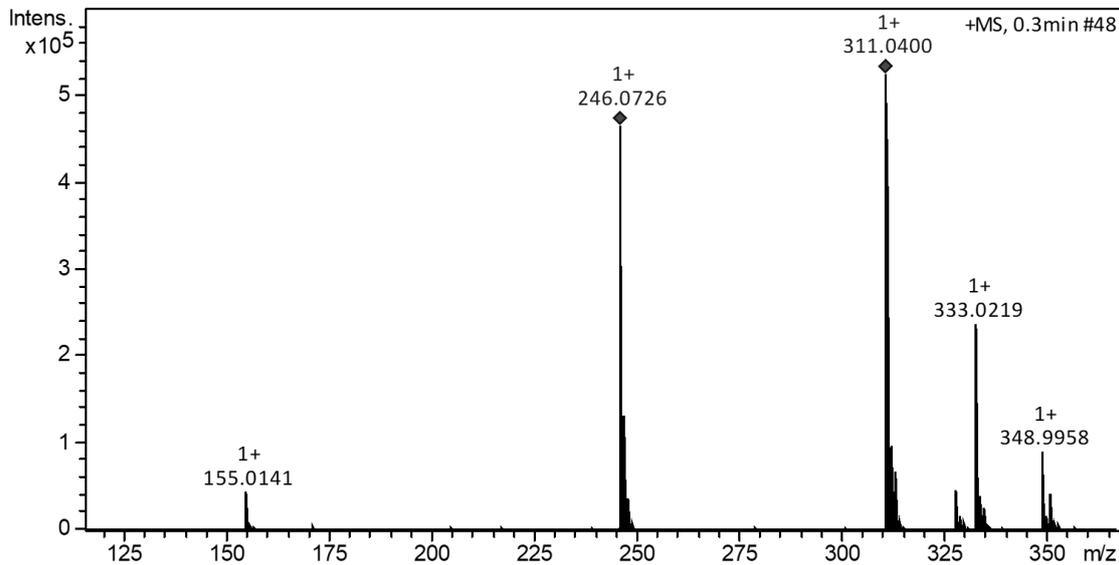
Posição (Tipo C)	Composto 28		Composto 33	
	δ_C	δ_H ; mult (int); J (Hz)	δ_C	δ_H ; mult (int); J (Hz)
4 (C)	159,9	-	163,5	-
10 (C)	159,9	-	162,2	-
1 (C)	128,4	-	134,8	-
3,5 (CH)	114,6	6,82; d (2H) J =8,8 Hz	114,8	6,82; d (2H) J =8,5 Hz
8,12 (CH)	132,6	7,37; d (2H) J =8,7Hz	138,2	7,25; d (2H) J =8,5 Hz
9,11 (CH)	114,6	6,82; d (2H) J =8,8 Hz	1137	6,85; d (2H) J =8,6 Hz
2,6 (CH)	132,6	7,37; d (2H) J =8,7 Hz	129,8	7,48; d (2H) J =8,8 Hz
7 (C)	128,4	-	118,8	-
10 - (OCH ₃)	55,3	3,78; s (3H)	55,4	3,81; s (3H)
4 - (OCH ₃)	55,3	3,78; s (3H)	55,7	3,85; s (3H)

Principal íon observado para o composto **28** no **Espectro 3**: ($C_{14}H_{14}O_2S_2$) [$M+$] 278,0425 sendo o valor calculado [$M+$]: 278,0429.



Espectro 3: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de **28**.

Principais íons observados para o composto **33** no **Espectro 4**: ($C_{14}H_{14}O_4S_2$) [$M+H$]: 311,0400; [$M+Na$]: 333,0219; [$M+K$]: 348,9958 sendo os valores calculados [$M+H$]: 311,0406; [$M+Na$]: 333,0220; [$M+K$]: 348,9959.



Espectro 4: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de **33**.

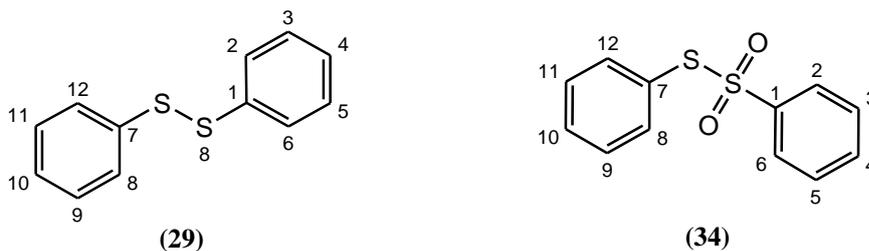
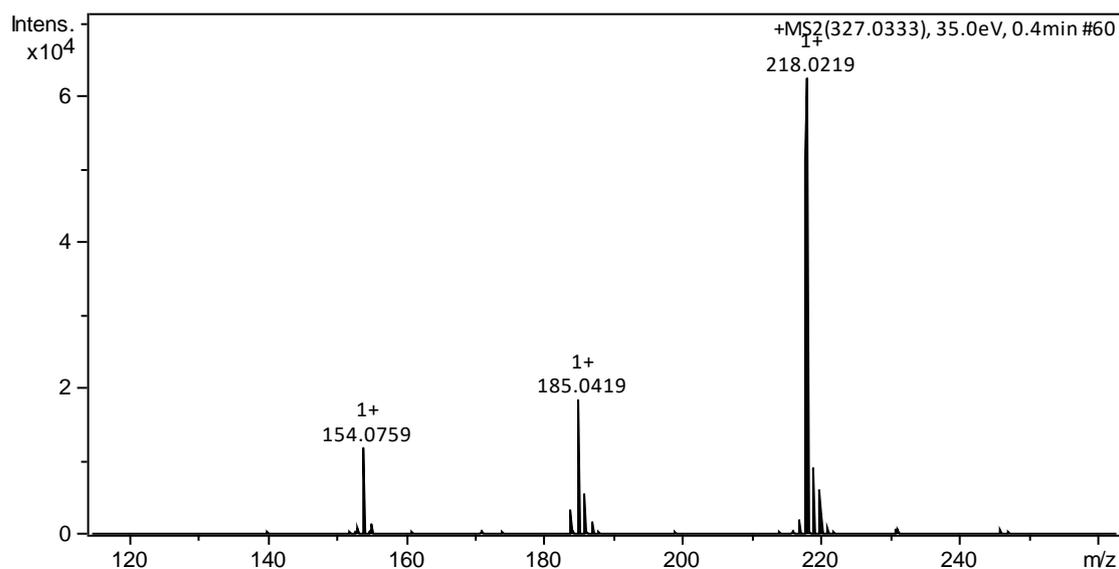
3.3.3. Identificação dos compostos **29** e **34**

Tabela 4: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para os compostos **29** e **34** obtidas dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 . O solvente deuterado foi usado como referência interna.

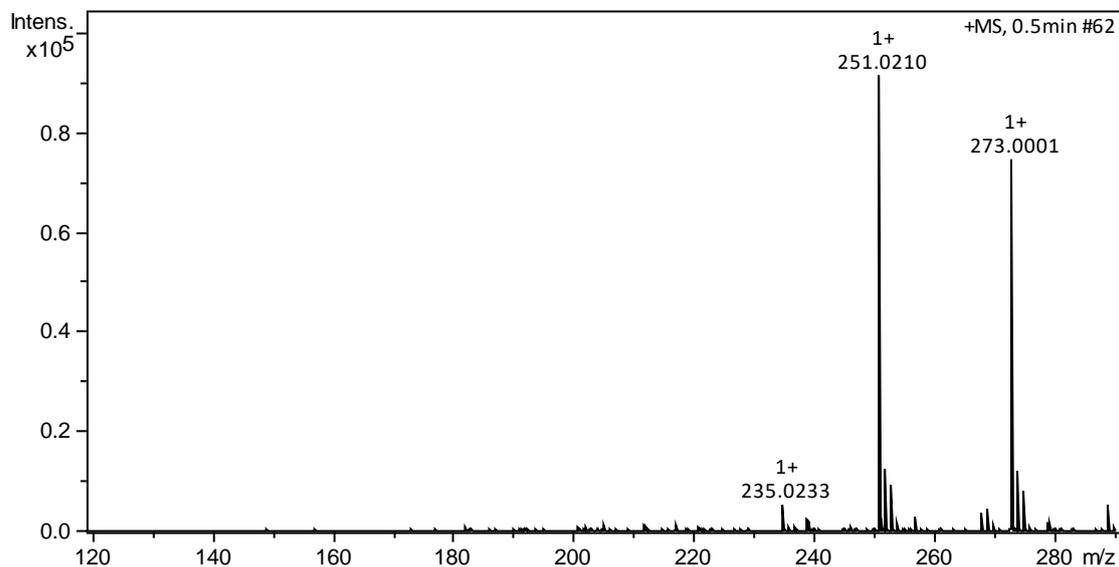
Posição (Tipo C)	Composto 29		Composto 34	
	δ_{C}	δ_{H} ; mult (int); J (Hz)	δ_{C}	δ_{H} ; mult (int); J (Hz)
4 (CH)	127,1	7,19 – 7,32; m (2H)	133,6	7,53 – 7,58; m (H)
10 (CH)	127,1	7,19 – 7,32; m (2H)	127,8	7,28 – 7,48; m (H)
1 (C)	137,0	-	142,9	-
3,5 (CH)	114,6	7,19 – 7,32; m (2H)	136,5	7,28 – 7,48; m (2H)
8,12 (CH)	127,5	7,49; d (2H) $J=7,2$ Hz	128,7	7,53 – 7,58; m (2H)
9,11 (CH)	114,6	7,19 – 7,32; m (2H)	129,4	7,28 – 7,48; m (2H)
2,6 (CH)	127,5	7,49; d (2H) $J=7,2$ Hz	127,5	7,28 – 7,48; m (2H)
7 (C)	137,0	-	131,3	-

Principal íon observado para o composto **29** no **Espectro 5**: ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{S}_2$) [M^+]: 218,0219 sendo o valor calculados [M^+]: 218,0218.



Espectro 5: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de **29**.

Principais íons observados para o composto **34** no **Espectro 6**: (C₁₂H₁₀O₂S₂) [M+H]: 251,0210; [M+Na]: 273,0001 sendo os valores calculados [M+H]: 251,0194; [M+Na]: 273,0008.



Espectro 6: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de **34**.

3.3.4. Identificação do composto **30**

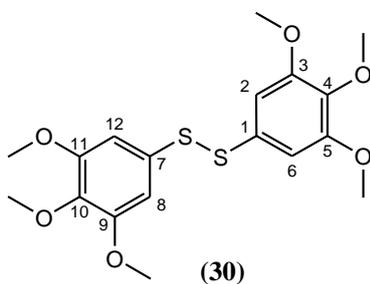
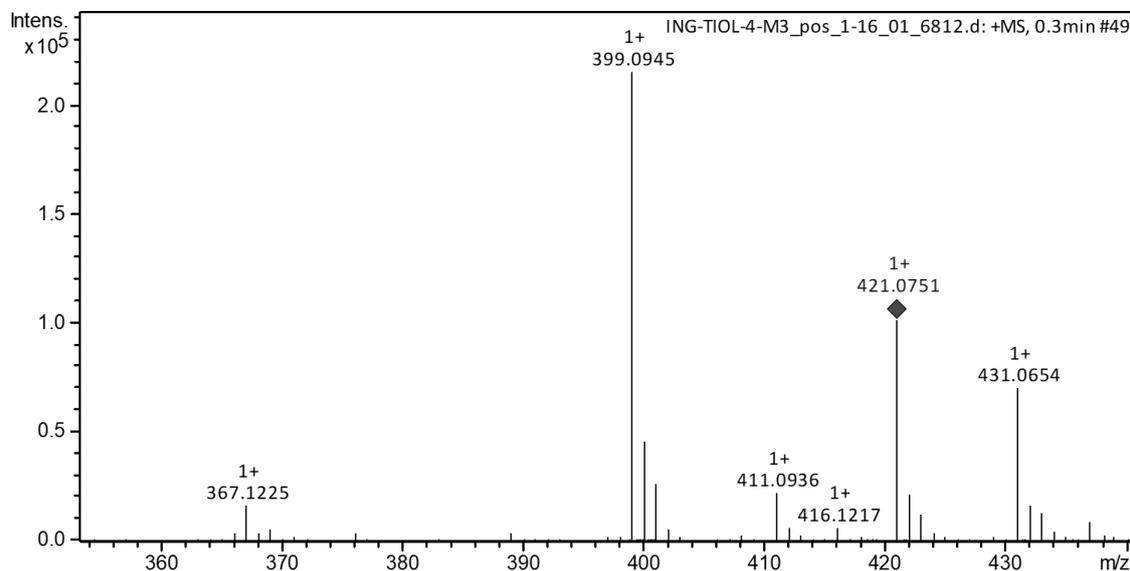


Tabela 5: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para o composto **30** obtidas dos experimentos de RMN de ¹H e ¹³C, em CDCl₃. O solvente deuterado foi usado como referência interna.

Posição (Tipo C)	Composto 30	
	δ_c	δ_H ; mult (int); J (Hz)
3,5 (OCH ₃)	56,1	3,78; s (12H)
9, 11 (OCH ₃)	56,1	3,78; s (12H)
4, 10 (OCH ₃)	60,9	3,79; s (6H)
2,6 (CH)	106,4	6,72; s (2H)
8,12 (CH)	106,4	6,72; s (2H)
1,7 (C)	132,0	-
4,10 (C)	137,9	-
3,5 (C)	153,4	-
9,11 (C)	153,4	-

Principais íons observados para o composto **30** no **Espectro 7**: (C₁₈H₂₂O₆S₂) [M+H]: 399,0945 e [M+Na]: 421,0751 sendo os valores calculados [M+H]: 399,0936 e [M+Na]: 421,0755.



Espectro 7: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de **30**.

3.3.5. Identificação do composto **31**

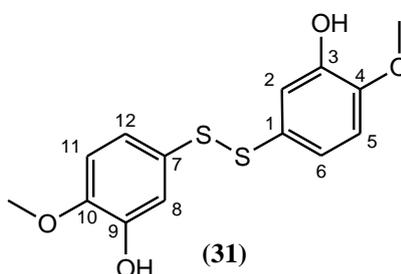
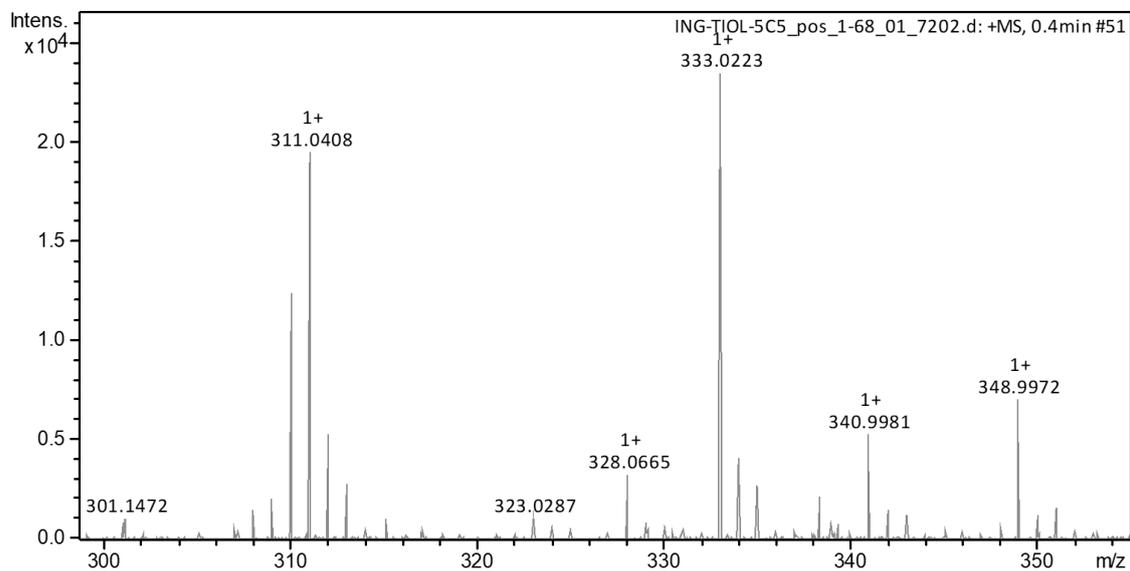


Tabela 6: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para o composto **31** obtidas dos experimentos de RMN de ¹H e ¹³C, em CDCl₃. O solvente deuterado foi usado como referência interna.

Posição (Tipo C)	Composto 31	
	δ_c	δ_H ; mult (int); J (Hz)
4, 10 (OCH ₃)	56,0	3,85; s (6H)
3, 9 (OH)	-	5,59; sl (2H)
5, 11 (CH)	110,9	6,75; d (2H) J = 8,4 Hz
6, 12 (CH)	122,0	6,96; dd (2H) J = 8,4 e 2,2 Hz
8, 2 (CH)	116,2	7,08; d (2H) J = 2,2 Hz
1, 7 (C)	129,3	-
9, 3 (C)	145,9	-
4, 10 (C)	146,7	-

Principais íons observados para o composto **31** no **Espectro 8**: (C₁₄H₁₄O₄S₂) [M+H]: 311,0407; [M+Na]: 333,0223; [M+K]: 348,9972 sendo os valores calculados [M+H]: 311,0412; [M+Na]: 333,0231; [M+K]: 348,9971.



Espectro 8: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de **31**.

3.3.6. Identificação do composto **39**

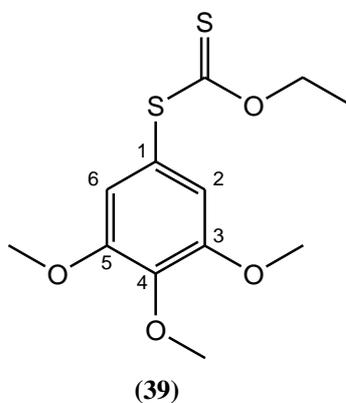
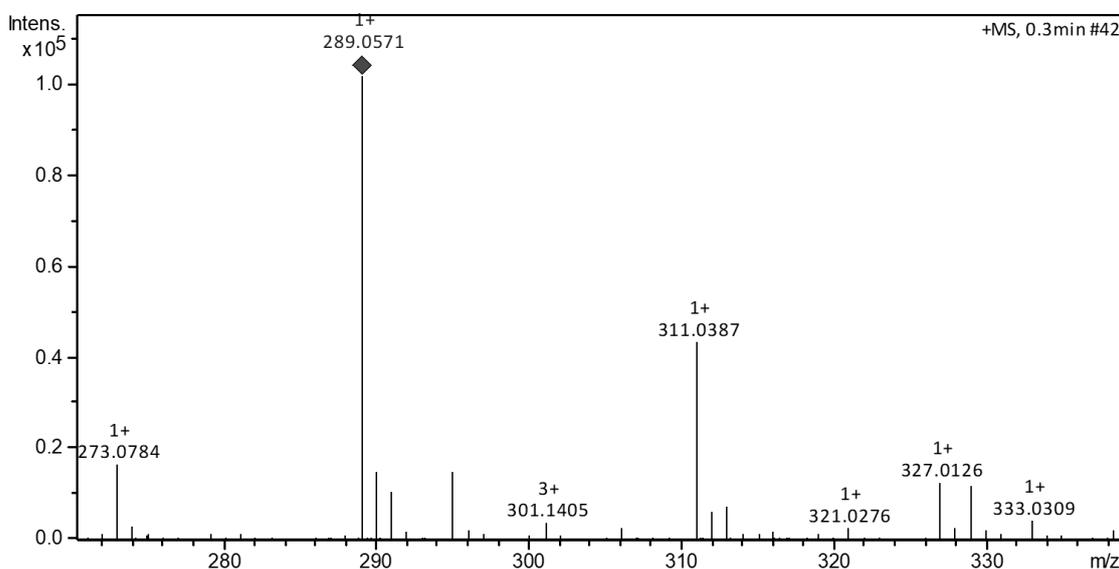


Tabela 7: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para o composto **39** obtidas dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 . O solvente deuterado foi usado como referência interna.

Posição (Tipo C)	Composto 39	
	δ_{C}	δ_{H} ; mult (int); J (Hz)
3,5 (OCH ₃)	56,3	3,84; s (6H)
4 (OCH ₃)	60,4	3,87; s (3H)
1 (CH ₃)	14,2	1,33; t (3H) $J=7,1$ Hz
1 (CH ₂)	70,3	4,60; q (2H) $J=7,1$ Hz
2,6 (CH)	112,2	6,74; s (2H)
3,5 (C)	153,3	-
4 (C)	139,6	-
1 (C)	124,5	-
1 (C=S)	213,18	-

Principais íons observados para o composto **39** no **Espectro 9**: ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{S}_2$) [$\text{M}+\text{H}$]: 289,0571; [$\text{M}+\text{Na}$]: 311,0387; [$\text{M}+\text{K}$]: 327,0126 sendo os valores calculados [$\text{M}+\text{H}$]: 289,0568; [$\text{M}+\text{Na}$]: 311,0388; [$\text{M}+\text{K}$]: 327,0127.



Espectro 9: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de **39**.

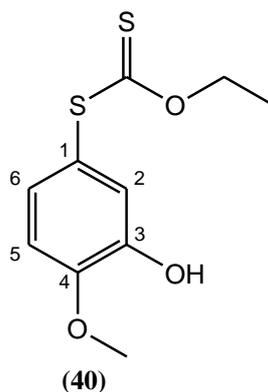
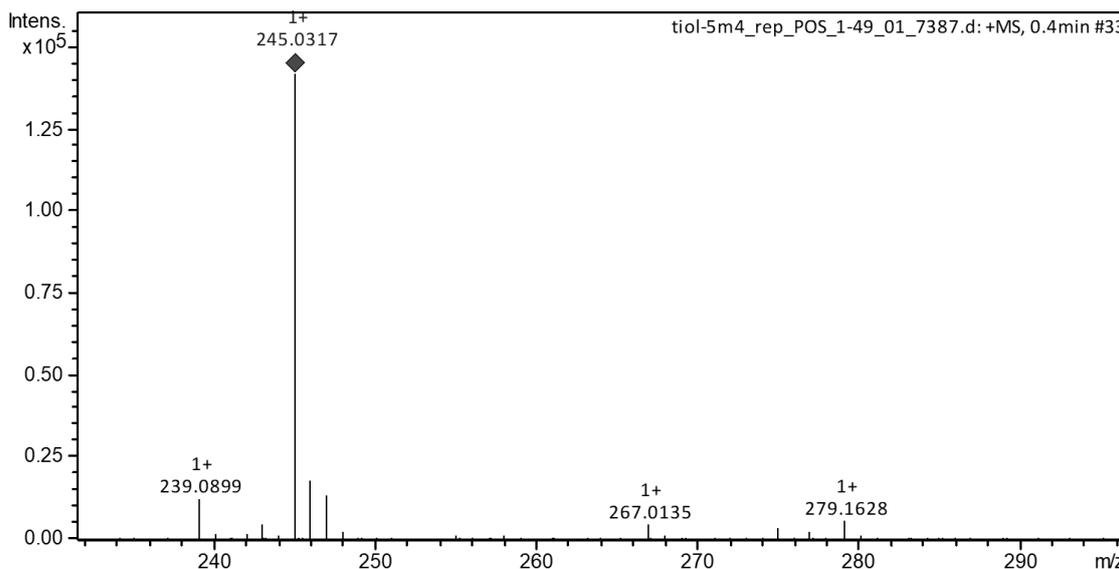
3.3.7. Identificação do composto **40**

Tabela 8: Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm e correlações C–H para o composto **40** obtidas dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em CDCl_3 . O solvente deuterado foi usado como referência interna.

