



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências

***Docking, síntese e avaliação citotóxica de novos
análogos da nimesulida como potenciais agentes
anticancerígenos***

Mafalda Incenso Pereira Catarro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Medicinal
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Paulo Jorge da Silva Almeida
Co-orientador: Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre

Covilhã, outubro de 2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Almeida, não só por ter aceitado orientar esta dissertação, mas também por todo o apoio, dedicação, paciência e confiança depositada. É um privilégio poder contar com o “chefe” neste percurso. Para além de orientador, ficará certamente um amigo.

Agradeço igualmente ao meu coorientador Professor Doutor Samuel Silvestre, pelo seu apoio, interesse e ajuda nos ensaios de viabilidade celular, sendo estes fundamentais na realização desta dissertação.

De igual modo, agradeço à Professora Doutora Adriana Santos por toda ajuda, disponibilidade e colaboração nos ensaios de citometria de fluxo.

Queria agradecer à Doutora Susana Ramos que me ajudou incansavelmente nos meus primeiros passos na investigação no laboratório de síntese orgânica.

Não posso deixar de agradecer ao Professor Doutor Renato Boto, à Professora Doutora Sílvia Nunes e à Professora Doutora Maria João Nunes pelo seu auxílio no laboratório.

Gostaria de agradecer a todo o pessoal que passou pelo laboratório de síntese orgânica e deixou a sua marca: Ivo Paulo, Eunice Cavalheiro, Pedro Soeiro, Liliana Alves, Catarina Nunes e Anaísa Coelho.

Também quero agradecer a todas as minhas colegas no Centro de Investigação em Ciências da Saúde-UBI, principalmente à Ana Paula Martins, Mariana Matias, Ângela Gonçalves, Vanessa de Brito, Sara Garcia, Mafalda Jesus e Catarina Canário por tudo o que me auxiliaram e ensinaram.

Um especial agradecimento aos meus companheiros de guerra João Serrano e João Marques, que fizeram com que me sentisse em casa no laboratório e pelos excelentes momentos passados tanto dentro daquelas quatro paredes como fora delas. Obrigada por me aturarem, sei que são amigos para a vida.

Queria também agradecer, Daniela Alves, Joana Figueiredo, Andreia Marta, Melani Reis e Marta Tenreiro por todo o apoio e amizade que demonstraram durante estes anos.

Agradeço à minha madrinha, tio, primos e a toda a minha família pelo apoio incansável ao longo destes anos. Em especial destaque, agradeço aos meus pais e ao meu irmão que sempre

acreditaram em mim e no meu trabalho. São o meu maior orgulho, sem vocês esta dissertação não seria possível.

Por fim, queria agradecer ao Sérgio Garcia, o meu grande pilar. Obrigada por toda a “química”, por estares sempre a meu lado, por todo o carinho, compreensão e apoio incondicional. Foste, sem dúvida, a melhor surpresa daquele laboratório.

Resumo

A nimesulida é um anti-inflamatório não esteroide, tendo também propriedades analgésicas e antipiréticas. Vários estudos demonstraram a sobreexpressão da enzima ciclooxigenase-2 em cancros sólidos, estando esta associada nomeadamente à produção da prostaglandina- E_2 , a qual potencializa a carcinogénese. Uma vez que a nimesulida e os seus análogos, bem como outros fármacos, inibem a ciclooxigenase-2, é expectável que apresentem propriedades anticancerígenas.

Recentemente, várias *orto*-(alquilcalcogénio)-*N*-acetanilidas estruturalmente semelhantes à nimesulida foram sintetizadas e foi avaliada a sua potencial atividade anticancerígena. De facto, em estudos *in vitro* de proliferação celular apresentam atividade antiproliferativa seletiva para células cancerígenas, destacando-se as células do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios. Os compostos mais potentes foram as acetanilidas *O*- e/ou *N*-benzilicas e -hexílicas.

Desta forma, tendo em conta os grupos já conhecidos de análogos da nimesulida que potenciam a atividade anticancerígena, foi sintetizada e caracterizada uma nova série de *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas. Nesta série destaca-se a introdução dos grupos nitro e acetamida na posição 4 das acetanilidas e os grupos ligados ao grupo tio e/ou amida [hexilo, metilenociclohexilo e (2,4-dimetilbenzilo)]. Adicionalmente, foram avaliados os seus efeitos na viabilidade celular de fibroblastos normais da derme humana, em células do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios e em células epiteliais humanas do cancro da mama sensíveis a estrogénios. Os resultados obtidos confirmam que as acetanilidas desenvolvidas neste trabalho de dissertação são potenciais agentes anticancerígenos para o cancro da mama, realçando-se as acetanilidas com protão na posição 4 com grupos *N*- e *S*-hexílicos e a acetanilida com grupo acetamida na posição 4 e com grupo *N*-hexílico e *S*-(2,4-dimetilbenzílico).

Os estudos de *docking* molecular foram realizados de forma a avaliar as energias de ligação e as possíveis interações com a ciclooxigenase-2, aromatase, recetor de androgénios e recetor alfa de estrogénios. Os resultados demonstraram que as acetanilidas podem ser potenciais inibidores da aromatase, e ligar-se a recetores de androgénios e a recetores alfa de estrogénios, embora não apresentem afinidade significativa para a ciclooxigenase-2.

Palavras-chave

Orto-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas, análogos da nimesulida, atividade anticancerígena.

Abstract

Nimesulide is a nonsteroidal anti-inflammatory drug with analgesic and antipyretic properties. Several studies have demonstrated an overexpression of cyclooxygenase-2 in solid cancer. This overexpression of cyclooxygenase-2 is associated, namely, with an increased production of prostaglandin-E₂ which therefore potentiates the carcinogenesis. Since nimesulide and its analogues, as well as other drugs, inhibited cyclooxygenase-2, it is expectable that these compounds have anticancer activity.

Recently, several *ortho*-(alkylthio)-*N*-alkylacetanilides structurally resembling nimesulide were synthesized and their potential anticancer activity was evaluated. In fact, *in vitro*, cell proliferation studies showed a selective antiproliferative activity for cancer cells, with prominence to the prostate cancer cell lines. The compounds that showed more anticancer activity were *O*- and/or *N*-benzylic and -hexyl acetanilides.

Thus, taking in mind already known groups that potentiate the antiproliferation activity of nimesulide analogues, a set of new *ortho*-(alkylthio)-*N*-alkylacetanilides were synthesized and characterized. In this new series was studied the introduction of the nitro and acetamide group at position 4, in which hexyl, methylcyclohexyl and/or 2,4-dimethylbenzyl are linked to thio and/or to an amide group. Additionally, cell viability of these acetanilides were evaluated against normal human dermal fibroblasts as well with human prostate and breast cancer cell lines. From the results obtained, acetanilides are a potential anticancer agent for breast cancer. Although the best anticancer activity was presented in the acetanilides with a proton in position 4 with groups *N*- and *S*-hexyl and in the acetanilide with a group acetamide in the position 4 and with a group *N*-hexyl e *S*-(2,4-dimethylbenzyl).

The docking molecular studies were performed in order to predict the binding energies and possible interactions with cyclooxygenase-2, aromatase, estrogen receptor and androgen receptor. The results of these studies can be potential inhibitors for aromatase, androgen receptor and estrogen receptor, but this not occur for the cyclooxygenase-2.

Keywords

Ortho-(alkylthio)-*N*-alkylacetanilides, nimesulide analogues, anticancer activity.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 Química Medicinal na descoberta e desenvolvimento de fármacos.....	1
1.2 Nimesulida	3
1.3 Mecanismos de ação da nimesulida no cancro	7
1.4 Análogos da nimesulida	11
1.5 <i>Orto</i> -(alquilcalcogênio)- <i>N</i> -alquilacetanilidas	18
Capítulo 2 - Discussão de resultados	23
2.1 Síntese e Caracterização estrutural	23
2.1.1 Materiais de Partida	24
2.1.2 Sais <i>N</i> -alquil-2-metilbenzotiazólios	26
2.1.3 <i>Orto</i> -(alquiltio)- <i>N</i> -alquilacetanilidas	31
2.2 Avaliação Biológica	42
2.2.1 Ensaio de MTT	42
2.2.2 Citometria de fluxo.....	46
2.3 <i>Docking</i> molecular	49
2.4 Conclusões e Perspetivas futuras	53
Capítulo 3 - Parte experimental	55
3.1 Síntese e Caracterização estrutural	55
3.1.1 Reagentes e Materiais de partida	56
3.1.1.1 <i>p</i> -Toluenossulfonato de hexilo	56
3.1.1.2 2-Metil-6-nitrobenzotiazole (1b).....	57
3.1.1.3 6-Amino-2-metilbenzotiazole (1c).....	57
3.1.1.4 6-Acetamida-2-metilbenzotiazole (1d)	58
3.1.2 Sais <i>N</i> -alquil-2-metilbenzotiazólios.....	59
3.1.2.1 <i>p</i> -Toluenossulfonato de 3-hexil-2-metil-6-nitrobenzotiazol-3-io (2b).....	59
3.1.2.2 <i>p</i> -Toluenossulfonato de 6-acetamida-3-hexil-2-metilbenzotiazol-3-io (2c).....	60
3.1.2.3 Brometo de 6-acetamida-3-(ciclohexilmetil)-2-metil-benzotiazol-3-io (2d).....	61
3.1.2.4 Iodeto de 6-acetamida-3-(2,4-dimetilbenzil)-2-metilbenzotiazol-3-io (2e).....	61
3.1.3 <i>Orto</i> -(alquiltio)- <i>N</i> -alquilacetanilidas	62
3.1.3.1 <i>N</i> -hexil- <i>N</i> -[2-(hexiltio)fenil]acetamida (3a).....	62
3.1.3.2 <i>N</i> -hexil- <i>N</i> -[2-(hexiltio)-4-nitrofenil]acetamida (3b)	63
3.1.3.3 <i>N</i> -[4-acetamida-2-(hexiltio)fenil]- <i>N</i> -hexilacetamida (3c)	64
3.1.3.4 <i>N</i> -[4-acetamida-2-(metilenociclohexiltio)fenil]- <i>N</i> -hexilacetamida (3d)	65
3.1.3.5 <i>N</i> -[4-acetamida-2-(metilenociclohexiltio)fenil]- <i>N</i> -hexilacetamida (3e)	66
3.1.3.6 <i>N</i> -[4-acetamida-2-(hexiltio)fenil]- <i>N</i> -metilenociclohexilacetamida (3f).....	67
3.1.3.7 <i>N</i> -[4-acetamida-2-(metilenociclohexiltio)fenil]- <i>N</i> -metilenociclohexilacetamida (3g)	68

3.1.3.8	<i>N</i> -[4-acetamida-2-(2,4-dimetilbenziltio)fenil]- <i>N</i> -metilenociclohexilacetamida (3h) 69	
3.1.3.9	<i>N</i> -[4-acetamida-2-(hexiltio)fenil]- <i>N</i> -(2,4-dimetilbenzil)acetamida (3i)	70
3.1.3.10	<i>N</i> -[4-acetamida-2-(metilenociclohexiltio)fenil]- <i>N</i> -(2,4-dimetilbenzil)acetamida (3j) 71	
3.1.3.11	<i>N</i> -[4-acetamida-2-(2,4-dimetilbenziltio)fenil]- <i>N</i> -(2,4-dimetilbenzil)acetamida (3k) 72	
3.2	Avaliação Biológica	73
3.2.1	Cultura de células	73
3.2.2	Preparação das soluções dos compostos.....	73
3.2.3	Ensaio de viabilidade celular	74
3.2.3.1	Ensaio de MTT	74
3.2.3.2	Citometria de fluxo	74
3.2.4	Análise estatística	75
3.3	<i>Docking</i> molecular	75
3.3.1	Preparação das proteínas	75
3.3.2	Preparação dos Ligandos	75
3.3.3	Cálculos da <i>Grid</i>	76
3.3.4	Simulações de <i>docking molecular</i>	76
Capítulo 4 - Referências		77
Capítulo 5 - Publicações		84
5.1	Comunicações em painel no âmbito desta dissertação	84
Capítulo 6 - Anexos		85

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Fases do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos	1
Figura 1.2 - <i>Docking</i> molecular	3
Figura 1.3 - Metabolismo do ácido araquidônico pela COX-2	8
Figura 1.4 - Representação esquemática do sítio ativo das isoenzimas COX-1 e COX-2.....	9
Figura 1.5 - Posições relevantes para a otimização da Nimesulida.	11
Figura 1.6 - FK-3311 (A), Flusolida (B) e L-745.337 (C).	11
Figura 1.7 - NS-398	12
Figura 1.8 - JCC76	12
Figura 1.9 - Composto quolínico <i>N</i> -(2-cloro-3-(2-ciano-1-hidroxiálil)-7-fenoxyquinolina-6-il)formamida.....	17
Figura 1.10 Comportamento piridínico <i>N</i> ² , <i>N</i> ⁶ -bis[(4-bromofenil)sulfonil]piridina-2,6-dicarboxamida.	18
Figura 1.11 - Formas enantioméricas e diastereoisoméricas de uma acetanilida representativa resultante da rotação impedida em torno da ligação N-arilo e N-CO, respetivamente	20
Figura 1.12 - Sinais de RMN de ¹ H dos prótons N-metilénicos não equivalentes das formas diastereoisoméricas E (H _a e H _b) e Z (H _c e H _d) das acetanilidas 3	20
Figura 2.1 - Morfologia das células MCF-7 após 24 horas de exposição.	47
Figura 2.2 - <i>Dot plots</i> da análise de fluorescência com iodeto de propídio em células MCF-7.	48
Figura 2.3 - Sobreposição dos ligandos originais co-cristalizados (rosa) e do ligando resultante (verde) para cada proteína	50

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - IC ₅₀ do JCC76 na inibição do crescimento de vários tipos de células do cancro da mama (exposição de 72 horas).	13
Tabela 1.2 - IC ₅₀ dos análogos do JCC76 na inibição do crescimento das células cancerígenas da mama SKBR-3 (exposição de 48 horas)	14
Tabela 1.3 - Atividade antiproliferativa dos análogos da nimesulida com grupos ésteres de glicolamida na posição D em células cancerígenas do cólon humano HCT-15, a uma concentração de 25 µM e após exposição de 48 horas	16
Tabela 1.4 - Viabilidade celular das linhas celulares (LNCaP, MCF-7 e NHDF) incubadas com acetanilidas a uma concentração de 30 µM, após 48 horas de exposição	21
Tabela 2.1 - Características físicas e bandas representativas no IV dos 2-metilbenzotiazóis 1	25
Tabela 2.2 - RMN de ¹ H dos 2-metilbenzotiazóis	26
Tabela 2.3 - RMN de ¹³ C dos 2-metilbenzotiazóis	26
Tabela 2.4 - Tempos de reação, características físicas e bandas representativas no IV dos sais <i>N</i> -alquil-2-metilbenzotiazólios 2	27
Tabela 2.5 - RMN de ¹ H da estrutura base dos sais <i>N</i> -alquil-2-metilbenzotiazólios 2.	28
Tabela 2.6 - RMN de ¹³ C da estrutura base dos sais <i>N</i> -alquil-2-metilbenzotiazólios 2.	29
Tabela 2.7 - RMN de ¹ H do grupo R ₂ hexilo e do seu contra-íão <i>p</i> -toluenossulfonato.....	29
Tabela 2.8 - RMN de ¹³ C do grupo R ₂ hexilo e do seu contra-íão <i>p</i> -toluenossulfonato	30
Tabela 2.9 - RMN de ¹ H e de RMN de ¹³ C do grupo R ₂ metilenociclohexilo	30
Tabela 2.10 - RMN de ¹ H e de RMN de ¹³ C do grupo R ₂ 2,4-dimetilbenzilo	31
Tabela 2.11 - Tempos de reação, características físicas e bandas representativas no IV das <i>orto</i> -(alquiltio)- <i>N</i> -alquilacetanilidas 3	33
Tabela 2.12 - RMN de ¹ H da estrutura base das <i>orto</i> -(alquiltio)- <i>N</i> -alquilacetanilidas 3.....	34
Tabela 2.13 - RMN de ¹³ C da estrutura base das <i>orto</i> -(alquiltio)- <i>N</i> -alquilacetanilidas 3.....	35

Tabela 2.14 - RMN de ^1H do grupo R_2 hexilo	36
Tabela 2.15 - RMN de ^{13}C do grupo R_2 hexilo.....	36
Tabela 2.16 - RMN de ^1H do grupo R_2 metilenociclohexilo.....	37
Tabela 2.17 - RMN de ^{13}C do grupo R_2 metilenociclohexilo.....	37
Tabela 2.18 - RMN de ^1H do grupo R_2 2,4-dimetilbenzilo	38
Tabela 2.19 - RMN de ^{13}C do grupo R_2 2,4-dimetilbenzilo.....	38
Tabela 2.20 - RMN de ^1H do grupo R_3 hexilo.	39
Tabela 2.21 - RMN de ^{13}C do grupo R_3 hexilo.....	39
Tabela 2.22 - RMN de ^1H do grupo R_3 metilenociclohexilo.....	40
Tabela 2.23 - RMN de ^{13}C do grupo R_3 metilenociclohexilo.....	40
Tabela 2.24 - RMN de ^1H do grupo R_3 2,4-dimetilbenzilo.	41
Tabela 2.25 - RMN de ^{13}C do grupo R_3 2,4-dimetilbenzilo.....	41
Tabela 2.26 - Viabilidade celular das diferentes linhas celulares utilizadas (NHDF, LNCaP e MCF-7) expostas às as <i>orto</i> -(alquiltio)- <i>N</i> -alquilacetanilidas 3 , a uma concentração de 30 μM , após 48 horas de exposição	44
Tabela 2.27 - Valores de IC_{50} (μM) para o 5-fluoruracilo, nimesulida e acetanilidas 3 nas células LNCaP e MCF-7, com um intervalo de confiança de 95%	46
Tabela 2.28 - Energias de ligação e RMSD obtidos no re- <i>docking</i> para cada proteína.	50
Tabela 2.29 - Energias de ligação obtida para os ligandos sintetizados relativos a cada proteína.	51
Tabela 2.30 - Principais interações dos ligandos originais co-cristalizados e ligandos sintetizados com cada proteína	52

Lista de Esquemas

Esquema 1.1 - Síntese patenteada da Nimesulida	4
Esquema 1.2 - Síntese alternativa da nimesulida..	5
Esquema 1.3 - Metabólitos da nimesulida no ser humano	7
Esquema 1.5 - Síntese de <i>orto</i> -(alquilcalcogénio)- <i>N</i> -alquilacetanilidas 3	19
Esquema 2. 1 - Via sintética para novas <i>orto</i> -(alquiltio)- <i>N</i> -alquilacetanilidas 3	23
Esquema 2.2 - Via sintética dos 2-metilbenzotiazóis 1	24
Esquema 2.3 - Sais <i>N</i> -alquil-2-metilbenzotiazólios 2	27
Esquema 2.4 - Via sintética das <i>orto</i> -(alquiltio)- <i>N</i> -alquilacetanilidas 3	31

Lista de Gráficos

Gráfico 2.1 - Distribuição percentual de células viáveis nos quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4).....	49
---	----

Lista de Acrónimos, Abreviaturas e Símbolos

2,4-diMeBn	2,4-dimetilbenzilo
AB	antibiótico/antimicótico
ADS	androstenediona
AINE	anti-inflamatório não esteróide
ALA	alanina
Ar	aromático
ARG	arginina
ASN	asparagina
ASP	Aspartato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	refletância total atenuada - do inglês, <i>Attenued Total Reflectance</i>
bcl-2	família de proteínas de linfoma 2 de células B - do inglês, <i>B-cell lymphoma 2 family</i>
ccf	cromatografia em camada fina
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
cm	centímetro(s)
cm ⁻¹	número(s) de onda
CO ₂	dióxido de carbono
COX	ciclooxigenase
COX-1	ciclooxigenase-1
COX-2	ciclooxigenase-2
COX-3	ciclooxigenase-3

d	duplete
dd	duplo duplete
ddd	duplo duplo duplete
DEPT	intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização - do inglês, <i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DHT	di-hidrotestosterona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-<i>d</i>₆	dimetilsulfóxido hexadeuterado
DNA	ácido desoxirribonucleico - do inglês, deoxyribonucleic acid
EST	estradiol
Et	etilo
FSC	<i>Forward Scatter Characteristics</i>
g	grama(s)
GLN	glutamina
GLU	glutamato
h	hora(s)
Hex	hexilo
HIS	histidina
HMBC	correlação heteronuclear a múltiplas ligações - do inglês, <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	correlação heteronuclear a uma ligação - do inglês, <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IC₅₀	concentração inibitória para 50% da atividade celular

ILE	isoleucina
IV	infravermelho
J	Joule
L	litro(s)
Log P	coeficiente de partição
LEU	leucina
LNCaP	células do adenocarcinoma da próstata - do inglês, <i>lymph node carcinoma of the prostate</i>
m	multiplete
MCF-7	células epiteliais humanas do cancro da mama - do inglês, <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
Me	metilo
MET	metionina
MeCy	metilenociclohexilo
mg	miligrama(s)
MHz	megaHertz
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mm	milímetro
mM	milimolar(es)
mol	mole(s)
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NHDF	fibroblastos normais da derme humana
nm	nanómetro(s)

nM	nanomolar(es)
NPX	naproxeno
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pf	ponto de fusão
PHE	fenilalanina
PI	iodeto de propídio
ppm	partes por milhão
QSAR	relação estrutura-atividade quantitativa - do inglês, <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
qt	quinteto
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de próton
RMN de ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono
RMSD	valor de desvio da raiz quadrada média, do inglês - <i>Root Mean Square Deviation</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	singuleto
SER	serina
SSC	<i>Side Scatter Characteristics</i>
t	triplete
td	triplo duplete
THR	treonina
TRP	triptofano
Ts	tosilato (<i>p</i> -toluenossulfonato)
TYR	tirosina

VAL	valina
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial - do inglês, Vascular Endotelial Growth Factor
Å	Ångström(s)
δ	desvio químico em RMN
°C	graus Celsius
μM	picomolar(es)
η	rendimento
ν_{max}	frequência máxima da banda de absorção

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Química Medicinal na descoberta e desenvolvimento de fármacos

A Química Medicinal visa descobrir e desenvolver compostos biologicamente ativos de forma a identificar e interpretar o seu modo de ação, a partir da análise das interações com os seus alvos biológicos. A Química Medicinal também está relacionada com o estudo, identificação e síntese dos metabolitos desses fármacos. Esta é uma ciência interdisciplinar que abrange áreas como a Química Orgânica, Bioquímica, Toxicologia, Química Analítica, Farmacologia, Farmacocinética, Espectroscopia, Simulação computacional, entre outras.¹

A descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco é um processo complexo, caro e arriscado. Para além disso, é um processo longo, o qual requer cerca de 12 a 24 anos desde o início do projeto de um novo fármaco até à sua comercialização (Figura 1.1).

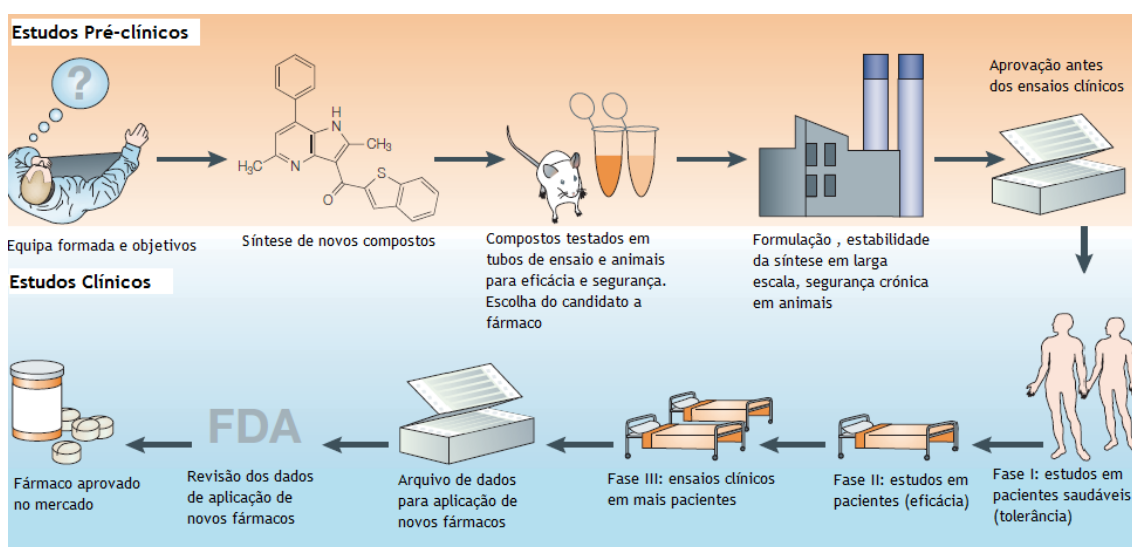


Figura 1.1 - Fases do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Adaptado de 2

Na elaboração de um projeto de descoberta e desenvolvimento de fármacos, a Química Medicinal está envolvida na produção de novos compostos bioativos nomeadamente com base no conhecimento adquirido da doença e dos fármacos competitivos, sendo a purificação e caracterização adequada desses novos compostos um dos passos cruciais desta ciência neste ramo.²

No processo de otimização, quando é identificado um *hit*, a Química Medicinal pretende sintetizar compostos análogos nomeadamente para explorar, com base na compreensão do modo de ação molecular, a relação estrutura-atividade destes compostos.²

No processo de desenvolvimento, é necessário avaliar a atividade *in vivo* no modelo adequado, tendo como finalidade a melhoria das propriedades farmacocinéticas, tais como capacidade de absorção, distribuição *in vivo*, taxa de metabolismo e taxa de excreção dos compostos em estudo.²

Um dos principais objetivos da Química Medicinal, tanto na otimização como no desenvolvimento de fármacos, é o de aumentar a afinidade e selectividade do fármaco para com o alvo biológico de modo a que a dose e os efeitos secundários sejam os mais baixos possíveis.¹

Contudo, na fase de descoberta de fármacos, 1 em 15-25 candidatos a fármacos apresenta todos os requisitos necessários para se tornar um fármaco comercializado. A falha na clínica ocorre principalmente devido à falha farmacocinética e toxicidade dos fármacos.