Posição (Tipo C)	Composto 40	
	δ_{C}	δ_{H} ; mult (int); J (Hz)
1 (CH_3)	13,63	1,32; t (3H) $J=7,1$ Hz
4 (OCH_3)	55,94	3,91; s (3H)
1 (CH_2)	70,24	4,59; q (2H) $J=7,1$ Hz
3 (OH)	-	5,63; s (1H)
5 (CH)	110,81	6,86; d (1H) $J=8,3$ Hz
6 (CH)	127,58	6,99; dd (1H) $J=6,3$ e 2,0 Hz
2 (CH)	121,17	7,05; d (1H) $J=2,0$ Hz
1 (C)	121,95	-
3 (C)	145,86	-
4 (C)	148,14	-
1 (C=S)	214,37	-

Principais íons observados para o composto **40** no **Espectro 10**: ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{S}_2$) $[\text{M}+\text{H}]^+$: 245,0317 e $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 267,0135 sendo os valores calculados $[\text{M}+\text{H}]^+$: 245,0306 e $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 267,0126.



Espectro 10: Espectro de massas (HR-ESI-MS) de **40**.

3.4. Avaliação biológica

3.4.1. Ensaios antitubulínicos e de inibição competitiva pela ligação com a colchicina

Os compostos **27**, **28**, **29**, **32**, **33** e **34** foram submetidos aos ensaios antitubulínicos, de inibição da ligação da colchicina na tubulina e de citotoxicidade sobre a linhagem MCF-7 (câncer de mama). Estes ensaios foram realizados no *National Cancer Institute* (NCI) em Frederick-USA, em parceria com o professor Ernest Hamel.

Considerando a falta de trabalhos relacionados a atividade biológica para os compostos sintetizados, foram utilizados como referência a atividade da CA-4 (**Tabela 9**) e de compostos análogos contendo o átomo de enxofre como grupo espaçador (BARBOSA et al., 2009; SANTOS et al., 2013).

Todos os compostos testados apresentaram atividade antitubulínica significativa, sendo o composto **28** o mais ativo ($IC_{50} = 1,4 \pm 0,2$), seguido de **29** ($IC_{50} = 1,8 \pm 0,1$) e **33** ($IC_{50} = 2,3 \pm 0,1$). Esses valores são muito próximos dos obtidos por Barbosa (2009) e Santos (2013) para análogos da CA-4 com enxofre como grupo espaçador, contendo um anel trimetoxilado e outro com substituinte nas posições *meta* e/ou *para*.

Zhang e colaboradores (2007) relatam que os substituintes metoxila são essenciais para uma boa atividade de inibição da tubulina; isto está ligado ao fato dos heterodímeros α e β -tubulinas organizarem-se para formar os microtúbulos através de ligações de hidrogênio pela região -CO₂H terminal da β -tubulina e a região -NH₂ da α -tubulina (NELSON e COX, 2002).

Composto que possuam substituinte que realizam essas ligações de hidrogênio mais vigorosamente com a α e β -tubulinas, conseguem impedir que estes heterodímeros polimerizem-se, o que caracteriza essa atividade antitubulínica. O composto **28** que apresentou a melhor atividade, possui os grupos metoxilas em posição *para* nos dois anéis aromáticos de sua estrutura, enquanto o composto **29** apresentou valor de IC_{50} muito próximo de **28**, sem possuir substituintes ligados aos anéis aromáticos de sua estrutura. Esse comportamento pode estar relacionado a outras características da estrutura, sendo que estudos teóricos e de *docking* molecular podem ser realizados na tentativa de explicar outras relações para atividade inibitória dos compostos.

Para a atividade de inibição da ligação da colchicina na tubulina, os compostos que apresentaram melhores resultados foram **32** e **33** com 40 ± 3 % e 39 ± 08 % de inibição, respectivamente, para uma concentração de $5 \mu\text{M}$ do inibidor. Quando a concentração do inibidor foi aumentada em dez vezes ($50 \mu\text{M}$) a porcentagem de inibição para alguns compostos aumentou significativamente (**27** e **28**), enquanto para outros reduziu em metade (**29**). Para o composto **34** essa concentração aumento em torno de vinte vezes em relação a de $5 \mu\text{M}$. Essas relações são incoerente e podem estar relacionadas a um problema de solubilização das amostras.

Os compostos não foram ativos contra a linhagem MCF-7, quando comparados a CA-4, apresentando IC_{50} superior a $10 \mu\text{M}$.

Tabela 9: Avaliação biológica dos compostos **27**, **28**, **29**, **32**, **33** e **34**.

Composto	Inibição da polimerização da tubulina	% de inibição da ligação da Colchicina		Inibição de crescimento celular MCF-7 (câncer de mama)
	$IC_{50} (\mu\text{M}) \pm \text{DP}$	$5 \mu\text{M}$ do inibidor	$50 \mu\text{M}$ do inibidor	$IC_{50} (\mu\text{M}) \pm \text{DP}$
CA-4	$0,54 \pm 0,06$	$100 \pm 0,4$	-	$0,039 \pm 0,006$
27	$6,3 \pm 1$	$9,9 \pm 5$	25 ± 5	> 10
28	$1,4 \pm 0,2$	29 ± 1	47 ± 1	> 10
29	$1,8 \pm 0,1$	10 ± 5	5 ± 4	> 10
32	$2,5 \pm 0,3$	40 ± 3	-	> 10
33	$2,3 \pm 0,1$	$39 \pm 0,8$	-	> 10
34	$3,5 \pm 0,3$	$4,0 \pm 3$	82 ± 5	> 10

3.4.2. Ensaio citotóxico sobre linhagens de células cancerígenas e Índice de Seletividade (IS) realizado na FACFAN-UFMS

O ensaio de atividade citotóxica foi realizado pela aluna de mestrado Camilla Izabela Nantes sob orientação da Profa. Dra. Danielle Bogo na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) da UFMS.

Os testes com os compostos **27**, **28**, **29**, **32**, **33** e **34** foram realizados em linhagens de células neoplásicas humanas MCF-7 (mama), HepG2 (fígado), HT-29 (côlon), PC-3 (próstata), 786-0 (rim), MDA-MB (mama triplo resistente), NCI-ADR (ovário com fenótipo de resistência) (**Tabela 10**) e para a linhagem B16 - F10 (melanoma murino). Os valores são expressos em GI_{50} e referem-se à concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular e foram utilizadas para classificar as amostras em inativas quando $GI_{50} > 100\mu M$, atividade moderada quando GI_{50} entre 10 e $100\mu M$ e ativas quando $GI_{50} < 10\mu M$ (MAXIMO DA SILVA et al., 2015).

Todos os compostos testados apresentaram atividade moderada em pelo menos uma linhagem de célula tumoral. O composto **33** foi o mais ativo, com valores de $GI_{50} < 10\mu M$ apresentados contra três linhagens de células neoplásicas; NCI/ADR, 786-0 e MDA-MB e, além de apresentar o melhor potencial antiproliferativo, este composto não foi citotóxico para linhagem de célula normal NIH/3T3 (fibroblasto murino) ($GI_{50} > 100\mu M$).

Tabela 10: Inibição de crescimento celular GI_{50} (μ M) para os compostos **27**, **28**, **29**, **32**, **33** e **34**.

Linhasgens de células	Compostos Avaliados					
	27	28	29	32	33	34
B16-F10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
PC-3	>10	>10	>10	>10	>10	>10
MCF-7	>10	>10	>10	>10	>10	>10
786-0	>10	>10	>10	>10	<10	>10
HT-29	>10	>10	>10	>10	>10	>10
MDA-MB	>10	>10	>10	>10	<10	>10
HepG2	>10	>10	>10	>10	>10	>10
NCI/ADR	>10	>10	>10	>10	<10	>10

A investigação da citotoxicidade dos compostos em células não neoplásicas NIH/3T3 permitiu a determinação do índice de seletividade (IS) (GI_{50} NIH/3T3 / GI_{50} célula neoplásica). Os resultados de IS apresentados na **Tabela 11** mostram que o composto **33** foi 13,47 vezes mais seletivo para células de câncer de mama triplo resistente e 13,71 vezes para linhagem de câncer renal em relação as células não tumorais (NIH/3T3). A melhor seletividade, ainda de **33**, foi em células de câncer de ovário com fenótipo de resistência onde se mostrou 19,11 vezes mais seletivo. Valores de IS superiores ou iguais a 2,0 indicam que o composto avaliado é duas vezes mais ativo em linhagens de células neoplásicas do que em células não neoplásicas (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991).

Tabela 11: Índice de Seletividade (IS) (GI_{50} NIH/3T3 / GI_{50} célula neoplásica) dos compostos **27**, **28**, **29**, **34**, **32** e **33**.

Compostos	Linhagem celulares							
	MCF-7 (mama)	786-0 (rim)	PC-03 (próstata)	HT-29 (cólon)	NCI/ADR (ovário)	HepG2 (fígado)	MDA-MB (mama)	B16 F-10 (melanoma)
29	-	-	-	-	-	-	5,41	-
27	1,09	-	-	-	1,04	1,71	-	-
28	2,52	9,57	2,33	1,95	2,07	6,25	5,51	5,43
34	2,45	2,22	2,50	1,95	2,40	2,12	2,12	2,86
32	-	-	-	-	-	1,12	-	-
33	1,91	13,71		1,35	19,11	9,23	13,47	4,39

As linhagens celulares para as quais o composto **33** apresentou melhor atividade antiproliferativa têm em comum a resistência a múltiplas drogas (MDR do inglês: *Multiple drug resistance*); esse fenômeno é identificado pela ausência de resposta das células neoplásica aos diferentes agentes quimioterápicos, não havendo relação estrutural e funcional entre estes

últimos (WAGNER-SOUZA et al., 2003). Como exemplo, o mecanismo melhor definido para esse fenômeno, envolve a manifestação do produto do gene MDR-1 de 170 KDa denominado glicoproteína P ou P-gp (GOTTESMAN e PASTAN, 1993). Esta proteína presente na superfície celular, funciona como uma bomba de efluxo, transportando fármacos para o meio extracelular. Quando tem sua expressão aumentada, confere o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (GROS, CROOP, HOUSMAN, 1986) gerando problemas no transporte de fármacos através da membrana plasmática. Ainda existem outros diversos problemas relacionados a MDR como a incapacidade da célula de sofrer apoptose (HANNUN, 1997).

Muito esforços foram voltados para a descoberta de fármacos eficazes que possam reverter essa resistência, denominados de moduladores da MDR ou quimiossensibilizadores (WAGNER-SOUZA et al., 2003). A excelente atividade citotóxica e a seletividade do composto **33** o apontam como um possível protótipo a fármaco, sendo necessária uma investigação aprofundada de outras atividades biológicas deste composto.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Material e métodos

As análises cromatográficas em camada delgada (ccd) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 e para a visualização dos componentes nas análises em ccd utilizou-se lâmpada ultravioleta (254 nm).

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em modo de inserção direta. A análise foi realizada em um espectrômetro de massas ESI-qTOF microTOF-Q III (BrukerDaltonics) no Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (CCBS-UFMS) operado em modo positivo (120-1200 Da).

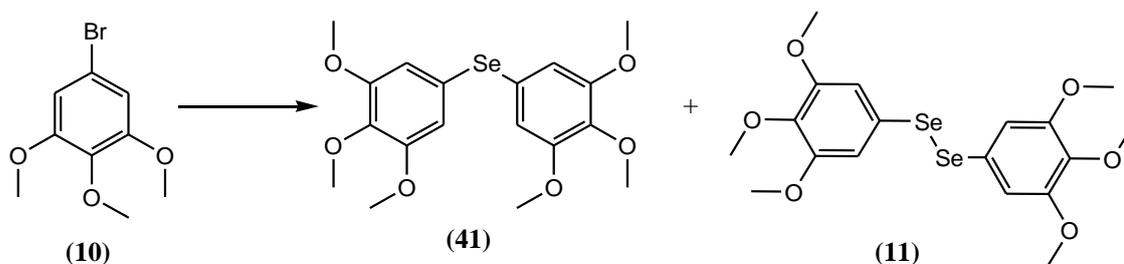
As purificações dos produtos foram realizadas por cromatografia em placa preparativa de sílica gel 60 F254 (0,063-0,2 mm). As amostras submetidas aos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C foram dissolvidas em CDCl_3 e este usado como referência interna. Os espectros de RMN de ^1H em 300 MHz e de ^{13}C (BBD) em 75 MHz foram obtidos usando espectrômetros nos modelos Bruker AVANCE DPX-300 (UFMS).

Os espectros de IV foram obtidos usando o método de pastilhas de KBr em um espectrômetro modelo FTIR MB100 Boomen (UFMS). Os solventes utilizados nos processos de extração e síntese foram tratados em laboratório. Os solventes deuterados utilizados foram: CDCl_3 Sigma 99,8 %, Merck 99,8 % e C_6D_6 99,8 %.

Os espectros de RMN e IV foram tratados utilizando o programa ACDLABS 12.0 versão livre e os espectros de massas de alta resolução foram tratados utilizando o programa Bruker Compass Data Analysis versão 4.2.383.1.

4.2. Procedimentos experimentais

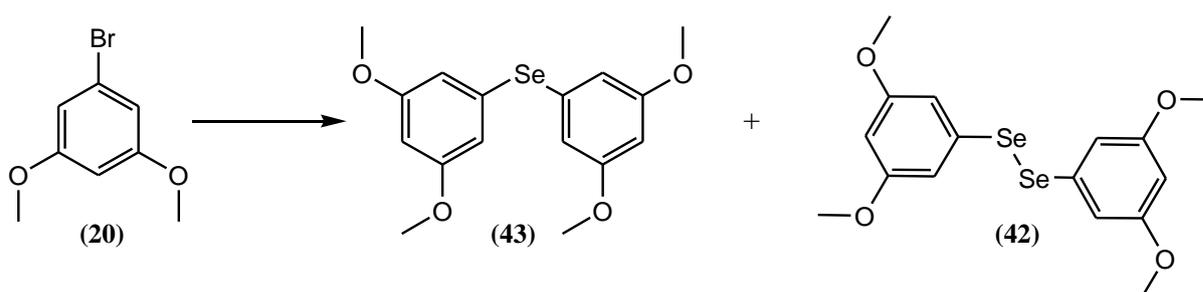
4.2.1. Procedimento geral para síntese de **11** e **41**:



Dissolveu-se **10** (5,347 mmol) em THF anidro (6 mL). Parte desta solução (1 mL) foi adicionado em um balão contendo Mg metálico em fita (7,397 mmol) sob atmosfera de N_2 . Um pequeno cristal de iodo foi adicionado para iniciar a reação. A seguir, a mistura foi agitada por

alguns minutos até a descoloração do iodo na reação. A solução restante do brometo **10** foi acrescentada rapidamente gota a gota para sustentar um refluxo suave na reação. Manteve-se a reação sob refluxo durante 1 h, sendo acompanhada por ccd (eluente: hexano/AcOEt 9:1, revelador: luz UV). A mistura reacional foi resfriada a t.a., adicionou-se Se em pó (422 mg, 5,347 mmol) e agitou-se sob refluxo por 3 h. Resfriou-se a mistura a 0 °C e acrescentou-se solução saturada de $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{aq})}$ (5 mL). A solução foi filtrada em Celite, depois lavou-se a Celite com solução saturada de $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{aq})}$ (25 mL) e Et_2O (60 mL). Transferiu-se a mistura para um funil de extração e separou-se a fase orgânica, sendo lavada com solução saturada de $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ (40 mL) e seca com MgSO_4 . A mistura foi purificada através de cromatografia em placa preparativa de sílica gel 60 ccd, sendo eluída com uma mistura de hexano/AcOEt 9,5:0,5. (SANTOS et al., 2013). Para este procedimento não houve formação dos produtos **11** e **41** esperados.

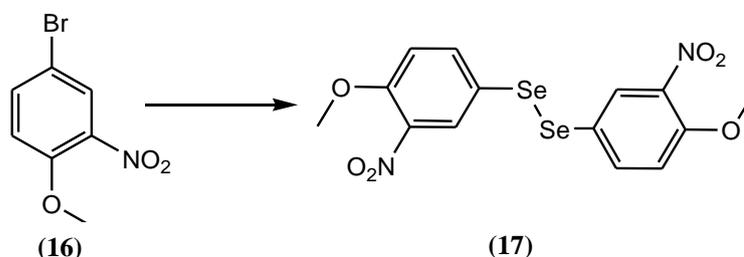
4.2.2. Procedimento geral para síntese de **42** e **43**:



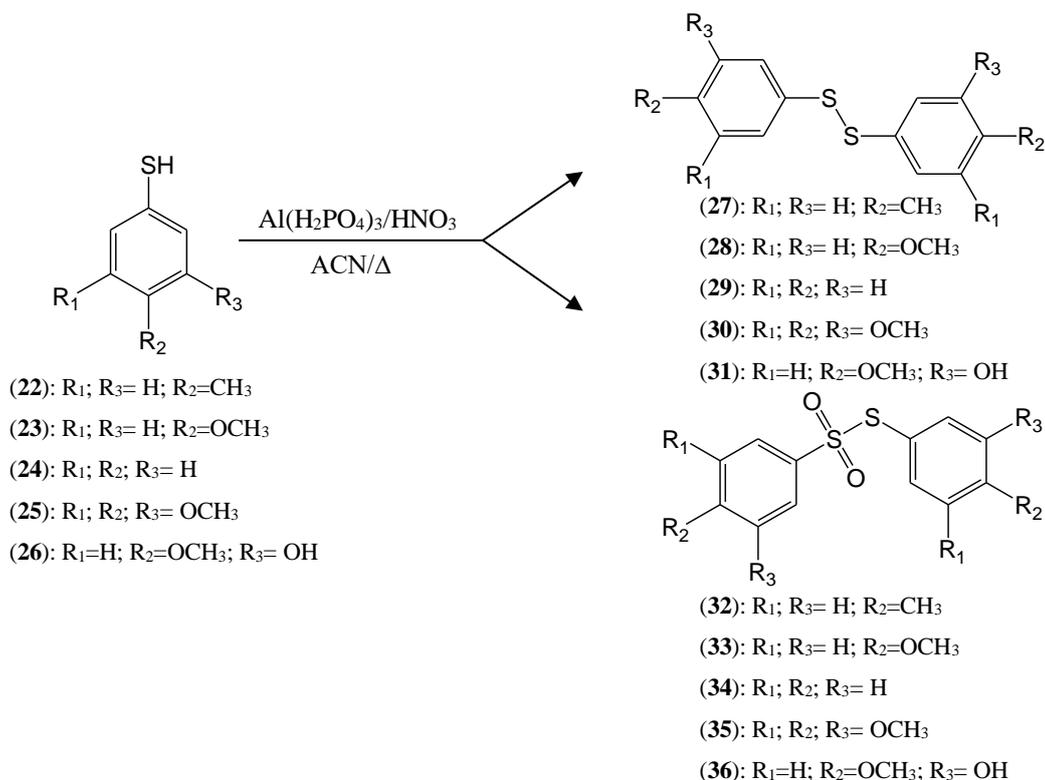
Dissolveu-se **20** (5,347 mmol) em THF anidro (6 mL). Parte desta solução (1 mL) foi adicionado em um balão contendo Mg metálico em fita (7,397 mmol) sob atmosfera de N_2 . Um pequeno cristal de iodo foi adicionado para iniciar a reação. A seguir, a mistura foi agitada por alguns minutos até a descoloração do iodo na reação. A solução restante do brometo **20** foi acrescentada rapidamente gota a gota para sustentar um refluxo suave na reação. Manteve-se a reação sob refluxo durante 1 h, sendo acompanhada por ccd (eluente: hexano/AcOEt 9:1, revelador: luz UV). A mistura reacional foi resfriada a t.a., adicionou-se Se em pó (422 mg, 5,347 mmol) e agitou-se sob refluxo por 3 h. Resfriou-se a mistura a 0 °C e acrescentou-se solução saturada de $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{aq})}$ (5 mL). A solução foi filtrada em Celite, depois lavou-se a Celite com solução saturada de $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{aq})}$ (25 mL) e Et_2O (60 mL). Transferiu-se a mistura para um funil de extração e separou-se a fase orgânica, sendo lavada com solução saturada de $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ (40 mL) e seca com MgSO_4 . A mistura foi purificada através de cromatografia em placa preparativa de sílica gel 60 ccd, sendo eluída com uma mistura de hexano/AcOEt 9,5:0,5.

(SANTOS et al., 2013). Para este procedimento não houve formação dos produtos **42** e **43** esperados.

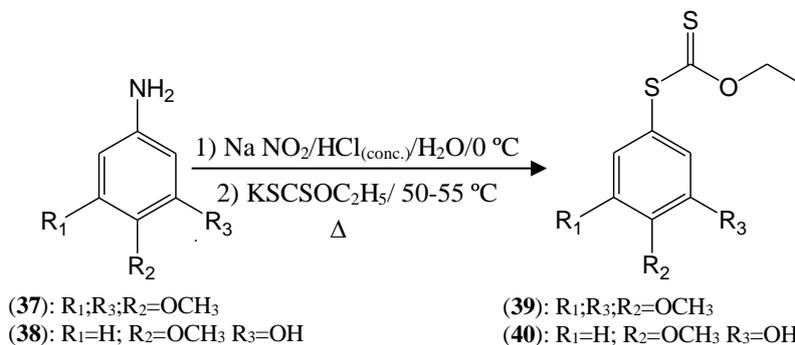
4.2.3. Procedimento geral para síntese de **17**:



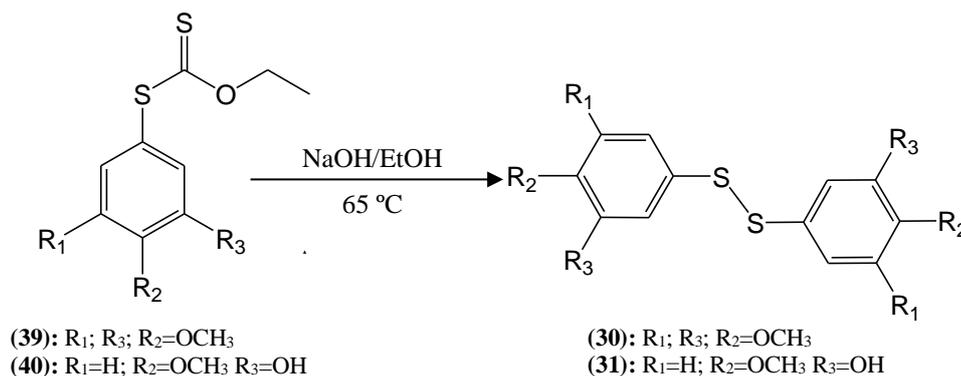
Dissolveu-se **16** (5,347 mmol) em THF anidro (6 mL). Parte desta solução (1 mL) foi adicionado em um balão contendo Mg metálico em fita (7,397 mmol) sob atmosfera de N₂. Um pequeno cristal de iodo foi adicionado para iniciar a reação. A seguir, a mistura foi agitada por alguns minutos até a descoloração do iodo na reação. A solução restante do brometo **16** foi acrescentada rapidamente gota a gota para sustentar um refluxo suave na reação. Manteve-se a reação sob refluxo durante 1 h, sendo acompanhada por ccd (eluente: hexano/AcOEt 9:1, revelador: luz UV). A mistura reacional foi resfriada a t.a., adicionou-se Se em pó (422 mg, 5,347 mmol) e agitou-se sob refluxo por 3 h. Resfriou-se a mistura a 0 °C e acrescentou-se solução saturada de NH₄Cl_(aq) (5 mL). A solução foi filtrada em Celite, depois lavou-se a Celite com solução saturada de NH₄Cl_(aq) (25 mL) e Et₂O (60 mL). Transferiu-se a mistura para um funil de extração e separou-se a fase orgânica, sendo lavada com solução saturada de NaCl_(aq) (40 mL) e seca com MgSO₄. A mistura foi purificada através de cromatografia em placa preparativa de sílica gel 60 ccd, sendo eluída com uma mistura de hexano/AcOEt 9,5:0,5. (SANTOS et al., 2013). Para este procedimento não houve formação do produto **17** esperado.

4.2.4. Procedimento geral para síntese de **27** a **36**.

Adicionou-se em um balão o tiol (32 mmol), $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ (0,16 mmol) preparado anteriormente pelo grupo de pesquisa (SANTOS, 2011) e HNO_3 concentrado (3 mL). A reação foi mantida em agitação sob refluxo por 2 horas e acompanhada por ccd (eluente: hexano/ AcOEt 9,5: 0,5, revelador: luz UV). A mistura foi transferida para um funil de separação e adicionou-se AcOEt (70 mL). O pH foi elevado a 7 adicionando cuidadosamente solução saturada de $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$. A fase orgânica foi lavada com H_2O destilada (40 mL), solução saturada de $\text{NaCl}(\text{aq})$ (40 mL), seca com MgSO_4 e filtrada. O solvente foi retirado em um evaporador rotativo e o produto foi purificado por cromatografia em placa preparativa de sílica gel 60 ccd, eluída com uma mistura gradiente de hexano/ AcOEt 9,5: 0,5 (SANTOS et al., 2012).

4.2.5. Procedimento geral para síntese de **39** e **40**.

Em um balão contendo o material de partida (1,0 g, 5,464 mmol) a temperatura 0 °C, adicionou-se uma solução de HCl (4,5 mL de HCl para 4,0 mL de H₂O destilada). A mistura foi agitada por 1 min e acrescentou-se lentamente NaNO₂ (453 mg, 6,567 mmol), permanecendo sob agitação por mais 10 min a 0 °C. A um segundo balão adicionou-se EtOCS₂K (2,623 g, 16,392 mmol) dissolvidos em H₂O destilada (5 mL) e, gotejou-se a solução contendo o sal de diazônio preparada anteriormente. A reação foi aquecida a 50-55 °C durante 40 min, sendo acompanhada por ccd (eluente: hexano/AcOEt 7:3, revelador: luz UV e vanilina 1%). A reação foi resfriada a t.a. e adicionou-se cuidadosamente uma solução de NaOH(aq) 20 % para elevar o pH a 7. Transferiu-se a mistura para um funil de extração e extraiu-se com AcOEt (3x 30 mL). A fase orgânica foi lavada com H₂O destilada (30 mL), solução saturada de NaCl(aq) (30 mL) e em seguida seca sobre MgSO₄ e filtrada, removendo o solvente em um evaporador rotativo. O produto foi purificado através de coluna cromatográfica do tipo “flash”, eluída com uma mistura de hexano/AcOEt 8:2, onde obteve-se o composto 51 (972 mg, 3,375 mmol) (SANTOS, 2011).

4.2.6. Procedimento geral para síntese de **39** e **40**.

Adicionou-se em um balão **39** ou **40** (0,694 mmol) dissolvidos em EtOH (5 mL) e acrescentou-se solução de NaOH_(aq) 3 M (3 mL). A reação foi aquecida a 65 °C por 3 horas, sendo acompanhada por ccd (eluente: hexano/AcOEt 8:2, revelador: luz UV e vanilina 1 %). A reação foi resfriada a t.a. e adicionou-se uma solução de HCl_(aq) 3 % até pH= 3. Transferiu-se a mistura para um funil de separação e extraiu-se com AcOEt (2x 35 mL), lavou-se a fase orgânica com solução saturada de NaCl_(aq) (40 mL), secou-se sobre MgSO₄ e filtrou-se. O solvente foi retirado em um evaporador rotativo, a mistura foi purificada através de cromatografia em placa preparativa (sílica gel), eluída com uma mistura de hexano/AcOEt 7:3 (SANTOS, 2011).

4.3. Ensaios Biológicos

4.3.1. Ensaios antitubulínicos e de inibição competitiva pela ligação com a colchicina

Os compostos **27**, **28**, **29**, **32**, **33** e **34** foram submetidos aos ensaios de avaliação da atividade antitubulínica e de inibição da ligação da colchicina no sítio ativo da tubulina, sendo estes realizados no *National Cancer Institute* (NCI) em Frederick – EUA sob a coordenação do Prof. Dr. Ernest Hamel. Com o intuito de avaliar o efeito dos compostos no ensaio de montagem da tubulina *in vitro* (HAMEL, 2003), tais substâncias (em diferentes concentrações) foram pré-incubadas sem GTP por 15 min a 30 °C, juntamente com tubulina cerebral bovina 10 µM em glutamato monossódico 0,8M a 30 °C (pH ajustado para 6,6 com HCl numa solução estoque a 2,0 M) e depois resfriado a 0 °C. Após a adição de GTP 0,4 mM, as misturas foram transferidas para cubetas num espectrofotômetro de gravação (Beckman DU7400 e DU7500) e aquecidas até 30 °C. O ensaio de montagem da tubulina foi seguido turbidimetricamente em 350 nm sendo que a IC₅₀ foi definida como a concentração do composto que reduziu a leitura da turbidez em 50% após uma incubação de 20 min, tendo como referência uma mistura reacional controle sem o composto. A capacidade das substâncias testadas para inibir a ligação da colchicina à tubulina foi medida como descrito (VERDIER-PINARD et al., 1998).

4.3.2. Ensaio citotóxico sobre a linhagem MCF-7 (*National Cancer Institute*)

As linhagens de células neoplásicas de mama (MCF-7) cresceram em meio DMEM (Gibco, Milano, Itália), suplementadas com 115 unidades/mL de penicilina G (Gibco, Milão, Itália), 115 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen, Milano, Itália) e 10% de soro bovino fetal (FBS, Invitrogen, Milano, Itália). As soluções estoque (10 mM) dos diferentes compostos foram

obtidas dissolvendo-os em Dimetilsulfóxido (DMSO). Os poços individuais de uma placa de cultura de tecidos, de 96 poços foram inoculados com 100 µL de meio completo contendo 8×10^3 células. As placas foram incubadas a 37 °C, numa incubadora de CO₂ umidificada a 5% durante 18 horas antes das experiências. Após a remoção do meio, foram adicionados 100 µL de meio fresco contendo o composto analisado em diferentes concentrações em triplicata e incubados a 37 °C durante 72 horas. A porcentagem de DMSO no meio nunca ultrapassou 0,25%. A viabilidade celular foi analisada pelo teste MTT como descrito (ROMAGNOLI et al., 2013). IC₅₀ foi definida como a concentração do composto necessário para inibir a proliferação celular em 50% em comparação com células tratadas com a quantidade máxima de DMSO (0,25%) e consideradas como 100% de viabilidade.

4.3.3. Ensaio citotóxico sobre linhagens de células cancerígenas e Índice de Seletividade (IS) realizado na FACFAN-UFMS

O ensaio de atividade citotóxica foi realizado pela aluna de mestrado Camilla Izabela Nantes sob orientação da Profa. Dra. Danielle Bogo na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) da UFMS. Os testes foram realizados em linhagens de células neoplásicas humanas MCF-7 (mama), MDA-MB (mama triplo resistente), HepG2 (fígado), PC-3 (próstata), 786-0 (rim), HT-29 (côlon), NCI-ADR (ovário com fenótipo de resistência) e também na linhagem de células B16-F10 (melanoma murino). Foi investigada ainda a citotoxicidade dos compostos em células não neoplásicas NIH/3T3 (fibroblasto murino); este teste permitiu a determinação do índice de seletividade (IS) que é a razão entre o valor da GI₅₀ de cada amostra na linhagem de células não neoplásicas NIH/3T3 e o valor da GI₅₀ de cada amostra em linhagem de células neoplásicas ($GI_{50} \text{ NIH/3T3} / GI_{50} \text{ célula neoplásica}$). Se o valor de IS for maior ou igual a 2,0 diz-se que, a amostra testada é duas vezes mais ativa na linhagem de células neoplásicas do que em células não neoplásicas (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991).

Inicialmente as células foram descongeladas e cultivadas em frascos estéreis de 25 cm² de área contendo meio de cultura RPMI 1640 ou DMEM, penicilina-estreptomicina 1%, suplementados com 10% de soro fetal bovino - SFB (meio completo). Estas foram incubadas em meio adequado (37 °C, umidade de 5% em atmosfera de CO₂) até aderirem a superfície de contato do frasco de cultivo ocupando em torno de 80% da área disponível (FRESHNEY, 2005). As células são então desagregadas por meio da ação de tripsina e transferidas para um frasco maior para que possam continuar se proliferando, esse processo é conhecido como repique. Essa proliferação segue até a realização do segundo repique.

Posteriormente, foi preparada uma suspensão com 7.500 células (contadas em Câmara de Neubauer) em 100 μL de meio (Trypan Blue® 1:5) que foi dispersa em placas de 96 poços; estas permaneceram incubadas por um período de 24 horas antes dos compostos sintetizados serem incorporados. Paralelo a este experimento, foi preparada também uma placa denominada de T0 que não recebeu os compostos citados, somente as células e o meio completo. A leitura da T0 permitiu calcular quanto as células cresceram no período de 24 horas e, obtida essa informação, os compostos foram incorporados às placas-teste. Estes foram dissolvido em DMSO e adicionados as placas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata para cada concentração, sendo que a maior concentração de solvente utilizada foi de 0,25% e então foram incubadas novamente por 48 horas.

Após o tempo de incubação realizou-se a leitura das placas-teste. O meio foi aspirado permanecendo apenas as células aderidas, estas foram fixadas com 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) 20% durante 30 minutos a 4°C. O TCA foi descartado e as placas lavadas 5 vezes em água corrente. Estas foram secas em capela de fluxo vertical e fez-se então adição de 50 μL de sulforodamina B (SRB) 0,1%, diluída em ácido acético 1%, para coloração das proteínas durante 30 minutos. Em seguida as placas foram lavadas 4 vezes com ácido acético 1% a fim de retirar o excesso de SRB, secas, e preenchidas com solução tampão Trizma® base (10 mM, pH 10,5) que solubilizou o corante das células fixadas e possibilitou a análise no espectrofotômetro em 540 nm.

Foram determinadas as absorvâncias das placas-teste (T), do controle negativo (CN) ou células não tratadas, branco das amostras-teste e a leitura do início da incubação (T0), sendo que em todos os experimentos incluiu-se um controle positivo (CP) que foram as células tratadas com Doxorubicina (Eurofarma) nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 horas de incubação. A inibição de crescimento - GI (%) foi calculada em programa Microsoft Office Excel 2007, por meio das fórmulas (MONKS et al.,1991):

Se $T \geq T0$ e $< CN$: $GI_{50} = 100. [(T-T0) / (CN-T0)]$

Se $T < T0$: $GI_{50} = 100. [(T-T0) / (T0)]$

Considerou-se potencialmente ativos os compostos com $GI_{50} \leq 10 \mu\text{M}$ e inativas quando $GI_{50} > 10 \mu\text{M}$ (MAXIMO DA SILVA et al., 2015).

5. CONCLUSÕES

As reações para obtenção dos compostos com selênio não culminaram no produto esperado, sendo as reações descontinuadas. Em contrapartida, a síntese de diaril compostos contendo átomos de enxofre resultou em oito produtos (**27** ao **34**), sendo que para o composto **31** não há relatos de síntese na literatura. Os compostos **35** e **36** não foram identificados entre os produtos resultantes das reações de oxidação de **30** e **31**.

Os produtos **27**, **28**, **29**, **32**, **33** e **34** foram submetidos a testes de atividade biológica onde todos apresentaram atividade antitubulínica significativa. Para os ensaios de citotoxicidade o composto **33** apresentou atividade significativa para as linhagens de células 786-0, MDA-MB e NCI/ADR, as quais são consideradas resistentes a múltiplas drogas. A próxima etapa é a avaliação da atividade citotóxica *in vivo*. Os compostos **30** e **31** serão submetidos aos ensaios de atividade antitubulínica e citotóxica, para investigação da relação estrutura-atividade, frente ao excelente resultado de **33** e a semelhança estrutural que possuem com essa estrutura.

6. REFERÊNCIAS

- ABBASI, M., MOHAMMADIZADEH, M. R., & SAEEDI, N. The synthesis of symmetrical disulfides by reacting organic halides with Na₂S₂O₃ · 5H₂O in DMSO. **New Journal of Chemistry**, 40(1), 89-92, 2016.
- BANDGAR, B. P.; PANDIT, S. S.; Direct synthesis of thiosulfonic S-esters from sulfonic acids using cyanuric chloride under mild conditions. **J. Sulfur. Chem.**, v.25, 347-350, 2004.
- BANWELL, Martin G. et al. 4, 5-Diaryl-1H-pyrrole-2-carboxylates as combretastatin A-4/lamellarin T hybrids: Synthesis and evaluation as anti-mitotic and cytotoxic agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 13, p. 4627-4638, 2006.
- BARBOSA, Euzébio G. et al. A diaryl sulfide, sulfoxide, and sulfone bearing structural similarities to combretastatin A-4. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2685-2688, 2009.
- CARVALHO, Pedro; TIRNAUER, Jennifer S.; PELLMAN, David. Surfing on microtubule ends. **Trends in cell biology**, v. 13, n. 5, p. 229-237, 2003.
- CONSTANTINO, Maurício Gomes. **Química orgânica: curso básico universitário**. Livros Técnicos e Científicos, 2008.
- CREMLYN, Richard James William. **An introduction to organosulfur chemistry**. John Wiley & Sons Inc, 1996.
- DUMONTET, Charles; JORDAN, Mary Ann. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 10, p. 790-803, 2010.
- EWING, David F. ¹³C substituent effects in monosubstituted benzenes. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 12, n. 9, p. 499-524, 1979.
- GROS, Philippe; CROOP, James; HOUSMAN, David. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. **Cell**, v. 47, n. 3, p. 371-380, 1986.
- GROZINGER, Karl G. et al. Synthesis of five nevirapine metabolites. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 229-239, 2000.

HAMEL, Ernest. Evaluation of antimetabolic agents by quantitative comparisons of their effects on the polymerization of purified tubulin. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2003.

HANNUN, Yusuf A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 1845-1853, 1997.

HATTORI, K., KOIKE, K., OKUDA, K., HIRAYAMA, T., EBIHARA, M., TAKENAKA, M., & NAGASAWA, H.; Solution-phase synthesis and biological evaluation of triostin A and its analogues. **Organic & biomolecular chemistry**, 14(6), 2090-2111, 2016.

HERMAN-ANTOSIEWICZ, A., POWOLNY, A. A., & SINGH, S. V.; Molecular targets of cancer chemoprevention by garlic-derived organosulfides. **Acta pharmacologica Sinica**, 28(9), 1355-1364, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), **Estimativa 2016, incidência de Câncer no Brasil**, Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>>. Data de acesso: 09/03/2017.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P. J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.1, p.33-38, 2004.

JOCELYN, D. C. Biochemistry of the thiol group. **Academic, New York**, 1992.

KHODYUK, R. G. D. **Síntese, caracterização estrutural e atividade biológica de ariltiosulfonatos halogenados**. 2013. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, 2013.

LANGLER, R. F.; BAERLOCKER, F. J.; PENN, L. Z.; Preparation and testing of sulfur-containing compounds as antifungal and antiproliferative agents. **WO 2001062668 A2**, 2001.

LEE, SANG-I.; KUEM, YUONG-S.; PARK, CHANG-K.; **Han'guk Nonghwa Hakhoechi**. 40, 249, 1997.

LI, Yao-Wu et al. Imidazolone–amide bridges and their effects on tubulin polymerization in cis-locked vinylogous combretastatin-A4 analogues: Synthesis and biological evaluation.

Bioorganic & medicinal chemistry, v. 19, n. 11, p. 3579-3584, 2011.

LIN, Ch M. et al. Interactions of tubulin with potent natural and synthetic analogs of the antimetabolic agent combretastatin: a structure-activity study. **Molecular pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 200-208, 1988.

LLAUGER, Laura et al. Evaluation of 8-arylsulfanyl, 8-arylsulfoxyl, and 8-arylsulfonyl adenine derivatives as inhibitors of the heat shock protein 90. **Journal of medicinal chemistry**, v. 48, n. 8, p. 2892-2905, 2005.

MACDONALD, Justin A.; MARCHAND, Maurice E.; LANGLER, Richard F. Improving upon the in vitro biological activity of antithrombotic disulfides. **Blood coagulation & fibrinolysis**, v. 15, n. 6, p. 447-450, 2004.

MAXIMO DA SILVA, Marciane et al. Synthesis, Antiproliferative Activity and Molecular Properties Predictions of Galloyl Derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5360-5373, 2015.

NAKANISHI, Warô; HAYASHI, Satoko; UEHARA, Tetsutaro. Structure of 1-(Arylselanyl)naphthalenes– Y Dependence in 1-(p-YC₆H₄Se) C₁₀H₇. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2001, n. 20, p. 3933-3943, 2001.

NATARAJAN, Palani. Facile synthesis of symmetric thiosulfonates by oxidation of disulfide with oxone/MX (MX= KBr, KCl, NaBr and NaCl). **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 27, p. 4131-4134, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, Princípios de Bioquímica. Sarvier, 3^a edição. **São Paulo**, 2002.

OAE, Shigeru; DOI, Joyce. **Organic sulfur chemistry**. CRC Press, 1991.

PAVIA, D. L.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G.; **Introdução à Espectroscopia**, 2. ed., São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PETTIT, G. R. et al. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. **Experientia**, v. 45, n. 2, p. 209-211, 1989.

PETTIT, George R. et al. Antineoplastic agents 322. synthesis of combretastatin A-4 prodrugs. **Anti-cancer drug design**, v. 10, n. 4, p. 299-309, 1995.

PILAT, M. J.; LORUSSO, P. M. Vascular disrupting agents. **Journal of cellular biochemistry**, v. 99, n. 4, p. 1021-1039, 2006.

RICE, William G. et al. Evaluation of selected chemotypes in coupled cellular and molecular target-based screens identifies novel HIV-1 zinc finger inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 19, p. 3606-3616, 1996.

ROMAGNOLI, Romeo et al. Concise synthesis and biological evaluation of 2-aryl-5-amino benzo [b] thiophene derivatives as a novel class of potent antimitotic agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n. 22, p. 9296-9309, 2013.

SANTOS, E. A.; **Síntese e avaliação biológica de análogos da combretastatina a-4 com os átomos de enxofre e selênio como grupos espaçadores**. UFMS, 2011.

SANTOS, Edson dos A. et al. Synthesis and evaluation of diaryl sulfides and diaryl selenide compounds for antitubulin and cytotoxic activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 16, p. 4669-4673, 2013.

SANTOS, Edson dos A. et al. Synthesis Method for Thiosulfonate and Report of Its Insecticidal Activity in *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 11, p. 15241-15251, 2012.

SHUKLA, Yogeshwer; KALRA, Neetu. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. **Cancer letters**, v. 247, n. 2, p. 167-181, 2007.

SILVERSTEIN, Robert M. et al. **Spectrometric identification of organic compounds**. John wiley & sons, 2014.

SMITH, Muneerah et al. The cytotoxicity of garlic-related disulphides and thiosulfonates in WHCO1 oesophageal cancer cells is dependent on S-thiolation and not production of ROS. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 7, p. 1439-1449, 2016.

SUFFNESS M, PEZZUTO JM.; **Assays for Bioactivity**. In *Methods in Plant Biochemistry*. K. Hostettmann (Editor). London Academic Press; 1991.

TADA, Masahiro et al. Nematicidal and antimicrobial constituents from *Allium grayi* Regel and *Allium fistulosum* L. var. *caespitosum*. **Agricultural and biological chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2383-2385, 1988.

TROEGER, J.; VOLKMER, F.; Action of phenylhydrazine on arylthiosulphonated ethyl acetoacetates. **Journal fuer Praktische Chemie (Leipzig)**, v. 70 (ii), p. 375-92, 1904.

WAGNER-SOUZA, Karen et al. Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 2, p. 103-112, 2003.

WANG, Huimin et al. Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA damage via a mechanism involving protein thiolation. **Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3316-3323, 2001.

WILD, Ute et al. Dehydrogenative Coupling Reactions with Oxidized Guanidino-Functionalized Aromatic Compounds: Novel Options for σ -Bond Activation. **Chemistry-A European Journal**, v. 22, n. 34, p. 11971-11976, 2016.

YOUNG, Scott L.; CHAPLIN, David J. Combretastatin A4 phosphate: background and current clinical status. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 13, n. 9, p. 1171-1182, 2004.

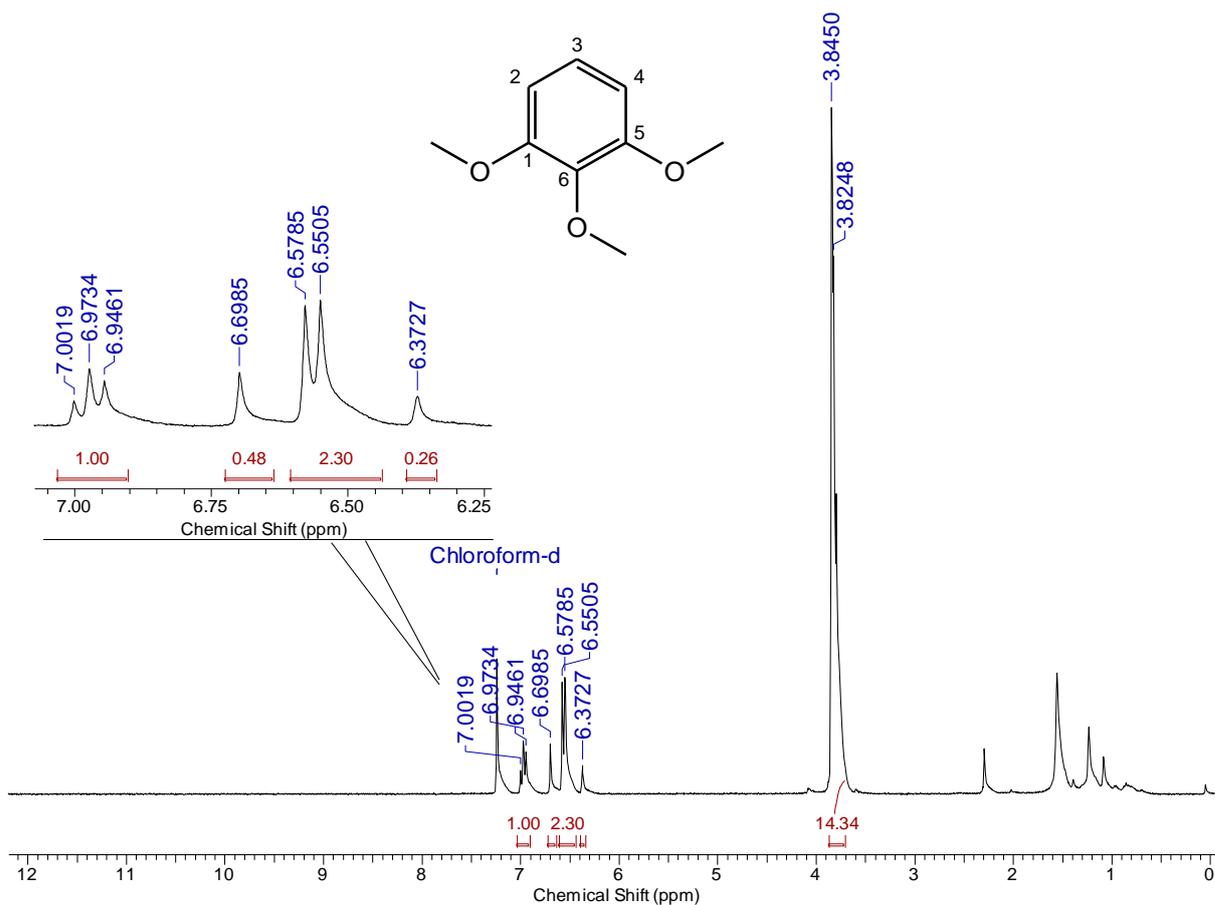
ZEFIROV, Nikolai S. et al. Thiosulfonates: synthesis, reactions and practical applications. **Sulfur Reports**, v. 14, n. 1, p. 223-240, 1993.