A química computacional tornou-se numa componente crucial no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos.³ Em 1980, surgiu o *docking* molecular devido às necessidades da biologia molecular estrutural e da descoberta de fármacos baseados na estrutura.⁴ O *docking* molecular envolve a previsão da conformação e orientação do ligando no sítio ativo do alvo biológico,³ sendo este geralmente realizado entre um ligando pequeno e uma macromolécula alvo (Figura 1.2).⁴ Este método tem como objetivo compreender e prever o reconhecimento molecular tanto estruturalmente, pela avaliação dos prováveis modos de ligação, como energeticamente, pela previsão da afinidade de ligação, envolvendo a determinação do modo de ligação mais favorável de um ligando com um alvo de interesse.⁵ A ampla utilização e aplicação deste método no desenvolvimento de fármacos, nomeadamente, em estudos de relação estrutura-atividade e otimização dos candidatos a fármacos é uma ferramenta já bem estabelecida da Química Medicinal.³

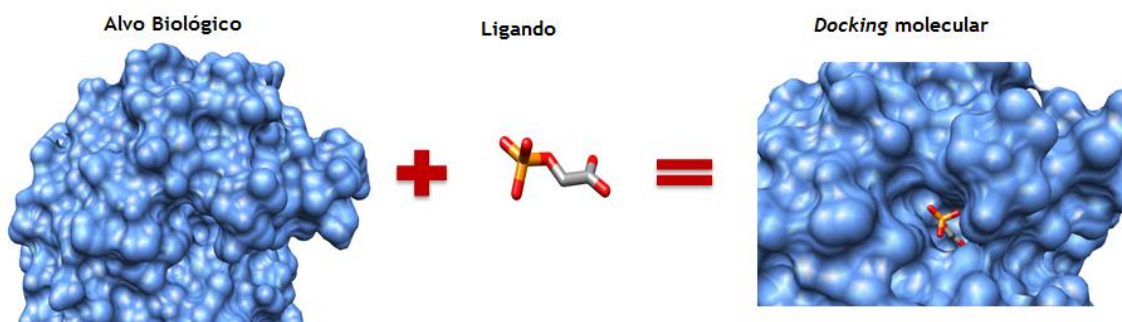


Figura 1.2 - *Docking* molecular. ^{Adaptado de 6}

Deve-se realçar a dificuldade de comparação de métodos de *docking*. O processo da obtenção do complexo alvo-ligando em que o ligando é separado do alvo e é novamente “dockado” com este é designado como *re-docking*. Este método permite comparar o método escolhido com os parâmetros de *re-docking*. Um dos parâmetros para definir o sucesso do *re-docking* é a quantificação do valor de desvio da raiz quadrada média (RMSD, do inglês - *Root Mean Square Deviation*) nas coordenadas cartesianas dos átomos do ligando nas conformações cristalográficas e de *docking*. O modo de ligação de um ligando pode ser definido por diversas variáveis, nomeadamente, a sua posição (translações x,y,z) e a sua flexibilidade e conformação (ângulos de rotação para cada ligação rotativa). Todos os métodos de *docking* requerem uma função de *scoring* que permita classificar os diversos modos de ligação dos ligandos, tendo-se como objetivo determinar qual o melhor modo de ligação. Embora esta componente computacional diminua o leque de candidatos a fármacos no processo de descoberta e desenvolvimentos destes, existe sempre a necessidade de estudos adicionais *in vitro* e *in vivo*.⁵

1.2 Nimesulida

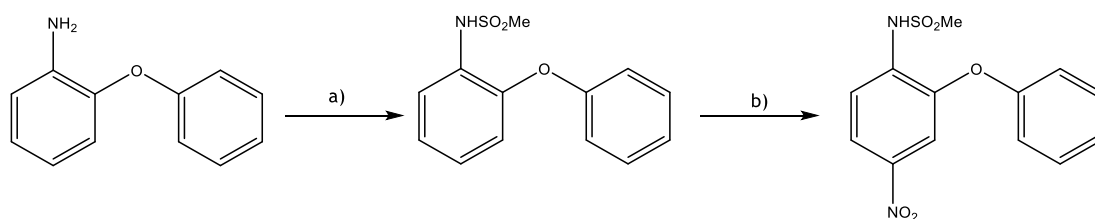
A Nimesulida, também conhecida como 2-fenoxi-4-nitrometanossulfonilida, 4-nitro-2-fenoximetanossulfonilina ou *N*-(4-nitro-2-fenoxifenil)metanossulfonilida, é um fármaco anti-inflamatório não esteróide (AINE) que também apresenta propriedades analgésicas e antipiréticas. Este fármaco é comumente utilizado em estados inflamatórios e de dor, nomeadamente, osteoporose, problemas musculares, cefaleias e sofrimento provocado por estados cancerígenos.⁷

A nimesulida foi descoberta em 1971 pelo Dr. George Moore e colaboradores nos laboratórios Riker. Designada por R-805 no decorrer dos ensaios clínicos, a nimesulida foi desenvolvida antes da descoberta do papel das prostaglandinas no processo de inflamação e dor. Estes investigadores analisaram detalhadamente a relação estrutura-atividade das sulfonamidas em estudo e determinaram as suas propriedades farmacológicas, sendo o desenvolvimento da

nimesulida uma extensão da relevância do grupo nitro localizado na posição *para* no anel arilsulfonamida.⁷

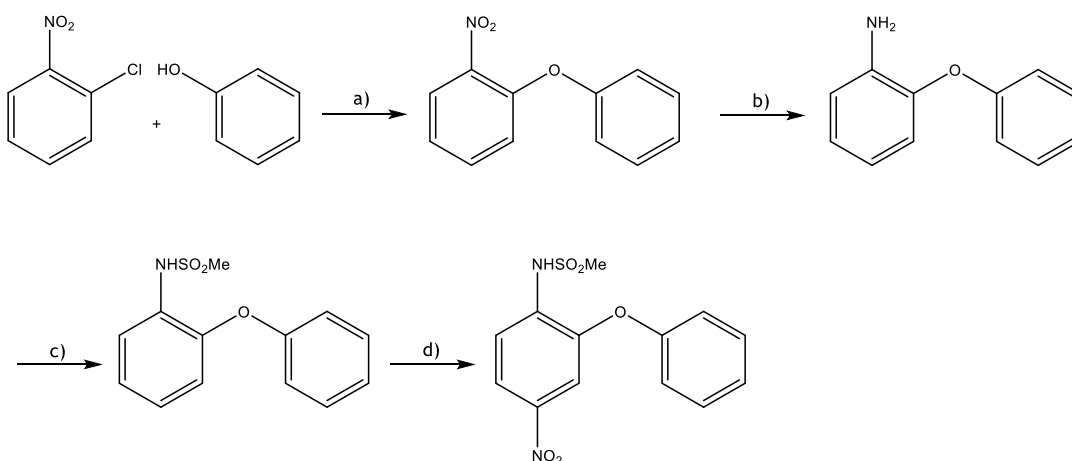
Em 1980, a empresa farmacêutica Helsinn Healthcare SA adquiriu os direitos de licenciamento mundiais para a nimesulida, sendo a sua produção iniciada em 1985. Atualmente, a comercialização da nimesulida é realizada em mais de 50 países de todo o mundo. Além de existirem diversas fórmulas para administração oral, em vários países a formulação tópica da nimesulida também é comercialmente disponível. Em Portugal, são vários os nomes comerciais deste fármaco, nomeadamente, Aulin®, Nimed® e Donulide®.⁷

A síntese descrita na patente original envolve a mesilação da 2-fenoxianilina com cloreto metileno-sulfonilo e posterior nitração, originando-se assim a nimesulida (Esquema 1.1).⁷



Esquema 1.1 - Síntese patenteada da Nimesulida.⁷ Reagentes e condições: a) $\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$, Et_3N , xileno; b) HNO_3 , NaNO_2 , AcOH .

Subsequentemente, foram descritos métodos de síntese alternativos para produzir a nimesulida. Um desses métodos é a síntese da 2-fenoxianilina a partir do *orto*-cloronitrobenzeno e do fenol, que posteriormente é reduzida, mesilada e nitrada (Esquema 1.2).⁷ Prasad e colaboradores descrevem uma síntese alternativa para aplicação em larga escala, que envolve a reação do 2-cloronitrobenzeno com o trifenilfosfato para originar o 2-fenoxinitrobenzeno, seguindo-se os passos de redução, mesilação e nitração.⁸



Esquema 1.2 - Síntese alternativa da nimesulida.⁷ Reagentes e condições: a) KOH; b) Zn, EtOH; c) $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, CH_3COCH_3 ; d) HNO_3 , AcOH .

Quimicamente, a nimesulida é um pó cristalino branco-amarelado com um ponto de fusão de 147-149 °C, e apresenta um peso molecular de 308,31 g/mol. Este fármaco é um ácido fraco com um pKa entre 6,4 e 6,8 e a sua lipossolubilidade, tal como determinado pelo coeficiente de partição (Log P) em *n*-octanol/água é de 1,788. Em termos de solubilidade, a nimesulida é solúvel em diversos solventes orgânicos como a acetona, clorofórmio e acetato de etilo e ainda em metanol e tem solubilidade baixa em etanol. Não obstante, esta é praticamente insolúvel em água, apresentando uma solubilidade de 0,014 mg/mL. No entanto, a solubilidade em água depende do pH e da temperatura do ambiente químico, verificando-se que a pH 7,4 e a 37°C a nimesulida apresenta uma solubilidade de 82,87 mg/L.⁷

Em termos farmacêuticos e farmacocinéticos, a nimesulida é geralmente administrada por via oral na forma de comprimido ou grânulos, sendo a dose normal de 100 mg duas vezes ao dia. A administração retal também pode ser utilizada, embora não de uma forma tão comum, sendo a dose normal de 200 mg duas vezes ao dia. Em alguns países, a nimesulida também está disponível na forma de suspensão ou em formulação tópica.⁷ Estudos reportaram que a administração oral de 100 mg de nimesulida em voluntários saudáveis resulta numa rápida e extensiva absorção no trato gastrointestinal, atingindo-se uma concentração plasmática máxima de 2,86-6,5 mg/L no espaço de 1,22-2,75 horas.⁹ A maioria do trato gastrointestinal parece estar envolvido na absorção da nimesulida, embora o colón apresente uma fraca capacidade de absorção da nimesulida. A sua taxa e extensão de absorção são semelhantes quer seja administrada na forma de comprimido, suspensão ou forma granular. Assim, infere-se que a absorção oral da nimesulida é praticamente completa. A presença de alimentos não reduz a taxa de absorção do fármaco.⁷ A idade condiciona pouco a farmacocinética da nimesulida, sendo esta bem tolerada por idosos e crianças e os seus efeitos farmacocinéticos são semelhantes tanto para o género masculino como para o género feminino.⁷

A nimesulida é facilmente distribuída pelo organismo e é preferencialmente eliminada por biotransformação metabólica, seguida de excreção essencialmente por via renal.⁷

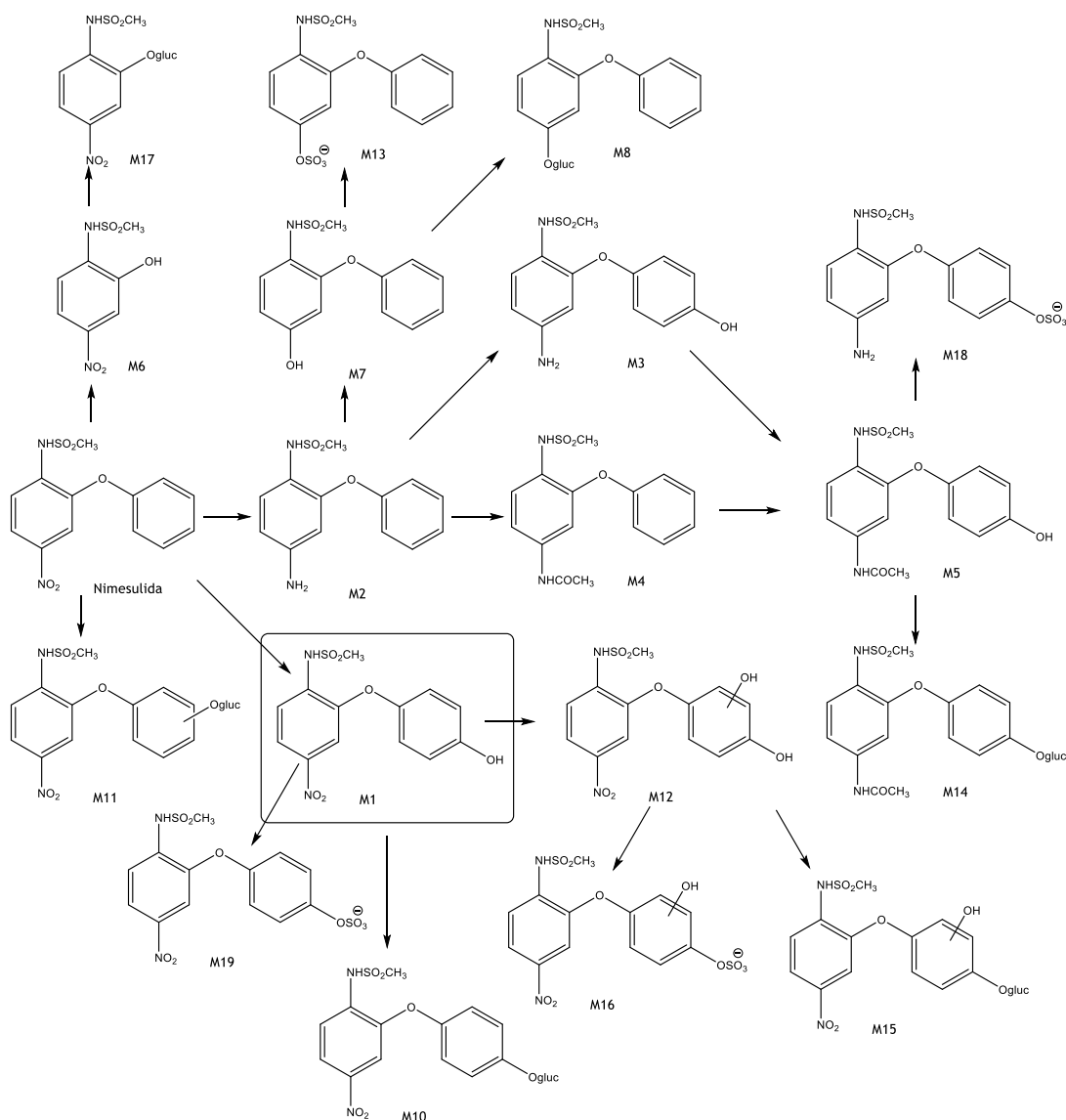
Em estudos de biotransformação da nimesulida identificaram-se um total de 18 metabolitos. A biotransformação prossegue por três vias principais: clivagem da ligação éter da molécula, redução do grupo nitro a amina e hidroxilação do anel fenoxi. Outros metabolitos resultam da hidroxilação e concomitante redução, acetilação do grupo amino e conjugação do ácido glucurónico ou sulfato com os metabolitos hidroxilados (Esquema 1.3).⁷

De todos os metabolitos, o que parece ser o mais importante é derivado com o grupo o 4-hidroxi no anel fenoxi (M1). Estudos revelaram que a isoenzima CYP1A2 da superfamília do citocromo P450 pode ser responsável pela hidroxilação da nimesulida, originando este metabolito M1 (via em destaque do Esquema 1.3). No entanto, foi igualmente sugerido que as CYP2C9 e CYP2C19 poderão estar também implicadas na hidroxilação da nimesulida.⁷

O tempo de meia-vida da nimesulida e do metabolito M1 é, respetivamente, de 1,80 a 4,73 horas e de 2,89 a 8,72 horas, sendo o tempo de semi-vida do M1 1,5 a 2 vezes superior ao tempo de semi-vida da nimesulida. Assim, conclui-se que a taxa de eliminação de M1 não é limitada pela taxa de formação da nimesulida, mas sim pelas suas próprias características de eliminação.

As interações medicamentosas podem alterar o perfil farmacocinético dos fármacos. De uma forma geral, não existem interações farmacocinéticas entre a nimesulida e outros fármacos que sejam de relevância clínica. No entanto, verificou-se que a varfarina e o ácido acetilsalicílico aumentam o risco de hemorragias quando administrados juntamente com a nimesulida.⁷

A nimesulida apresenta baixas ocorrências de úlceras e hemorragias gastrointestinais, asma e não apresenta reações cardiovasculares. No entanto, este fármaco apresenta efeitos adversos ao nível do trato gastrointestinal superior, fígado, rins, pele e sistema imunológico, destacando-se o risco de hepatotoxicidade. A nimesulida está associada a diversas reações hepáticas, nomeadamente, aumento nos níveis plasmáticos das enzimas transaminases hepáticas e alterações da função hepática.⁷



Esquema 1.3 - Metabolitos da nimesulida no ser humano. Adaptado de 7

1.3 Mecanismos de ação da nimesulida no cancro

A inflamação é um processo multifatorial que reflete a imunidade natural do organismo contra diferentes agentes ou estímulos. A ativação de recetores específicos desencadeia sinais intracelulares que regulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias que, juntamente com quimiocinas e proteínas de adesão celular, conduzem ao recrutamento e ativação de células imunes.¹⁰

A inflamação está envolvida de diversas formas no desenvolvimento de cancro. Esta pode desempenhar um papel na iniciação do tumor, desencadeando a produção de espécies reativas de oxigénio, responsáveis por danos no DNA (ácido desoxirribonucleico - do inglês, *deoxyribonucleic acid*), aumentando assim o número de mutações. Não obstante, a

inflamação também pode estar envolvida na promoção do tumor pela secreção de fatores de crescimento que lhe está associada.¹⁰

As prostaglandinas desempenham um papel importante em funções fisiológicas como vasodilatação, proteção gástrica, manutenção da homeostasia renal e agregação de plaquetas. Adicionalmente, em concreto, a prostaglandina E_2 desempenha um papel fundamental na mediação de febre, sensibilidade à dor e inflamação.

As prostaglandinas H sintetases, comumente conhecidas como ciclooxigenases (COX) são enzimas que catalizam a biossíntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. O ácido araquidônico é hidrolisado dos fosfolípidos da membrana celular pela fosfolipase A_2 .¹¹ As ciclooxigenases catalisam duas reações acopladas. Inicialmente, as COXs convertem o ácido araquidônico a prostaglandina G_2 , seguindo-se a conversão desta a prostaglandina H_2 . Posteriormente, pela ação de diferentes enzimas, a prostaglandina H_2 é convertida a prostaglandina D_2 , E_2 e I_2 e a tromboxano A_2 (Figura 1.3).¹⁰

Atualmente estão descritas três isoformas da COX. A ciclooxigenase-1 (COX-1) é a isoforma constitutiva, sendo esta responsável pelos níveis basais de prostanóides envolvidos na regulação de processos fisiológicos, nomeadamente, proteção da mucosa gástrica e manutenção renal.¹¹ A ciclooxigenase-2 (COX-2) é a isoforma indutível, uma vez que esta é induzida por fatores de crescimento e vários tipos de citocinas, sendo, portanto, sobreexpressa, nomeadamente durante a inflamação. Esta isoforma é quase indetetável em condições fisiológicas¹² e é expressa principalmente no cérebro, espinal medula e rins.¹³ A ciclooxigenase-3 (COX-3) parece estar associada à sensibilidade à dor e à febre, embora o seu papel não seja bem conhecido.¹⁰

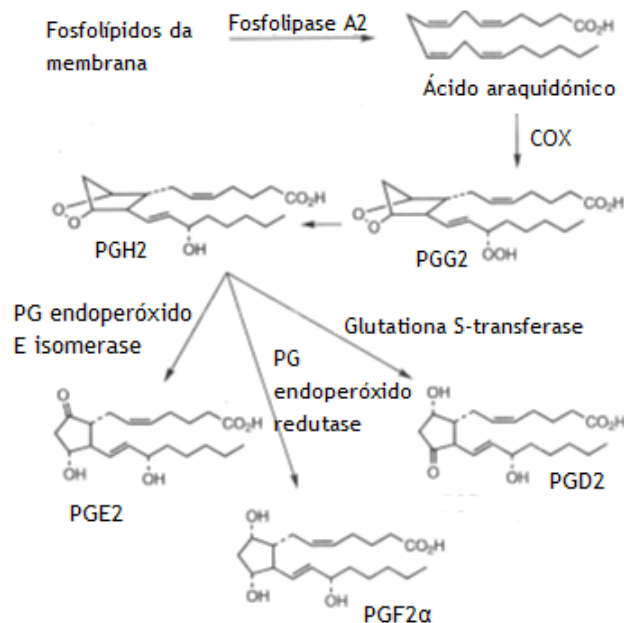


Figura 1.3 - Metabolismo do ácido araquidônico pela COX-2. ^{Adaptado de 11}

As isoformas COX-1 e a COX-2 são bastante semelhantes, apresentando uma homologia de 60% entre espécies,¹⁰ embora estas apresentem algumas diferenças estruturais. Contrariamente à COX-1, a COX-2 apresenta uma extensão de 18 aminoácidos no C-terminal. Para além disso, os resíduos que originam o canal de ligação ao substrato e o sítio catalítico são idênticos, diferenciando-se na posição 523 com o aminoácido isoleucina na COX-1 e valina na COX-2. Esta diferença conduz à alteração do tamanho e forma dos dois sítios ativos. A presença da cavidade hidrofílica adicional na isoforma COX-2, assim como com o aumento do seu sítio ativo (cerca de 20%), é a base explicativa da seletividade dos AINE inibidores seletivos desta isoforma (Figura 1.4).^{11,14}

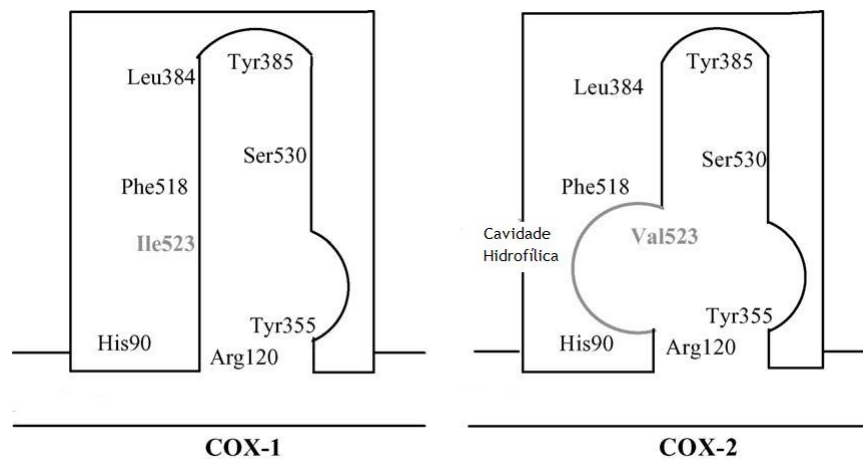


Figura 1.4 - Representação esquemática do sítio ativo das isoenzimas COX-1 e COX-2. Adaptado de 14

A sobreexpressão da COX-2 foi detetada em vários tipos de cancros sólidos, nomeadamente, cólon, pulmão, pâncreas e mama, estando correlacionada com um mau prognóstico. Esta sobreexpressão da COX-2 está associada, nomeadamente, com um aumento dos níveis da prostaglandina E_2 .¹⁰

A prostaglandina E_2 é uma molécula imunorreguladora conhecida pela sua capacidade de modular a proliferação celular e morte celular, podendo desempenhar um papel relevante na carcinogénese. A sua biossíntese está correlacionada com o aumento do crescimento tumoral. Esta prostaglandina inibe a apoptose a partir de vários mecanismos, sendo um deles a regulação positiva do nível da proteína anti-apoptótica bcl-2 (família de proteínas de linfoma 2 de células B - do inglês, *B-cell lymphoma 2 family*).¹⁰ A prostaglandina E_2 é igualmente relevante na invasão tumoral, podendo aumentar o número de metástases e os níveis do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF - do inglês, *Vascular Endotelial Growth Factor*). O VEGF é um promotor de angiogénese que, pelo aumento da vascularização dos tumores, promove a progressão tumoral.¹⁰

Assim, a prostaglandina E_2 e, conseqüentemente, a COX-2 desempenham um papel importante na progressão do tumor através do aumento da proliferação celular, sobrevivência celular e invasão tumoral.¹⁰

Apesar do recente progresso na investigação oncológica, a incidência de vários tumores continua a aumentar, sendo necessário desenvolver novas terapias anticancerígenas. Os inibidores da COX-2, nomeadamente alguns AINEs, desempenham um papel fundamental na inibição da carcinogénese, conseguindo reduzir consistentemente o aparecimento e incidência de vários tipos de cancro.¹⁰ Além disso, estes fármacos foram os primeiros a ser reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde como analgésicos graduais na dor do cancro.

Os AINEs que inibem a COX-2 estão envolvidos em diversos mecanismos de inibição da carcinogénese. Estes inibem a expressão ou atividade de promotores do ciclo celular, o que leva à supressão da proliferação celular. Para além disso, estes compostos inibem igualmente, por regulação negativa, controladores do ciclo celular. Os AINEs que inibem significativamente a COX-2 são capazes de reduzir a angiogénese pela inibição da expressão do promotor VEGF. Adicionalmente, estes fármacos atuam de forma a induzir a morte celular por apoptose, sendo um dos principais alvos a bcl-2.¹⁵

A prostaglandina E_2 , para além de estar envolvida na sobreexpressão da COX-2, também pode levar à sobreexpressão da enzima aromatase em cancros da mama hormono-dependentes. A aromatase é uma enzima pertencente ao complexo citocromo P450 que é codificada pelo CYP19.¹⁶ Esta enzima é responsável pela biossíntese de estrogénios a partir de androgénios. A progressão de cancros da mama hormono-dependentes requer estrogénios, sendo estes caracterizados pela sobreexpressão de recetores de estrogénios. Assim, como estratégia terapêutica e de forma a inibir a ação de estrogénios, é sugerida a ligação de compostos competitivos aos recetores de estrogénios ou a utilização de inibidores da aromatase, os quais vão diminuir a produção de estrogénios.¹⁷ Os AINEs inibidores da COX-2, têm capacidade de inibir a atividade da aromatase, inibindo assim o crescimento do tumor. Neste âmbito, a nimesulida e os seus análogos demonstraram efeitos inibidores da aromatase¹⁶⁻²¹ e, conseqüentemente, da biossíntese de estrogénios, podendo estes resultados ser significativos para a prevenção de cancros da mama hormono-dependentes.²²

Embora o mecanismo molecular não seja conhecido, a utilização de AINEs como agentes anticancerígenos no cancro da próstata também tem sido estudada. O desenvolvimento de cancros da próstata hormono-dependentes está associado à presença de androgénios e, conseqüentemente, à presença de recetores de androgénios, sendo este último um alvo fundamental na intervenção do desenvolvimento e progressão cancerígena. Assim, ao inibir o recetor de androgénios, os AINEs são capazes de inibir a progressão do cancro da próstata.²³

1.4 Análogos da nimesulida

No desenvolvimento de análogos da nimesulida e por forma a otimizar este fármaco no que respeita à sua atividade anticancerígena, deve-se ter em conta dados de relação estrutura-atividade relevantes. Estudos realizados consideraram a modificação de uma ou mais posições relevantes para a otimização da nimesulida (A-E, Figura 1.5). São exemplos representativos os análogos da nimesulida FK-3311, Flusolida, L-745.337, NS-398 e JCC76.²⁴⁻³³

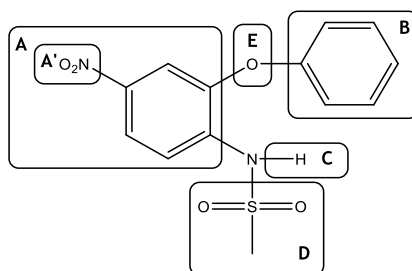


Figura 1.5 - Posições relevantes para a otimização da Nimesulida.