ZHANG, Qiang et al. Highly potent triazole-based tubulin polymerization inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 50, n. 4, p. 749-754, 2007.

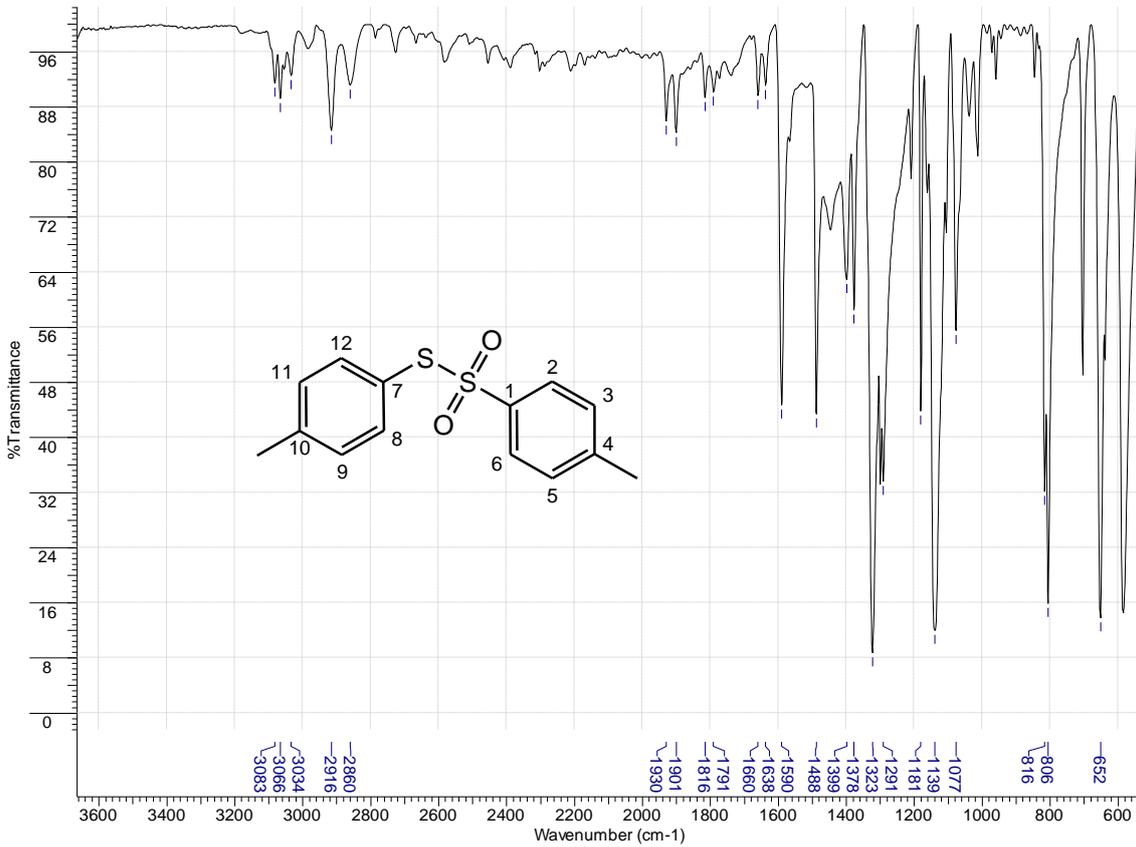
ZHANG, W., SHEN, Q., WU, Y., GAO, X., YAO, F., WANG, J., WEN, Z., QIAO, F., SUN, J., QI, H.; **Diphenyl selenide, diphenyl selenoxide, or diphenyl selenone compound, and its application**. Shenyang Pharmaceutical University, Peop. Rep. China, patente 2013.

7. APÊNDICE A

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl ₃ - ING-GRR1M2-DPL - Ingrid cx		
Date	05 Apr 2016 12:11:22				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-GRR1M2_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000

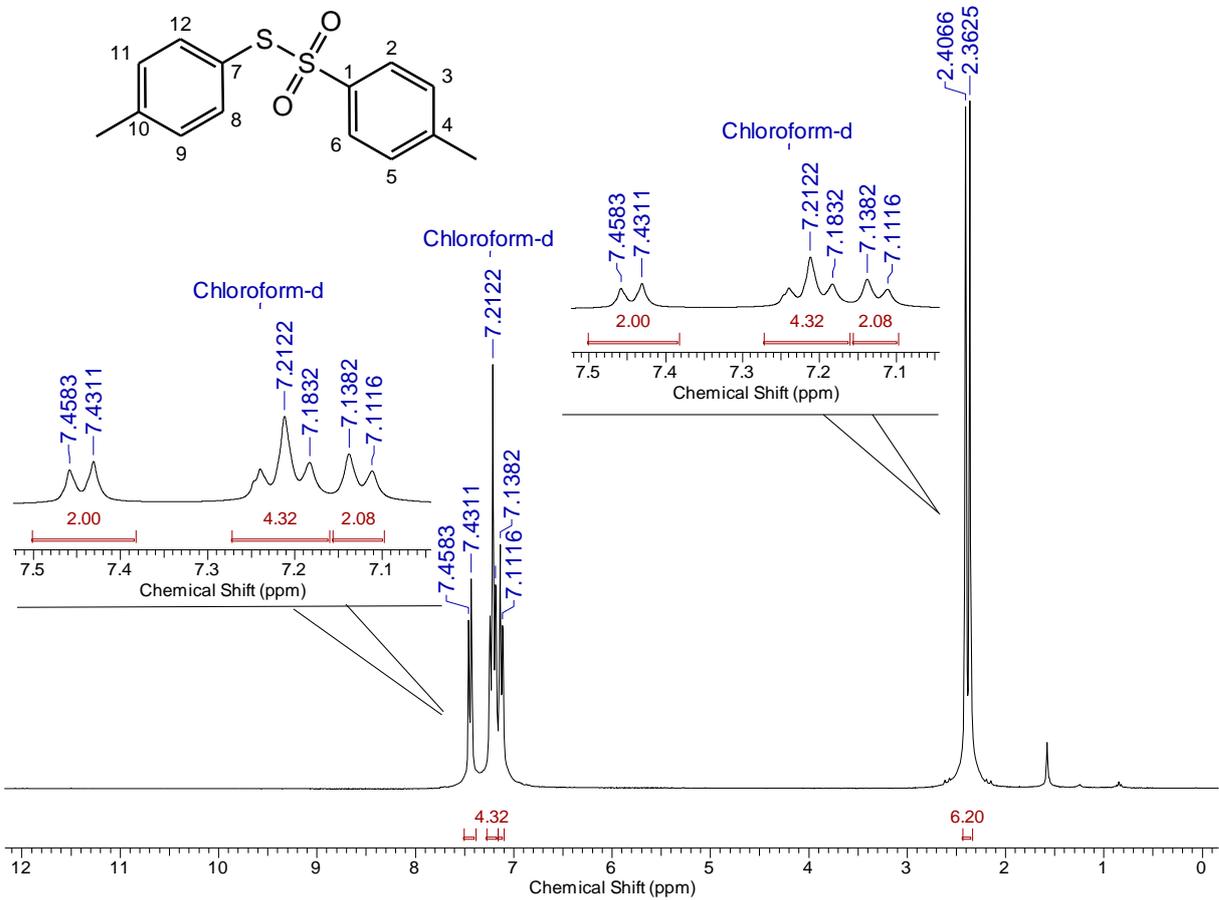
Espectro 11: Espectro de RMN de ¹H de **21** em CDCl₃.

Title	brasileiro de verão (GMT-2:00)	Comment	Amostra 027 por Iscm data quarta-feira, novembro 30 2016
Origin	brasileiro de verão (GMT-2:00)		
File Name	D:\DOCUMENTS\DOCUMENTS\MESTRADO\PROJETO EDSON\INFRVERMELHO\INGRID\ING-TIOL-1-1_1.SP		
Date Stamp	wed nov 30 14:49:02 2016 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Date	wed nov 30 14:49:10 2016 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000
Points Count	3601	Data Spacing	1.0000



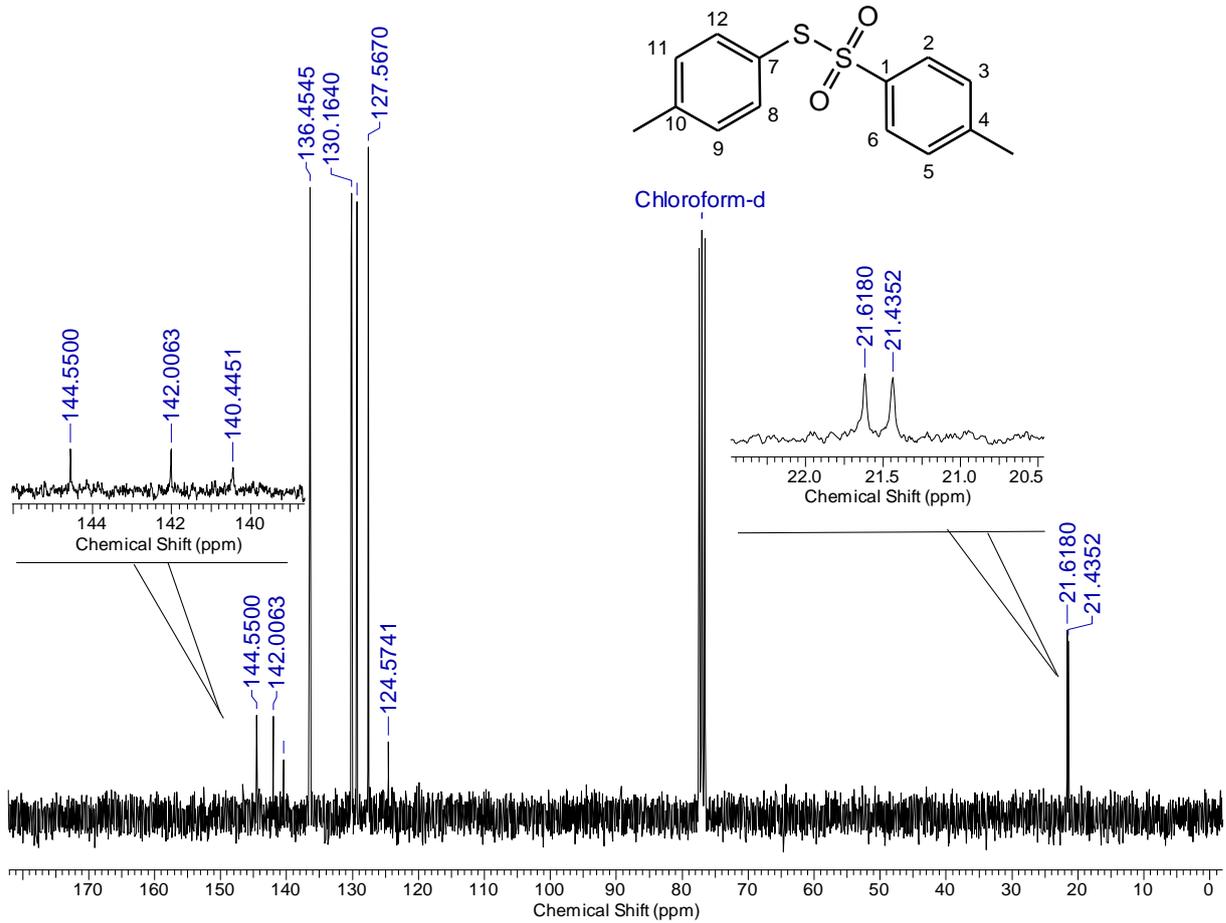
Espectro 12: Espectro de IV (KBr) de 32.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl3 - ING-TiOL1-1N -DPL - Ingrid cx	
Date	27 Aug 2016 10:35:22			
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TiOL1-1N_001001r			
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)
				27.000



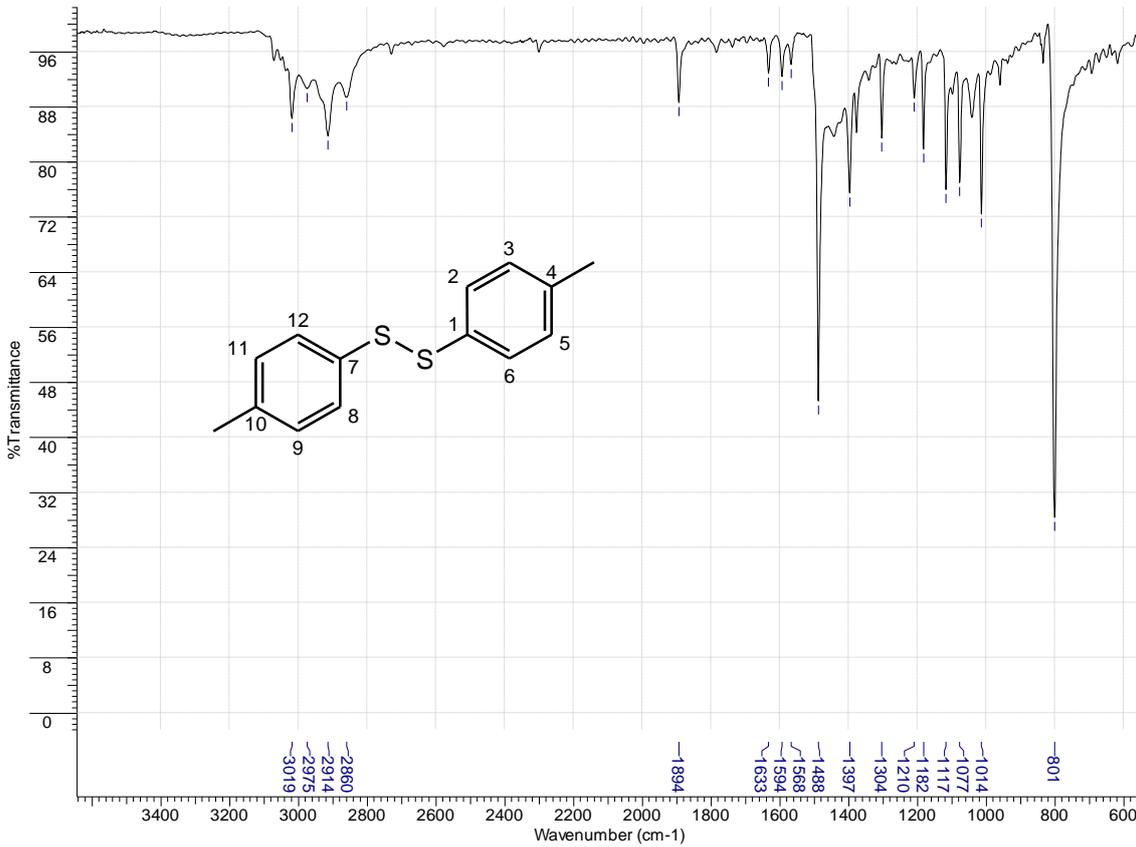
Espectro 13: Espectro de RMN de ¹H de **32** em CDCl₃

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C - CDCl3 - ING-TiOL1-1N -DPL - Ingrid cx		
Date	27 Aug 2016 10:41:42				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TiOL1-1N_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	302
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



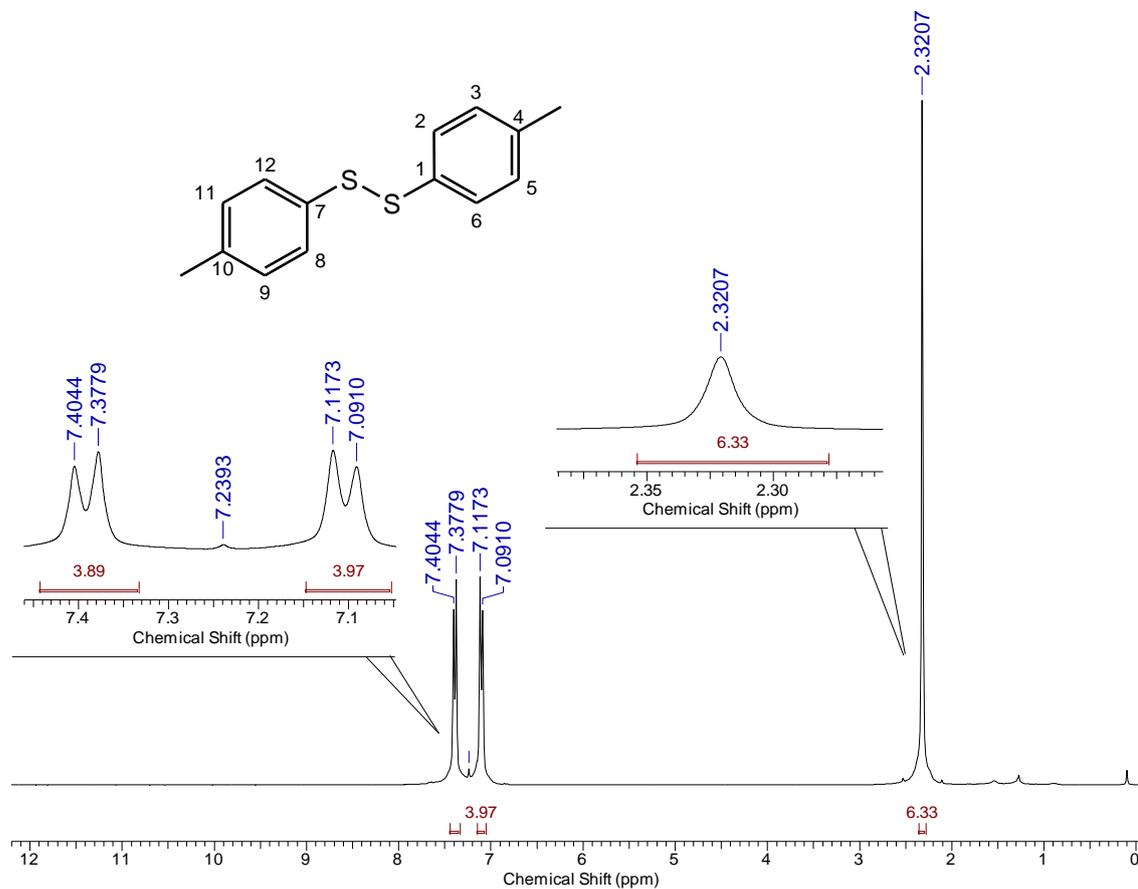
Espectro 14: Espectro de RMN de ¹³C de **32** em CDCl₃.

Title	brasileiro de verão (GMT-2:00)	Comment	Amostra 026 por Iscm data quarta-feira, novembro 30 2016
Origin	brasileiro de verão (GMT-2:00)		
File Name	D:\DOCUMENTS\DOCUMENTS\MESTRADO\PROJETO EDSON\INFRVERMELHO\INGRID\ING-TIOL-1-2_1.SP		
Date Stamp	wed nov 30 14:41:15 2016 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Date	wed nov 30 14:41:27 2016 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000
Points Count	3601	Data Spacing	1.0000



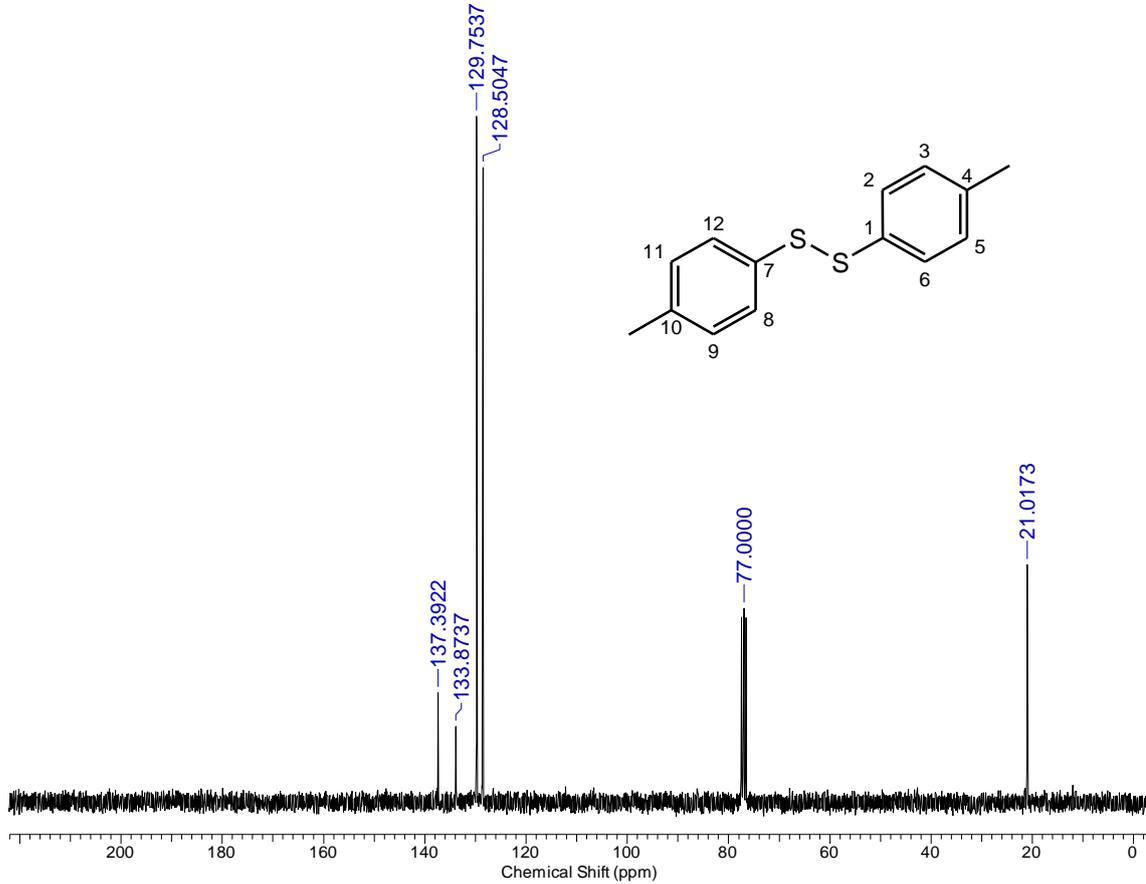
Espectro 15: Espectro de IV (KBr) de **27**.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl ₃ - ING-TIOL1-2N -DPL - Ingrid cx		
Date	27 Aug 2016 12:00:40				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN1N-ING-TIOL1-2N_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



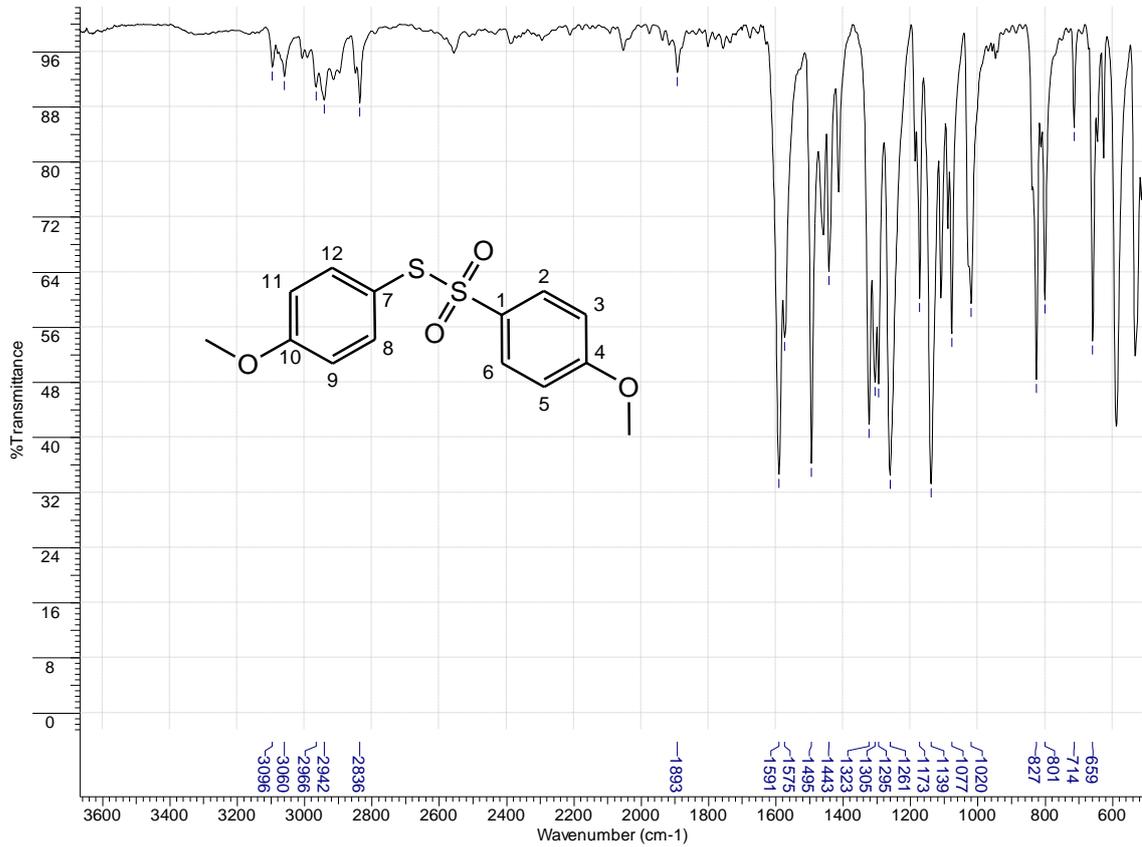
Espectro 16: Espectro de RMN de ¹H de **27** em CDCl₃

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C - CDCl3 - ING-TIOL1-2N -DPL - Ingrid cx		
Date	27 Aug 2016 12:04:26				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN13C-TIOL1-2N_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	139
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



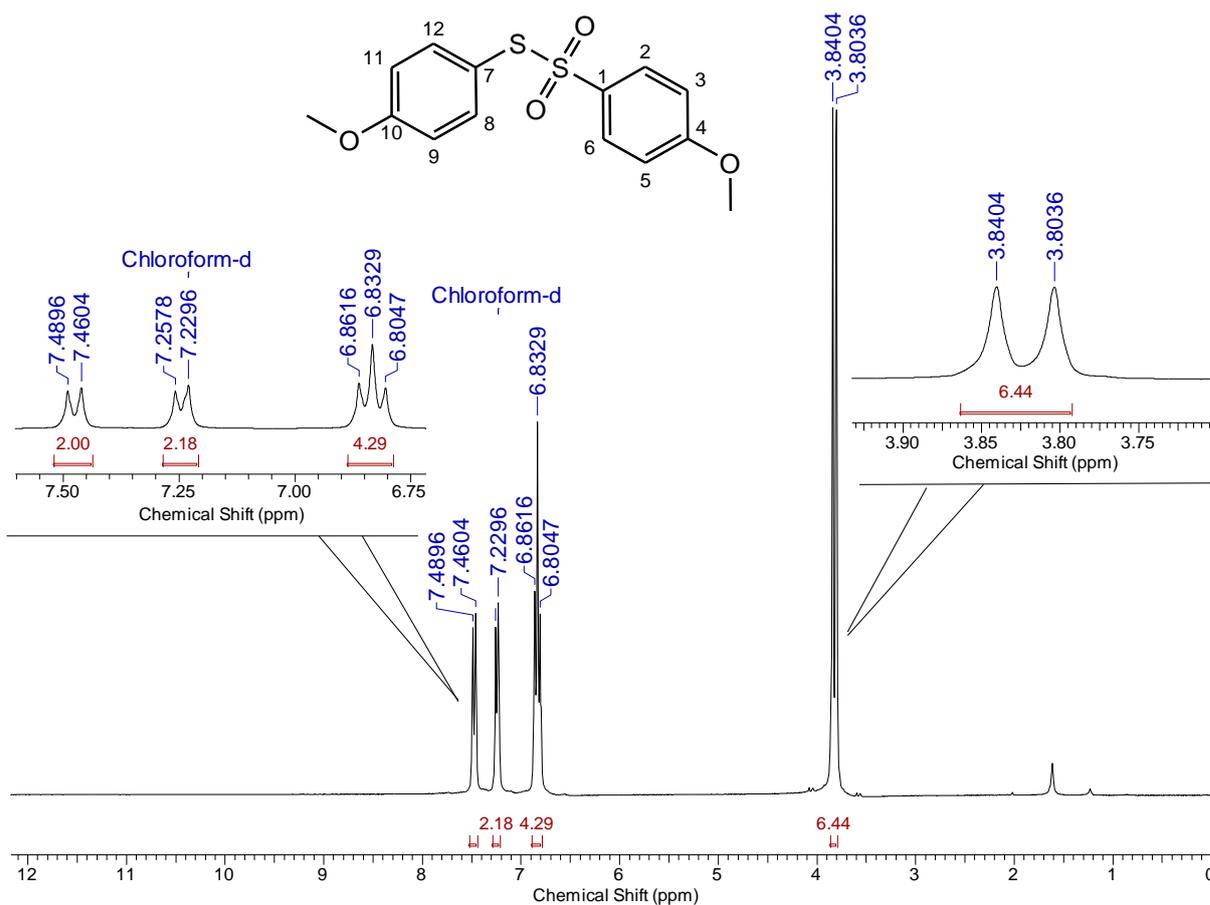
Espectro 17: Espectro de RMN de ^{13}C de **27** em CDCl_3 .

Title	brasileiro de verão (GMT-2:00)	Comment	Amostra 030 por Iscm data quarta-feira, novembro 30 2016
Origin	brasileiro de verão (GMT-2:00)		
File Name	D:\DOCUMENTS\DOCUMENTS\MESTRADO\PROJETO EDSON\INFRAVERMELHO\INGRID\ING-TIOL-2-1_1.SP		
Date Stamp	wed nov 30 15:19:01 2016 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Date	wed nov 30 15:19:06 2016 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000
Points Count	3601	Data Spacing	1.0000



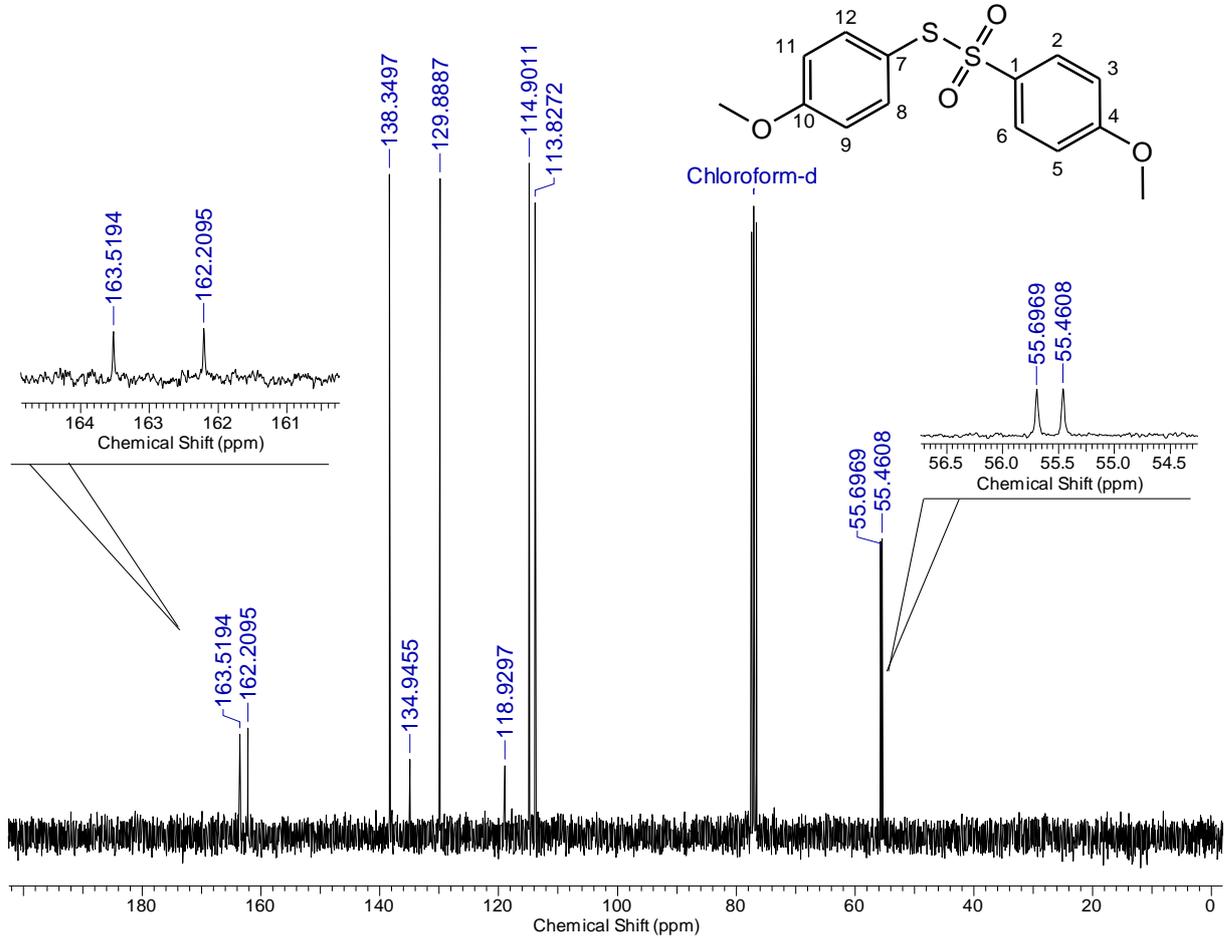
Espectro 18: Espectro de IV (KBr) de 33.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H -CDCl3 - ING-TIOL2-N1- DPL - Ingrid cx		
Date	16 Aug 2016 08:46:08				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TIOL2-1N_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



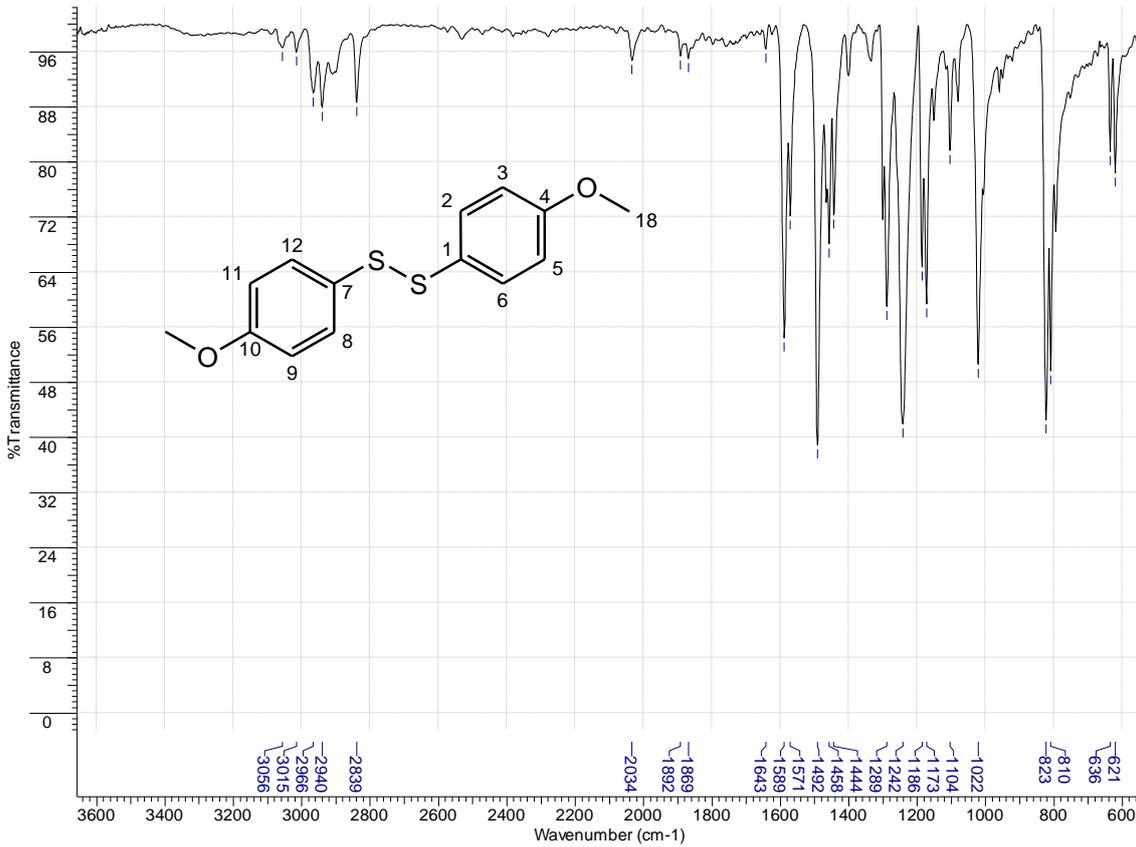
Espectro 19: Espectro de RMN de ¹H de 33 em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C -CDCl3 - ING-TIOL2-N1- DPL - Ingrid cx		
Date	16 Aug 2016 08:56:06				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TIOL2-1N_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	411
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



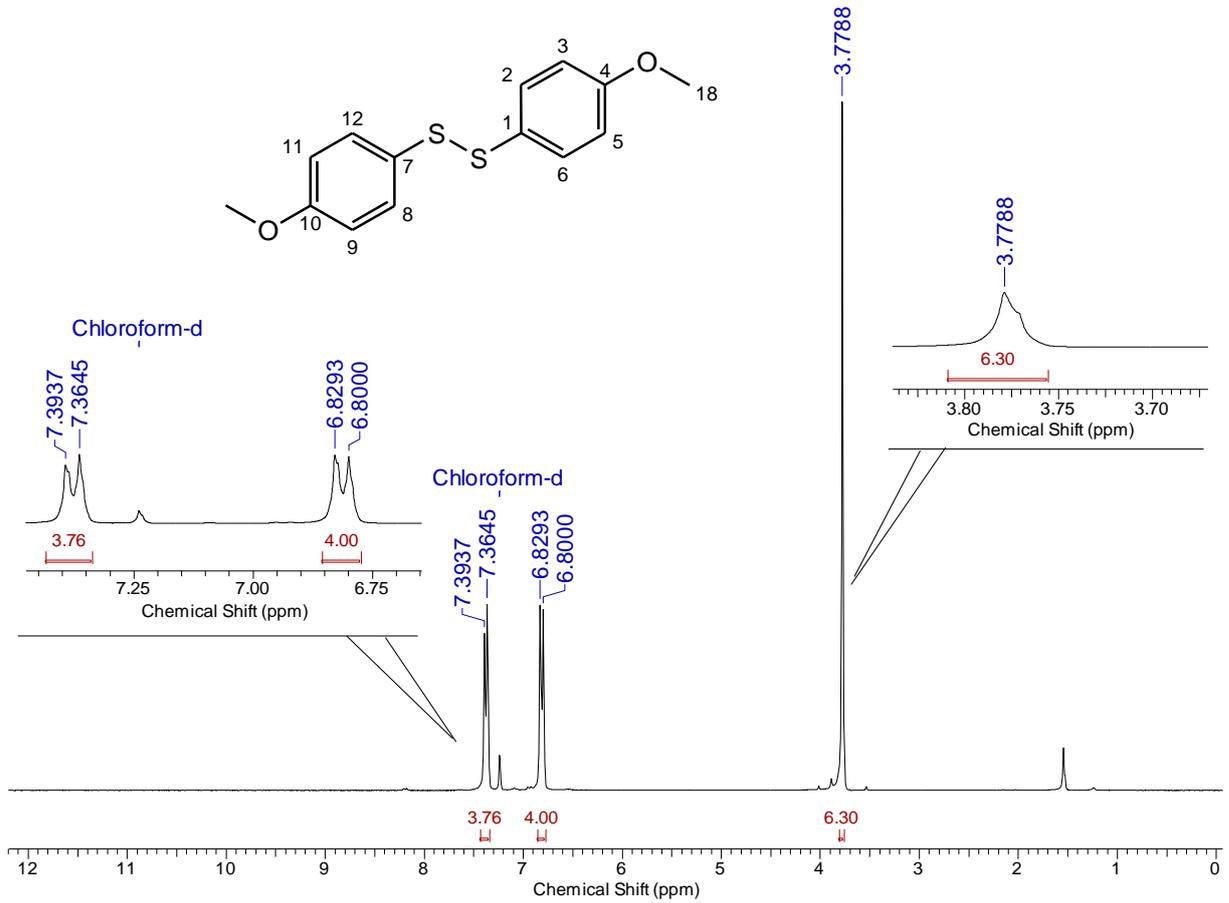
Espectro 20: Espectro de RMN de ¹³C de **33** em CDCl₃.

Title	brasileiro de verão (GMT-2:00)	Comment	Amostra 028 por Iscm data quarta-feira, novembro 30 2016
Origin	brasileiro de verão (GMT-2:00)		
File Name	D:\DOCUMENTS\DOCUMENTS\MESTRADO\PROJETO EDSON\INFRVERMELHO\INGRID\ING-TIOL-2-2_1.SP		
Date Stamp	wed nov 30 15:00:23 2016 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Date	wed nov 30 15:00:32 2016 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000
Points Count	3601	Data Spacing	1.0000



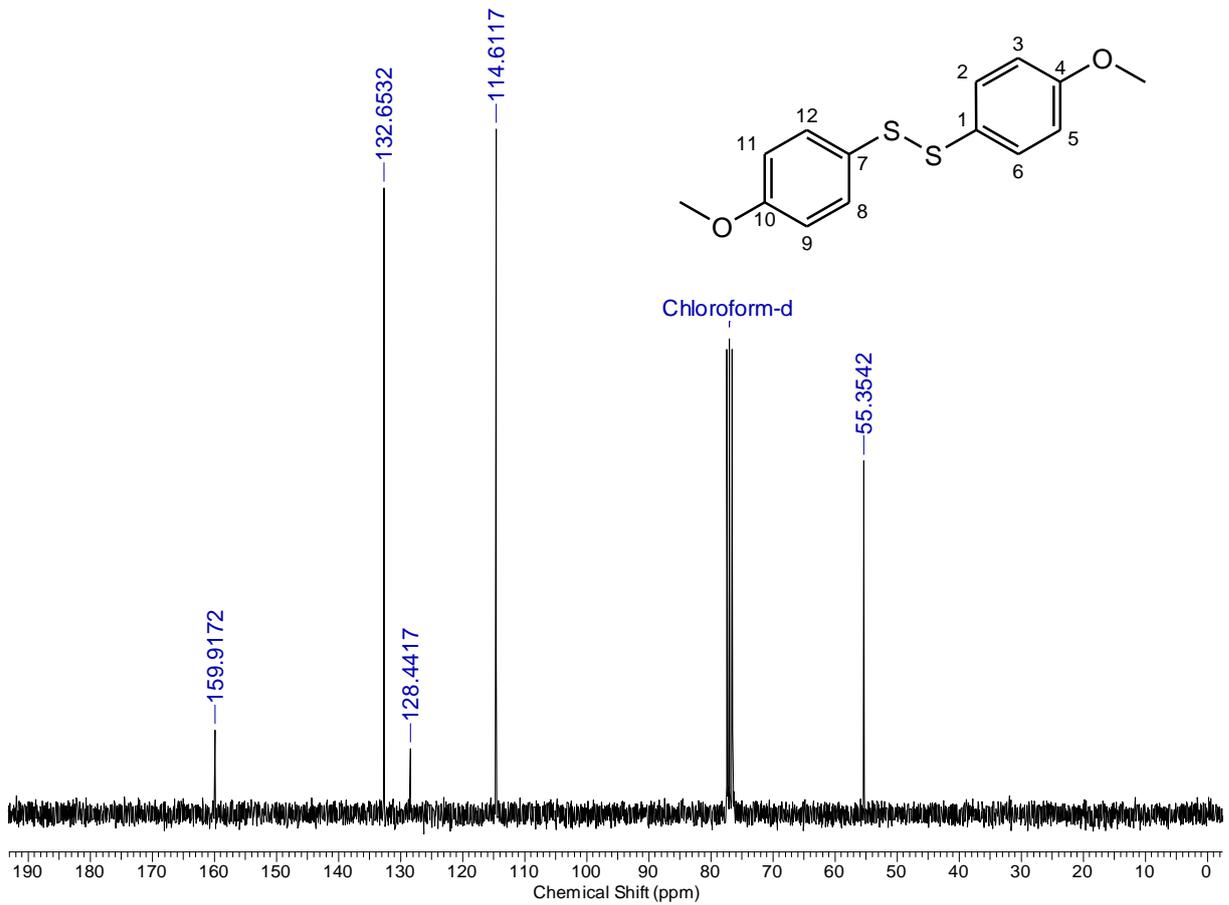
Espectro 21: Espectro de IV (KBr) de 28.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H -CDCl3 - ING-TIOL2-2N- DPL - Ingrid cx		
Date	16 Aug 2016 09:11:28				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TIOL2-2N_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