No análogo FK-3311 substituiu-se o grupo nitro por um grupo eletroatrator - metilcetona. Para além disso, introduziram-se dois grupos fluor nas posições 2 e 4 no grupo fenilo (Figura 1.6 A). Em estudos da sua actividade biológica, o FK-3311, assim como o seu congénere com grupo ciano na posição A', demonstraram uma atividade anti-inflamatória comparativamente semelhante à observada com os análogos com o grupo nitro, tendo estes sido selecionados como potenciais candidatos para desenvolvimentos futuros.³⁴ Nakamura e colaboradores sintetizaram derivados do FK-3311, modificando a posição E. Este estudo revelou que os calcogénios azoto e enxofre apresentaram um efeito semelhante ao seu congénere oxigénio.²⁴ A Flusolida, também conhecida por CGP 28238, é um análogo em que se substituiu a metilcetona por uma ciclopentanona, que tem maior restrição conformacional (Figura 1.6 B). Este composto é altamente potente e seletivo para a isoenzima COX-2, apresentando uma concentração inibitória para 50% da atividade celular (IC₅₀) de 15 nM.²⁵ O L-745.337 é um congénere tioéter da Flusolida (Figura 1.6 C).²⁶

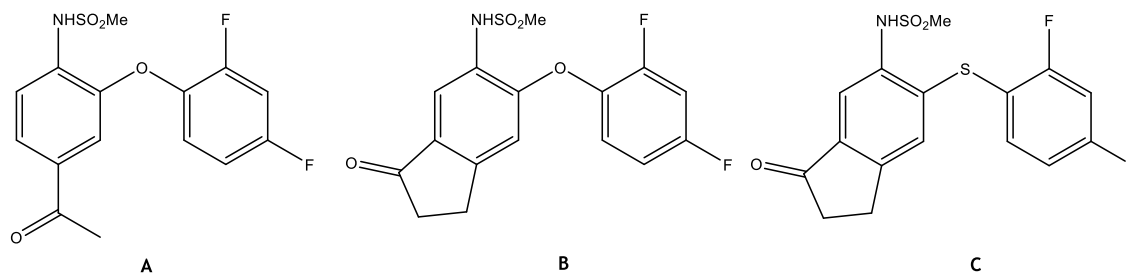


Figura 1.6 - FK-3311 (A), Flusolida (B) e L-745.337 (C).

O NS-398 é um análogo da nimesulida que apresenta um grupo ciclohexilo na posição B em alternativa ao grupo fenilo (Figura 1.7). Este é um anti-inflamatório não esteróide com potente atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética, apresentando uma toxicidade mínima.²⁷ Este composto demonstrou apresentar efeito antiproliferativo em vários tipos de células cancerígenas, tais como, cabeça, pescoço, ovário e mieloma.^{29,30} No entanto, num estudo em células cancerígenas da mama sensíveis a estrogénios (MCF-7 - do inglês, *Michigan Cancer Foundation-7*) verificou-se que este composto a uma concentração de 2 μM após uma exposição de 7 dias não afetou significativamente a proliferação celular.²⁸

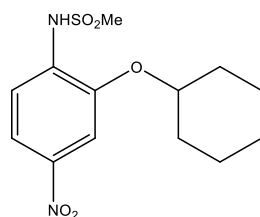


Figura 1.7 - NS-398.

O JCC76 é um análogo da nimesulida com grupo 2,5-dimetilbenzilo na posição B e grupo ciclohexilcarboxamida na posição A' (Figura 1.8).

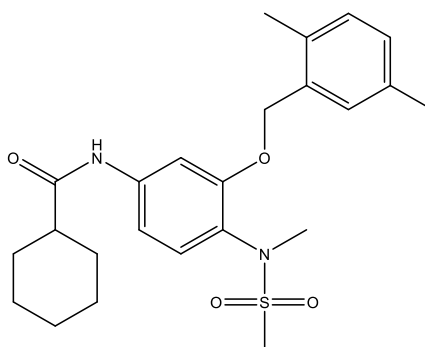


Figura 1.8 - JCC76.

Este composto inibe seletivamente a proliferação de células cancerígenas da mama SK-BR-3, após 48 horas de exposição, tendo um IC₅₀ de $1,38 \pm 0,10 \mu\text{M}$.³³ Além disso, foi determinado o IC₅₀ do JCC76 em vários tipos de células cancerígenas da mama, após exposição de 72 horas ao composto, observando-se uma inibição relevante para este tipo de células (Tabela 1.1).³¹

Tabela 1.1 - IC₅₀ do JCC76 na inibição do crescimento de vários tipos de células do cancro da mama (exposição de 72 horas).

Tipo celular	IC ₅₀ ± desvio-padrão (µM)
BT-474	2,17 ± 0,24
MCF-7	22,10 ± 3,76
MDA-MD-453	3,93 ± 0,53
MDA-MD-231	19,58 ± 2,16

Com o objetivo de otimizar a estrutura do JCC76, Zhong e colaboradores sintetizaram análogos deste, modificando a posição C da molécula, e avaliaram o seu efeito antiproliferativo em células cancerígenas da mama SK-BR-3. No entanto, neste estudo verificou-se que o JCC76 continuava a ser o mais citotóxico, com grupo metilo na posição C.³⁵

Noutro estudo, Zhong e colaboradores modificaram a posição A' da estrutura do JCC76, verificando-se que a presença do grupo benzamida está associada a uma maior citotoxicidade em células cancerígenas da mama SK-BR-3 do que do grupo benzilamida (Tabela 1.2). Adicionalmente, substituintes na posição *meta* do grupo benzamida apresentam um menor efeito antiproliferativo. A introdução de halogenetos na posição *para* do grupo benzamida, tais como brometo e iodeto leva a um maior efeito antiproliferativo, com IC₅₀ de 0,22 µM e 2,15 µM, respetivamente. No entanto, o cloreto diminui ligeiramente a atividade antiproliferativa, com IC₅₀ de 2,15 µM. Para além disso, grupos substituintes como o nitro e ciano não aumentam o efeito antiproliferativo, enquanto o grupo metoxi aumenta o efeito antiproliferativo com valores de IC₅₀ entre 0,19 µM e 0,68 µM.³⁶

Tabela 1.2 -IC₅₀ dos análogos do JCC76 na inibição do crescimento das células cancerígenas da mama SKBR-3 (exposição de 48 horas).^{Adaptado de 36}

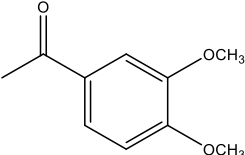
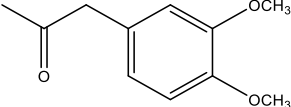
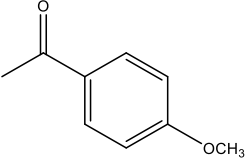
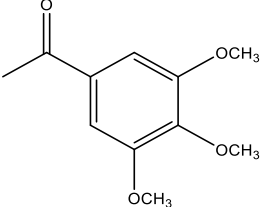
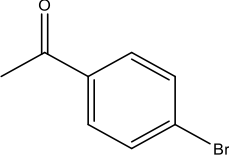
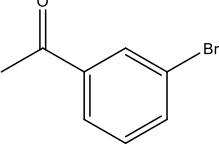
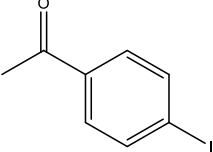
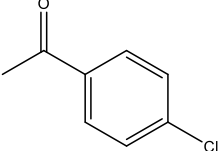
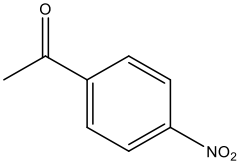
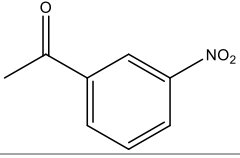
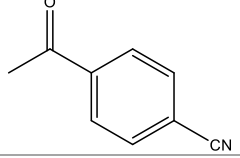
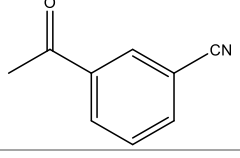
R	IC ₅₀ ± desvio-padrão (µM)
	0,19 ± 0,14
	34,02 ± 2,01
	0,15 ± 0,05
	0,30 ± 0,02
	0,22 ± 0,01
	7,34 ± 3,99
	0,13 ± 0,07
	2,15 ± 0,94

Tabela 1.2 -IC₅₀ dos análogos do JCC76 na inibição do crescimento das células cancerígenas da mama SKBR-3 (exposição de 48 horas).^{Adaptado de 36} (continuação)

	1,13 ± 0,10
	1,97 ± 0,21
	1,46 ± 0,06
	3,01 ± 0,12

Num outro estudo, Karakus e colaboradores modificam a posição A' da estrutura da nimesulida, sintetizando 1-[4-(metanossulfonamido)-3-fenoxifenil]-3-alkil/aryl tioureas e avaliaram o seu efeito antiproliferativo em células cancerígenas pulmonares A549, verificando-se que os compostos testados não demonstraram qualquer atividade antiproliferativa significativa.³⁷

Adicionalmente, Su e Chen tentaram otimizar a estrutura da nimesulida, alterando a posição A' e a posição B e determinaram o IC₅₀ desses compostos em células LTED. Os resultados sugeriram que, para a posição B, o grupo 2,5-dimetilbenzilo e o grupo 2,5-diclorobenzilo são os que levaram ao maior efeito antiproliferativo. Não obstante, verifica-se que tanto os grupos 2-metil e 3-metilbenzilo bem como o grupo 2,4,6-trimetilbenzilo na posição B diminuem a atividade cancerígena deste tipo de compostos.³⁸

De forma a avaliar a modificação nas posições C e D, Su e colaboradores sintetizaram análogos da nimesulida e avaliaram a sua atividade antiproliferativa em células SK-BR-3 a uma concentração de 25 µM, após 48 horas de exposição. Os análogos alquilo ou aril-substituídos na posição C da estrutura da nimesulida, comparativamente aos seus congêneres com protão ou grupo metilo, apresentam menor inibição do crescimento celular. Assim, sugere-se que um grupo pequeno na posição C favorece a atividade antiproliferativa. A introdução de carboxamidas na posição D da estrutura da nimesulida diminui a atividade anticancerígena. No entanto, o grupo 4-cloro-3-nitrobenzamida revelou uma atividade antiproliferativa superior a 80%.³³

Kankanala e colaboradores sintetizaram e determinaram o IC₅₀ em células cancerígenas do cólon humano (HCT-15) de análogos da nimesulida, introduzindo na posição D ésteres de glicolamida. Alguns destes compostos apresentaram efeito antiproliferativo significativo (Tabela 1.3).³⁹

Tabela 1. 3 - Atividade antiproliferativa dos análogos da nimesulida com grupos ésteres de glicolamida na posição D em células cancerígenas do cólon humano HCT-15, a uma concentração de 25 µM e após exposição de 48 horas. ^{Adaptado de 39}

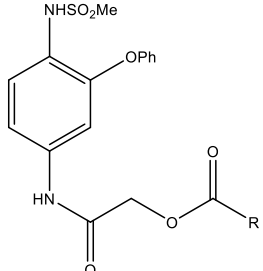
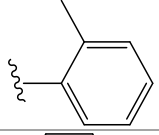
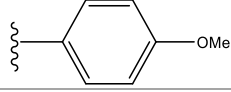
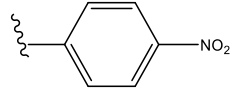
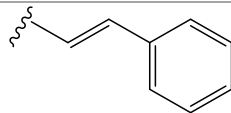
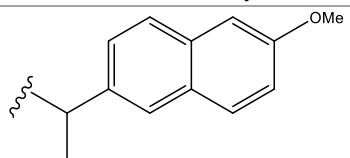
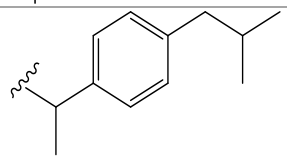
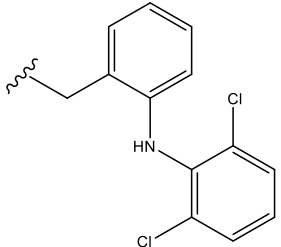
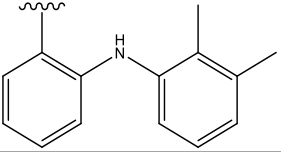
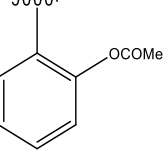
	
R	Viabilidade celular (%)
CH ₃	20,30
CH ₂ CH ₃	28,50
Ph	31,00
	49,38
	28,80
	42,40
	41,91
	19,40
	48,89

Tabela 1.3 - Atividade antiproliferativa dos análogos da nimesulida com grupos ésteres de glicolamida na posição D em células cancerígenas do cólon humano HCT-15, a uma concentração de 25 μM e após exposição de 48 horas. ^{Adaptado de 39} (continuação)

	51,22
	55,79
	66,05

Noutro estudo, Mareddy e colaboradores sintetizaram novos e potenciais agentes anti-cancerígenos com base na estrutura da nimesulida e incluindo o grupo 1,2,3-triazole, sendo este último introduzido na posição D da estrutura da nimesulida. Estes compostos demonstraram propriedades citotóxicas promissoras contra células cancerígenas do cólon humano HCT-15, com IC_{50} entre 21 e 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$.⁴⁰

Relativamente à modificação da estrutura base (posição A) da nimesulida, são exemplos mais representativos os derivados quinolínicos⁴¹⁻⁴³ e os piridínicos^{13,14,44,45}.

Os compostos quinolínicos, sintetizados por Reddy e colaboradores, foram preparados tendo como base a estrutura da quinolina e da nimesulida. Muitos destes compostos revelaram-se citotóxicos quando avaliados em células cancerígenas da próstata humana PC-3, destacando-se o *N*-(2-cloro-3-(2-ciano-1-hidroxiálil)-7-fenoxiquinolina-6-il)formamida com um IC_{50} de 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 1.9).⁴²

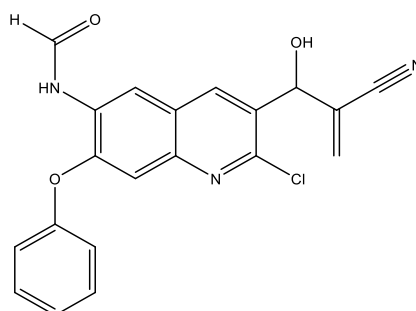


Figura 1.9 - Composto quinolínico *N*-(2-cloro-3-(2-ciano-1-hidroxiálil)-7-fenoxiquinolina-6-il)formamida.

Praveena e colaboradores sintetizaram análogos quinolínicos da nimesulida, incorporando o grupo 1,2,3-triazole. Estes compostos demonstraram um efeito antiproliferativo promissor em células cancerígenas do pulmão A549, com IC₅₀ entre 8 e 9 μM.⁴³

Uma série de análogos piridínicos foi sintetizada por Lu e colaboradores. A sua atividade antiproliferativa foi avaliada em três tipos de células (B16-F10, MCF-7 e HepG2). Destes, o composto *N*²,*N*⁶-bis[(4-bromofenil)sulfonyl]piridina-2,6-dicarboxamida apresenta uma elevada atividade antiproliferativa contra as três linhas celulares cancerígenas, com IC₅₀ de 2,8 μM, 1,8 μM e 1,2 μM, respetivamente (Figura 1.10).⁴⁵

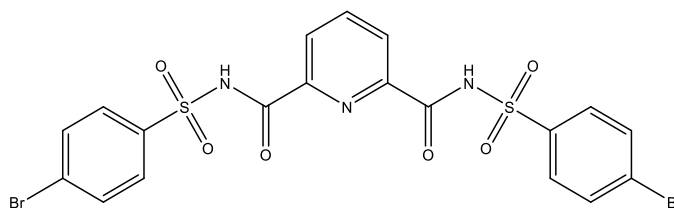


Figura 1.10 Composto piridínico *N*²,*N*⁶-bis[(4-bromofenil)sulfonyl]piridina-2,6-dicarboxamida.

1.5 *Orto*-(alquilcalcogénio)-*N*-alquilacetanilidas

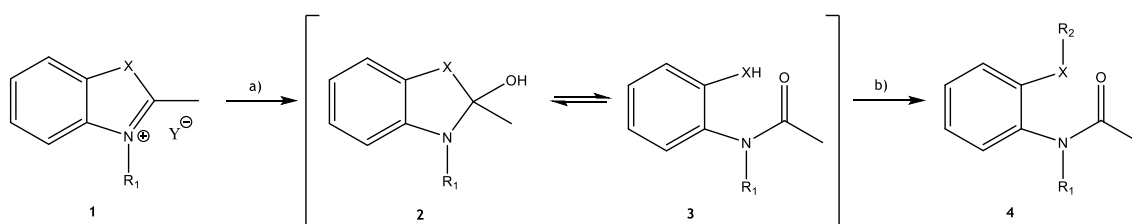
Os corantes cianínicos, conhecidos como cianinas, são uma classe bem conhecida de compostos orgânicos com um papel relevante na investigação devido às suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, tendo, deste modo, inúmeras aplicações em áreas tão distintas como a área da saúde e/ou área tecnológica.⁴⁶

Os sais *N*-alquil-2-metilbenzoazólio, devido à introdução de substituintes quer na parte aromática quer no átomo de azoto quaternário, são comumente utilizados na síntese de precursores de corantes cianínicos, estando estes associados à sua diversidade.

A síntese corrente destes sais, geralmente designados sais de amónio quaternários, consiste na fusão de 2-metilbenzoazoles com reagentes alquilantes adequados na presença ou ausência de solventes. No entanto, no decorrer da preparação de sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólio 1, observou-se que, em condições básicas, estes sais interagem com a água, indicando claramente uma transformação completa *in situ* da sua forma hidroxilada 2. Assim, tornou-se relevante a compreensão desta reação secundária de hidrólise de forma a evitar reações indesejáveis na síntese de cianinas.⁴⁷

No seguimento dos estudos para a clarificação da identidade dos intermediários resultantes da hidrólise de sais *N*-alquil-2-metilbenzoazólio, foi estudada a síntese de *orto*-(alquilcalcogénio)-*N*-acetanilidas (Esquema 1.4). Deste modo, a hidrólise de sais 3-alquil-2-

metilbenzotiazol-3-íio **1** foi efetuada em etanol a 96% na presença de trietilamina por refluxo, resultando na abertura do anel heterocíclico. A clivagem subsequente do grupo 2-hidroxiázole **2** e, sob condições de alquilação adequadas, os intermediários *N*-alquil-(2-hidrocalcogénio)acetanilidas **3** foram alquilados *in situ* originando as *orto*-(alquilcalcogénio)-*N*-alquilacetanilidas correspondentes **4**.^{48,49}



Esquema 1.4 - Síntese de *orto*-(alquilcalcogénio)-*N*-alquilacetanilidas **3**. Reagentes e condições: c) 1. NEt₃, EtOH a 96%, refluxo; 2. EtOH, NaOH, YR₃, refluxo.

As acetanilidas **4**, devido à rotação restrita da ligação *N*-arilo, comportam-se como atropisómeros enantioméricos à temperatura ambiente.⁴⁸ O atropisomerismo resulta da restrição de rotação de uma ligação simples, produzindo uma barreira energética suficientemente elevada que permite o isolamento ou apenas a deteção dos diferentes atropisómeros. Este fenómeno é caracterizado por uma atividade ótica promovida por um eixo de ligação, não necessitando que o composto apresente carbonos assimétricos como elemento de quiralidade.⁵⁰ Tal fenómeno já foi observado em acetanilidas formadas a partir da hidrólise básica de iodeto *N*-etil-2-metilbenzoxazólio e iodeto de *N*-etil-2-metilbenzotiazólio.⁵¹

As *orto*-(alquilcalcogénio)-*N*-alquilacetanilidas **4** apresentam esse efeito de atropisomerismo devido ao impedimento da rotação livre em torno da ligação *N*-arilo, que resulta na obtenção de dois enantiómeros (*R* e *S*) (Figura 1.11). Este fenómeno é bem evidenciado no espectro de ressonância magnética nuclear de protão (RMN de ¹H) pelos sinais dos dois protões geminais *N*-CH₂ magneticamente não equivalentes (Figura 1.12).⁴⁸

Além do atropisomerismo, estes compostos apresentam igualmente duas formas diastereoisoméricas que resultam da rotação impedida à volta da ligação amida (*N*-CO) (Figura 1.11). Este impedimento de rotação origina os diastereoisómeros *Z* e *E* (anel de benzeno na posição *cis* e *trans* em relação ao oxigénio do carbonilo, respetivamente), os quais são facilmente diferenciados por RMN de ¹H (Figura 1.12). Em geral, as anilidas *N*-substituídas existem predominantemente sob a forma do diastereoisómero *E* (≥ 96%).

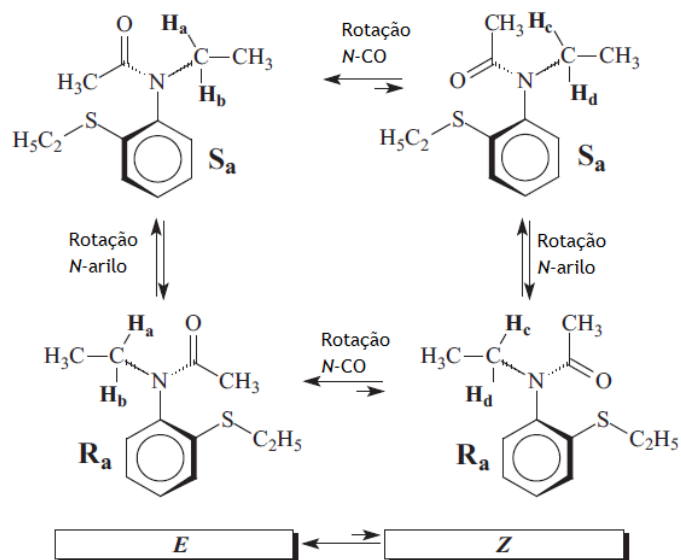


Figura 1.11 - Formas enantioméricas e diastereoisoméricas de uma acetanilida representativa resultante da rotação impedida em torno da ligação N-arilo e N-CO, respetivamente.⁴⁸

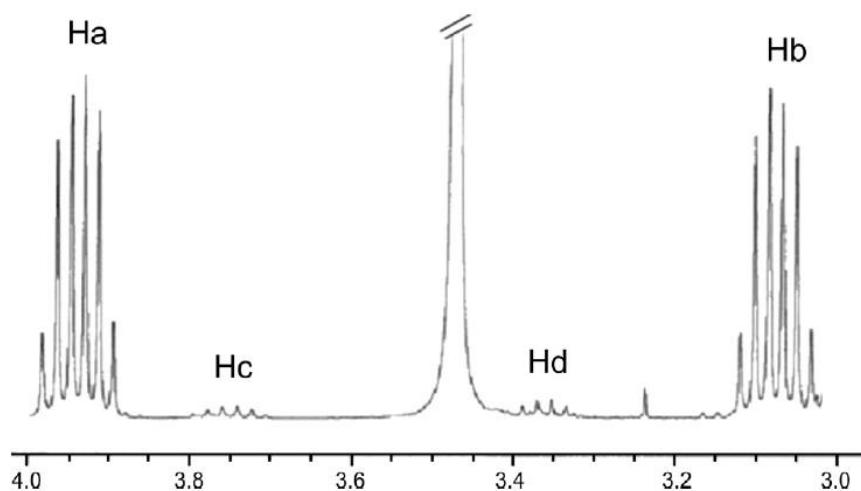


Figura 1.12 - Sinais de RMN de ^1H dos prótons N-metilénicos não equivalentes das formas diastereoisoméricas E (H_a e H_b) e Z (H_c e H_d) das acetanilidas 3.⁴⁸

Adicionalmente, Almeida e colaboradores avaliaram o efeito antiproliferativo *in vitro* de 18 acetanilidas com esta estrutura base contra fibroblastos normais da derme humana (NHDF - do inglês, *normal human dermal fibroblasts*), células do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP - do inglês, *lymph node carcinoma of the prostate*) e células MCF-7.⁴⁹

Os resultados obtidos revelaram que as acetanilidas estudadas apresentam baixa a moderada atividade antiproliferativa, sendo estas mais citotóxicas para as células LNCaP do que para as células MCF-7 e NHDF (Tabela 1.4).

Tabela 1.4 - Viabilidade celular das linhas celulares (LNCaP, MCF-7 e NHDF) incubadas com acetanilidas a uma concentração de 30 μ M, após 48 horas de exposição.^{Adaptado de 49}

X	R ₁	R ₂	LNCaP	MCF-7	NHDF
O	Et	Et	68,32 \pm 10,63	93,45 \pm 3,38	85,59 \pm 10,74
O	Et	Pr	74,29 \pm 10,14	92,54 \pm 3,64	83,97 \pm 6,84
O	Et	Hex	38,46 \pm 2,62	55,53 \pm 4,85	78,34 \pm 7,75
O	Et	Bn	52,97 \pm 4,41	88,84 \pm 2,70	75,77 \pm 2,96
O	Hex	Pr	45,86 \pm 2,01	51,52 \pm 9,41	84,34 \pm 5,20
O	Bn	Et	65,75 \pm 10,13	87,59 \pm 3,58	91,07 \pm 12,63
S	Et	Et	75,99 \pm 9,89	99,50 \pm 5,98	82,65 \pm 3,13
S	Et	Pr	59,74 \pm 4,03	89,14 \pm 7,94	76,19 \pm 6,36
S	Et	Hex	53,19 \pm 6,17	67,65 \pm 5,63	83,48 \pm 8,95
S	Et	Bn	51,71 \pm 5,02	95,33 \pm 7,97	79,17 \pm 7,78
S	Pr	Me	65,78 \pm 2,66	95,34 \pm 6,77	81,49 \pm 4,77
S	Hex	Pr	59,65 \pm 9,99	47,58 \pm 6,46	82,99 \pm 8,86
S	Bn	Et	62,44 \pm 3,19	89,37 \pm 5,62	80,05 \pm 6,03
S	Bn	Bn	52,63 \pm 6,08	79,81 \pm 5,21	96,68 \pm 12,68
S	MeBn	Et	41,85 \pm 1,75	77,00 \pm 7,68	75,21 \pm 6,90
S	MeBn	MeBn	39,03 \pm 2,59	13,71 \pm 4,71	79,02 \pm 10,39
Se	Et	Et	86,20 \pm 8,98	98,23 \pm 5,71	95,45 \pm 8,18
Se	Et	Hex	59,35 \pm 1,60	82,63 \pm 6,97	98,90 \pm 7,91
—	—	—	11,22 \pm 1,67	0,17 \pm 0,32	1,51 \pm 2,56

As acetanilidas **3** substituídas com grupos benzílicos, nomeadamente, benzilo e 2-metilbenzilo, e com grupo hexilo revelaram-se os compostos mais citotóxicos para ambas as linhas cancerígenas do que as acetanilidas congéneres metílicas, etílicas e propílicas (destaque da Tabela 1.4). Não obstante, verificou-se que a acetanilida dissustituída com grupos 2-metilbenzilos foi a acetanilida mais promissora. Adicionalmente, Almeida e colaboradores referiram que o desenvolvimento de novas acetanilidas hexílicas e/ou benzílicas era de interesse de forma a explorar a sua relação estrutura-atividade,⁴⁹ proposta

esta que foi o mote a partir do qual foram traçados os objetivos deste trabalho de dissertação que a seguir se apresentam. Assim, foram objetivos desta dissertação:

- Síntese de uma série de *orto*-(alquiltio)-*N*-acetanilidas a partir do 2-metilbenzotiazole. Com esta série pretende-se a introdução do grupo nitro e acetamida na posição 4 das acetanilidas e a introdução de grupos que potencialmente levasse a maior seletividade ligados ao grupo tio e/ou amida. Assim, por forma a aprofundar os estudos de relação estrutura-atividade anteriormente referidos foram escolhidos o grupo hexilo, metilenociclohexilo e 2,4-dimetilbenzilo com base nos estudos publicados na literatura e aqui revistos, nos quais se verificou a sua importância quando presentes em derivados da nimesulida no que diz respeito à atividade anti-cancerígena;
- Avaliação da viabilidade celular das acetanilidas sintetizadas em células normais NHDF em células cancerígenas LNCaP e MCF-7, através do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT);
- Determinação do IC₅₀ das acetanilidas que reduziram a proliferação celular para 40% ou menos em relação ao controlo negativo, nos diferentes tipos de células;
- Análise da morte celular e da viabilidade celular através do ensaio de citometria de fluxo com marcação com iodeto de propídio;
- Estudos de *docking* molecular das acetanilidas sintetizadas com alvos biológicos como a COX-2, aromatase, recetor de androgénios e recetor alfa de estrogénios, de forma a ter mais pistas sobre o seu potencial mecanismo de acção.