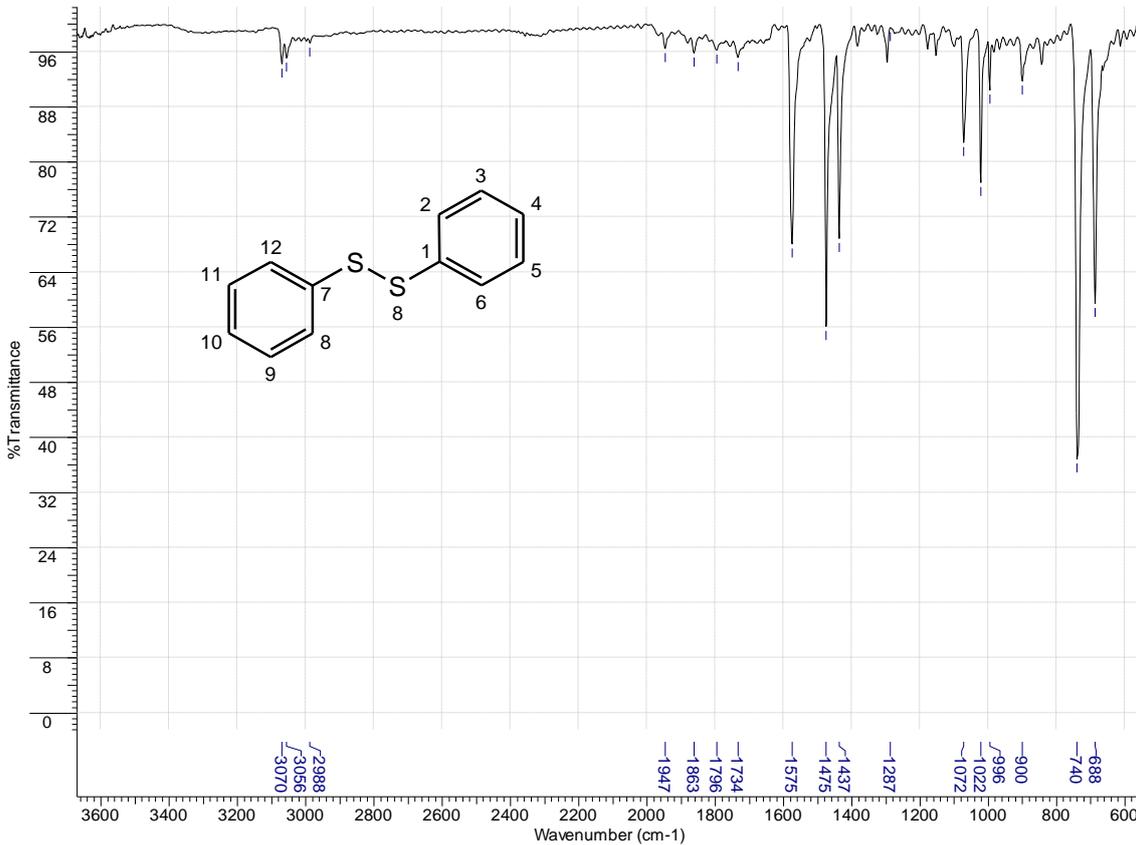
Espectro 22: Espectro de RMN de ¹H de **28** em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C -CDCl3 - ING-TIOL2-2N- DPL - Ingrid cx		
Date	16 Aug 2016 09:25:46				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TIOL2-2N_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	637
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



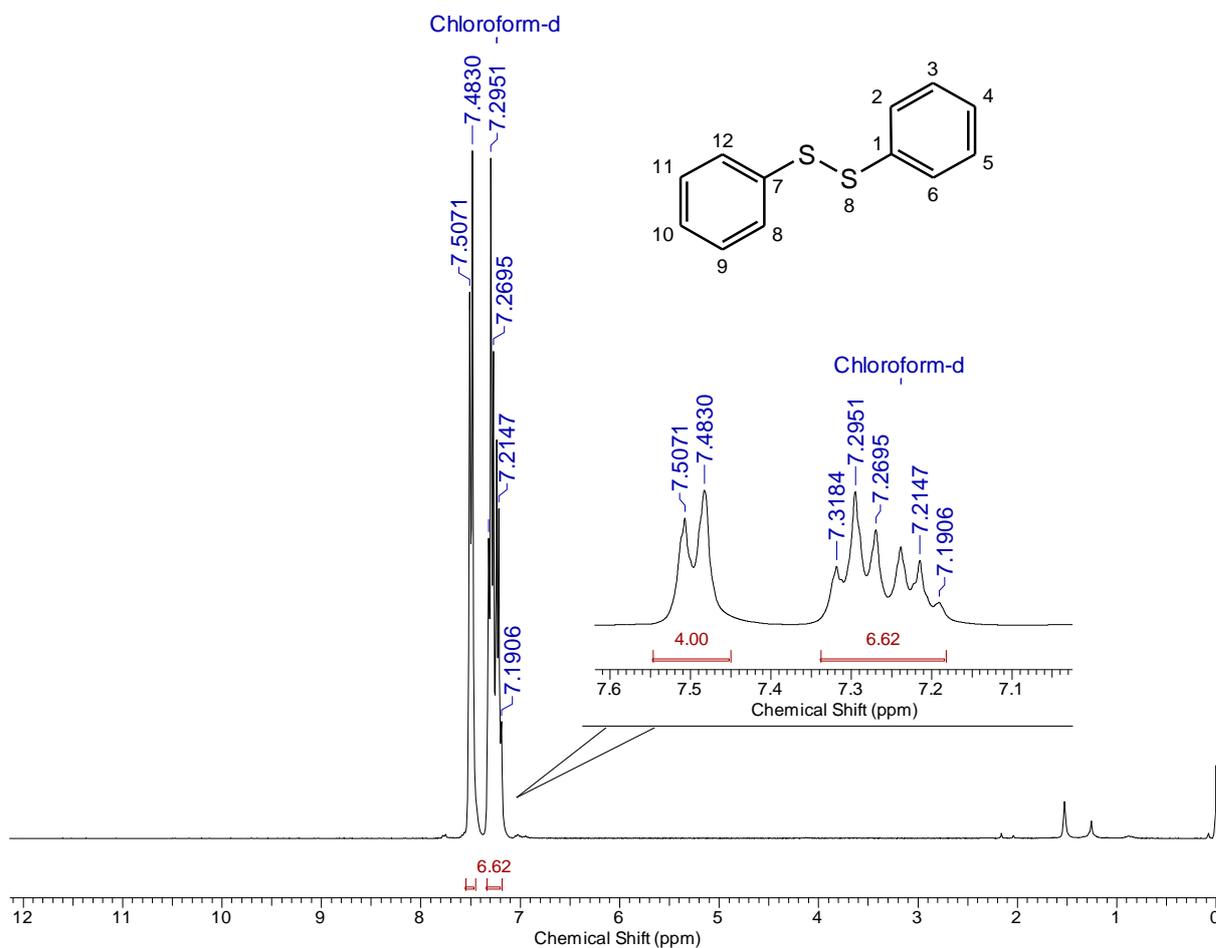
Espectro 23: Espectro de RMN de ¹³C de **28** em CDCl₃.

Title	brasileiro de verão (GMT-2:00)	Comment	Amostra 029 por Iscm data quarta-feira, novembro 30 2016
Origin	brasileiro de verão (GMT-2:00)		
File Name	D:\DOCUMENTS\DOCUMENTS\MESTRADO\PROJETO EDSON\INFRVERMELHO\INGRID\ING-TIOL-3-3_1.SP		
Date Stamp	wed nov 30 15:09:32 2016 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Date	wed nov 30 15:09:37 2016 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000
Points Count	3601	Data Spacing	1.0000



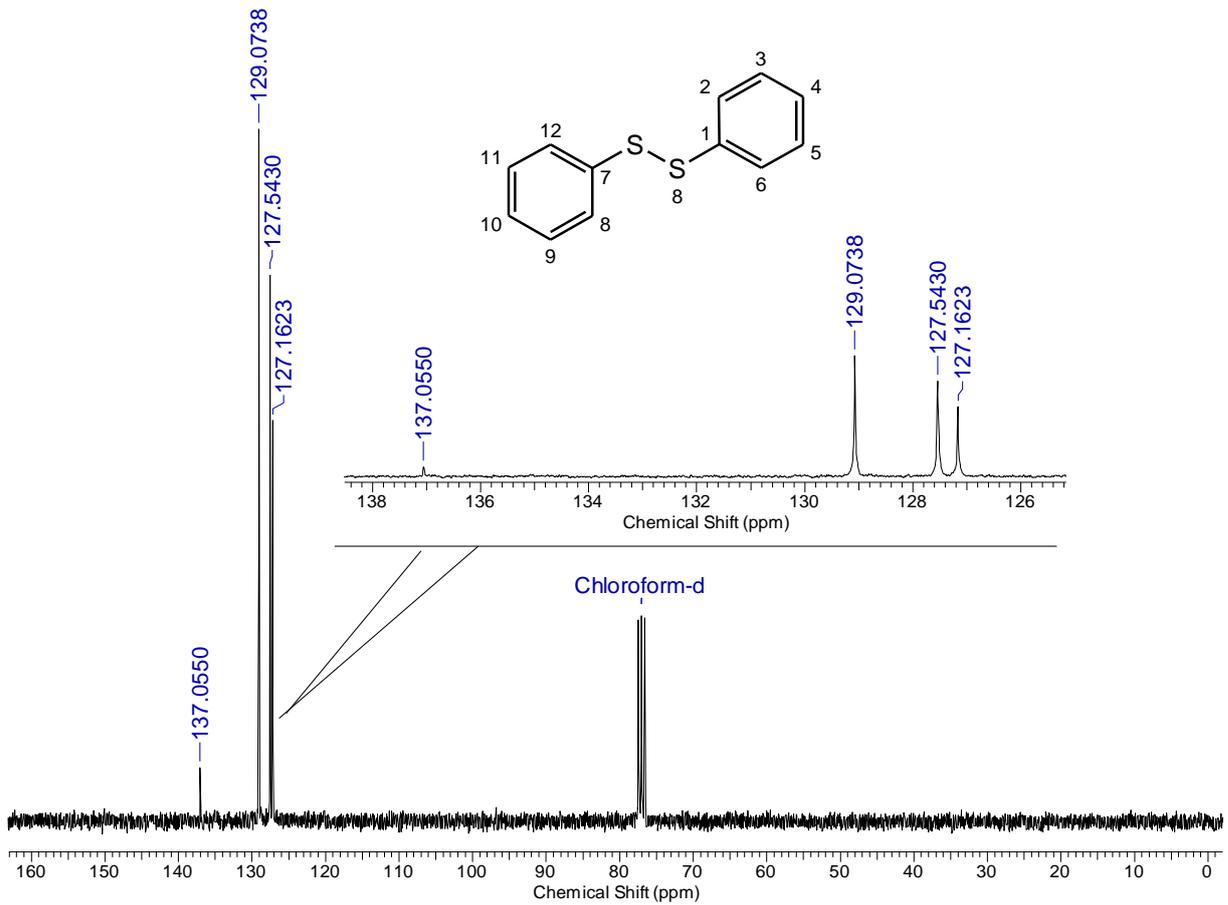
Espectro 24: Espectro de IV (KBr) de **29**.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl ₃ - ING-TIOL3-3-DPL - Ingrid cx		
Date	27 Jul 2016 13:31:26				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TIOL3-3_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



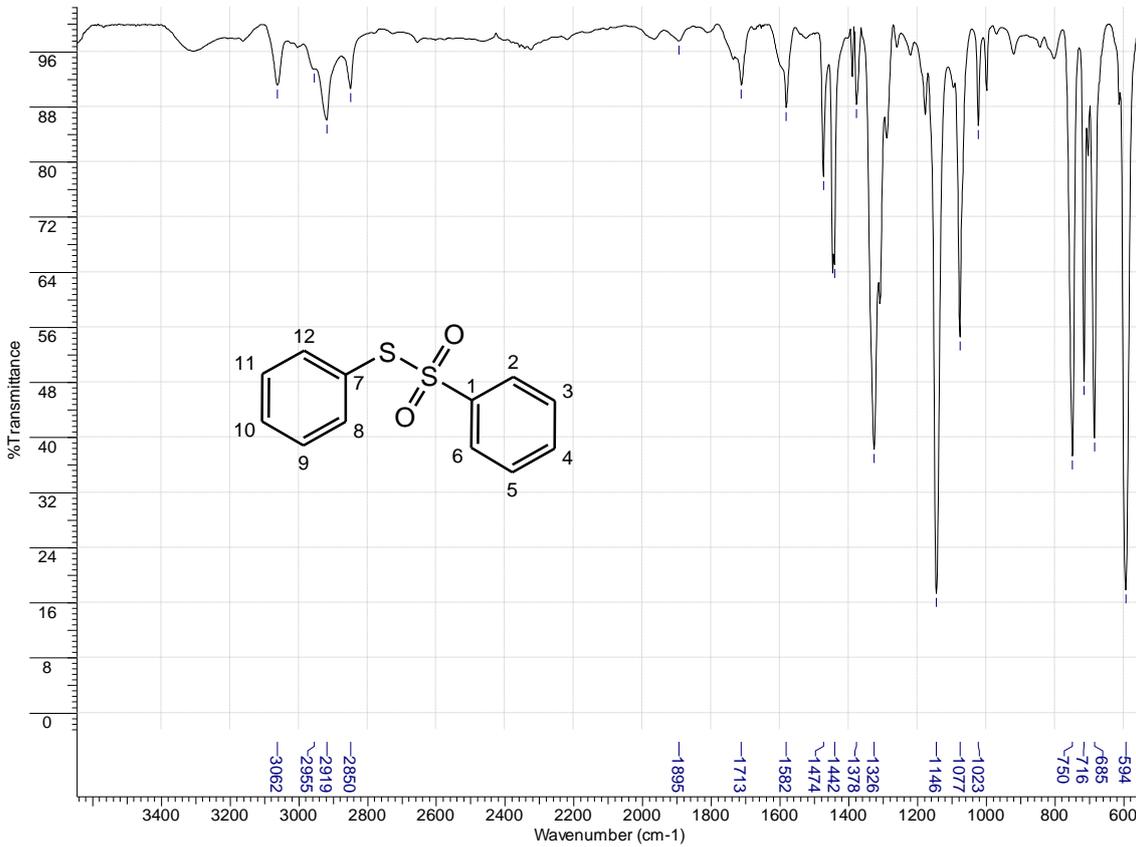
Espectro 25: Espectro de RMN de ¹H de **29** em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C- CDCl3 - ING-TIOL3-3-DPL - Ingrid cx		
Date	30 Jul 2016 13:47:36				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TIOL3-3_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	482
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



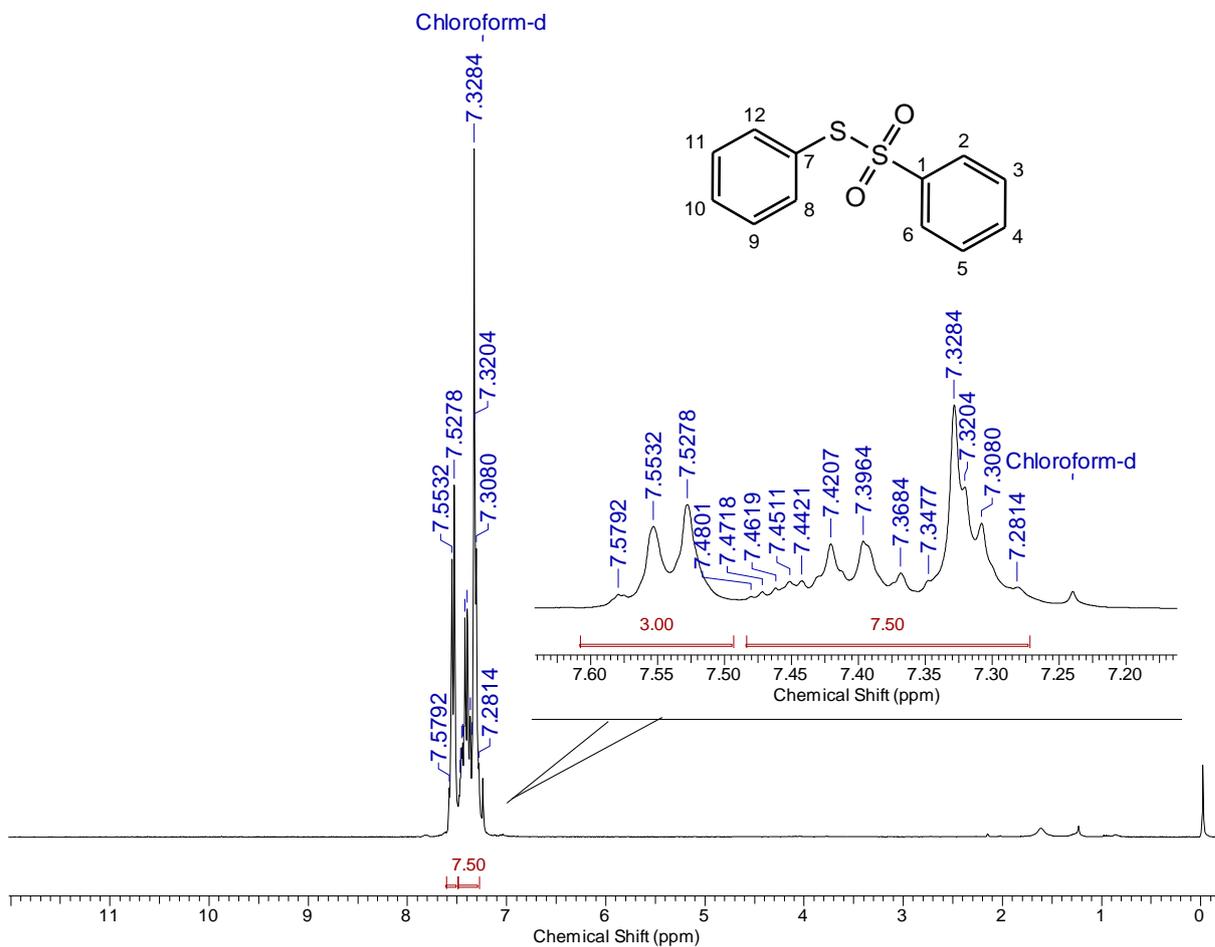
Espectro 26: Espectro de RMN de ^{13}C de **29** em CDCl_3 .

Title	brasileiro de verão (GMT-2:00)	Comment	Amostra 036 por Iscm data quinta-feira, fevereiro 09 2017
Origin	brasileiro de verão (GMT-2:00)		
File Name	D:\DOCUMENTS\DOCUMENTS\MESTRADO\PROJETO EDSON\INFRAVERMELHO\INGRID\TIOL-3M2_1.SP		
Date Stamp	thu feb 09 16:39:49 2017 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Date	thu feb 09 16:40:04 2017 Horário brasileiro de verão (GMT-2:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000
Points Count	3601	Data Spacing	1.0000



Espectro 27: Espectro de IV (KBr) de **34**.

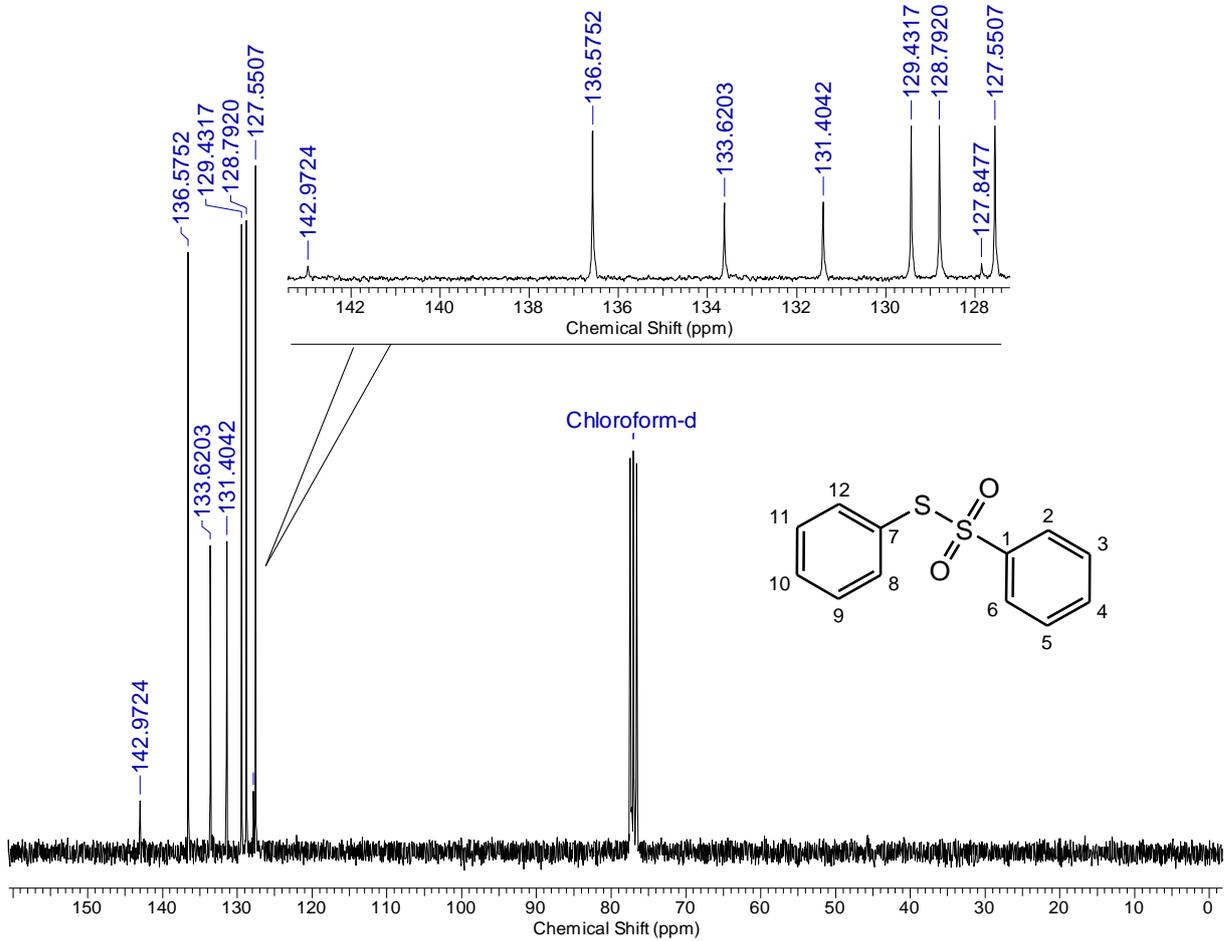
Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl ₃ - ING-TIOL3-1-DPL - Ingrid cx		
Date	27 Jul 2016 13:36:06				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TIOL3-1_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



Espectro 28: Espectro de RMN de ¹H de **34** em CDCl₃.