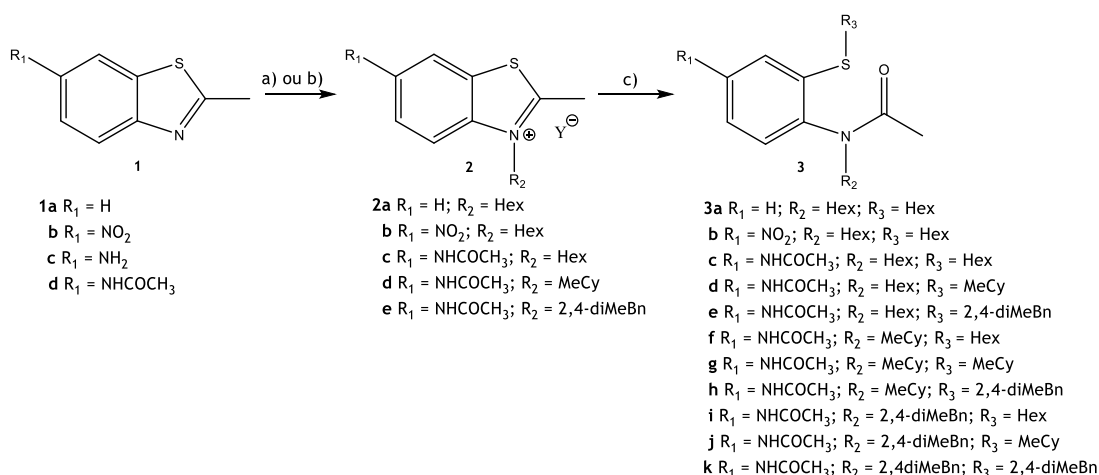
Capítulo 2 - Discussão de resultados

2.1 Síntese e caracterização estrutural

Tendo em conta a via sintética de preparação de *orto*-(alquilcalcogênio)acetanilidas **3** descrita por Almeida e colaboradores,^{48,49} e a sua similaridade com a nimesulida, esta dissertação tem como principal objetivo o desenvolvimento de novas *N*-alquil-(2-alquiltio)acetanilidas 4-substituídas **3** como potenciais agentes cancerígenos.

Assim, inicialmente, sintetizaram-se 2-metilbenzotiazóis 6-substituídos **1** e os seus sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólios **2** resultantes para posterior obtenção de novas *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas **3** (Esquema 2.1).

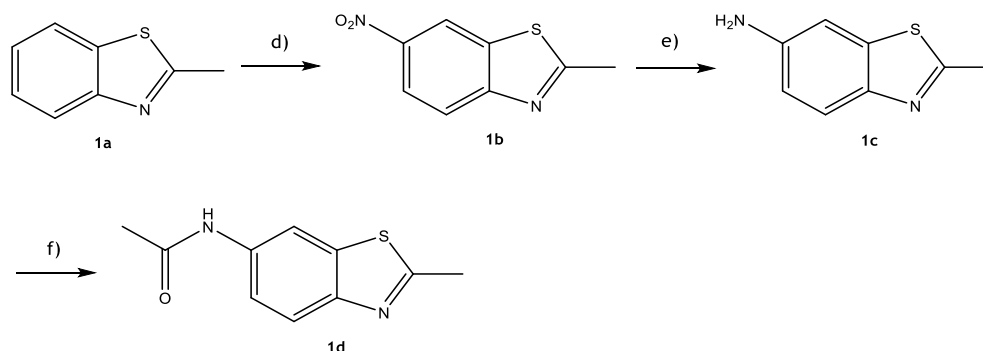
Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por infravermelho (IV), por RMN de ¹H e por ressonância magnética de carbono (RMN de ¹³C). A atribuição dos sinais de RMN de ¹H e de RMN de ¹³C baseou-se nos desvios químicos e multiplicidade (para o RMN de ¹H) e foi inequivocamente estabelecida com o auxílio da técnica de intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização (DEPT - do inglês, *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*), de correlação heteronuclear a uma ligação (HSQC - do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e de correlação heteronuclear a múltiplas ligações (HMBC - do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Para os sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólios **2** foi ainda determinado o seu ponto de fusão (pf).



Esquema 2. 1 - Via sintética para novas *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas **3**. Reagentes e condições: a) R₂Y, CH₃CN, refluxo; b) R₂Y, (105-120 °C); c) 1. NEt₃, EtOH a 96%, refluxo; 2. EtOH, NaOH, YR₃, refluxo.

2.1.1 Materiais de Partida

Com o objetivo de avaliar a influência de grupos R_1 de *orto*-(alquilcalcogênio)acetanilidas **3** em estudos posteriores de viabilidade celular, foi sintetizada uma série de 2-metilbenzotiazóis substituídos na posição 6 **1** (Esquema 2.2), tendo como finalidade a sua utilização como precursores dos sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazóis **2**.



Esquema 2.2 - Via sintética dos 2-metilbenzotiazóis **1**. Reagentes e condições: *d*) H_2SO_4 , HNO_3 , 0 °C-t.a.; *e*) $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, HCl , $MeOH$, refluxo; *f*) $(CH_3CO)_2$, $CHCl_3$, 0 °C.

O 2-metil-6-nitrobenzotiazole (**1b**) foi obtido pela nitração do 2-metilbenzotiazole (**1a**) na presença de ácido sulfúrico e ácido nítrico, de acordo com as condições reacionais descritas na literatura,⁵² substituindo-se apenas o ácido nítrico fumegante pelo ácido nítrico a 65%.

O 6-amino-2-metilbenzotiazole (**1c**) foi sintetizado a partir da redução do grupo nitro do 2-metil-6-nitrobenzotiazole (**1b**) à amina respectiva, na presença de cloreto de estanho di-hidratado. O 6-amino-2-metilbenzotiazole (**1c**) não foi utilizado na avaliação da influência de grupos R_1 , uma vez que, ao alquilar para obtenção do sal de benzotiazólio respectivo, o grupo amino deveria ser igualmente alquilado.

O 6-acetamida-2-metilbenzotiazole (**1d**) foi facilmente obtido a partir do 6-amino-2-metilbenzotiazole (**1c**) por acetilação da amina com anidrido acético.

Na Tabela 2.1 encontram-se descritas as características físicas e espectroscópicas de IV dos 2-metilbenzotiazóis **1**. Os rendimentos obtidos são bons a muito bons (64-86%), como seria de esperar, uma vez que estas sínteses estão amplamente descritas e otimizadas. Os pontos de fusão, embora apresentem intervalos bastante estreitos, não são próximos dos da literatura, o que sugere a presença de uma pequena contaminação. No entanto, os espectros de RMN de 1H e de ^{13}C demonstram que os compostos apresentam uma pureza superior a 95%. Não obstante, estes compostos são sintetizados exclusivamente como precursores para a obtenção de sais **2**, pelo que não houve necessidade de posteriores purificações.

Dos espectros de IV, é de salientar as bandas da vibração da ligação NO₂ a 1505 e 1331 cm⁻¹ e a 3375, 3314 e 1603 cm⁻¹ as bandas da vibração da ligação N-H do grupo amino. As bandas da vibração da ligação N-H e C=O do grupo acetamida evidenciam-se, respetivamente, a 3291 cm⁻¹ e 1664 cm⁻¹.

Tabela 2.1 - Características físicas e bandas representativas no IV dos 2-metilbenzotiazóis 1.

Composto	η (%)	pf (°C)	IV (cm ⁻¹)
1b	86	159-160,5 165 ⁵²	1505 (NO ₂), 1331 (NO ₂)
1c	64	114-116,5 122 ⁵³	3375 (NH ₂), 3314 (NH ₂), 1603 (NH ₂)
1d	80	144-145 149-150 ⁵⁴	3291 (NH), 1664 (C=O)

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C apresentam todos os sinais esperados teoricamente (Tabelas 2.2 e 2.3). Nos espectros de RMN de ¹H, destaca-se o acoplamento a quatro ligações entre os protões aromáticos 7 e 5, verificando-se um duplete com constante de acoplamento cerca de 2,2 Hz, devido ao acoplamento a longa distância com o protão 5, e um duplo duplete com constantes de acoplamento cerca de 8,8 Hz e 2,2 Hz, no intervalo de 8,75 a 6,71 ppm. Para além destes dois sinais, verifica-se um duplete correspondente ao protão aromático 4. O singuleto, no intervalo de 2,89 a 2,63 ppm, corresponde aos protões do grupo metilo ligado ao carbono 2-C. Dos grupos característicos de cada 2-metilbenzotiazole 1, é de salientar o singuleto a 5,27 ppm correspondente ao grupo amino do 6-amino-2-metilbenzotiazole (**1c**) e dois singuletos a 10,34 e 2,07 ppm, que correspondem, respetivamente, ao protão ligado ao azoto e aos protões do grupo metilo da acetamida **1d**.

Tabela 2.2 - RMN de ¹H dos 2-metilbenzotiazóis 1.

RMN de ¹ H		7-ArH	5-ArH	4-ArH	2-CH ₃	R ₁
1b	Multiplicidade δ (ppm)	d 8,75	dd 8,31	d 8,01	s 2,89	—
	J (Hz)	2,3	8,9; 2,3	8,9	—	—
literatura ⁵⁵		9,09	8,29	8,08	2,89	—
1c	Multiplicidade δ (ppm)	d 7,00	dd 6,71	d 7,52	s 2,65	s 5,27
	J (Hz)	2,2	8,6; 2,2	8,6	—	—
literatura ⁵⁵		7,11	6,84	7,64	2,63	5,24
1d	Multiplicidade δ (ppm)	d 8,39	dd 7,48	d 7,81	s 2,75	s 10,14 s 2,07
	J (Hz)	2,0	8,8; 2,1	8,7	—	—
literatura ⁵⁴		8,40	7,50	7,80	2,74	10,34 2,07

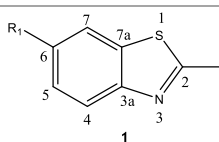
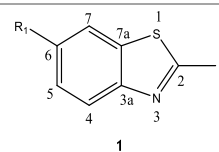


Tabela 2.3 - RMN de ¹³C dos 2-metilbenzotiazóis 1.

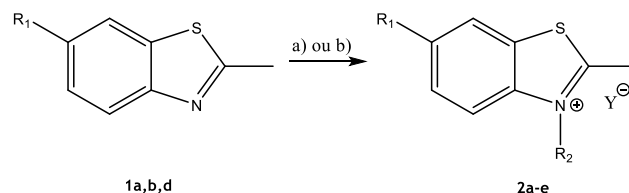
RMN de ¹³ C	7a-C	7-ArCH	6-C	5-ArCH	4-ArCH	3a-C	2-C	2-CH ₃	R ₁
1b	135,77	117,71	144,49	121,25	122,35	156,86	173,05	20,41	—
literatura ⁵⁶	135,4	118,3	143,6	120,7	121,7	156,2	173,6	20,0	—
1c	136,76	104,06	146,65	114,37	122,09	144,57	160,02	19,40	—
literatura ⁵⁶	136,4	103,9	146,2	114,1	121,7	144,3	159,5	19,4	—
1d	135,76	111,20	136,41	118,24	121,82	148,88	165,31	19,64	168,48 24,04
literatura ⁵⁶	135,5	111,0	136,1	118,1	121,5	148,6	164,8	19,6	168,0 24,0



2.1.2 Sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazóis

Com base nos estudos realizados por Almeida e colaboradores,⁴⁹ os sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazóis 2 foram sintetizados com o objetivo de introduzir grupos alquilo mais seletivos para os estudos de viabilidade celular. Deste modo, foram escolhidos os grupos hexilo, metilenociclohexilo e 2,4-dimetilbenzilo como grupos alquilo R₂, tendo em conta o seu papel destes grupos na maior atividade anticancerígena observada em análogos da nimesulida.

Os sais de benzotiazólio **2** foram obtidos a partir da *N*-alquilação pelo método de fusão ou por refluxo em acetonitrilo, de acordo com os métodos frequentemente utilizados para a obtenção de sais de amónio quaternário (Esquema 2.3).⁵⁷



Esquema 2.3 - Sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólios **2**. Reagentes e condições: a) R_2Y , CH_3CN , refluxo; b) R_2Y , (105-120 °C).

As características físicas e espectroscópicas de IV dos sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólios **2** estão apresentados na Tabela 2.4. Estes compostos foram obtidos com rendimentos baixos a moderados (16-71%), tendo-se como objetivo otimizar as sínteses por forma a aumentar os rendimentos dos mesmos. Não existem referências relativas aos pontos de fusão, uma vez que os sais de benzotiazólio **2** sintetizados são compostos novos. No entanto, o intervalo de fusão é estreito, indicativo de elevada pureza, que foi confirmado pelos espectros de RMN.

Tabela 2.4 - Tempos de reação, características físicas e bandas representativas no IV dos sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólios **2**.

Composto	Tempo de reação (h)	η (%)	pf (°C)	IV (cm^{-1})
2b	72	16	202-203,5	1508 (NO_2), 1344 (NO_2), 1192 (S=O)
2c	25	63	187-189	1685 (C=O), 1181 (S=O)
2d	120	25	247-249	1669 (C=O)
2e	24	71	182-183,5	1658 (C=O)

Dos espectros de IV, destacam-se as bandas de vibração da ligação NO_2 a 1508 e 1344 cm^{-1} do *p*-toluenossulfonato de 3-hexil-2-metil-6-nitrobenzotiazol-3-íio (**2b**). Os diferentes sais **2c-e**, com grupo acetamida, apresentam a banda de vibração da ligação C=O entre 1685 a 1658 cm^{-1} . Adicionalmente, o contra-íão *p*-toluenossulfonato (Ts) dos sais **2b** e **2c** apresenta, respetivamente, uma banda de vibração característica da ligação S=O do íão sulfonato a 1192 cm^{-1} e 1181 cm^{-1} .

Comparando a *N*-alquilação do 2-metil-6-nitrobenzotiazole (**1b**) e do 6-acetamida-2-metilbenzotiazole (**1d**) com o *p*-toluenossulfonato de hexilo, destaca-se que o rendimento obtido do sal **2c** com grupo acetamida é significativamente mais elevado do que o obtido para o congêneres **2b**. Não obstante, verifica-se que o tempo de reação necessário para sintetizar o sal **2b** é bastante superior comparativamente ao do sal **2c**. Assim, conclui-se que a *N*-alquilação do 6-acetamida-2-metilbenzotiazole (**1d**) é mais fácil de realizar comparativamente com a do 2-metil-6-nitrobenzotiazole (**1b**), o que seria de esperar tendo em conta o efeito eletroatrator e desativador do grupo nitro.

Nas Tabelas 2.5 e 2.6 estão apresentados os espectros de RMN de ¹H e de RMN de ¹³C relativos à estrutura base dos sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólios **2** sintetizados. No espectro de RMN de ¹H, verifica-se igualmente o acoplamento a quatro ligações entre os prótons aromáticos 7 e 5. Desta forma, no intervalo de 9,41 a 7,78 ppm, verifica-se um duplete com constante de acoplamento de 2,0 Hz, um duplo duplete e um duplete com constantes de acoplamento de 8,2 a 9,3 Hz e um duplete com constante de acoplamento de 9 Hz. O grupo metilo ligado ao carbono 2-C apresenta um singuleto no intervalo de 3,28 a 3,09 ppm. Adicionalmente, os sais **2c-e** com grupo acetamida apresentam dois singuletos a 10,60 ppm e 2,10 ppm, correspondentes ao próton ligado ao azoto e aos prótons do grupo metilo deste grupo característico. No espectro de RMN de ¹³C os sinais obtidos são os esperados teoricamente, evidenciando-se os carbonos aromáticos no intervalo de 124 a 112 ppm, o carbono do grupo metilo de 17 a 16 ppm e o carbono do carbonilo e do grupo metilo da acetamida a 169 ppm e 24 ppm, respetivamente.

Tabela 2.5 - RMN de ¹H da estrutura base dos sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólios **2**.

RMN de ¹ H		7-ArH	5-ArH	4-ArH	2-CH ₃	R ₁
2b	Multiplicidade δ (ppm)	d 9,41	dd 8,63	d 8,57	3,28	—
	<i>J</i> (Hz)	2,4	9,3; 2,3	9,3	—	—
2c	Multiplicidade δ (ppm)	d 8,72	dd 7,79	d 8,15	3,09	s 10,58 s 2,10
	<i>J</i> (Hz)	2,0	9,2; 2,1	8,2	—	—
2d	Multiplicidade δ (ppm)	d 8,85	dd 7,84	d 8,29	3,16	s 10,60 s 2,14
	<i>J</i> (Hz)	2,0	9,2; 2,1	9,2	—	—
2e	Multiplicidade δ (ppm)	d 8,91	dd 7,78	d 7,96	s 3,09	s 10,65 s 2,12
	<i>J</i> (Hz)	2,0	9,1; 2,3	9,2	—	—

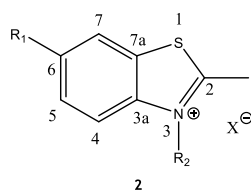
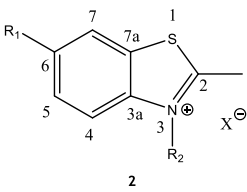


Tabela 2.6 - RMN de ^{13}C da estrutura base dos sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólios 2.

						
RMN de ^{13}C	7-ArCH	5-ArCH	4-ArCH	2-CH ₃	NHCOCH ₃	NHCOCH ₃
2b	121,79	124,23	118,12	17,52	—	—
2c	112,78	121,78	117,10	16,57	24,08	169,09
2d	112,70	120,93	117,57	17,08	24,08	169,07
2e	113,15	121,38	117,35	17,02	24,14	169,26

Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C relativos aos grupos *N*-alquilo podem ser visualizados nas Tabelas 2.7, 2.8 (*N*-hexilo), 2.9 (*N*-metilenociclohexilo) e 2.10 [*N*-(2,4-dimetilbenzilo)].

Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C confirmam o grupo hexilo e o contra-ção *p*-toluenossulfonato nos sais *p*-toluenossulfonato de 3-hexil-2-metil-6-nitrobenzotiazol-3-íio (2b) e *p*-toluenossulfonato de 6-acetamida-3-hexil-2-metilbenzotiazol-3-íio (2c). O grupo *N*-hexilo apresenta dois tripletos, correspondentes aos prótons do metileno ligado ao átomo azoto (4,75 a 4,58 ppm) e aos prótons do grupo metilo (0,87 a 0,81 ppm), e dois quintetos relativos aos prótons dos metilenos que antecedem o metileno ligado ao átomo de azoto. Relativamente ao contra-ção, destacam-se os dois dupletos no intervalo de 7,48 a 7,07 ppm correspondentes aos prótons aromáticos do contra-ção *p*-toluenossulfonato, verificando-se a simetria da mesma; e o singuleto correspondente aos prótons do grupo metilo.

Tabela 2.7 - RMN de ^1H do grupo R₂ hexilo e do seu contra-ção *p*-toluenossulfonato.

N-hexilo (NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃)							Ts	
RMN de ^1H	NCH ₂	CH ₂	CH ₂	CH ₂	CH ₂	CH ₃	ArH	Ar-CH ₃
2b	Multiplicidade δ (ppm)	t 4,75	qt 1,83	qt 1,43	m 1,32-1,26	t 0,87	d 7,45 d 7,07	s 2,26
2c	Multiplicidade δ (ppm)	t 4,58	qt 1,78	qt 1,36	m 1,30-1,17	t 0,81	d 7,48 d 7,10	s 2,24

Tabela 2.8 - RMN de ^{13}C do grupo R_2 hexilo e do seu contra-íon *p*-toluenossulfonato.

N-hexilo ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)							Ts	
RMN de ^{13}C	NCH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_3	ArH	Ar- CH_3
2b	49,83	27,70	25,51	30,81 21,98	13,89	125,45	20,77	
2c	49,15	27,82	25,82	30,77 21,97	13,88	125,48	20,78	

Nos dados espectroscópicos de RMN de ^1H relativos ao grupo N-metilenociclohexilo do sal brometo de 6-acetamida-3-(ciclohexilmetil)-2-metil-benzotiazol-3-íon (**2d**), verifica-se um duplete correspondente aos prótons do metileno ligado ao átomo de azoto, um multiplete correspondente ao próton do grupo metino e um multiplete que corresponde aos prótons do $4'$ - CH_2 . Os restantes prótons não se conseguem identificar inequivocamente; no entanto, pela integração confirma-se a estrutura pretendida. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta todos os sinais esperados.

Tabela 2.9 - RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C do grupo R_2 metilenociclohexilo.

2d	RMN de ^1H	RMN de ^{13}C
	Multiplicidade δ (ppm)	
NCH_2	d 4,55	54,49
$1'$ -CH	m 2,03-1,90	36,99
$4'$ - CH_2	m 1,63-1,57	25,51
$2'$ - CH_2	m 1,75-1,63 m 157-1,53 m 1,22-1,04	29,51 25,08
$3'$ - CH_2		
$5'$ - CH_2		
$6'$ - CH_2		

No que diz respeito aos dados espectroscópicos de RMN de ^1H do grupo R_2 2,4-dimetilbenzilo, este apresenta um singuleto correspondente ao metileno ligado ao átomo de azoto. Os dois dupletos e o singuleto no intervalo de 7,13 a 6,19 ppm são referentes aos prótons aromáticos. Os grupos metilos encontram-se a 2,43 e 2,21 como singuletos. Os dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C confirmam o grupo alquilo pretendido.

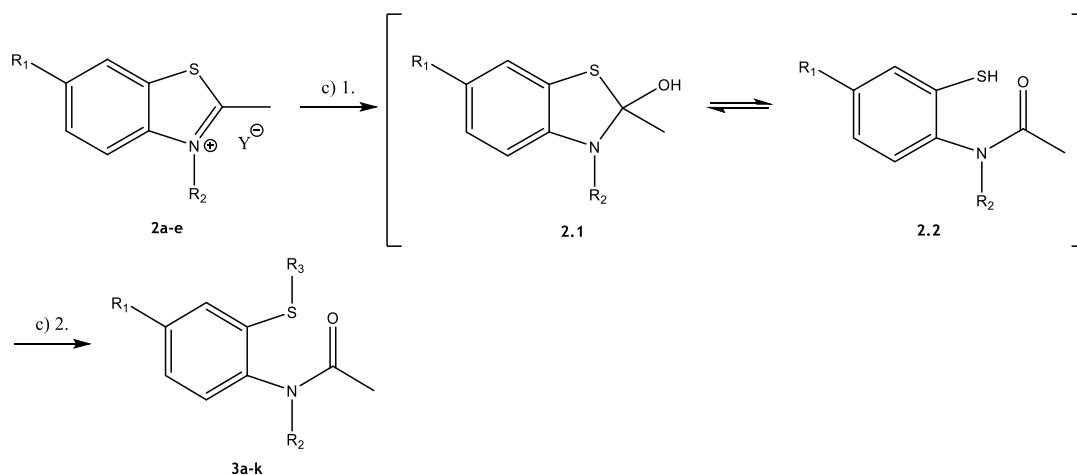
Tabela 2.10 - RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C do grupo R_2 2,4-dimetilbenzilo.

2e	RMN de ^1H	RMN de ^{13}C
	Multiplicidade δ (ppm)	
NCH_2	s 5,93	50,36
3'-ArCH	s 7,13	131,52
5'-ArCH	d 6,84	127,03
6'-ArCH	d 6,19	123,88
2'-Ar- CH_3	s 2,43	20,56
4'-Ar- CH_3	s 2,21	18,94

2.1.3 *Orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas

A partir dos sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólios **2**, sintetizaram-se as *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas **3** pelo método geral descrito na literatura para sais 2-metilbenzoazólios.⁴⁸

Deste modo, procedeu-se à hidrólise dos sais **2** em etanol a 96% e na presença de trietilamina, originando o intermediário *N*-alquil-(2-tiol)acetanilida **2.2** resultante da abertura do anel **2.1** formado inicialmente. Este intermediário **2.2** foi alquilado *in situ*, obtendo-se assim as *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas **3** pretendidas (Esquema 2.4).



Esquema 2.4 - Via sintética das *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas **3**. Reagentes e condições: c) 1. NEt_3 , EtOH a 96%, refluxo; 2. EtOH, NaOH, YR_3 , refluxo.

As *orto*-(alquiltio)-*N*-acetanilidas **3** foram obtidas com baixos a moderados rendimentos (17 a 69%), não otimizados. Relativamente aos espectros de IV, evidencia-se em todas as acetanilidas **3** a banda de vibração da ligação C=O a 1600 cm⁻¹. As bandas de vibração da ligação NO₂ e da ligação N-H do grupo acetamida são também evidentes, respetivamente, a 1519 e 1344 cm⁻¹ e entre 3300 a 3200 cm⁻¹ (Tabela 2.11).