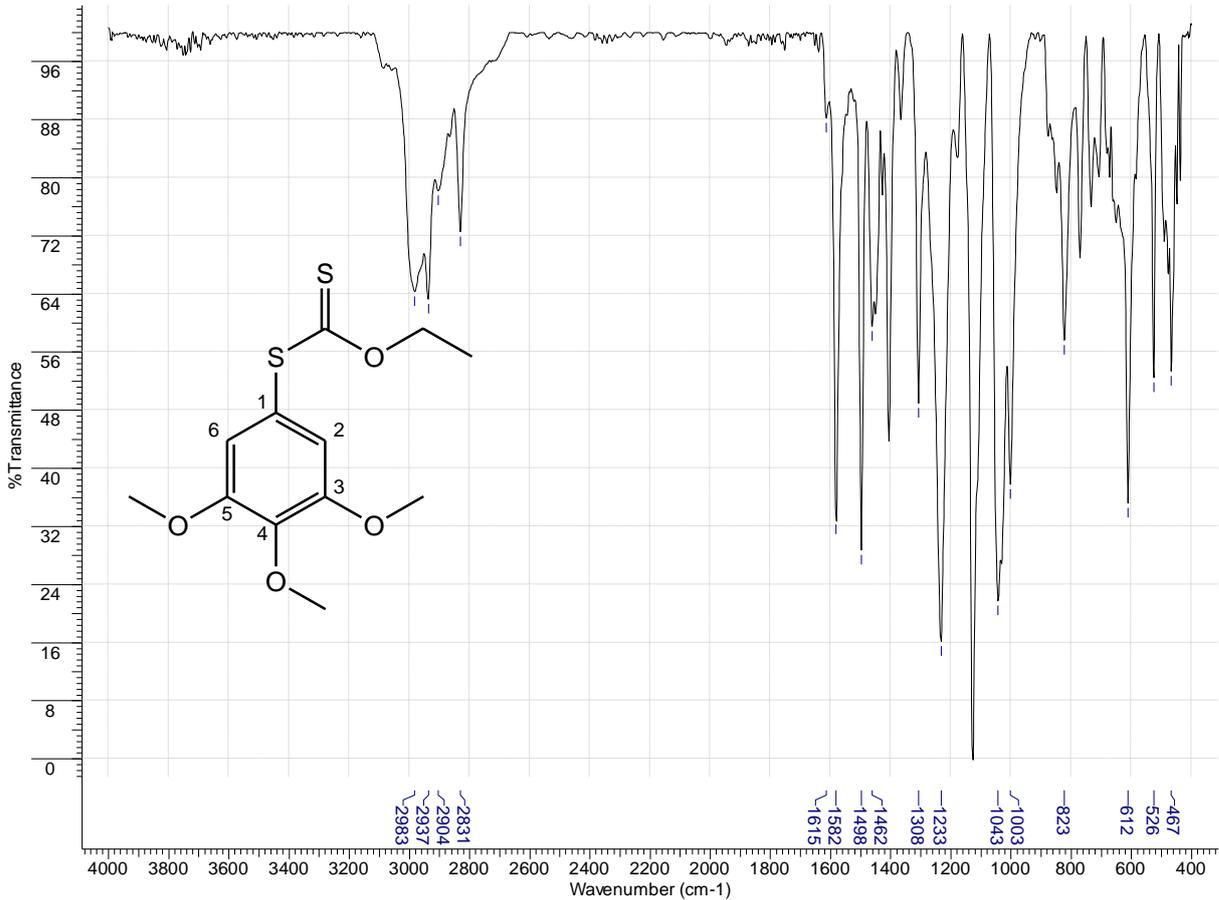
]

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C- CDCl3 - ING-TIOL3-1-DPL - Ingrid cx		
Date	30 Jul 2016 13:30:32				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TIOL3-1_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	977
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



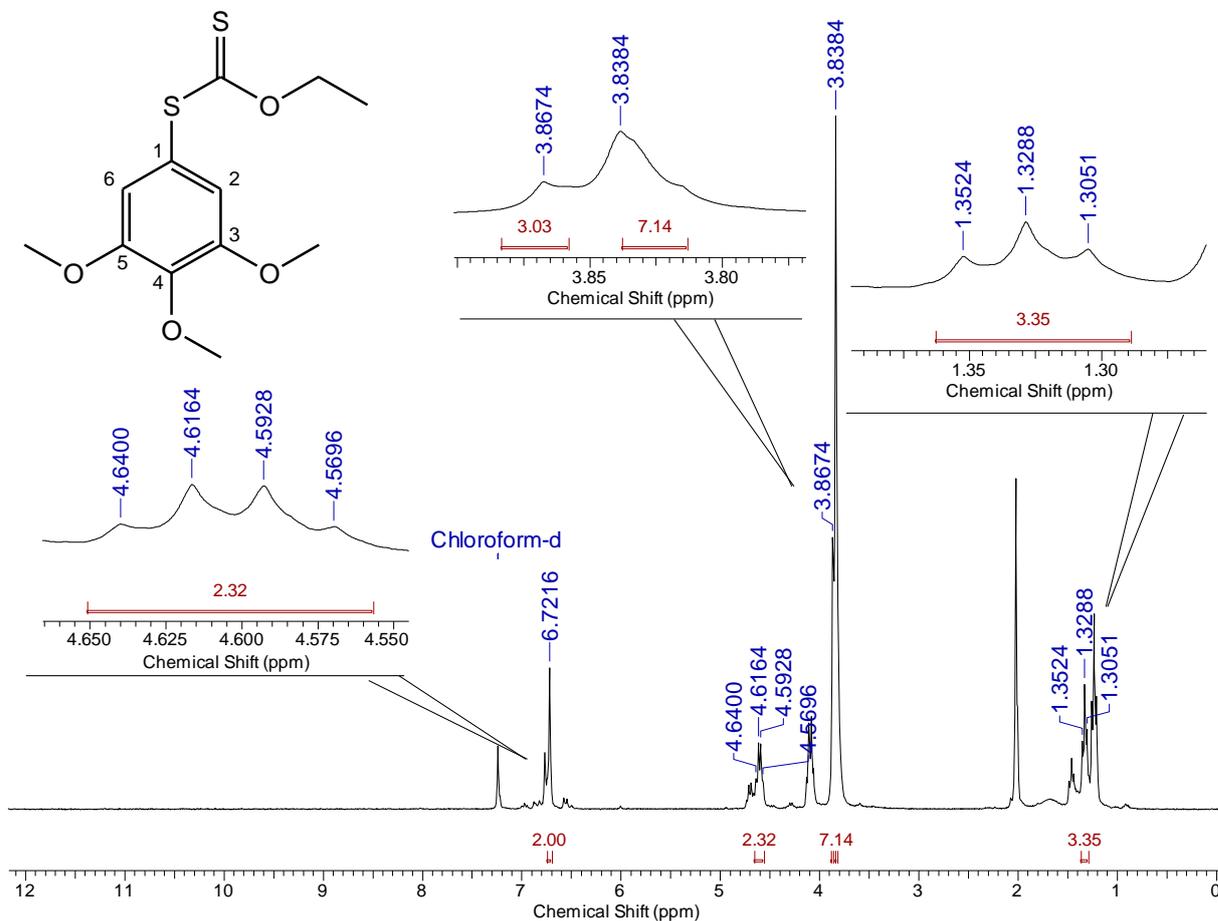
Espectro 29: Espectro de RMN de ^{13}C de **34** em CDCl_3 .

Title	cial do Brasil (GMT-3:00)	Comment	Amostra 010 por Iscm data quarta-feira, maio 10 2017
Origin	cial do Brasil (GMT-3:00)		
File Name	C:\USERS\USUARIO\DESKTOP\INFRA SPECTROS\10-05-2017\ING-TIOL 4P_1.SP		
Date Stamp	wed may 10 15:02:40 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Date	wed may 10 15:03:01 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000
Points Count	3601	Data Spacing	1.0000



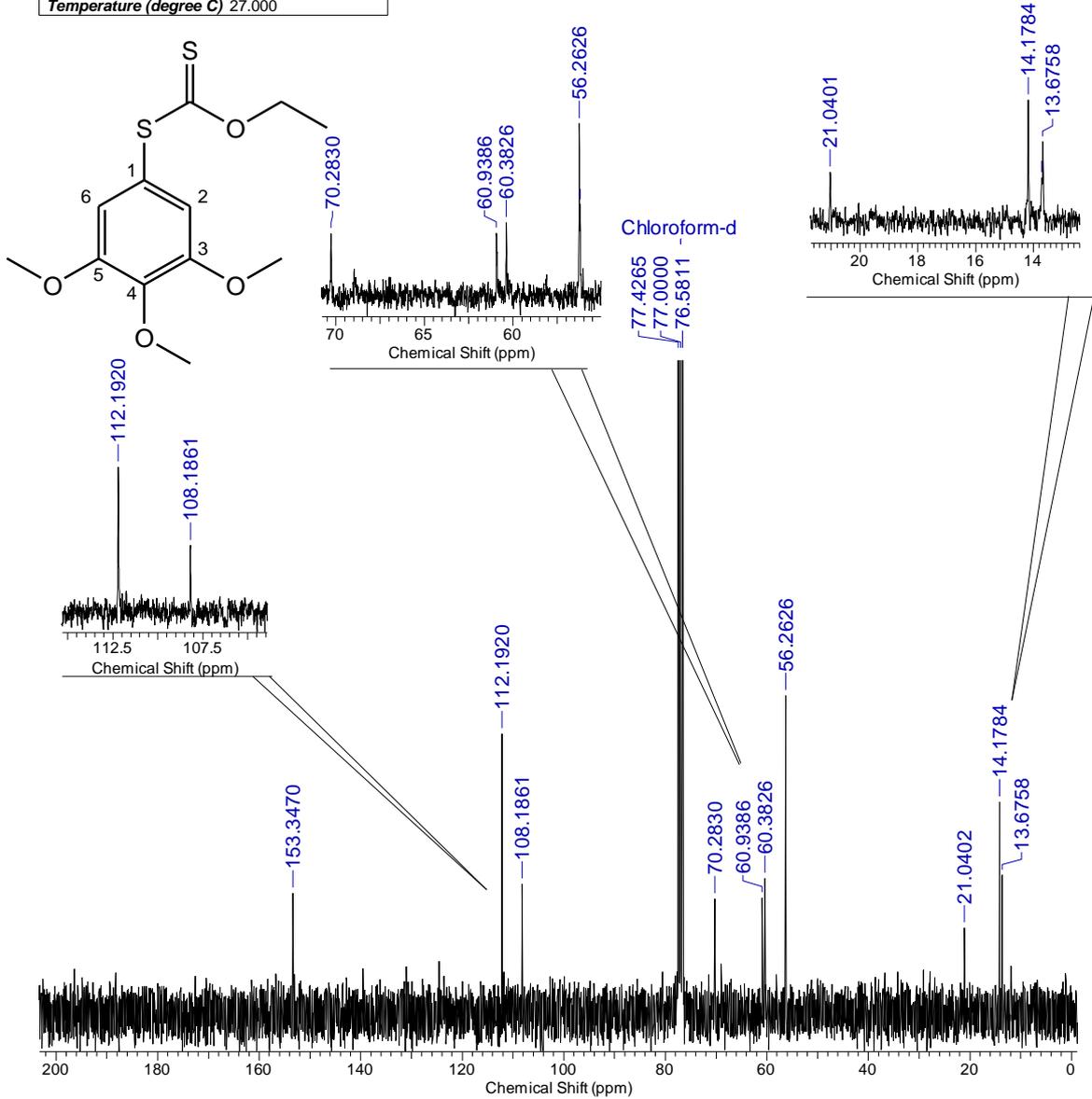
Espectro 30: Espectro de IV (KBr) de 39.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl3 - ING-TIOL4-P - EDSON - Ingrid		
Date	31 Jan 2017 10:12:32				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TIOL4-P_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



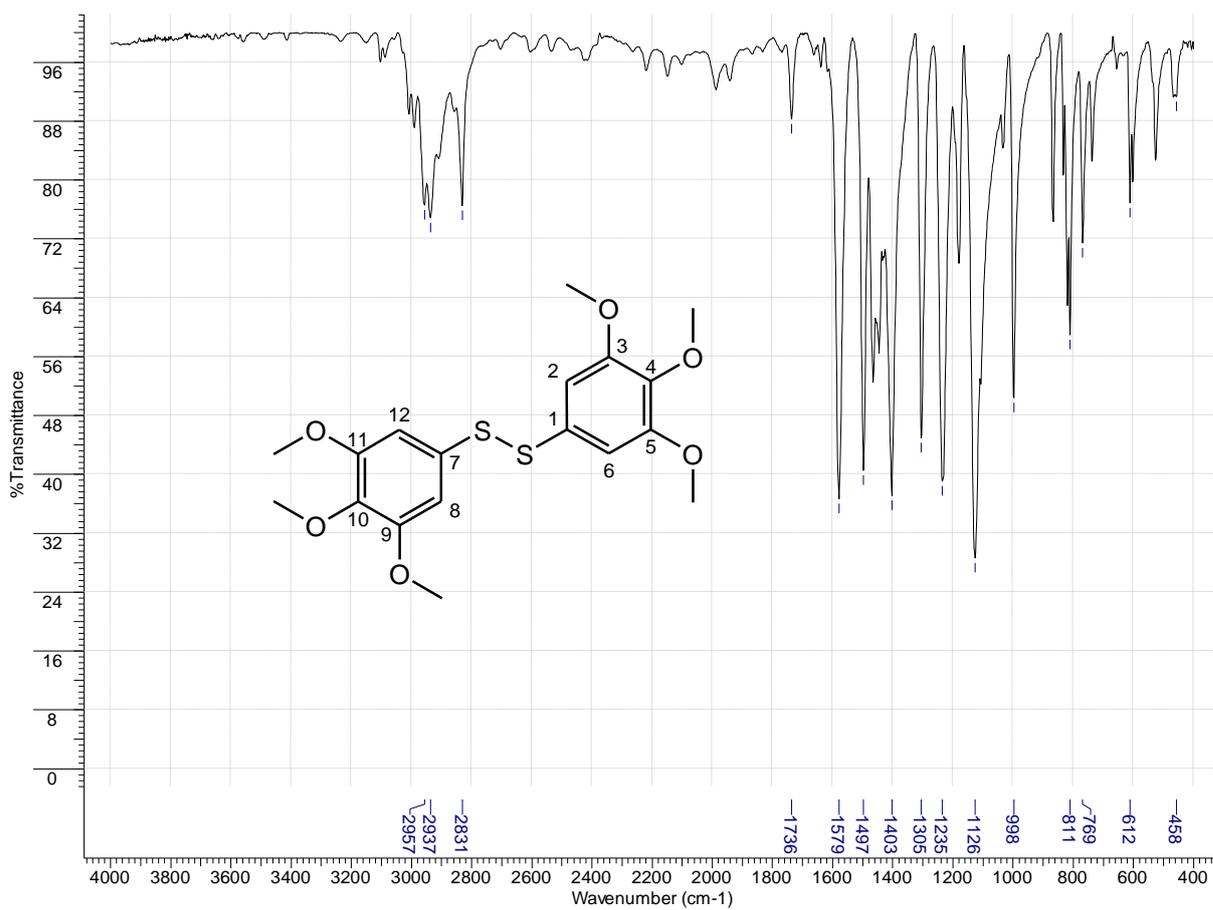
Espectro 31: Espectro de RMN de ^1H de **39** em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C -CDCl3 - ING-TIOL4-P - EDSON - Ingrid
Date	31 Jan 2017 11:37:52		
File Name	C:\Documents and Settings\REJANE\Desktop\INGRID\EDITADOS\ING-TIOL4-P_003001r		
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C
Number of Transients	1309	Original Points Count	16384
Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		



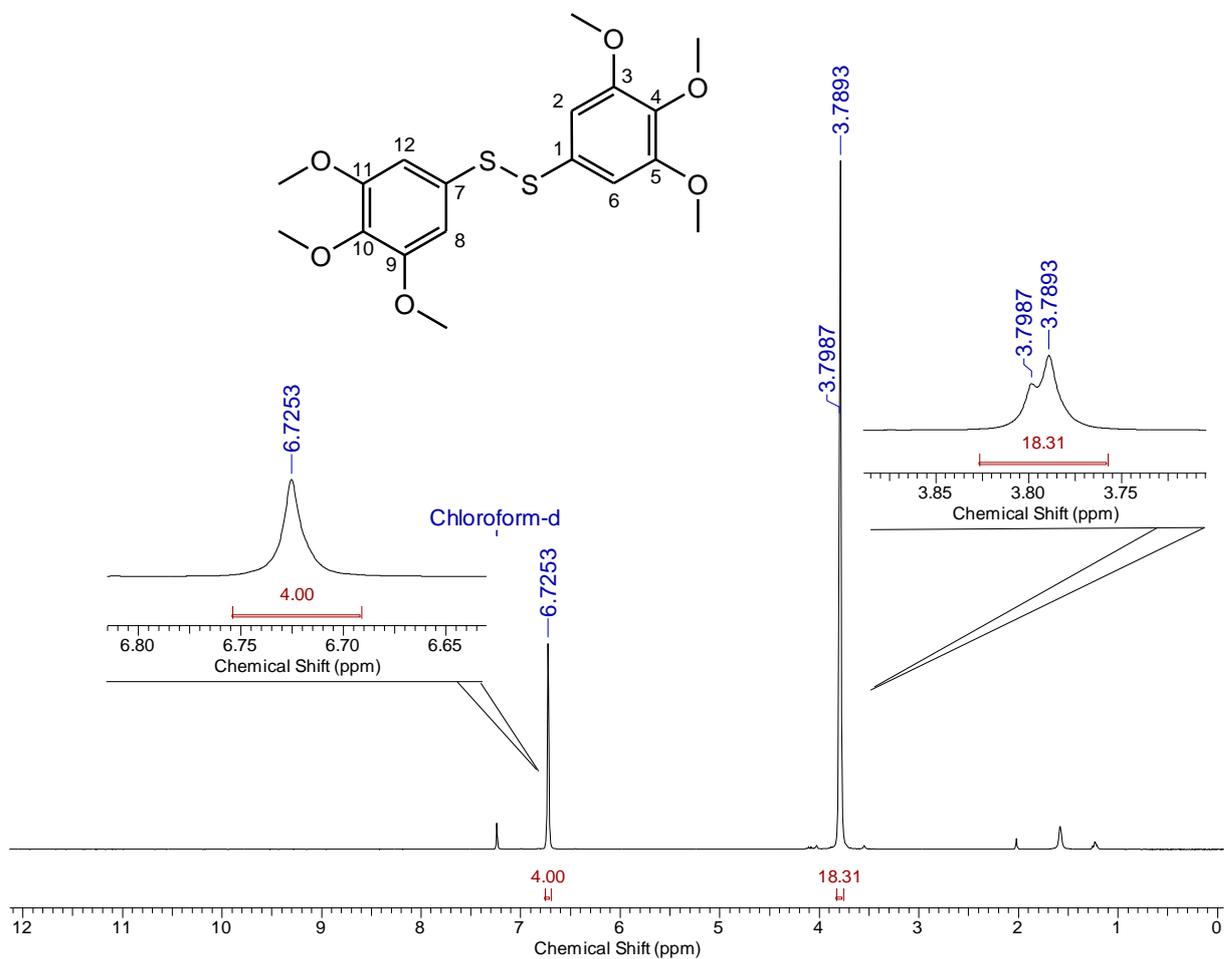
Espectro 32: Espectro de RMN de ^{13}C de **39** em CDCl₃.

Title	cial do Brasil (GMT-3:00)	Comment	Amostra 006 por Iscm data quarta-feira, julho 12 2017
Origin	cial do Brasil (GMT-3:00)		
File Name	D:\DOCUMENTS\DOCUMENTS\MESTRADO\PROJETO EDSON\INFRVERMELHO\TIOL_4_M3C_1.SP		
Date Stamp	wed jul 12 16:52:46 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Date	wed jul 12 16:53:10 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000
Points Count	3601	Data Spacing	1.0000



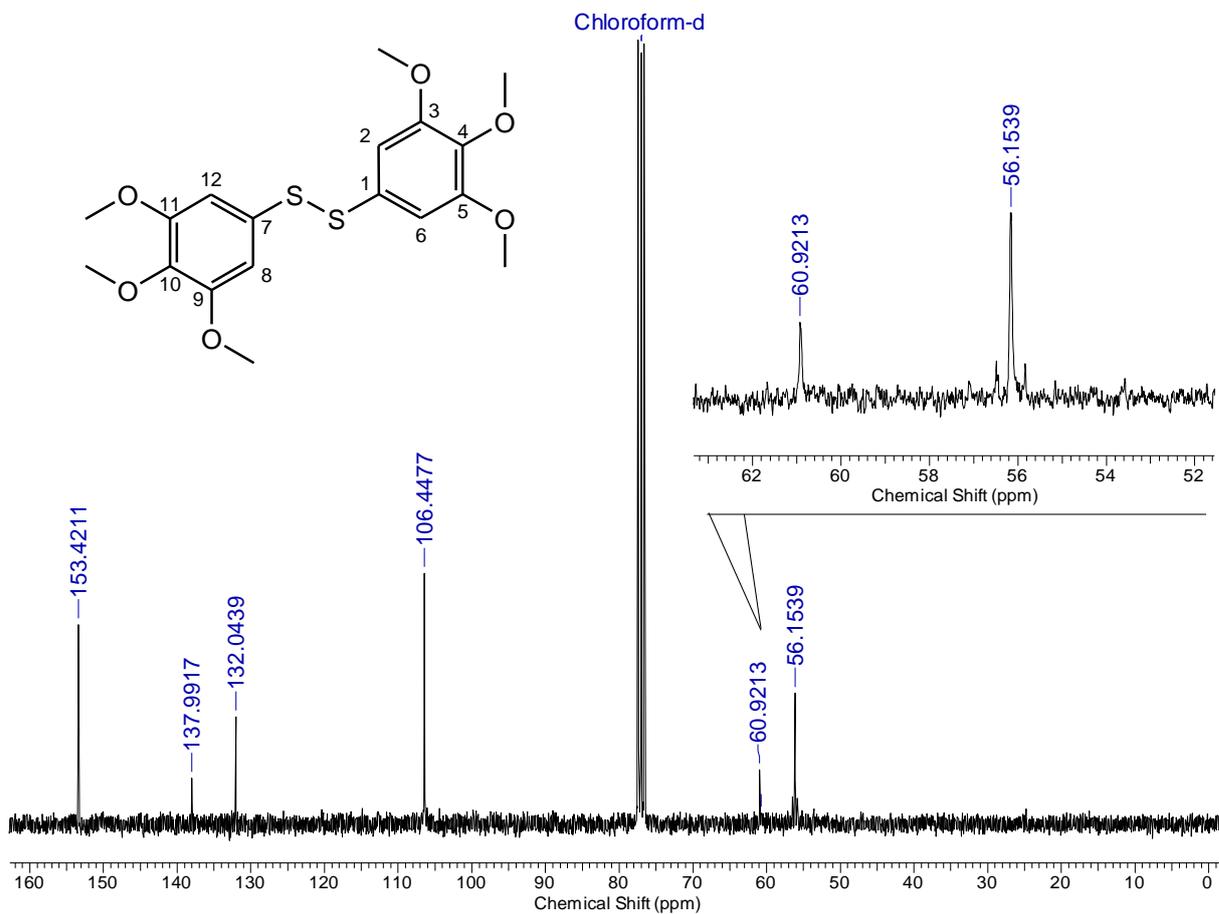
Espectro 33: Espectro de IV (KBr) de **30**.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H- CDCl3- TIOL4-M3C- EDSON- INGRID		
Date	11 Jul 2017 10:35:16				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\TIOL4-M3C_011001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