Nas Tabelas 2.12 e 2.13 encontram-se os dados espetroscópicos de RMN de ¹H e de RMN de ¹³C relativos à estrutura base das *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas **3** sintetizadas. Tendo em conta que a *N*-hexil-*N*-[2-(hexiltio)fenil]acetamida (**3a**) apresenta um protão na posição 4, no seu espetro de RMN de ¹H verificam-se dois dupletos e dois tripletos dos quatro protões aromáticos no intervalo de 7,26 a 7,08 ppm. Nas restantes *orto*-(alquiltio)-*N*-acetanilidas **3b-k**, verifica-se novamente o acoplamento a quatro ligações entre os protões aromáticos 7 e 5, do qual resulta dois dupletos e um duplo duplete no intervalo de 8 a 6,4 ppm. O grupo metilo ligado ao carbono 2-C apresenta um singuleto entre 1,82 a 1,73 ppm. As acetanilidas **3c-k** com grupo acetamida na posição 4 evidenciam dois singuletos correspondentes ao protão ligado ao átomo de azoto (zona de 8 ppm) e aos protões do grupo metilo (zona de 2,2 ppm) do respetivo grupo característico. No espetro de RMN de ¹³C destaca-se que os sinais respetivos a cada carbono se encontram no mesmo desvio químico, nomeadamente, os carbonos aromáticos entre 115 e 130 ppm, o grupo metilo da acetanilida na zona dos 22 ppm e, quando aplicável, o carbonilo e o grupo metilo da acetamida entre 169,23 e 168,76 e na zona dos 24 ppm, respetivamente.

Tabela 2.11 - Tempos de reação, características físicas e bandas representativas no IV das *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas 3.

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	Tempos de reação		η (%)	IV (cm ⁻¹)
				Passo 1 (min)	Passo 2 (h)		
3a	H	Hex	Hex	45	3	17	1660 (C=O)
3b	NO ₂	Hex	Hex	70	5	41	1659 (C=O), 1519 (NO ₂), 1344 (NO ₂)
3c	NHCOCH ₃	Hex	Hex	45	5	69	3307-3269 (NH), 1665 (C=O), 1632 (C=O)
3d		Hex	MeCy	45	7	54	3307-3268 (NH), 1664 (C=O), 1632 (C=O)
3e		Hex	2,4-diMeBn	60	2	56	3299-3265 (NH), 1663 (C=O), 1631 (C=O)
3f		MeCy	Hex	75	7	47	3293-3269 (NH), 1667 (C=O), 1634 (C=O)
3g		MeCy	MeCy	60	6	42	3303-3265 (NH), 1665 (C=O), 1633 (C=O)
3h		MeCy	2,4-diMeBn	30	3	53	3301-3265 (NH), 1666 (C=O), 1633 (C=O)
3i		2,4-diMeBn	Hex	75	2	27	3305-3269 (NH), 1661 (C=O), 1634 (C=O)
3j		2,4-diMeBn	MeCy	45	4	60	3304-3268 (NH), 1662 (C=O), 1633 (C=O)
3k		2,4-diMeBn	2,4-diMeBn	60	3	19	3247 (NH), 1694 (C=O)

Tabela 2.12 - RMN de ¹H da estrutura base das *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas 3.

RMN de ¹ H		3-ArH	4-ArH	5-ArH	6-ArH	NCOCH ₃	R ₁
3a	Multiplicidade δ (ppm)	d 7,26	td 7,32	td 7,15	d 7,08	s 1,77	—
	J (Hz)	7,0	7,7; 1,1	7,6; 1,2	7,6	—	—
3b	Multiplicidade δ (ppm)	d 8,08	—	dd 8,00	d 7,26	s 1,79	—
	J (Hz)	2,5	—	8,5; 2,5	8,3	—	—
3c	Multiplicidade δ (ppm)	d 7,69	—	dd 7,16	d 7,00	s 1,78	s 7,76 s 2,20
	J (Hz)	2,3	—	8,4; 2,3	8,4	—	—
3d	Multiplicidade δ (ppm)	d 7,72	—	dd 7,21	d 6,98	s 1,78	s 8,31 s 2,20
	J (Hz)	2,2	—	8,4; 2,3	8,4	—	—
3e	Multiplicidade δ (ppm)	d 7,89	—	dd 7,27	d 9,96	s 1,73	s 8,52 s 2,18
	J (Hz)	2,3	—	8,5; 2,0	7,6	—	—
3f	Multiplicidade δ (ppm)	d 7,71	—	dd 7,21	d 7,00	s 1,81	s 8,13 s 2,21
	J (Hz)	2,3	—	8,4; 2,3	8,4	—	—
3g	Multiplicidade δ (ppm)	d 7,71	—	dd 7,21	d 6,99	s 1,79	s 8,27 s 2,19
	J (Hz)	2,2	—	8,5; 2,2	8,4	—	—
3h	Multiplicidade δ (ppm)	d 7,85	—	dd 7,25	d 7,00	m 1,79- 1,49	s 8,09 s 2,19
	J (Hz)	2,3	—	7,8; 2,0	8,5	—	—
3i	Multiplicidade δ (ppm)	d 7,70	—	a)	d 6,44	s 1,82	s 7,40 s 2,17
	J (Hz)	2,3	—	—	8,4	—	—
3j	Multiplicidade δ (ppm)	d 7,73	—	dd 6,90	d 6,44	s 1,82	s 7,30 s 2,16
	J (Hz)	2,3	—	8,4; 2,3	8,4	—	—
3k	Multiplicidade δ (ppm)	d 7,90	—	dd 6,95	d 6,43	s 1,77	s 8,00 s 2,16
	J (Hz)	2,3	—	8,5; 1,9	8,4	—	—

a) Sobreposição de sinais

Tabela 2.13 - RMN de ^{13}C da estrutura base das *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas 3.

3

RMN de ^{13}C	3-ArCH	4-ArCH	5-ArCH	6-ArCH	NCOCH ₃	NCOCH ₃	NHCOCH ₃	NHCOCH ₃
3a	126,05	128,73	125,22	129,75	22,51	170,73	—	—
3b	120,38	—	120,01	130,46	22,49	169,64	—	—
3c	116,96	—	116,18	129,54	22,42	171,43	24,61	169,23
3d	116,97	—	116,01	129,65	22,48	171,24	24,69	169,00
3e	117,98	—	116,71	a)	22,41	171,13	24,63	169,14
3f	117,15	—	116,26	129,68	22,22	172,52	24,64	169,19
3g	117,10	—	116,08	129,72	22,50	171,19	24,71	168,98
3h	118,18	—	116,75	a)	22,49	171,52	24,67	169,03
3i	116,60	—	115,69	a)	22,34	171,23	24,70	168,93
3j	116,62	—	115,54	a)	22,39	171,11	24,77	168,76
3k	117,84	—	116,29	a)	22,33	170,97	24,75	168,85

a) Indefinido

Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C com grupo R_2 hexilo apresentam os sinais teoricamente esperados (Tabelas 2.14 e 2.15). Pela análise dos dados de RMN de ^1H , verifica-se, devido ao impedimento da rotação livre em torno da ligação *N*-hexilo, a ocorrência do efeito de atropisomerismo nos prótons do carbono ligado ao átomo azoto representados por dois duplos duplos dupletos no intervalo a 4,06 ppm e 3,00 ppm. Para além do efeito de atropisomerismo, destaca-se o tripleto a 0,83 ppm correspondente aos prótons do grupo metilo do *N*-hexilo. No espectro de RMN de ^{13}C , é de destacar entre 47,87 e 47,61 ppm o sinal correspondente ao carbono ligado ao átomo de azoto e na zona dos 14 ppm o carbono do grupo metilo do *N*-hexilo.

Tabela 2.14 - RMN de ^1H do grupo R_2 hexilo.

N-hexilo ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)							
RMN de ^1H		NCH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_3
3a	Multiplicidade δ (ppm)	ddd 4,06 ddd 3,10	a)				b)
3b	Multiplicidade δ (ppm)	ddd 4,05 ddd 3,14	a)				b)
3c	Multiplicidade δ (ppm)	ddd 4,03 ddd 3,08	a)				b)
3d	Multiplicidade δ (ppm)	ddd 4,03 ddd 3,08	a)				t 0,84
3e	Multiplicidade δ (ppm)	ddd 3,96 ddd 3,00	m 1,55-1,33	m 1,31-1,10			t 0,83

- a) Sobreposição de sinais
b) Indefinido

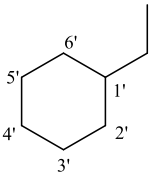
Tabela 2.15 - RMN de ^{13}C do grupo R_2 hexilo.

N-hexilo ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)						
RMN de ^{13}C	NCH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_3
3a	47,61	a)				
3b	47,48	a)				
3c	47,77	a)				14,09
3d	47,68	a)				14,14
3e	47,87	27,93	31,69 26,77 22,67			14,12

- a) Indefinido

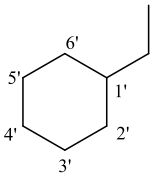
Nas tabelas 2.16 e 2.17 estão representados os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C das acetanilidas com grupo R_2 metilenciclohexilo. No espectro de RMN de ^1H , destaca-se novamente o efeito de atropisomerismo relativo aos prótons do carbono ligado ao átomo de azoto representado pelos dois duplos dupletos a 3,96 ppm e 2,77 ppm. Adicionalmente, identifica-se o multiplete entre 1,48 e 1,36 ppm correspondente ao $1'$ -H. Os restantes prótons não se conseguem identificar inequivocamente devido a sobreposição de sinais; no entanto, confirmam-se as estruturas pretendidas em número de prótons. Nos dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C , destaca-se o carbono ligado ao átomo de azoto e o $1'$ -C na região dos 53 ppm e 36 ppm, respetivamente.

Tabela 2.16 - RMN de ^1H do grupo R_2 metilenociclohexilo.

N-metilenociclohexilo								
								
RMN de ^1H		NCH_2	$1'\text{-CH}$	$2'\text{-CH}_2$	$3'\text{-CH}_2$	$4'\text{-CH}_2$	$5'\text{-CH}_2$	$6'\text{-CH}_2$
3f	Multiplicidade δ (ppm)	dd 4,00 m 2,96-2,87	m 1,51-1,37	a)				
3g	Multiplicidade δ (ppm)	dd 4,01 dd 2,89	m 1,53-1,39	a)				
3h	Multiplicidade δ (ppm)	dd 3,96 dd 2,77	m 1,48-1,36	m 1,79-1,49 m 1,17-1,07 m 1,04-0,82				

a) Sobreposição de sinais

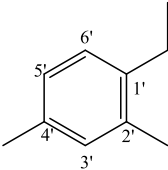
Tabela 2.17 - RMN de ^{13}C do grupo R_2 metilenociclohexilo.

N-metilenociclohexilo								
								
RMN de ^{13}C		NCH_2	$1'\text{-CH}$	$2'\text{-CH}_2$	$3'\text{-CH}_2$	$4'\text{-CH}_2$	$5'\text{-CH}_2$	$6'\text{-CH}_2$
3f		53,48	36,52	a)				
3g		53,26	36,58	a)				
3h		53,38	36,54	31,19 30,97 26,53 25,98 25,95				

a) Indefinido

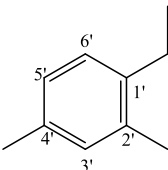
Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C relativos às acetanilidas com o grupo N -(2,4-dimetilbenzilo), embora não seja possível defini-los inequivocamente, apresentam-se com o esperado teoricamente (Tabelas 2.18 e 2.19). O efeito de atropisomerismo também se verifica nos prótons do carbono ligado ao átomo de azoto devido ao impedimento da rotação da ligação N -(2,4-dimetilbenzilo), representada por dois dupletos a 5,52 ppm e 4,03 ppm. Para além disso, é de destacar os dois singletos a 2,25 ppm e 2,05 ppm correspondentes aos prótons dos metilenos do grupo R_2 . Os dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C verificam-se concordantes para as três acetanilidas com grupo R_2 (2,4-dimetilbenzilo) nomeadamente o carbono ligado ao átomo de azoto na região dos 47 ppm, o $3'\text{-C}$ a 131,01 ppm e os carbonos dos grupos metilos na zona dos 21 ppm e dos 19 ppm.

Tabela 2.18 - RMN de ^1H do grupo R_2 2,4-dimetilbenzilo.

N-(2,4-dimetilbenzilo)						
						
RMN de ^1H		NCH ₂	3'-ArH	5'-ArH	6'-ArH	2'-Ar-CH ₃ 4'-Ar-CH ₃
3i	Multiplicidade δ (ppm)	d 5,52 d 4,15	s 6,85		d 6,96 d 6,83	s 2,25 s 2,06
3j	Multiplicidade δ (ppm)	d 5,51 d 4,16	s 6,86		d 6,97 d 6,83	s 2,24 s 2,05
3k	Multiplicidade δ (ppm)	d 5,45 d 4,03	s 6,85		a)	

a) Indefinido

Tabela 2.19 - RMN de ^{13}C do grupo R_2 2,4-dimetilbenzilo.

N-(2,4-dimetilbenzilo)						
						
RMN de ^{13}C	NCH ₂	3'-ArH	5'-ArH	6'-ArH	2'-Ar-CH ₃	4'-Ar-CH ₃
3i	46,98	131,01		a)	21,12 19,12	
3j	46,93	131,01		a)	21,14 19,13	
3k	47,24	131,01			a)	

a) Indefinido

Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C das acetanilidas com grupo R_3 hexilo encontram-se descritos nas Tabelas 2.20 e 2.21. No RMN de ^1H , evidenciam-se dois tripletos na zona dos 3 ppm e 0,90 ppm relativos, respetivamente, aos protões do carbono ligado ao átomo de enxofre e aos protões do grupo metilo do S-hexilo. Os dois quintetos entre 1,73 e 1,68 ppm e a 1,47 ppm correspondem aos protões dos metilenos que antecedem o carbono ligado ao átomo de enxofre, verificando-se apenas na acetanilida 3i o último sinal. Nos dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C , evidencia-se o átomo de carbono ligado ao átomo de enxofre, assim como o carbono do grupo metilo do S-hexilo na zona dos 31 ppm e dos 14 ppm, respetivamente.

Tabela 2.20 - RMN de ^1H do grupo R_3 hexilo.

S-hexilo ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)							
RMN de ^1H		SCH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_3
3a	Multiplicidade δ (ppm)	t 3,01	qt 1,68	a)		b)	
3b	Multiplicidade δ (ppm)	t 3,01	qt 1,73	a)		b)	
3c	Multiplicidade δ (ppm)	t 2,91	qt 1,69	a)		b)	
3f	Multiplicidade δ (ppm)	m 2,96-2,87	qt 1,69	a)		t 0,87	
3i	Multiplicidade δ (ppm)	t 2,92	qt 1,70	qt 1,47	m 1,38-1,26		t 0,90

- a) Sobreposição de sinais
b) Indefinido

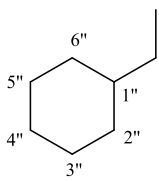
Tabela 2.21 - RMN de ^{13}C do grupo R_3 hexilo.

S-hexilo ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)						
RMN de ^{13}C	SCH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_2	CH_3
3a	31,37	a)				
3b	31,37	a)				
3c	31,32	a)				14,09
3f	31,39	a)				14,12
3i	31,38	28,52	28,75	31,48 22,64		14,14

- a) Indefinido

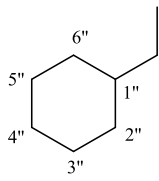
Os espectros de RMN de ^1H relativos ao grupo R_3 metilenociclohexilo evidenciam essencialmente dois sinais, nomeadamente o duplete a 2,80 ppm, que corresponde aos prótons do carbono ligado ao átomo de enxofre, e o multiplete correspondente ao $1''\text{-H}$ (Tabela 2.22). O espectro de RMN de ^{13}C apresenta os sinais teoricamente esperados, nomeadamente o carbono ligado ao átomo de enxofre e o carbono do grupo metino na zona dos 38 ppm e dos 37 ppm, respetivamente (Tabela 2.23).

Tabela 2.22 - RMN de ^1H do grupo R_3 metilenociclohexilo.

S-metilenociclohexilo								
								
RMN de ^1H		SCH ₂	1''-CH	2''-CH ₂	3''-CH ₂	4''-CH ₂	5''-CH ₂	6''-CH ₂
3d	Multiplicidade δ (ppm)	d 2,79	m 1,61- 1,38	a)				
3g	Multiplicidade δ (ppm)	d 2,79	m 1,77- 1,54	a)				
3j	Multiplicidade δ (ppm)	d 2,80	m 1,63- 1,54	m 1,97-1,86 m 1,78-1,62 m 1,32-1,11 m 1,10-0,97				

a) Sobreposição de sinais

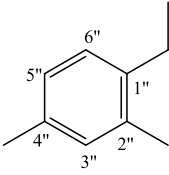
Tabela 2.23 - RMN de ^{13}C do grupo R_3 metilenociclohexilo.

S-metilenociclohexilo								
								
RMN de ^{13}C		SCH ₂	1''-CH	2''-CH ₂	3''-CH ₂	4''-CH ₂	5''-CH ₂	6''-CH ₂
3d		38,62	37,24	a)				
3g		38,65	37,26	a)				
3j		38,64	37,30	33,12 33,07 26,37 26,15				

a) Indefinido

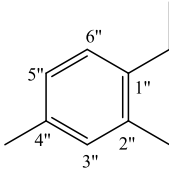
Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C das acetanilidas com grupo S-(2,4-dimetilbenzilo) apresentam os sinais esperados teoricamente (Tabelas 2.24 e 2.25). No espectro de RMN de ^1H , destaca-se os três singletos a 4 ppm, a 2,34 ppm e a 2,27 ppm correspondentes aos prótons do carbono ligado ao átomo de enxofre e aos prótons dos grupos metilos do 2,4-dimetilbenzilo, respetivamente. No espectro de RMN de ^{13}C destacam-se os mesmos sinais, encontrando-se sempre no mesmo desvio químico; nomeadamente o carbono do metileno ligado ao átomo de enxofre a 34,8 ppm, o 3''-C a 131,6 ppm e os carbonos dos dois grupos metilos a 21,1 ppm e 19,2 ppm.

Tabela 2.24 - RMN de ^1H do grupo R_3 2,4-dimetilbenzilo.

S-(2,4-dimetilbenzilo)						
						
RMN de ^1H		SCH ₂	3''-ArH	5''-ArH	6''-ArH	2''-Ar-CH ₃ / 4''-Ar-CH ₃
3e	Multiplicidade δ (ppm)	s 4,09	s 6,97	d 7,13 d 6,91		s 2,34 s 2,27
3h	Multiplicidade δ (ppm)	s 4,09	s 6,97	d 7,13 d 6,91		s 2,34 s 2,27
3k	Multiplicidade δ (ppm)	s 4,10	s 6,97	a)		

a) Sobreposição de sinais

Tabela 2.25 - RMN de ^{13}C do grupo R_3 2,4-dimetilbenzilo.

S-(2,4-dimetilbenzilo)						
						
RMN de ^{13}C	SCH ₂	3''-ArH	5''-ArH	6''-ArH	2''-Ar-CH ₃	4''-Ar-CH ₃
3e	34,75	131,57	a)		21,12 19,19	
3h	34,81	131,58	a)		21,13 19,23	
3k	34,80	131,63	a)			

a) Indefinido

Assim, conclui-se que todas as acetanilidas foram sintetizadas e caracterizadas por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , assim como por IV, sendo estas obtidas com rendimentos baixos a moderados. Esta via sintética é um método simples que permite a rápida obtenção de análogos da nimesulida.

2.2 Avaliação Biológica

Devido à similaridade estrutural das acetanilidas e dos análogos da Nimesulida com potencial anticancerígeno, um dos objetivos desta dissertação foi avaliar os efeitos das *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas **3** sintetizadas na viabilidade celular, em células saudáveis NHDF e células cancerígenas LNCaP e MCF-7.

Assim, com base na estrutura da nimesulida e em estudos relativos à modificação desta,^{33,35,36,49} variou-se a natureza do grupo R₁, tendo-se como objetivo avaliar a influência do grupo nitro, presente na estrutura da nimesulida, assim como do grupo acetamida. Para além disso, pretendeu-se avaliar a influência de grupos alquilo ligados ao grupo amida (R₂) e/ou ligado ao grupo tio (R₃), sendo assim escolhidos o grupo hexilo, o metilenciclohexilo e o 2,4-dimetilbenzilo, tendo em conta a sua influência conhecida em compostos análogos e já referidos anteriormente na escolha dos substituintes dos sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólios no subcapítulo 2.1.2.

Assim, avaliou-se o efeito na viabilidade celular das acetanilidas **3** através do ensaio de MTT e determinou-se o IC₅₀ das acetanilidas que revelaram uma atividade antiproliferativa mais proeminentemente e seletiva. Adicionalmente, analisou-se os efeitos das duas acetanilidas mais promissoras na viabilidade celular a partir do ensaio de citometria de fluxo com marcação com iodeto de propídio.

2.2.1 Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT pelo procedimento descrito por Almeida e colaboradores⁴⁹ sendo este um método fiável e amplamente utilizado.⁵⁸⁻⁶⁰

O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico baseado na capacidade que as células viáveis metabolicamente ativas têm em reduzir o MTT a cristais de formazano pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase. Dado que os cristais de formazano, de coloração violeta, são insolúveis em meio aquoso, estes são dissolvidos em dimetilsulfóxido por forma a determinar espectrofotometricamente, a 570 nm, a intensidade de cor formada, que se considera ser diretamente proporcional ao número de células viáveis no ensaio.⁶¹

Inicialmente, realizaram-se estudos preliminares com o objetivo de testar a redução da proliferação celular, originada pelas *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas **3** sintetizadas, nas diferentes linhas celulares a uma concentração de 30 µM, com um tempo de exposição de 48 horas. O efeito dos compostos foi comparado com células não tratadas, que serviram de controlo negativo, com o 5-fluorouracilo e peróxido de hidrogénio, que serviram como controlos positivos e com a nimesulida, sendo esta o composto de referência.

As células NHDF foram incluídas no estudo com o objetivo de avaliar a seletividade da ação das acetanilidas **3** em relação às células cancerígenas. Uma aproximação muito básica da seletividade foi calculada através da razão da percentagem de viabilidade celular nas células normais (NHDF) e nas células cancerígenas (LNCaP e MCF-7).

Na tabela 2.26 apresentam-se os resultados obtidos de viabilidade celular dos estudos preliminares das *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas **3** nas diferentes linhas celulares. Os dados expressam-se por viabilidade celular, em percentagem, em comparação com o respetivo controlo negativo.

Comparando o controlo positivo 5-fluorouracilo com a nimesulida, verifica-se um efeito similar nas células cancerígenas da próstata (LNCaP). No entanto, nas células cancerígenas da mama (MCF-7) não se verifica o mesmo, tendo o 5-fluorouracilo maior efeito anti-proliferativo que a Nimesulida.

Relativamente à Nimesulida e às acetanilidas **3**, observa-se que a maioria das acetanilidas apresenta um efeito antiproliferativo superior ao da nimesulida. No entanto, nas células LNCaP verifica-se que as acetanilidas *N*-hexílicas **3b-e** têm menor efeito antiproliferativo. O mesmo se verifica nas células MCF-7, à exceção da acetanilida **3e**.

De uma forma geral, as acetanilidas **3** apresentam efeito antiproliferativo nas células cancerígenas e geralmente fraca redução da proliferação das células normais. Assim, e com base nas seletividades calculadas, as acetanilidas em estudo parecem ser bastante seletivas, destacando-se as acetanilidas **3g-i** para as células LNCaP e as acetanilidas **3a,g,i** para as células MCF-7.

De modo a avaliar a influência de grupos introduzidos na posição 4, foram sintetizadas três acetanilidas **3a-c** com grupos R₁ diferentes (H, NO₂ ou NHCOCH₃) e grupos R₂ e R₃ iguais (grupo hexilo). Contrariamente ao esperado, os resultados deste estudo de viabilidade celular demonstraram que a acetanilida **3a** é mais citotóxica para as células cancerígenas do que as acetanilidas congéneres **3b** e **3c**, observando-se seletividade de 21,41 para as células MCF-7. Deste modo, este composto **3a** revelou um efeito antiproliferativo significativo em células do cancro da mama (4,22%) em comparação tanto com as células do cancro da próstata (44,53%) como com os fibroblastos da derme (90,36%). Curiosamente, nas células MCF-7, verifica-se que a acetanilida **3b** com o grupo nitro é a menos citotóxica das acetanilidas congéneres. Assim, é de inferir que em termos de influência de grupos na posição 4, o grupo acetamida está associado a um efeito antiproliferativo mais elevado do que o observado com o seu congénere **3b**, possuindo o grupo nitro.

Tabela 2.26 - Viabilidade celular das diferentes linhas celulares utilizadas (NHDF, LNCaP e MCF-7) expostas às as *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas **3**, a uma concentração de 30 μ M, após 48 horas de exposição.

Composto (30 μ M)	R ₁	R ₂	R ₃	NHDF	LNCaP	Seletividade NHDF/LNCaP	MCF-7	Seletividade NHDF/MCF-7
H ₂ O ₂ (1 mM)	—	—	—	15,52 ± 4,02	2,15 ± 4,37	7,22	4,44 ± 0,99	3,50
5- Fluorouracilo	—	—	—	86,77 ± 5,62	70,90 ± 11,56	1,22	28,28 ± 3,99	3,07
Nimesulida	—	—	—	89,32 ± 9,99	73,77 ± 22,03	2,03	42,52 ± 13,13	2,10
3a	H	Hex	Hex	90,36 ± 6,84	44,53 ± 8,56	1,21	4,22 ± 2,47	21,41
3b	NO ₂	Hex	Hex	110,69 ± 10,39	116,81 ± 25,01	0,95	65,94 ± 2,66	1,68
3c	NHCOCH ₃	Hex	Hex	93,64 ± 5,37	153,88 ± 29,89	0,61	36,56 ± 11,83	2,56
3d		Hex	MeCy	98,22 ± 9,77	117,05 ± 15,70	0,84	35,89 ± 8,34	2,74
3e		Hex	2,4-diMeBn	82,95 ± 4,76	87,59 ± 27,26	0,95	11,13 ± 2,95	7,45
3f		MeCy	Hex	82,81 ± 10,88	49,83 ± 10,32	1,66	24,17 ± 3,06	3,43
3g		MeCy	MeCy	86,16 ± 11,47	29,70 ± 4,42	2,90	7,52 ± 0,93	11,46
3h		MeCy	2,4-diMeBn	79,66 ± 8,33	22,98 ± 3,52	3,47	9,08 ± 1,79	8,77
3i		2,4-diMeBn	Hex	80,08 ± 7,06	19,14 ± 4,69	4,18	6,86 ± 2,77	11,67
3j		2,4-diMeBn	MeCy	80,50 ± 8,35	40,44 ± 12,44	1,99	13,59 ± 2,34	5,92
3k		2,4-diMeBn	2,4-diMeBn	89,94 ± 8,64	48,02 ± 6,89	1,87	15,27 ± 1,65	5,89

Relativamente ao estudo dos grupos alquilo em R₂ e R₃, destaca-se o efeito antiproliferativo significativo das acetanilidas com grupos metilenociclohexilo e 2,4-dimetilbenzilo em ambas as células cancerígenas (LNCaP e MCF-7), inferindo-se, de uma forma geral, que estes grupos alquilo são promissores na atividade anticancerígena. Adicionalmente, é evidenciado que as acetanilidas **3g-i** apresentam uma atividade antiproliferativa elevada, com especial destaque para as células MCF-7 (viabilidade celular de 7,52, 9,08 e 6,86). É de realçar que as acetanilidas **3g** e **3i** demonstram ser bastante seletivas para as células MCF-7, tal como se pode observar pelo índice de seletividade (11,46 e 11,67, respetivamente). Do conjunto de acetanilidas sintetizadas, destaca-se a acetanilida **3i**, sendo esta, a acetanilida com maior atividade antiproliferativa e elevada seletividade para ambas as células cancerígenas (LNCaP e MCF-7).

Após a análise dos resultados preliminares e de forma a explorar o seu interesse como potenciais agentes anticancerígenos, realizaram-se estudos de curvas concentração-resposta para as acetanilidas que reduziram a proliferação celular para 40% ou menos em relação ao controlo negativo, nas linhas celulares em estudo. A nimesulida (composto de referência) e o 5-fluorouracilo (controlo positivo) também foram alvo de estudo. Assim, de forma a determinar os IC₅₀, avaliou-se a viabilidade celular destes compostos nas concentrações de 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM e 100 µM, após um período de 48 horas de exposição aos mesmos. Os cálculos de IC₅₀ foram efectuados mediante ajustamento sigmóide.

Na tabela 2.27 encontram-se os valores de IC₅₀ calculados para os diferentes compostos. Pelos resultados obtidos, verifica-se que o valor de IC₅₀ obtido para a nimesulida nas células MCF-7 parece ser concordante com o descrito na literatura.³³ É de realçar que as acetanilidas **3** apresentam valores de IC₅₀ inferiores ao da nimesulida nas duas linhas celulares cancerígenas. No entanto, verifica-se que as acetanilidas **3g** e **3h** são as mais promissoras como inibidoras da proliferação celular da linha LNCaP, com valores de IC₅₀ de 25,31 µM (R² = 0,8083) e de 23,83 µM (R² = 0,8226), respetivamente. Nas células MCF-7, as acetanilidas **3a** e **3k** apresentam, respetivamente, valores de IC₅₀ de 22,23 µM (R² = 0,8601) e de 38,33 µM (R² = 0,9739), sendo as mais promissoras como inibidoras do crescimento destas células do cancro da mama.

Tabela 2.27 - Valores de IC₅₀ (μM) para o 5-fluorouracilo, nimesulida e acetanilidas **3** nas células LNCaP e MCF-7, com um intervalo de confiança de 95%.

Composto	Linha celular	IC ₅₀	R ²
5-Fluorouracilo	LNCaP	4,683	0,7909
	MCF-7	3,182	0,9642
Nimesulida	LNCaP	51,80	0,6935
	MCF-7	>100 120,4 ³³	—
3a	MCF-7	22,23	0,8601
3c	MCF-7	46,42	0,8726
3d	MCF-7	41,42	0,9391
3e	MCF-7	51,43	0,9214
3f	MCF-7	61,92	0,9448
3g	LNCaP	25,31	0,8083
	MCF-7	62,59	0,9261
3h	LNCaP	23,83	0,8226
	MCF-7	53,61	0,8875
3i	LNCaP	39,54	0,9161
	MCF-7	61,97	0,8671
3j	MCF-7	79,83	0,8442
3k	MCF-7	38,33	0,9739

2.2.2 Citometria de fluxo

Tendo em conta os resultados observados nos ensaios MTT, pretendeu-se avaliar o efeito na viabilidade celular das acetanilidas **3g** e **3i** através da citometria de fluxo, recorrendo à marcação celular com iodeto de propídio (PI). Deste modo, os estudos realizaram-se em células MCF-7 após 24 horas de exposição dos compostos, a uma concentração de 30 μM. O efeito antiproliferativo dos compostos foi comparado com o do 5-fluorouracilo e com o do composto de referência nimesulida. As células não tratadas serviram de controlo negativo.

A citometria de fluxo é uma técnica analítica que tem como princípio a dispersão da luz e a emissão de fluorescência de fluorocromos conjugados a moléculas específicas. Assim, através da dispersão da luz pelas células e da emissão de fluorescência, esta técnica permite discriminar, de uma forma pormenorizada, as subpopulações existentes numa determinada população de células, tanto ao nível fisiológico como ao nível metabólico.⁶² O iodeto de propídio é um fluorocromo utilizado como marcador de morte celular. Este marcador

atravessa apenas células mortas com membrana comprometida e intercala-se no DNA, resultando numa emissão de fluorescência proporcional ao conteúdo de DNA da célula.⁶³

A morfologia das células foi estudada após 24 horas de exposição aos compostos, através de observação em microscópio óptico, tendo sido tiradas fotografias (Figura 2.1). Comparativamente, as células não tratadas (controlo negativo) apresentam uma área celular significativamente mais elevada do que as células expostas tanto ao 5-fluorouracilo e nimesulida, como às acetanilidas **3g** e **3i** estudadas. No entanto, é de salientar que as células expostas ao 5-fluorouracilo e à nimesulida apresentam aglomerados, embora de área menor que as observadas no controlo negativo. Além disso, verifica-se que a morfologia das células expostas às acetanilidas **3g** e **3i** é bastante diferente, evidenciando-se a sua forma arredondada.

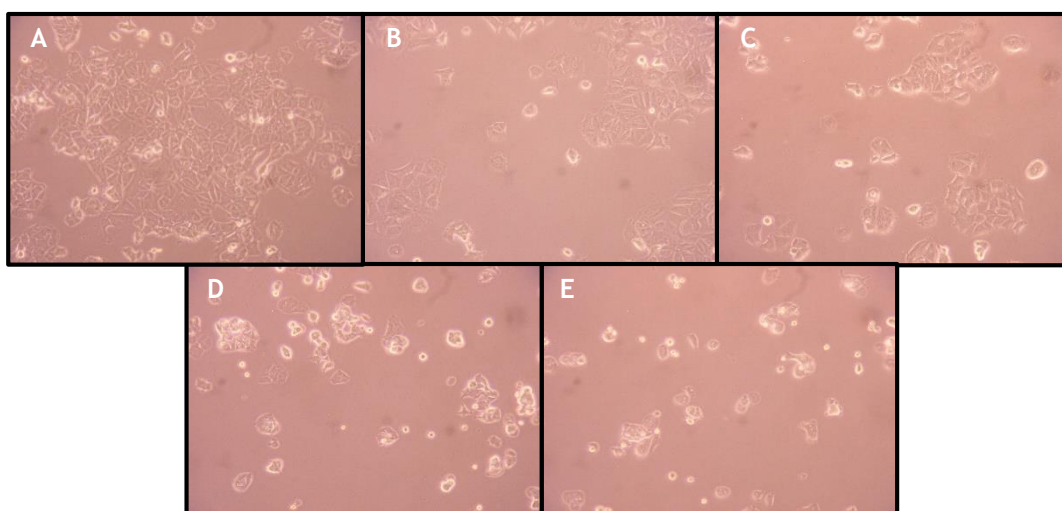


Figura 2.1 - Morfologia das células MCF-7 após 24 horas de exposição. A - Células não expostas (controlo negativo); B - Células expostas ao 5-fluorouracilo; C - Células expostas à nimesulida (composto referência); D - Células expostas à acetanilida **3g**; E - Células expostas à acetanilida **3i**. Zoom: 100 x.

A avaliação do efeito dos compostos na viabilidade celular foi realizada utilizando apenas a marcação com iodeto de propídio. Este é um método rápido e simples, uma vez que as células que sofreram danos são facilmente marcadas pelo iodeto de propídio, sendo assim posteriormente identificadas.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo por marcação com iodeto de propídio em células MCF-7 estão representados na Figura 2.2 e no Gráfico 2.1.

Com base no gráfico de tamanho versus intensidade de fluorescência de iodeto de propídio, os eventos subdividiram-se em quatro regiões (quadrantes) diferentes: Q1, Q2, Q3 e Q4. O quadrante Q1 corresponde a células de maiores dimensões e de marcação negativa pelo PI, sendo considerada a subpopulação de células viáveis. O quadrante Q2 possui células viáveis

de menores dimensões com marcação negativa pelo PI, incluindo-se nesta subpopulação células em fase de apoptose inicial e restos celulares. Os quadrantes Q3 e Q4 apresentam marcação positiva pelo PI, sendo o quadrante Q3 relativo a células não viáveis de maior dimensão e o quadrante Q4 relativo a células não viáveis de menor dimensão.

Comparativamente ao controlo negativo (células não tratadas), o 5-fluorouracilo não provocou qualquer efeito relevante na viabilidade celular. No entanto, a nimesulida provocou uma ligeira diminuição da viabilidade celular, enquanto que as acetanilidas **3g** e **3i** provocaram uma diminuição significativa da mesma (Q1), destacando-se a acetanilida **3i**. Assim, pode-se inferir que as acetanilidas estudadas provocaram uma diminuição da percentagem de células viáveis superior à do controlo positivo 5-fluorouracilo.

A apoptose é caracterizada por alterações morfológicas, incluindo o encolhimento celular.⁶⁴ Nos quadrantes Q2 e Q4 verifica-se um aumento significativo de células de menor dimensão nas células expostas às acetanilidas **3g** e **3i**. Deste modo, embora o iodeto de propídio não seja um marcador de apoptose, pela informação do tamanho celular (parâmetro FSC, *Forward Scatter Characteristics*), sugere-se que as células nos quadrantes Q2 e Q4 estejam em fase de apoptose inicial.

Os estudos realizados demonstram que as acetanilidas **3g** e **3i** levam a valores significativos de morte celular que são superiores ao observado com o 5-fluorouracilo e com o composto de referência nimesulida. É ainda de destacar que os valores obtidos estão de acordo com os estudos preliminares realizados pelo ensaio de MTT.

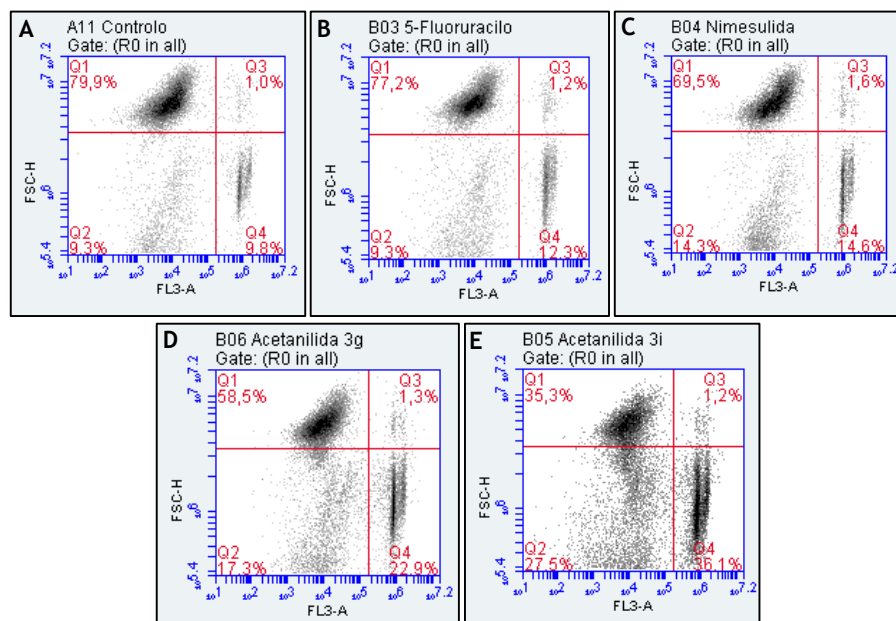


Figura 2.2 - *Dot plots* da análise de fluorescência com iodeto de propídio em células MCF-7. A- Células não expostas (controlo negativo); B - Células expostas ao 5-Fluorouracilo; C - Células expostas à Nimesulida (composto de referência); D - Células expostas à acetanilida **3g**; E - Células expostas à acetanilida **3i**.

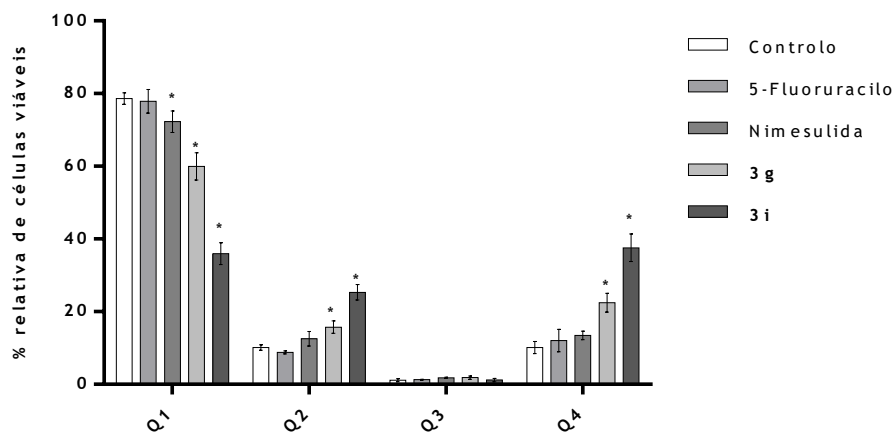


Gráfico 2.1 - Distribuição percentual de células viáveis nos quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4).

2.3 Docking molecular

Tendo em conta proteínas alvo envolvidas no processo de carcinogénese, realizaram-se estudos de *docking* molecular por forma a quantificar a energia e modo de ligação entre as acetanilidas **3** sintetizadas e a COX-2, aromatase, recetor de androgénios e recetor alfa de estrogénios.

De forma a validar os métodos, realizou-se o *re-docking* do ligando original co-cristalizado e dos ligandos referidos na literatura^{65,66} para cada proteína alvo. Os estudos de docking molecular foram realizados no AutoDockTools 1.5.6. de acordo com as coordenadas das proteínas obtidas na base de dados PDB (*Protein Data Bank*). A *grid box* foi centrada no sítio ativo de cada proteína.

Nos resultados de *re-docking* obtidos, verificou-se que as conformações resultantes de cada ligando foram semelhantes às do ligando co-cristalizado (Figura 2.3), sendo as interações obtidas capazes de reproduzir as interações do complexo proteína-ligando cristalizado. Para além disso, os valores de RMSD obtidos são inferiores a 2 Å, sendo este um dos critérios definidos para validar o *docking* (Tabela 2.28).⁶⁵ É ainda de salientar que os valores de *score* dos ligandos referidos na literatura^{65,66} são semelhantes aos obtidos no *re-docking* (dados não mostrados). Deste modo, pode-se inferir que os modelos de *docking* estão validados, permitindo assim realizar outras simulações que quantifiquem a energia de ligação entre os ligandos de interesse e o sítio ativo de cada proteína alvo.

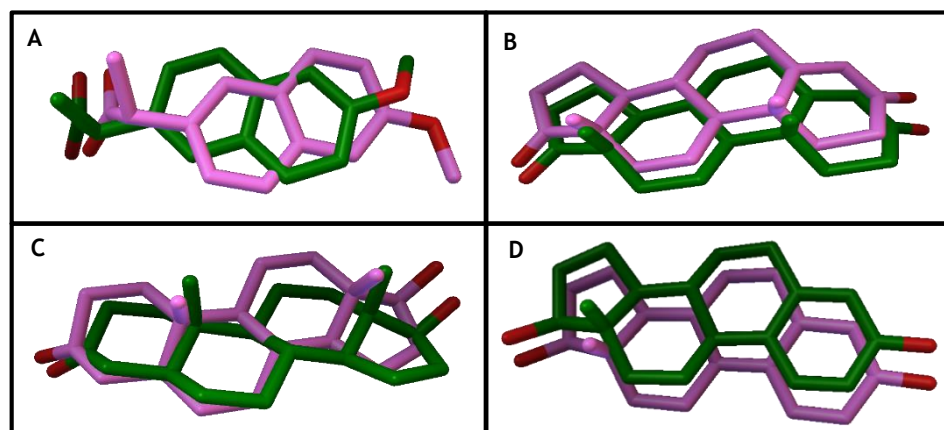


Figura 2.3 - Sobreposição dos ligandos originais co-cristalizados (rosa) e do ligando resultante (verde) para cada proteína. A - COX-2 (Naproxeno-NPX); B - Aromatase (Androstenediona-ADS); C - Recetor de Androgénios (Di-hidrotestosterona-DHT); D - Recetor alfa de Estrogénios (Estradiol-EST).

Tabela 2.28 - Energias de ligação e RMSD obtidos no re-docking para cada proteína.

Complexo Proteína - Ligando	Resolução (Å)	Grid box	Energia de ligação (kcal/mol)	RMSD (Å)
COX-2 - Naproxeno	2,4	x 50 y 50 z 50	-7,57	1,29
Aromatase - Androstenediona	2,9	x 50 y 50 z 50	-11,87	0,82
Recetor de androgénios - Di-hidrotestosterona	1,9	x 50 y 50 z 50	-10,61	0,89
Recetor alfa de estrogénios - Estradiol	2,8	x 50 y 50 z 50	-9,4	0,87

Com base nas simulações de re-docking, realizaram-se, com as mesmas condições, as simulações de docking para os ligandos sintetizados. Em todas as simulações, a nimesulida é utilizada como composto de referência.

Na Tabela 2.29 estão apresentadas as energias de ligação determinadas para os ligandos sintetizados relativos a cada proteína. A partir dos resultados obtidos, verifica-se que a energia de ligação dos ligandos é superior comparativamente com a nimesulida, demonstrando a possibilidade destes compostos serem potenciais inibidores da aromatase, e ligandos do recetor de androgénios e do recetor alfa de estrogénios. Relativamente aos resultados obtidos para a COX-2, verifica-se que os compostos sintetizados não apresentam uma afinidade significativa com o sítio ativo desta proteína.

Tabela 2.29 - Energias de ligação obtida para os ligandos sintetizados relativos a cada proteína.

Composto	COX-2	Aromatase	Recetor de androgénios	Recetor alfa de estrogénios
Nimesulida	-8,08	-8,91	-7,45	-6,72
3a	-4,63	-8,55	-7,65	-7,51
3b	-7,08	-9,63	-7,77	-7,23
3c	-5,72	-9,37	-8,05	-8,21
3d	-5,81	-10,48	-9,50	-9,69
3e	-5,53	-10,05	-9,82	-10,70
3f	-7,01	-10,85	-9,22	-9,57
3g	-8,17	-11,34	-10,39	-11,15
3h	-7,16	-12,63	-10,69	-10,73
3i	-6,09	-9,15	-9,53	-9,01
3j	-7,08	-12,31	-9,65	-10,76
3k	-6,33	-10,62	-9,47	-11,19

Contrariamente aos resultados de viabilidade celular e relativamente à influência dos grupos em R₁, os resultados da simulação de *docking* demonstram que a acetanilida **3a** é o congénere que apresenta menos afinidade com todas as proteínas. Para além disso, destaca-se a acetanilida **3c**, com grupo acetamida, que apresenta maior afinidade para o recetor de androgénios e o recetor alfa de estrogénios em relação aos seus congéneres. Este resultado, comparativamente à acetanilida **3b**, pode explicar a concordância dos resultados obtidos nos estudos de viabilidade celular. Adicionalmente, as simulações de *docking* para as acetanilidas **3** mostram maior afinidade para o recetor alfa de estrogénios do que para o recetor de androgénios, o que vai de encontro, mais uma vez, aos resultados obtidos nos estudos de viabilidade celular (Dados apresentados na Tabela 2.26). Não obstante, com exceção da acetanilida **3i**, verifica-se que as acetanilidas **3g** e **3h** são as que revelam maior afinidade para as proteínas alvo.

Na Tabela 2.30 estão apresentadas as principais interações entre as proteínas e os ligandos. As interações entre as proteínas e as acetanilidas **3** é bastante semelhante às interações envolvidas entre cada proteína e os seus ligandos co-cristalizados. Assim, pode-se concluir que, embora algumas acetanilidas apresentem menor afinidade com as proteínas alvo, não se podem descartar como potenciais inibidores/ligandos destas.

É de realçar que as simulações de *docking* realizadas são especulativas, uma vez que em estudos *in vitro* e *in vivo* os resultados podem diferir devido às condições fisiológicas, como se verifica para a acetanilida **3i**.

Tabela 2.30 - Principais interações dos ligandos originais co-cristalizados e ligandos sintetizados com cada proteína.

Composto	COX-2	Aromatase	Recetor de androgénios	Recetor alfa de estrogénios
Nimesulida	TYR-355, ARG-120, VAL-523, TRP-387, PHE-518, TYR-385, LEU-352	ARG-115, ASP-309, THR-310, SER-478, ALA-306, ILE-133, ILE-305, LEU-477, MET-374, PHE-134, PHE-221, TRP-224, VAL-370, VAL-373	ARG-752, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895	ARG-394, GLU-353, LEU-391, MET-388
3a	TYR-355, VAL-523, HIS-90, ARG-513, TRP-387, PHE-518, TYR-385, LEU-352	ARG-115, ASP-309, THR-310, SER-478, ALA-306, ILE-133, LEU-477, MET-374, PHE-134, PHE-221, TRP-224, VAL-370, VAL-373, VAL-369	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895, MET-745	ARG-394, HIS-524, GLU-353, LEU-391
3b	TYR-355, ARG-120, VAL-523, HIS-90, ARG-513, TRP-387, PHE-518, TYR-385, LEU-352	ARG-115, ASP-309, THR-310, SER-478, ALA-306, ILE-133, ILE-305, LEU-477, MET-374, PHE-134, VAÇ-370, VAL-373	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895	ARG-394, HIS-524, GLU-353, PHE-404, LEU-391, MET-388
3c	TYR-355, ARG-120, VAL-523, HIS-90, ARG-513, PHE-518 TYR-385, LEU-352	ARG-115, ASP-309, THR-310, SER-478, ALA-306, ILE-133, LEU-477, MET-374, PHE-134, TRP-224, VAL-370, VAL-373, VAL-369	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895	ARG-394, HIS-524, GLU-353, LEU-391, MET-388
3d	TYR-355, ARG-120, VAL-513, HIS-90, ARG-513, TRP-387, PHE-518, TYR-385	ARG-115, ASP-309, THR-310, SER-518, ALA-306, ILE-133, ILE-305, LEU-477, PHE-134, PHE-221, TRP-224, VAL-370, VAL-373, VAL-369	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895	ARG-394, HIS-524, GLU-353, PHE-404, LEU-391, MET-388
3e	TYR-355, ARG-120, VAL-523, HIS-90, ARG-513, TRP-387, PHE-518, TYR-385, LEU-352	ARG-115, ASP-309, THR-310, SER-478, ALA-306, ILE-133, ILE-305, LEU-477, MET-374, PHE-134, PHE-221, TRP-224, VAL-370, VAL-373, VAL-369	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895, MET-745	ARG-394, HIS-524, GLU-353, PHE-404, LEU-391, MET-388
3f	TYR-355, ARG-120, VAL-523, HIS-90, ARG-513, TRP-387, TYR-385, LEU-352	ASP-309, THR-310, SER-478, ALA-306, ILE-133, ILE-305, LEU-477, MET-374, PHE-134, PHE-221, TRP-224, VAL-370, VAL-373, VAL-369	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895, MET-745	ARG-394, HIS-524, GLU-353, PHE-404, LEU-391, MET-388
3g	TYR-355, ARG-120, VAL-523, HIS-90, ARG-513, TRP-387, PHE-518, TYR-385, LEU-352	ARG-115, ASP-309, THR-310, SER-478, ALA-306, ILE-133, ILE-305, LEU-477, MET-374, PHE-134, PHE-221, TRP-224, VAL-370, VAL-373	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895, MET-745	ARG-394, HIS-524, GLU-353, PHE-404, LEU-391, MET-388
3h	TYR-355, ARG-120, VAL-523, HIS-90, ARG-513, TRP-387, PHE-518, TYR-385, LEU-352	ARG-115, ASP-309, THR-310, SER-478, ALA-306, ILE-133, ILE-305, LEU-477, MET-374, PHE-134, PHE-221, TRP-224, VAL-370, VAL-373	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895, MET-745	ARG-394, HIS-524, GLU-353, PHE-404, LEU-391, MET-388
3i	TYR-355, ARG-120, VAL-523, HIS-90, ARG-513, TRP-387, PHE-518, TYR-385, LEU-352	ARG-115, ASP-309, THR-310, SER-478, ALA-306, ILE-133, LEU-477, MET-374, PHE-134, PHE-221, TRP-224, VAL-373, VAL-369	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895, MET-745	ARG-394, HIS-524, GLU-353, PHE-404, LEU-391, MET-388

Tabela 2.30 - Principais interações dos ligandos originais co-cristalizados e ligandos sintetizados com cada proteína. (continuação)

3j	TYR-355, ARG-120, VAL-523, HIS-90, TRP-387, PHE-518, TYR-385, LEU-352	ARG-115, ASP-309, THR-310, SER-478, ALA-306, ILE-133, ILE-305, LEU-477, MET-374, PHE-134, TRP-224, VAL-370, VAL-373, VAL-369	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, MET-895	ARG-394, HIS-524, GLU-353, PHE-404, LEU-391, MET-388
3k	TYR-355, ARG-120, VAL-523, HIS-90, ARG-513, TRP-387, PHE-518, TYR-385, LEU-352	ARG-115, ASP-309, THR-310, SER-478, ALA-306, ILE-133, ILE-305, LEU-477, MET-374, PHE-134, PHE-221, TRP-224, VAL-370, VAL-373, VAL-369	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895	ARG-394, HIS-524, GLU-353, PHE-404, LEU-391, MET-388
NPX	TYR-355, ARG-120, VAL-523, TRP-387, PHE-518	—	—	—
ADS	—	ARG-115, ASP-309, THR-310, ALA-306, ILE-133, ILE-305, LEU-477, MET-374, PHE-134, PHE-221, TRP-224, VAL-370, VAL-373	—	—
DHT	—	—	ARG-752, THR-877, ASN-705, GLN-711, LEU-873, PHE-764, MET-895, MET-745	—
EST	—	—	—	ARG-394, HIS-524, GLU-353, PHE-404, LEU-391, MET-388

2.4 Conclusões e Perspetivas futuras

Nesta dissertação foi sintetizada e caracterizada uma nova série de *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas 4-substituídas **3** a partir de sais de benzotiazólios 6-substituídos **2**, com rendimentos globais baixos a moderados (17 a 69%). Esta via sintética é um método simples que permite a obtenção de análogos da nimesulida com potencial efeito anticancerígeno.