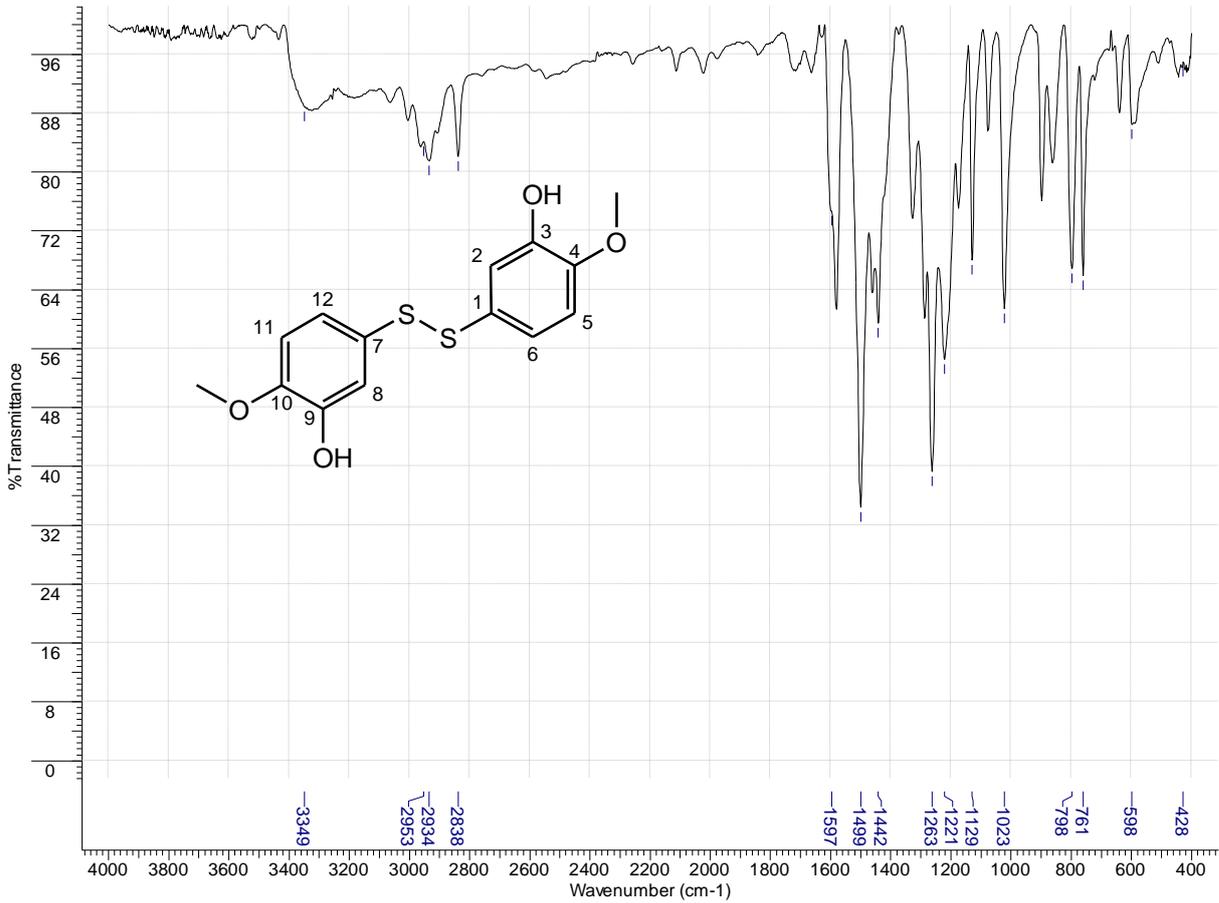
Espectro 34: Espectro de RMN de ^1H de **30** em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C- CDCl3- TIOL4-M3C- EDSON- INGRID		
Date	11 Jul 2017 11:09:34				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\TIOL4-M3C_033001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	896
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



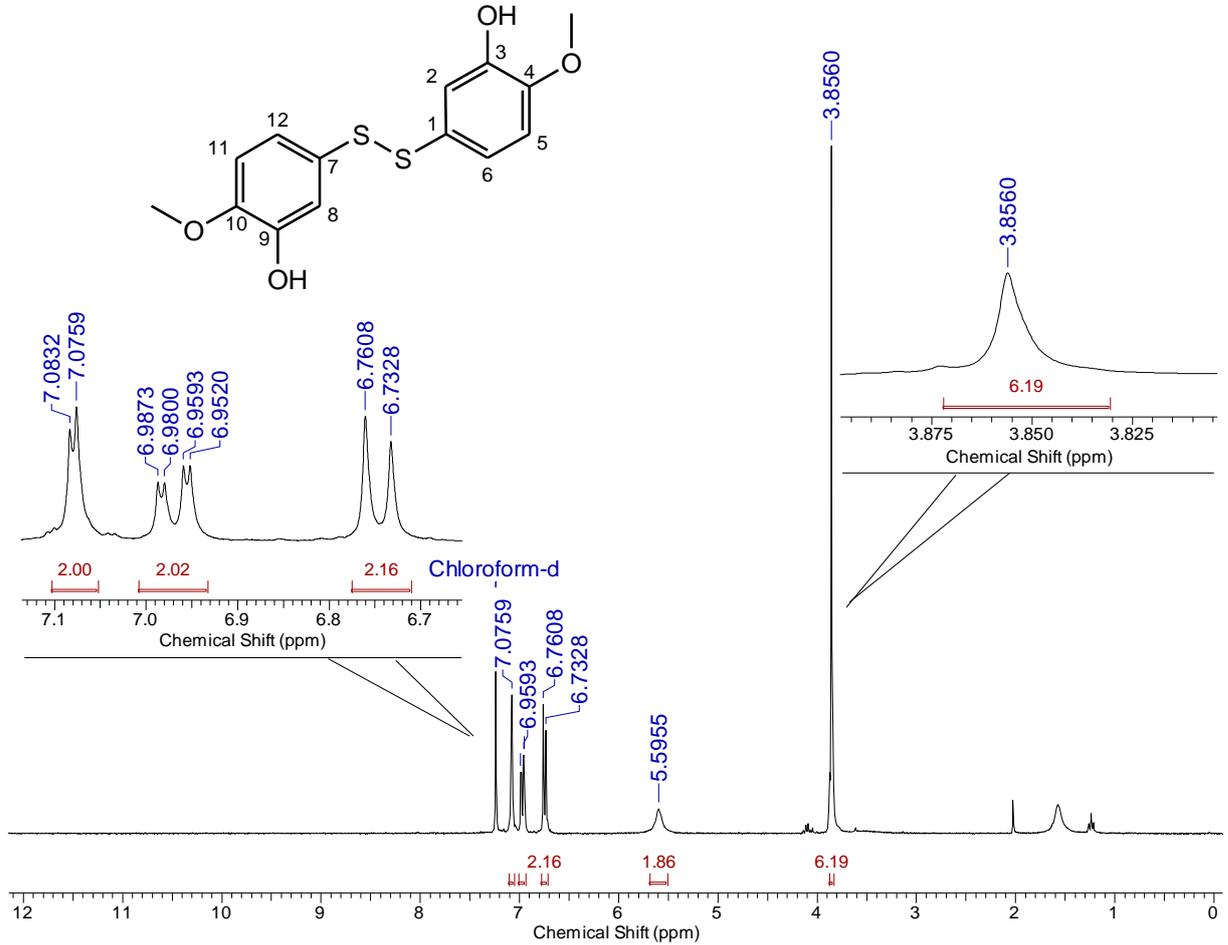
Espectro 35: Espectro de RMN de ¹³C de **30** em CDCl₃.

Title	cial do Brasil (GMT-3:00)	Comment	Amostra 028 por Iscm data quarta-feira, maio 31 2017
Origin	cial do Brasil (GMT-3:00)		
File Name	D:\DOCUMENTS\DOCUMENTS\MESTRADO\PROJETO EDSON\INFRAVERMELHO\TIOL 5 E TIOL 4\ING_TIOL5C5_1.SP		
Date Stamp	wed may 31 15:46:58 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Date	wed may 31 15:47:12 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000
Points Count	3601	Data Spacing	1.0000



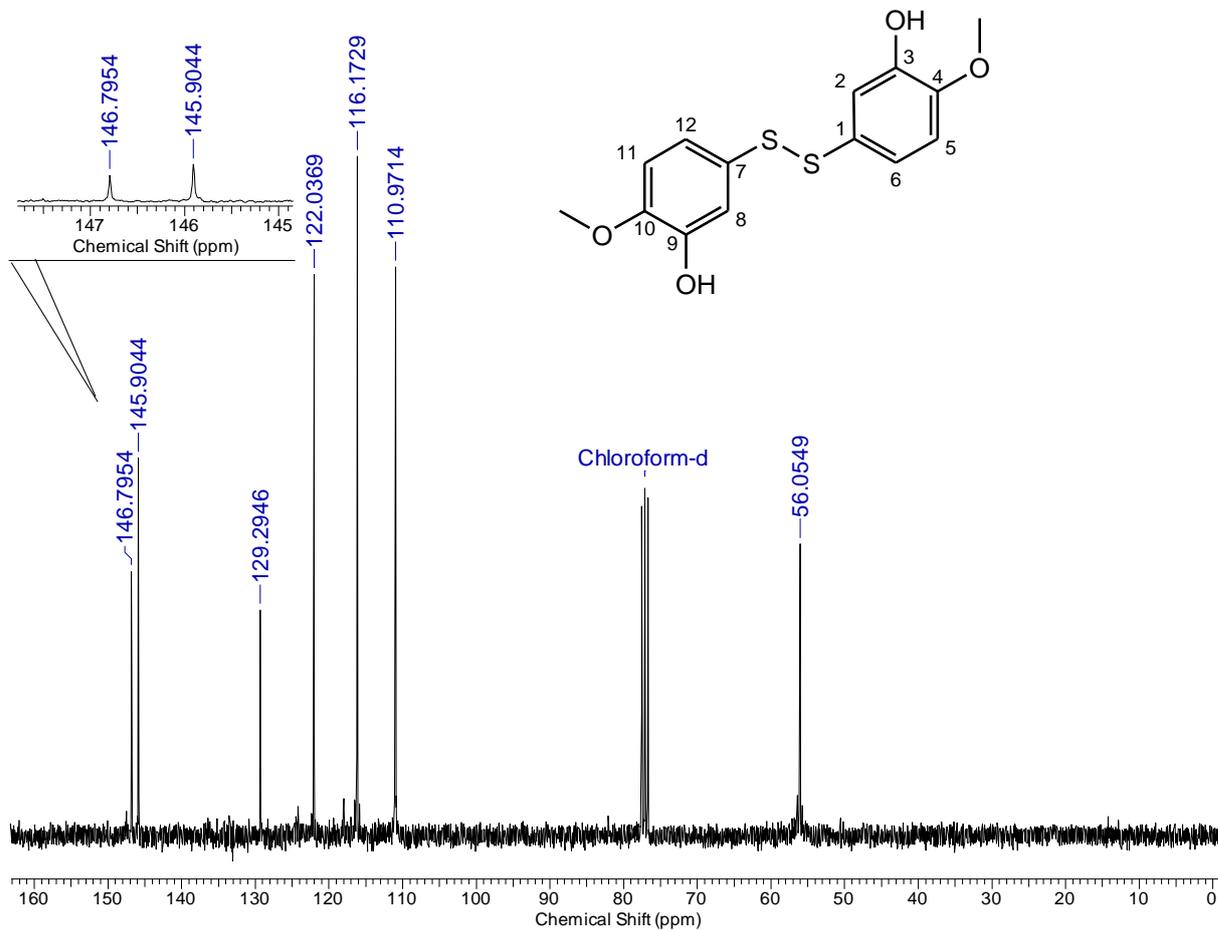
Espectro 36: Espectro de IV (KBr) de 31.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H- CDCl3 TIOL5-5di- EDSON- INGRID		
Date	05 Jul 2017 14:51:30				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\Edson\TIOL5-5di_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



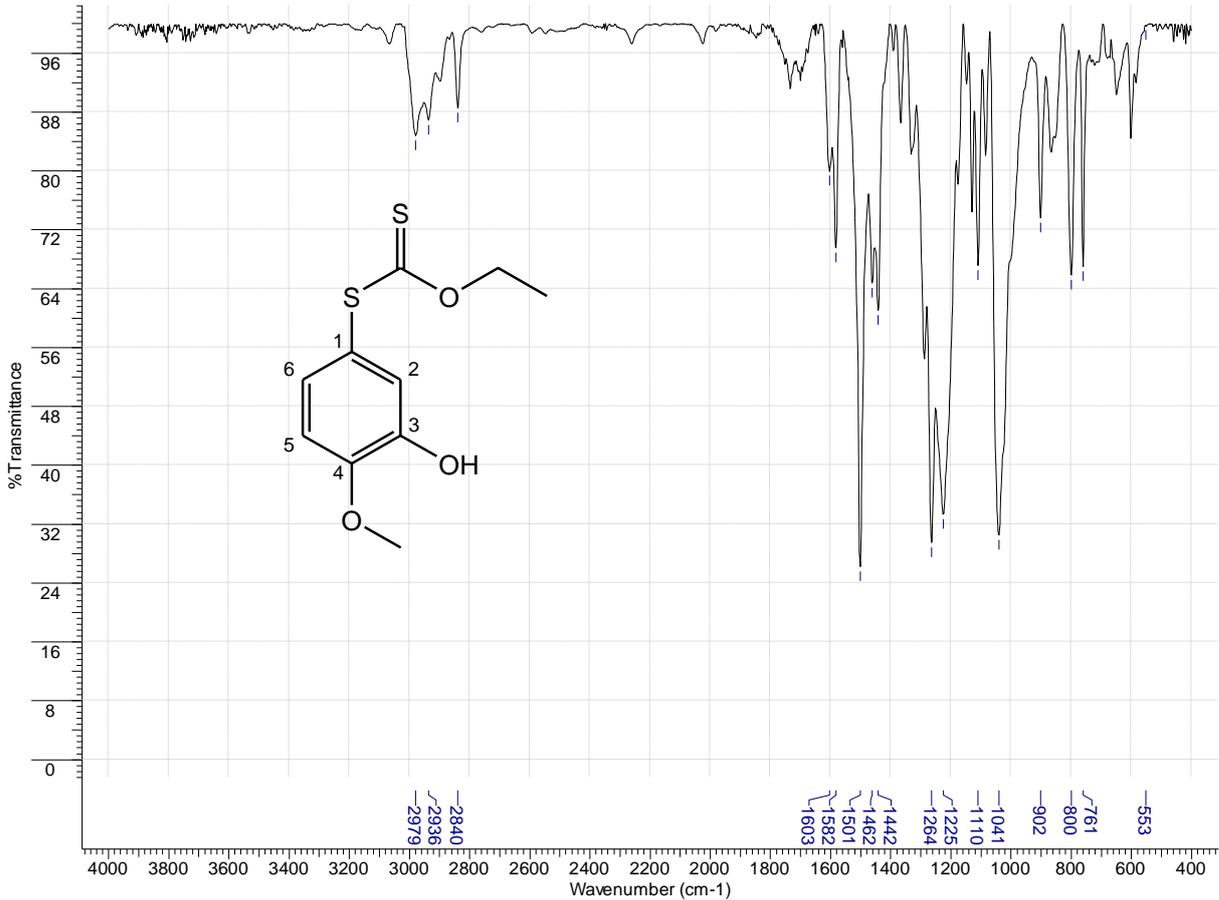
Espectro 37: Espectro de RMN de 1H de **31** em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C- CDCl3- TIOL5-5DI- DENIS- INGRID		
Date	11 Jul 2017 09:33:38				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\TIOL5-5DI_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	206
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



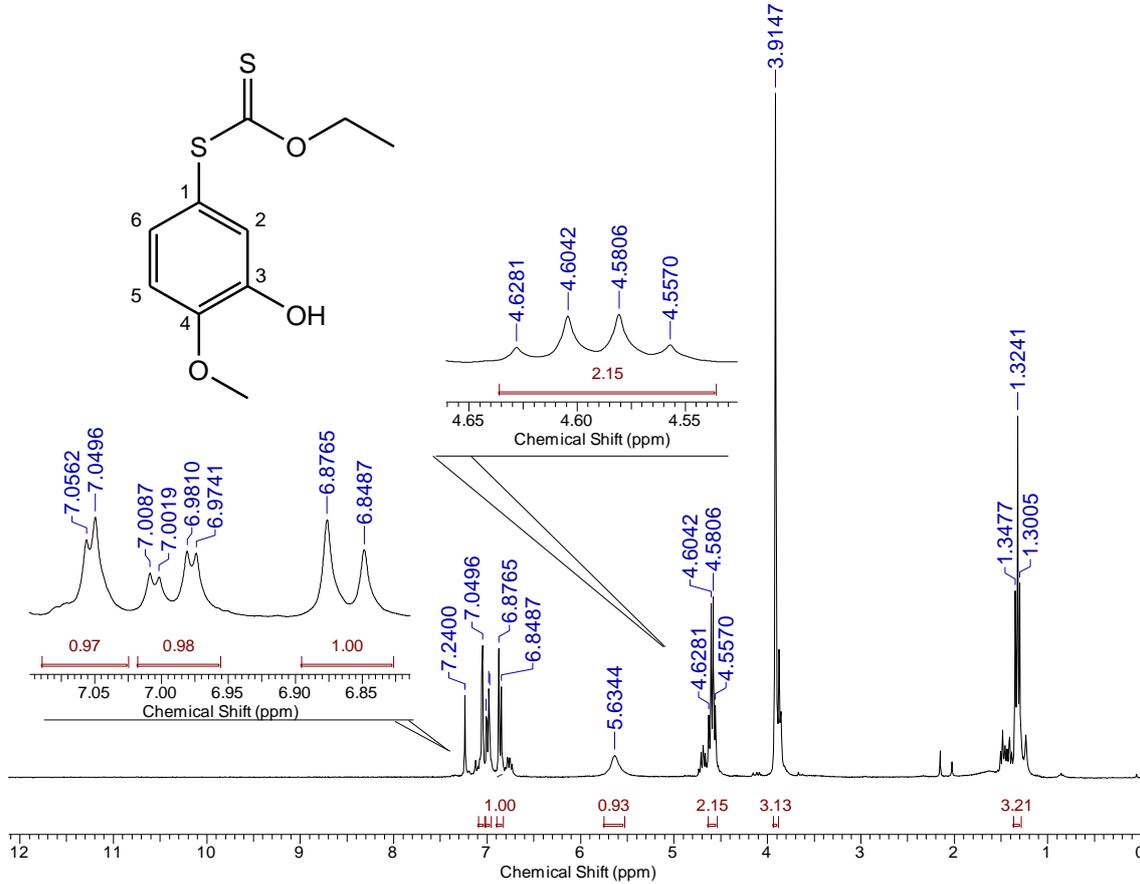
Espectro 38: Espectro de RMN de ^{13}C de **31** em CDCl_3 .

Title	cial do Brasil (GMT-3:00)	Comment	Amostra 009 por lscm data quarta-feira, maio 10 2017
Origin	cial do Brasil (GMT-3:00)		
File Name	C:\USERS\USUARIO\DESKTOP\INFRA SPECTROS\10-05-2017\ING-TIOL 5M4_1.SP		
Date Stamp	wed may 10 14:50:19 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Date	wed may 10 14:50:46 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000
Points Count	3601	Data Spacing	1.0000



Espectro 39: Espectro de IV (KBr) de 40.

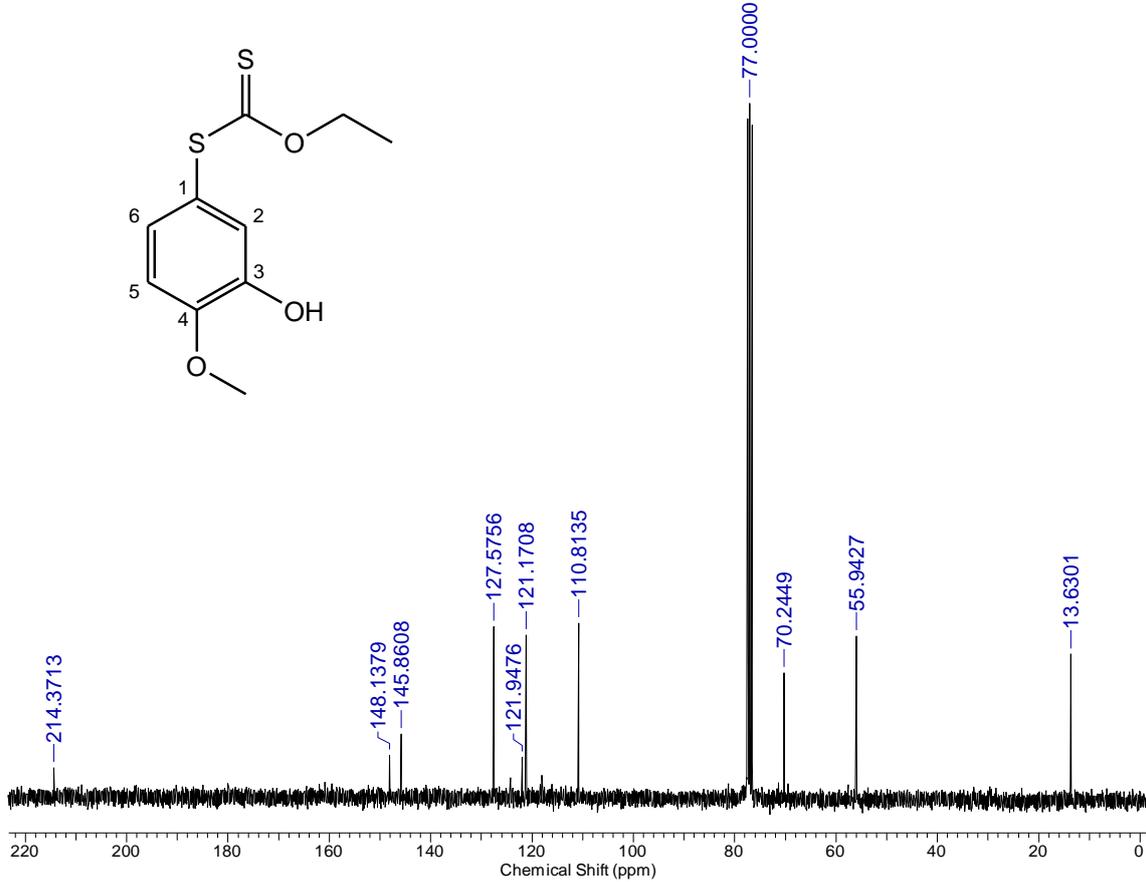
Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl3 - ING-TIOL 5-M4- DPL - Ingrid cx		
Date	11 Feb 2017 12:17:40				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TIOL 5-M4_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



Espectro 40: Espectro de RMN de ^1H de **40** em CDCl_3 .

6 Mar 2017

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C - CDCl3 - ING-TIOL 5-M4- DPL - Ingrid cx		
Date	11 Feb 2017 12:57:36				
File Name	D:\Documents\Documents\Mestrado\Projeto Edson\RMN\ING-TIOL 5-M4_033001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	1684
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



Espectro 41: Espectro de RMN de ¹³C de **40** em CDCl₃.