As *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas 4-substituídas **3** foram avaliadas citotoxicamente nas linhas celulares NHDF, LNCaP e MCF-7. De uma forma geral, as acetanilidas **3** apresentam efeito antiproliferativo para ambas as células cancerígenas (LNCaP e MCF-7) e não têm efeito significativo nas células normais (NHDF). Os resultados demonstraram que a acetanilida **3a**, com grupo $R_1=H$, é a acetanilida mais citotóxica para ambas as células cancerígenas, evidenciando a sua seletividade para as células do cancro da mama MCF-7 (21,41). Não obstante, em termos de comparação da influência do grupo nitro *versus* grupo acetamida na posição 4, a acetanilida **3b** com grupo nitro revelou ser a menos citotóxica das acetanilidas congéneres **3a,b**, estando o grupo acetamida associado a um efeito antiproliferativo mais relevante que o seu congénere **3b**.

Relativamente às acetanilidas com grupo acetamida na posição 4, destacam-se as acetanilidas **3g-i** para as células LNCaP e as acetanilidas **3g,i** para as células MCF-7. Adicionalmente, a acetanilida **3i**, com grupo *N*-(2,4-dimetilbenzilo) e *S*-hexilo, é a acetanilida com maior atividade antiproliferativa e elevada seletividade para ambas as células cancerígenas, destacando-se o seu elevado efeito antiproliferativo contra as células MCF-7.

Assim, com base nos resultados obtidos e de forma a aprofundar a relação estrutura-atividade, pretende-se desenvolver acetanilidas congêneres sem grupos na posição 4 ($R_1=H$) das acetanilidas 6-susbtituídas com grupo acetamida que revelaram maior efeito antiproliferativo.

Tendo em conta os resultados nos estudos preliminares, avaliou-se, em células MCF-7, a viabilidade celular das acetanilidas **3g** e **3i** através da citometria de fluxo, recorrendo à marcação com iodeto de propídio. Os resultados obtidos revelaram que estas acetanilidas apresentam valores significativos de morte celular comparativamente ao controlo 5-fluorouracilo e ao composto de referência nimesulida, sugerindo-se que as células estejam a entrar na fase inicial de apoptose. Como o iodeto de propídio não é um marcador de apoptose, sugere-se a realização de novos ensaios de citometria de fluxo com combinação dos corantes iodeto de propídio e Anexina-V, sendo assim possível distinguir células em apoptose inicial de células em necrose.

Os estudos de *docking* molecular demonstram a possibilidade destas acetanilidas serem potenciais inibidores da aromatase, e ligandos do recetor de androgénio e recetor alfa de estrogénio, não apresentando afinidade significativa para a COX-2.

Por fim, é de enfatizar, que após a síntese dos compostos congêneres anteriormente referidos em conjunto com os resultados anteriormente publicados, abre a perspetiva de realização de estudos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR - do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationship*).

Capítulo 3 - Parte experimental

3.1 Síntese e Caracterização estrutural

Os reagentes e solventes foram adquiridos de firmas comerciais e estavam analiticamente puros. Os solventes, sempre que necessário, foram secos sobre peneiros moleculares 4 Å. O iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazol-3-io (**2a**) foi preparado pelo método descrito na literatura,⁵⁷ fora do âmbito desta dissertação.

As reações foram seguidas por cromatografia em camada fina (ccf), utilizando placas de alumínio de 0,2 mm revestidas com sílica-gel (Macherey-Nagel 60 G/UV₂₅₄). Após a eluição e secagem das placas, estas foram visualizadas à luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm e/ou 365 nm.

Na separação dos compostos por cromatografia em coluna foi utilizada sílica-gel (Fluka 60 Å, 70-230 mesh, 0,063-0,200 mm), em colunas de vidro equipadas com membrana porosa.

Na realização das técnicas cromatográficas mencionadas é referido, em cada caso, o eluente utilizado ou, tratando-se de eluentes mistos, indicada a percentagem dos diversos componentes.

Os pontos de fusão foram determinados em tubos capilares abertos no equipamento Büchi B-540 e não foram corrigidos.

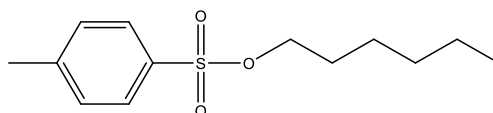
Os espectros de infravermelho foram obtidos por refletância total atenuada (ATR - do inglês, *Attenuated Total Reflectance*) num equipamento Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10: smart iTR equipado com cristal ATR de diamante, sendo processados com o *software* OMNIC 8.2. Na aquisição em modo ATR, colocaram-se as amostras, tanto na forma sólida como na forma de óleo, diretamente sobre o cristal e registou-se o espectro, utilizando como referência o espectro do ar. Os espectros das amostras foram adquiridos à temperatura ambiente entre 4000 e 600 cm⁻¹, a partir da média de 32 varrimentos com uma resolução espectral de 4 cm⁻¹. Na descrição dos espectros obtidos, é indicada a frequência máxima da banda de absorção (ν_{\max} em cm⁻¹) e, caso se justifique, a atribuição dessa banda a um grupo de átomos relevante na estrutura do composto.

Os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram adquiridos à temperatura ambiente num espectrómetro Brüker Avance III 400 MHz (400,13 MHz e 100,62 MHz, respetivamente), sendo processados com o *software* TOPSPIN 3.1. Para a sua realização foram utilizados como solventes o dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*₆) e o clorofórmio deuterado (CDCl₃),

sendo estes utilizados como padrão interno (DMSO- d_6 , $\delta = 2,50$ ppm e $39,52$ ppm ou $CDCl_3$, $\delta = 7,26$ ppm e $77,16$ em RMN de 1H e RMN de ^{13}C , respetivamente). Na realização dos espetros de RMN de ^{13}C utilizou-se a técnica DEPT. As técnicas HSQC e HMBC foram realizadas para a maioria dos compostos. Na descrição dos compostos, os espetros de RMN de 1H (400 MHz) foram indicados da seguinte forma: solvente; desvio químico [δ , em partes por milhão (ppm)]; multiplicidade do sinal [s (singuleto), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), t (triplete), td (triplo duplete), qt (quinteto), ou m (multiplete)]; área relativa (nH, número de prótons); constante de acoplamento [J em Hertz (Hz)]. Na descrição dos espetros de ^{13}C (101 MHz), realizados em desacoplamento, são apresentados apenas os desvios químicos - δ (em ppm).

3.1.1 Reagentes e Materiais de partida

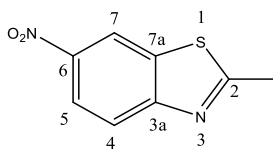
3.1.1.1 *p*-Toluenossulfonato de hexilo



A uma solução de hexanol (0,126 mL, 1 mmol) e piridina (0,324 mL, 4 mmol), arrefecida em banho de gelo, adicionou-se cloreto de *p*-toluenossulfonilo (0,210 g, 1,1 mmol). Deixou-se a reação num banho de gelo, verificando-se por ccf (diclorometano) que a reação ficou completa após 2 horas.

Depois de terminada a reação, verteu-se a mistura reacional sobre ácido clorídrico concentrado (600 μ L de ácido clorídrico concentrado em 2 mL de gelo por cada 1 mmol de hexanol). Decantou-se o produto formado e dissolveu-se em diclorometano. Lavou-se com água (3x1,5 mL) e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. Obteve-se o *p*-toluenossulfonato de hexilo na forma de óleo incolor, com um rendimento de 80%; IV (ν_{max}/cm^{-1}): 3852, 3750, 3648, 3566, 2955, 2929, 2859, 1921, 1739, 1683, 1653, 1598, 1558, 1540, 1495, 1466, 1457, 1356, 1306, 1291, 1210, 1188, 1173 (S=O), 1119, 1096, 1037, 1019, 956, 924, 813, 785, 742, 723, 705, 688, 661, 634, 610; RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7,79 (d, 2H, $J=8,3$ Hz, 2xArH), 7,49 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, 2xArH), 4,01 (t, 2H, $J=6,3$ Hz, OCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 1,54 (qt, 2H, $J=6,6$ Hz, OCH₂CH₂), 1,24-1,11 (m, 6H, 3xCH₂), 0,81 (t, 3H, $J=7,2$ Hz, O(CH₂)₅CH₃); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 145,29 (C), 133,01 (C), 130,61 (2xArCH), 128,02 (2xArCH), 71,37 (OCH₂), 30,89 (CH₂), 28,57 (CH₂), 24,85 (CH₂), 22,33 (CH₂), 21,54 (CH₃), 14,23 (O(CH₂)₅CH₃).

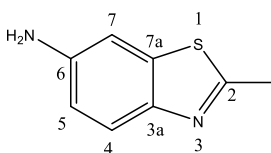
3.1.1.2 2-Metil-6-nitrobenzotiazole (1b)



A uma solução de 2-metilbenzotiazole (**1a**) (0,149 g, 1 mmol) em ácido sulfúrico (0,590 mL), arrefecida em banho de gelo, adicionou-se, gota a gota, uma mistura de ácido nítrico/ácido sulfúrico (0,079 mL, 1,5 mmol/0,090 μ L). Deixou-se a reação num banho de gelo, sob agitação, durante 30 minutos e à temperatura ambiente durante 1 hora. A evolução da reação foi seguida por ccf (diclorometano), sendo as alíquotas neutralizadas com carbonato de sódio a 5% e extraídas com acetato de etilo.

Terminada a reação, verteu-se a mistura reacional sobre gelo (2 mL de gelo por cada 1 mmol de 2-metil-6-nitrobenzotiazole (**1b**)). Guardou-se no frigorífico durante 1 dia e filtrou-se sob vácuo. Recristalizou-se o produto obtido de metanol e filtrou-se sob vácuo. Obteve-se o 2-metil-6-nitrobenzotiazole (**1b**) na forma de cristais amarelos, com um rendimento de 86%; pf 159-160,5 °C; IV (v_{\max}/cm^{-1}): 3099, 3067, 1602, 1570, 1505 (NO_2), 1435, 1410, 1374, 1343, 1331 (NO_2), 1269, 1238, 1174, 1128, 1118, 1039, 994, 916, 904, 839, 822, 755, 749, 719, 672, 649; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,75 (d, 1H, $J=2,3$ Hz, 7-ArH), 8,31 (dd, 1H, $J=8,9$; 2,3 Hz, 5-ArH), 8,01 (d, 1H, $J=8,9$ Hz, 4-ArH), 2,89 (s, 3H, 2-CH₃); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 173,05 (C), 156,86 (C), 144,49 (C), 135,77 (C), 122,35 (4-ArCH), 121,25 (5-ArCH), 117,71 (7-ArCH), 20,41 (2-CH₃).

3.1.1.3 6-Amino-2-metilbenzotiazole (1c)

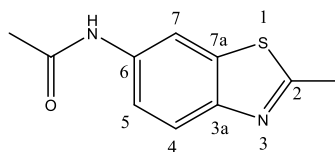


Refluxou-se uma solução de 2-metil-6-nitrobenzotiazole (**1b**) (0,195 g, 1 mmol) e cloreto de estanho (II) di-hidratado (1,57 g, 8,3 mmol) em ácido clorídrico (3 mL) e metanol (3 mL). A evolução da reação foi seguida por ccf (diclorometano/metanol 5%), sendo as alíquotas neutralizadas com hidróxido de sódio a 20% e extraídas com diclorometano.

Terminada a reação (1 hora), evaporou-se o metanol sob pressão reduzida e verteu-se a mistura reacional sobre gelo (2 mL de gelo por cada 1 mmol de 6-amino-2-metilbenzotiazole (**1c**)). À mistura reacional adicionou-se hidróxido de sódio a 20% até pH 10. Filtrou-se, adicionou-se etanol e aqueceu-se o produto bruto. Filtrou-se, concentrou-se a solução sob pressão reduzida e filtrou-se sob vácuo. Obteve-se o 6-amino-2-metilbenzotiazole (**1c**) na forma de cristais rosa, com um rendimento de 64%; pf 114-116,5 °C; IV (v_{\max}/cm^{-1}): 3375

(NH₂), 3314 (NH₂), 3205, 2916, 1636, 1603 (NH₂), 1558, 1517, 1464, 1430, 1366, 1327, 1286, 1264, 1228, 1165, 1121, 1097, 1048, 1015, 910, 839, 827, 815, 807, 728, 650; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7,52 (d, 1H, *J*=8,6 Hz, 4-ArH), 7,00 (d, 1H, *J*=2,2 Hz, 7-ArH), 6,71 (dd, 1H, *J*=8,6; 2,2 Hz, 5-ArH), 5,27 (s, 2H, NH₂), 2,65 (s, 3H, 2-CH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 160,02 (C), 146,65 (C), 144,57 (C), 136,76 (C), 122,09 (4-ArCH), 114,37 (5-ArCH), 104,06 (7-ArCH), 19,40 (2-CH₃).

3.1.1.4 6-Acetamida-2-metilbenzotiazole (**1d**)



A uma solução de 6-amino-2-metilbenzotiazole (**1c**) (0,167 g, 1 mmol) em clorofórmio seco (10 mL), arrefecida em banho de gelo, adicionou-se, gota-a-gota, anidrido acético (0,113 mL, 1,2 mmol). A evolução da reação foi seguida por ccf (diclorometano/metanol 5%), tendo-se completado após 2 horas.

Terminada a reação, lavou-se a mistura reacional, sequencialmente, com uma solução de carbonato de sódio (3x4 mL) e água (3x4 mL). Secou-se a fase orgânica sobre sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida até se observar a formação de precipitado e filtrou-se sob vácuo. Obteve-se o 6-acetamida-2-metilbenzotiazole (**1d**) na forma de cristais brancos, com um rendimento de 80%; pf 144-145 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3291 (NH), 3180, 3142, 3103, 2980, 2157, 1683, 1664 (C=O), 1611, 1583, 1528, 1460, 1415, 1398, 1367, 1323, 1288, 1254, 1212, 1159, 1051, 1031, 999, 967, 949, 918, 866, 845, 829, 819, 737, 713, 667, 644; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10,14 (s, 1H, NH), 8,39 (d, 1H, *J*=2,0 Hz, 7-ArH), 7,81 (d, 1H, *J*=8,7 Hz, 4-ArH), 7,48 (dd, 1H, *J*=8,8; 2,1 Hz, 5-ArH), 2,75 (s, 3H, 2-CH₃), 2,07 (s, 3H, NHCOCH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 168,48 (C), 165,31 (C), 148,88 (C), 136,41 (C), 135,76 (C), 121,82 (4-ArCH), 118,24 (5-ArCH), 111,20 (7-ArCH), 24,04 (NHCOCH₃), 19,64 (2-CH₃).

3.1.2 Sais *N*-alquil-2-metilbenzotiazólios

Preparados a partir de 2-metilbenzotiazóis **1** pelas condições reacionais A ou B, tendo-se isolado os diferentes sais pelos métodos de isolamento 1,2 e 3. Para cada caso é indicada a condição reacional e o método de isolamento. Como exemplo, A2 representa que foi utilizada a condição reacional A e o método de isolamento 2.

Condição reacional A: Aqueceu-se uma mistura de 2-metilbenzotiazole **1** (1 mmol) e reagente alquilante adequado (1,2 mmol) a uma temperatura de 105 a 120 °C. A evolução da reação foi seguida por ccf (diclorometano ou diclorometano/metanol 5%) tendo-se completado entre 25 a 120 horas.

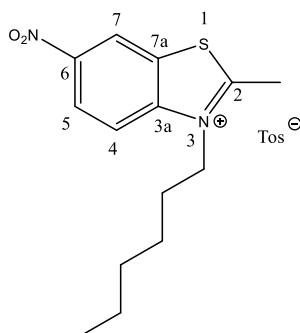
Condição reacional B: Refluxou-se uma solução de 2-metilbenzotiazole **1** (1 mmol), reagente alquilante adequado (3 mmol) e iodeto de sódio (1 mmol) em acetonitrilo (4 mL). A evolução da reação foi seguida por ccf (diclorometano/metanol 5%), tendo-se completado após 24 horas.

Método de isolamento 1: Dissolveu-se o produto resultante na mínima quantidade possível de água a quente. Após o arrefecimento, lavou-se a fase aquosa com éter etílico (3x2 mL) e evaporou-se o solvente quase à secura sob pressão reduzida. Filtraram-se os cristais sob vácuo, tendo-se obtido os sais de benzotiazólios **2** respetivos.

Método de isolamento 2: Recristalizou-se o produto formado de diclorometano. Após o arrefecimento, adicionou-se éter etílico até se observar a formação de precipitado. Filtrou-se sob vácuo, tendo-se obtido o sal de benzotiazólio **2** respetivo.

Método de isolamento 3: Filtrou-se o precipitado sob vácuo e lavou-se com acetonitrilo seco, tendo-se obtido o sal de benzotiazólio **2** respetivo.

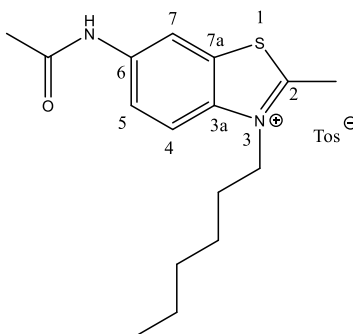
3.1.2.1 *p*-Toluenossulfonato de 3-hexil-2-metil-6-nitrobenzotiazol-3-io (**2b**)



A partir da reação do 2-metil-6-nitrobenzotiazole (**1b**) e do *p*-toluenossulfonato de hexilo pelo procedimento experimental A1, à temperatura de 105 °C após 72 horas de reação, na forma de cristais verdes, com um rendimento de 16%; pf 203-203,5 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3078, 2948,

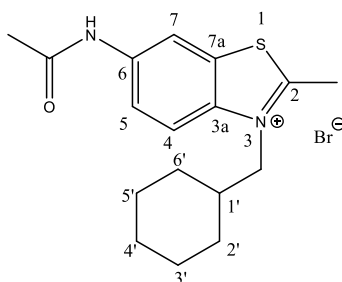
2922, 2865, 1607, 1585, 1533, 1508 (NO₂), 1456, 1409, 1344 (NO₂), 1192 (S=O), 1147, 1119, 1033, 1011, 933, 889, 863, 811, 751, 709, 722, 677; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 9,41 (d, 1H, *J*=2,4 Hz, 7-ArH), 8,63 (dd, 1H, *J*=9,3 Hz, 2,3 Hz, 5-ArH), 8,57 (d, 1H, *J*=9,3 Hz, 4-ArH), 7,45 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, 2xArH Ts), 7,07 (d, 2H, *J*=7,8 Hz, 2xArH Ts), 4,75 (t, 2H, *J*=8,0 Hz, NCH₂), 3,28 (s, 3H, 2-CH₃), 2,26 (s, 3H, Ar-CH₃ Ts), 1,83 (qt, *J*=7,8 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 1,43 (qt, 2H, *J*=6,9 Hz, N(CH₂)₂CH₂), 1,32-1,26 (m, 4H, N(CH₂)₃CH₂CH₂), 0,87 (t, 3H, *J*=6,7 Hz, N(CH₂)₅CH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 182,93 (C), 146,11 (C), 145,69 (C), 144,32 (C), 137,59 (C), 130,18 (C), 128,01 (2xArCH Ts), 125,45 (2xArCH Ts), 124,23 (5-ArCH), 121,79 (7-ArCH), 118,12 (4-ArCH), 49,83 (NCH₂), 30,81 (CH₂), 27,70 (NCH₂CH₂), 25,51 (N(CH₂)₂CH₂), 21,98 (CH₂), 20,77 (Ar-CH₃ Ts), 17,52 (2-CH₃), 13,89 (N(CH₂)₅CH₃).

3.1.2.2 *p*-Toluenossulfonato de 6-acetamida-3-hexil-2-metilbenzotiazol-3-io (2c)



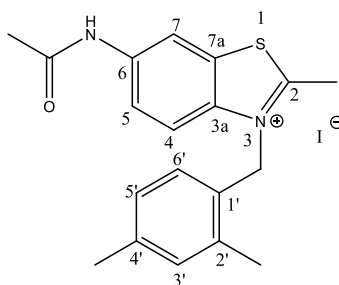
A partir da reação do 6-acetamida-2-metilbenzotiazole (1c) e do *p*-toluenossulfonato de hexilo pelo procedimento experimental A2, à temperatura de 120 °C após 25 horas, na forma de pó laranja, com um rendimento de 63%; pf 187-189 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3247, 3188, 3116, 3033, 2957, 2923, 2856, 1685 (C=O), 1592, 1560, 1483, 1398, 1373, 1345, 1274, 1218, 1181 (S=O), 1122, 1052, 1032, 1009, 901, 826, 814, 680; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10,58 (s, 1H, NH), 8,72 (d, 1H, *J*=2,0 Hz, 7-ArH), 8,15 (d, 1H, *J*=8,2 Hz, 4-ArH), 7,79 (dd, 1H, *J*=9,2 Hz, 2,1 Hz, 5-ArH), 7,48 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, 2xArH Ts), 7,10 (d, 2H, *J*=7,9 Hz, 2xArH Ts), 4,58 (t, 2H, *J*=7,9 Hz, NCH₂), 3,09 (s, 3H, 2-CH₃), 2,24 (s, 3H, Ar-CH₃ Ts), 2,10 (s, 3H, NHCOCH₃), 1,78 (qt, 2H, *J*=7,7 Hz, NCH₂CH₂), 1,36 (qt, 2H, *J*=7,3 Hz, N(CH₂)₂CH₂), 1,30-1,17 (m, 4H, N(CH₂)₃CH₂CH₂), 0,81 (t, 3H, *J*=7,0 Hz, N(CH₂)₅CH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 174,97 (C), 169,09 (NHCOCH₃), 145,53 (C), 139,08 (C), 137,73 (C), 136,32 (C), 130,07 (C), 128,08 (2xArCH Ts), 125,48 (2xArCH Ts), 121,78 (5-ArCH), 117,10 (4-ArCH), 112,78 (7-ArCH), 49,15 (NCH₂), 30,77 (CH₂), 27,82 (NCH₂CH₂), 25,82 (N(CH₂)₂CH₂), 24,08 (NHCOCH₃), 21,97 (CH₂), 20,78 (Ar-CH₃ Ts), 16,57 (2-CH₃), 13,88 (N(CH₂)₅CH₃).

3.1.2.3 Brometo de 6-acetamida-3-(ciclohexilmetil)-2-metil-benzotiazol-3-io (2d)



A partir da reação do 6-acetamida-2-metilbenzotiazole (1d) e do brometo de metilenociclohexilo pelo procedimento experimental A1, à temperatura de 115 °C após 120 horas, na forma de cristais castanhos, com um rendimento de 25%; pf 247-249 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3168, 3115, 3015, 2984, 2930, 2847, 1669 (C=O), 1588, 1547, 1479, 1453, 1398, 1374, 1351, 1324, 1270, 1093, 1049, 1024, 955, 901, 815, 778, 715, 642, 619; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 10,60 (s, 1H, NH), 8,85 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, 7-ArH), 8,29 (d, 1H, $J=9,2$ Hz, 4-ArH), 7,84 (dd, 1H, $J=9,2$ Hz, 2,1 Hz, 5-ArH), 4,55 (d, 2H, $J=7,6$ Hz, NCH₂), 3,16 (s, 3H, 2-CH₃), 2,14 (s, 3H, NHCOCH₃), 2,03-1,90 (m, 1H, 1'-CH), 1,75-1,63 (m, 2H, 2xCH), 1,63-1,57 (m, 2H, 4'-CH₂), 1,57-1,53 (m, 2H, 2xCH), 1,22-1,04 (m, 4H, 4xCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 175,33 (C), 169,07 (NHCOCH₃), 139,04 (C), 136,87 (C), 129,95 (C), 120,93 (5-ArCH), 117,57 (4-ArCH), 112,70 (7-ArCH), 54,49 (NCH₂), 36,99 (1'-CH), 29,51 (2xCH₂), 25,51 (4'-CH₂), 25,08 (2xCH₂), 24,08 (NHCOCH₃), 17,08 (2-CH₃).

3.1.2.4 Iodeto de 6-acetamida-3-(2,4-dimetilbenzil)-2-metilbenzotiazol-3-io (2e)



A partir da reação do 6-acetamida-2-metilbenzotiazole (1d) e do iodeto de 2,4-dimetilbenzilo pelo procedimento experimental B3 após 24 horas, na forma de pó creme, com um rendimento de 71%; pf 182-183,5 °C; IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3177, 3084, 3030, 2951, 1658 (C=O), 1539, 1551, 1480, 1401, 1374, 1321, 1282, 1150, 1056, 1032, 964, 894, 809, 769, 729, 712, 652; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 10,65 (s, 1H, NH), 8,91 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, 7-ArH), 7,96 (d, 1H, $J=9,2$ Hz, 4-ArH), 7,78 (dd, 1H, $J=9,1$ Hz, 2,3 Hz, 5-ArH), 7,13 (s, 1H, 3'-ArH), 6,84 (d, 1H, $J=7,9$ Hz, ArH), 6,19 (d, 1H, $J=7,8$ Hz, ArH), 5,93 (s, 2H, NCH₂), 3,09 (s, 3H, 2-CH₃), 2,43 (s, 3H, Ar-CH₃), 2,21 (s, 3H, Ar-CH₃), 2,12 (s, 3H, NHCOCH₃); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 176,47 (C), 169,26 (NHCOCH₃), 139,28 (C), 137,41 (C), 136,62 (C), 135,46

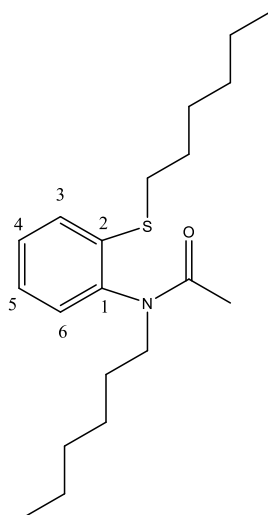
(C), 131,52 (3'-ArCH), 130,26 (C), 127,78 (C), 127,03 (ArCH), 123,88 (ArCH), 121,38 (5-ArCH), 117,35 (4-ArCH), 113,15 (7-ArCH), 50,36 (NCH₂), 24,14 (NHCOCH₃), 20,56 (Ar-CH₃), 18,94 (Ar-CH₃), 17,02 (2-CH₃).

3.1.3 *Orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas

Refluxou-se uma solução de haleto de 3-alkil-2-metilbenzotiazólio 6 -substituído **2** (1 mmol) e trietilamina (1,1 mmol) em etanol a 96% (50 mL). A evolução da reação foi seguida por ccf (diclorometano ou diclorometano/metanol 5%) tendo-se completado entre 30 a 90 minutos. Terminada a reação, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. Ao produto resultante adicionou-se hidróxido de sódio (1 mmol), reagente alquilante adequado (1 mmol) e etanol (50 mL). Refluxou-se novamente a mistura reacional durante um período de 2 a 7 horas, seguindo-se a reação por ccf (diclorometano ou diclorometano/metanol 5%).

Depois de terminada a reação, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida e dissolveu-se o produto formado em diclorometano. Filtraram-se os insolúveis e lavou-se o filtrado, sequencialmente, com hidróxido de sódio a 5% (3 x 6 mL), com ácido clorídrico a 5% (3 x 6 mL) e água (3 x 6 mL). Secou-se a fase orgânica sobre sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, tendo-se obtido um óleo. Purificou-se o óleo resultante por cromatografia em coluna utilizando como eluente clorofórmio ou a mistura diclorometano/etanol 1%, originando as respetivas acetanilidas puras.

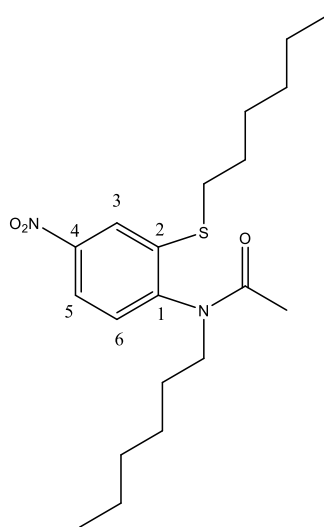
3.1.3.1 *N*-hexil-*N*-[2-(hexiltio)fenil]acetamida (**3a**)



A partir da reação do iodeto de 3-hexil-2-metilbenzotiazol-3-io (**2a**) e do *p*-toluenossulfonato de hexilo, na forma de óleo amarelo, com um rendimento de 17% após cromatografia em coluna (diclorometano/etanol 1%); IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3059, 2954, 2926, 2855, 1660 (C=O), 1583, 1468, 1436, 1391, 1299, 1194, 1096, 1067, 1036, 977; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm)

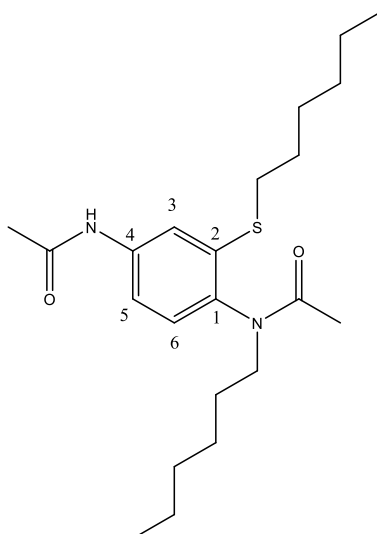
7,32 (td, 1H, $J=7,7$ Hz, 1,1 Hz, 4-ArH), 7,26 (d, 1H, $J=7,0$ Hz, 3-ArH), 7,15 (td, 1H, $J=7,6$ Hz, 1,2 Hz, 5-ArH), 7,08 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, 6-ArH), 4,06 (ddd, 1H, $J=13,4$ Hz, 10,2 Hz, 6,1 Hz, NCH), 3,10 (ddd, 1H, $J=13,3$ Hz, 10,3 Hz, 5,1 Hz, NCH), 2,91 (t, 2H, $J=7,4$ Hz, SCH₂), 1,77 (s, 3H, NCOCH₃), 1,68 (qt, 2H, $J=7,5$ Hz, SCH₂CH₂), 1,62-1,38 (m, 4H, 2xCH₂), 1,37-1,18 (m, 10H, 5xCH₂), 0,90 (t, 3H, $J=6,7$ Hz, (CH₂)₅CH₃), 0,84 (t, 3H, $J=6,6$ Hz, (CH₂)₅CH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 170,73 (NCOCH₃), 140,04 (C), 138,24 (C), 129,75 (6-ArCH), 128,73 (4-ArCH), 126,05 (3-ArCH), 125,22 (5-ArCH), 47,61 (NCH₂), 31,78 (CH₂), 31,50 (CH₂), 31,27 (SCH₂), 28,83 (CH₂), 28,66 (CH₂), 28,05 (CH₂), 26,84 (CH₂), 22,75 (CH₂), 22,66 (CH₂), 22,51 (NCOCH₃), 14,18 ((CH₂)₅CH₃), 14,15 ((CH₂)₅CH₃).

3.1.3.2 N-hexil-N-[2-(hexiltio)-4-nitrofenil]acetamida (3b)



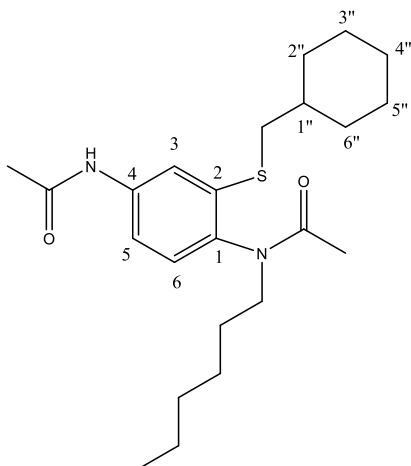
A partir da reação do *p*-toluenossulfonato de 3-hexil-2-metil-6-nitrobenzotiazol-3-íio (2b) e do *p*-toluenossulfonato de hexilo, na forma de óleo laranja, com um rendimento de 41% após cromatografia em coluna (clorofórmio); IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3092, 3061, 2954, 2954, 2925, 2854, 1659 (C=O), 1547, 1519 (NO₂), 1466, 1391, 1344 (NO₂), 1324, 1298, 1258, 1186, 1134, 1052, 976, 911, 881, 842, 758, 745, 723, 607; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8,08 (d, 1H, $J=2,5$ Hz, 3-ArH), 8,00 (dd, 1H, $J=8,5$ Hz, 2,5 Hz, 5-ArH), 7,26 (d, 1H, $J=8,3$ Hz, 6-ArH), 4,05 (ddd, 1H, $J=13,6$ Hz, 10,2 Hz, 6,0 Hz, NCH), 3,14 (ddd, 1H, $J=13,5$ Hz, 10,3 Hz, 5,1 Hz, NCH), 3,01 (t, 2H, $J=7,3$ Hz, SCH₂), 1,79 (s, 3H, NCOCH₃), 1,73 (qt, 2H, $J=7,6$ Hz, SCH₂CH₂), 1,59-1,39 (m, 4H, 2xCH₂), 1,38-1,29 (m, 4H, 2xCH₂), 1,29-1,22 (m, 6H, 3xCH₂), 0,90 (t, 3H, $J=7,0$ Hz, (CH₂)₅CH₃), 0,86 (t, 3H, $J=7,0$ Hz, (CH₂)₅CH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 169,64 (NCOCH₃), 147,90 (C), 144,97 (C), 141,95 (C), 130,46 (6-ArCH), 120,38 (3-ArCH), 120,01 (5-ArCH), 47,48 (NCH₂), 31,65 (CH₂), 31,37 (SCH₂ + CH₂), 28,71 (CH₂), 28,10 (CH₂), 28,08 (CH₂), 26,72 (CH₂), 22,67 (CH₂), 22,58 (CH₂), 22,49 (NCOCH₃), 14,12 ((CH₂)₅CH₃), 14,09 ((CH₂)₅CH₃).

3.1.3.3 N-[4-acetamida-2-(hexiltio)fenil]-N-hexilacetamida (3c)



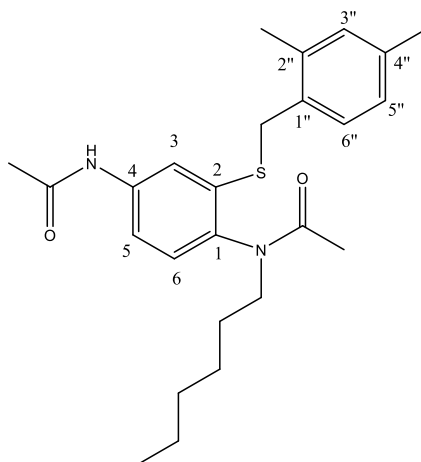
A partir da reação do *p*-toluenossulfonato de 6-acetamida-3-hexil-2-metilbenzotiazol-3-io (2c) e do *p*-toluenossulfonato de hexilo, na forma de óleo amarelo, com um rendimento de 69% após cromatografia em coluna (diclorometano/etanol 1%); IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3307-3269 (NH), 3178, 3098, 3047, 2954, 2926, 2855, 1696, 1665 (C=O), 1632 (C=O), 1598, 1584, 1528, 1485, 1390, 1367, 1303, 1245, 1194, 1148, 1095, 1010, 869, 824, 725; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,76 (s, 1H, NH), 7,69 (d, 1H, $J=2,3$ Hz, 3-ArH), 7,16 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, 2,3 Hz, 5-ArH), 7,00 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, 6-ArH), 4,03 (ddd, 1H, $J=13,4$ Hz, 10,2 Hz, 6,1 Hz, NCH), 3,08 (ddd, 1H, $J=13,4$ Hz, 10,2 Hz, 5,1 Hz, NCH), 2,91 (t, 2H, $J=7,3$ Hz, SCH₂), 2,20 (s, 3H, NHCOCH₃), 1,78 (s, 3H, NCOCH₃), 1,69 (qt, 2H, $J=7,4$ Hz, SCH₂CH₂), 1,60-1,38 (m, 4H, 2xCH₂), 1,33-1,27 (m, 4H, 2xCH₂), 1,27-1,21 (m, 6H, 3xCH₂), 0,89 (t, 3H, $J=6,9$ Hz, (CH₂)₅CH₃), 0,83 (t, 3H, $J=6,8$ Hz, (CH₂)₅CH₃); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171,43 (NCOCH₃), 169,23 (NHCOCH₃), 139,21 (C), 138,71 (C), 134,86 (C), 129,54 (6-ArCH), 116,96 (3-ArCH), 116,18 (5-ArCH), 47,77 (NCH₂), 31,69 (CH₂), 31,43 (CH₂), 31,32 (SCH₂), 28,71 (CH₂), 28,45 (CH₂), 27,95 (CH₂), 26,78 (CH₂), 24,61 (NHCOCH₃), 22,67 (CH₂), 22,59 (CH₂), 22,42 (NCOCH₃), 14,09 (2x((CH₂)₅CH₃)).

3.1.3.4 *N*-[4-acetamida-2-(metilenociclohexiltio)fenil]-*N*-hexilacetamida (**3d**)



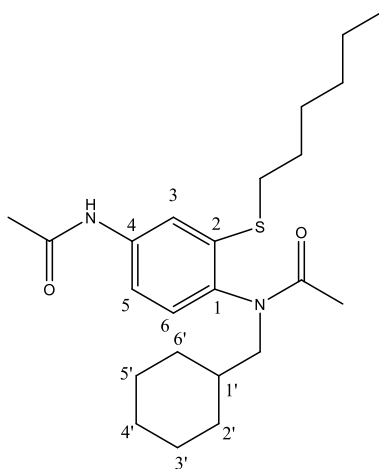
A partir da reação do *p*-toluenossulfonato de 6-acetamida-3-hexil-2-metilbenzotiazol-3-io (**2c**) e do brometo de metilenociclohexilo, na forma de óleo creme, com um rendimento de 54% após cromatografia em coluna (diclorometano/etanol 1%); ν_{\max} (cm^{-1}): 3307-3268 (NH), 3177, 3098, 3048, 2922, 2851, 1695, 1664 (C=O), 1632 (C=O), 1583, 1598, 1528, 1484, 1390, 1367, 1303, 1245, 1192, 1148, 1095, 1062, 1010, 961, 871, 824, 731; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,31 (s, 1H, NH), 7,72 (d, 1H, $J=2,2$ Hz, 3-ArH), 7,21 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, 2,3 Hz, 5-ArH), 6,98 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, 6-ArH), 4,03 (ddd, 1H, $J=13,3$ Hz, 10,1 Hz, 6,1 Hz, NCH), 3,08 (ddd, 1H, $J=13,3$ Hz, 10,1 Hz, 5,1 Hz, NCH), 2,79 (d, 2H, $J=6,7$ Hz, SCH₂), 2,20 (s, 3H, NHCOCH₃), 1,94-1,83 (m, 2H, CH₂), 1,78 (s, 3H, NCOCH₃), 1,75-1,61 (m, 4H, 2xCH₂), 1,61-1,38 (m, 3H, 1''-CH + CH₂), 1,30-1,19 (m, 8H, 4xCH₂), 1,08-0,94 (m, 2H, CH₂), 0,84 (t, 3H, $J=6,5$ Hz, N(CH₂)₅CH₃); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171,24 (NCOCH₃), 169,00 (NHCOCH₃), 139,33 (C), 138,93 (C), 135,19 (C), 129,65 (6-ArCH), 116,97 (3-ArCH), 116,01 (5-ArCH), 47,68 (NCH₂), 38,62 (SCH₂), 37,24 (1''-CH), 33,09 (CH₂), 33,08 (CH₂), 31,74 (CH₂), 28,02 (CH₂), 26,82 (CH₂), 26,34 (CH₂), 26,12 (2xCH₂), 24,69 (NHCOCH₃), 22,70 (CH₂), 22,48 (NCOCH₃), 14,14 (N(CH₂)₅CH₃).

3.1.3.5 *N*-[4-acetamida-2-(metilenociclohexiltio)fenil]-*N*-hexilacetamida (**3e**)



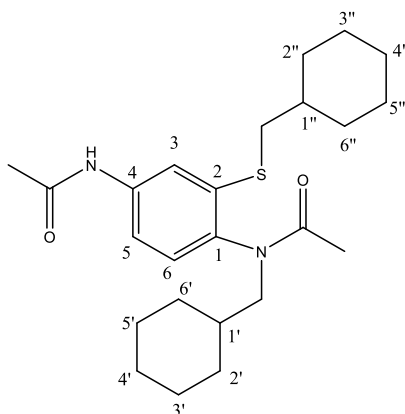
A partir da reação do *p*-toluenossulfonato de 6-acetamida-3-hexil-2-metilbenzotiazol-3-íio (**2c**) e do brometo de 2,4-dimetilbenzilo, na forma de óleo amarelo, com um rendimento de 56% após cromatografia em coluna (diclorometano/etanol 1%); IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3299-3265 (NH), 3175, 3096, 3041, 2953, 2926, 2856, 1694, 1663 (C=O), 1631 (C=O), 1597, 1583, 1526, 1484, 1442, 1389, 1366, 1302, 1246, 1194, 1153, 1095, 1061, 1033, 1009, 869, 823, 721, 659, 607; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,52 (s, 1H, NH), 7,89 (d, 1H, $J=2,3$ Hz, 3-ArH), 7,27 (dd, 1H, $J=8,5$ Hz, 2,0 Hz, 5-ArH), 7,13 (d, 1H, $J=7,8$ Hz, ArH), 6,97 (s, 1H, 3''-ArH), 6,96 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, 6-ArH), 6,91 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, ArH), 4,09 (s, 2H, SCH₂), 3,96 (ddd, 1H, $J=13,3$ Hz, 10,2 Hz, 6,1 Hz, NCH), 3,00 (ddd, 1H, $J=13,3$ Hz, 10,2 Hz, 5,1 Hz, NCH), 2,34 (s, 3H, Ar-CH₃), 2,27 (s, 3H, Ar-CH₃), 2,18 (s, 3H, NHCOCH₃), 1,73 (s, 3H, NCOCH₃), 1,55-1,33 (m, 2H, NCH₂CH₂), 1,31-1,10 (m, 6H, (CH₂)₂CH₂CH₂CH₂), 0,83 (t, 3H, $J=6,7$ Hz, N(CH₂)₅CH₃); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171,13 (NCOCH₃), 169,14 (NHCOCH₃), 139,06 (C), 138,72 (C), 137,79 (C), 136,83 (C), 135,30 (C), 131,57 (3''-ArCH), 130,42 (C), 129,95 (ArCH), 129,69 (ArCH), 126,98 (ArCH), 117,98 (3-ArCH), 116,71 (5-ArCH), 47,87 (NCH₂), 34,75 (SCH₂), 31,69 (CH₂), 27,93 (NCH₂CH₂), 26,77 (CH₂), 24,63 (NHCOCH₃), 22,67 (CH₂), 22,41 (NCOCH₃), 21,12 (Ar-CH₃), 19,19 (Ar-CH₃), 14,12 (N(CH₂)₅CH₃).

3.1.3.6 *N*-[4-acetamida-2-(hexiltio)fenil]-*N*-metilenciclohexilacetamida (**3f**)



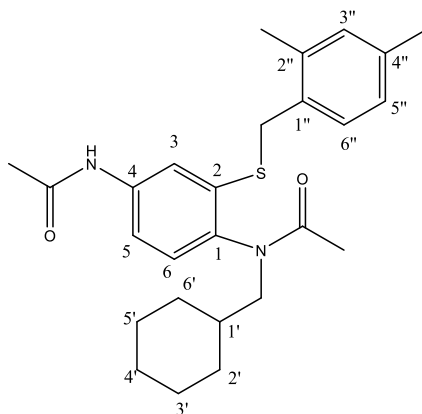
A partir da reação do brometo de 6-acetamida-3-(ciclohexilmetil)-2-metil-benzotiazol-3-io (**2d**) e do *p*-toluenossulfonato de hexilo, na forma de óleo amarelo, com um rendimento de 47% após cromatografia em coluna (diclorometano/etanol 1%); IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3293-3269 (NH), 3099, 2922, 2851, 1777, 1696, 1667 (C=O), 1634 (C=O), 1598, 1529, 1484, 1447, 1390, 1365, 1304, 1249, 1207, 1169, 1084, 1035, 982, 870, 823, 727, 702, 611; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,13 (s, 1H, NH), 7,71 (d, 1H, $J=2,3$ Hz, 3-ArH), 7,21 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, 2,3 Hz, 5-ArH), 7,00 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, 6-ArH), 4,00 (dd, 1H, $J=13,5$ Hz, 9,1 Hz, NCH), 2,96-2,87 (m, 3H, NCH + SCH₂), 2,21 (s, 3H, NHCOCH₃), 1,81 (s, 3H, NCOCH₃), 1,79-1,54 (m, 8H, 4xCH₂), 1,51-1,37 (m, 3H, 1'-CH + CH₂), 1,35-1,24 (m, 4H, 2xCH₂), 1,23-1,09 (m, 2H, CH₂), 1,08-0,90 (m, 2H, CH₂), 0,87 (t, 3H, $J=6,87$ Hz, S(CH₂)₅CH₃); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 172,52 (NCOCH₃), 169,19 (NHCOCH₃), 138,83 (C), 138,80 (C), 135,26 (C), 129,68 (6-ArCH), 117,15 (3-ArCH), 116,26 (5-ArCH), 53,48 (NCH₂), 36,52 (1'-CH), 31,45 (CH₂), 31,39 (SCH₂), 31,22 (CH₂), 30,94 (CH₂), 28,75 (CH₂), 28,46 (CH₂), 26,51 (CH₂), 25,99 (CH₂), 25,95 (CH₂), 24,64 (NHCOCH₃), 22,62 (CH₂), 22,22 (NCOCH₃), 14,12 (S(CH₂)₅CH₃).

3.1.3.7 *N*-[4-acetamida-2-(metilenociclohexiltio)fenil]-*N*-metilenociclohexilacetamida (3g)



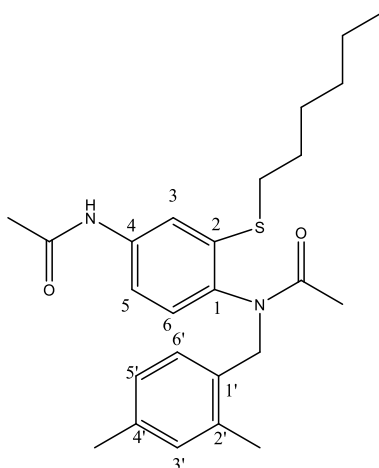
A partir da reação do brometo de 6-acetamida-3-(ciclohexilmetil)-2-metil-benzotiazol-3-io (2d) e do brometo de metilenociclohexilo, na forma de óleo rosa, com um rendimento de 42% após cromatografia em coluna (diclorometano/etanol 1%); IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3303-3265 (NH), 3176, 3097, 3048, 2920, 2849, 1694, 1665 (C=O), 1633 (C=O), 1598, 1528, 1484, 1446, 1390, 1364, 1303, 1247, 1207, 1182, 1149, 1083, 1033, 1011, 980, 873, 824, 733, 657, 610; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,27 (s, 1H, NH), 7,71 (d, 1H, $J=2,2$ Hz, 3-ArH), 7,21 (dd, 1H, $J=8,5$ Hz, 2,2 Hz, 5-ArH), 6,99 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, 6-ArH), 4,01 (dd, 1H, $J=13,5$ Hz, 9,1 Hz, NCH), 2,89 (dd, 1H, $J=13,5$ Hz, 5,4 Hz, NCH), 2,79 (d, 2H, $J=6,7$ Hz, SCH₂), 2,19 (s, 3H, NHCOCH₃), 1,94-1,83 (m, 2H, CH₂), 1,79 (s, 3H, NCOCH₃), 1,77-1,54 (m, 9H, 1''-CH + 4xCH₂), 1,53-1,39 (m, 1H, 1'-CH), 1,30-1,09 (m, 6H, 3xCH₂), 1,08-0,90 (m, 4H, 2xCH₂); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171,79 (NCOCH₃), 168,98 (NHCOCH₃), 139,22 (C), 138,81 (C), 135,53 (C), 129,72 (6-ArCH), 117,10 (3-ArCH), 116,08 (5-ArCH), 53,26 (NCH₂), 38,65 (SCH₂), 37,26 (1''-CH), 36,58 (1'-CH), 33,10 (CH₂) 33,09 (CH₂), 31,26 (CH₂), 30,99 (CH₂), 26,55 (CH₂), 26,35 (CH₂), 26,12 (2xCH₂), 26,02 (CH₂), 25,98 (CH₂), 24,71 (NHCOCH₃), 22,50 (NCOCH₃).

3.1.3.8 *N*-[4-acetamida-2-(2,4-dimetilbenziltio)fenil]-*N*-metilenociclohexilacetamida (**3h**)



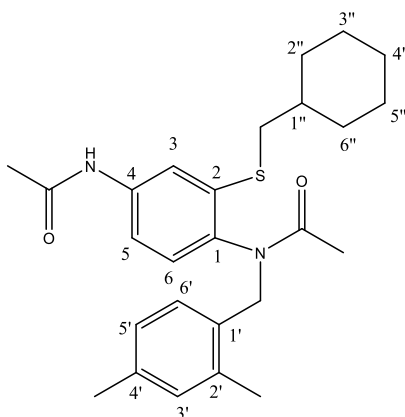
A partir da reação do brometo de 6-acetamida-3-(ciclohexilmetil)-2-metil-benzotiazol-3-io (**2d**) e do brometo de 2,4-dimetilbenzilo, na forma de óleo amarelo, com um rendimento de 53% após cromatografia em coluna (diclorometano/etanol 1%); IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3301-3265 (NH), 2920, 2849, 1694, 1666 (C=O), 1633 (C=O), 1597, 1526, 1484, 1446, 1388, 1302, 1247, 1207, 1182, 1149, 1084, 1033, 1011, 979, 869, 823, 734, 694, 658, 610; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,09 (s, 1H, NH), 7,85 (d, 1H, $J=2,3$ Hz, 3-ArH), 7,25 (dd, 1H, $J=7,8$ Hz, 2,0 Hz, 5-ArH), 7,13 (d, 1H, $J=7,7$ Hz, ArH), 7,00 (d, 1H, $J=8,5$ Hz, 6-ArH), 6,97 (s, 1H, 3''-ArH), 6,91 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, ArH), 4,09 (s, 2H, SCH_2), 3,96 (dd, 1H, $J=13,6$ Hz, 9,2 Hz, NCH), 2,77 (dd, 1H, $J=13,5$ Hz, 5,4 Hz, NCH), 2,34 (s, 3H, Ar- CH_3), 2,27 (s, 3H, Ar- CH_3), 2,19 (s, 3H, NHCOCH_3), 1,79-1,49 (m, 9H, $\text{NCOCH}_3 + 3\times\text{CH}_2$), 1,48-1,36 (m, 1H, 1'-CH), 1,17-1,07 (m, 2H, CH_2), 1,04-0,82 (m, 2H, CH_2). RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171,52 (NCOCH_3), 169,03 (NHCOCH_3), 138,86 (C), 138,65 (C), 137,79 (C), 136,85 (C), 135,84 (C), 131,58 (3''-ArCH), 130,46 (C), 129,95 (ArCH), 129,87 (ArCH), 126,98 (ArCH), 118,18 (3-ArCH), 116,75 (5-ArCH), 53,38 (NCH_2), 36,54 (1'-CH), 34,81 (SCH_2), 31,19 (CH_2), 30,97 (CH_2), 26,53 (CH_2), 25,98 (CH_2), 25,95 (CH_2), 24,67 (NHCOCH_3), 22,49 (NCOCH_3), 21,13 (Ar- CH_3), 19,23 (Ar- CH_3).

3.1.3.9 *N*-[4-acetamida-2-(hexiltio)fenil]-*N*-(2,4-dimetilbenzil)acetamida (**3i**)



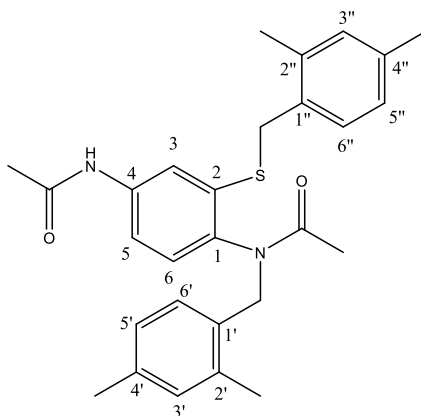
A partir da reação do iodeto de 6-acetamida-3-(2,4-dimetilbenzil)-2-metilbenzotiazol-3-íolo (**2e**) e do *p*-toluenossulfonato de hexilo, na forma de óleo amarelo, com um rendimento de 27% após cromatografia em coluna (diclorometano/etanol 1%); IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3305-3269 (NH), 3177, 3097, 2953, 2926, 2856, 1695, 1661 (C=O), 1634 (C=O), 1598, 1583, 1528, 1485, 1386, 1302, 1244, 1200, 1122, 1083, 1034, 1008, 969, 872, 828, 779, 749, 649, 605; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,75 (d, 1H, $J=2,3$ Hz, 3-ArH), 7,40 (s, 1H, NH), 6,96 (d, 1H, $J=7,7$ Hz, ArH), 6,92 (dd, 1H, $J=8,5$ Hz, 2,2 Hz, 5-ArH), 6,85 (s, 1H, 3'-ArH), 6,83 (d, 1H, $J=8,1$ Hz, ArH), 6,43 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, 6-ArH), 5,50 (d, 1H, $J=14,4$ Hz, NCH), 4,15 (d, 1H, $J=14,4$ Hz, NCH), 2,91 (t, 2H, $J=7,3$ Hz, SCH₂), 2,24 (s, 3H, Ar-CH₃), 2,16 (s, 3H, NHCOCH₃), 2,04 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,82 (s, 3H, NCOCH₃), 1,68 (qt, 2H, $J=7,5$ Hz, SCH₂CH₂), 1,47 (qt, 2H, $J=7,1$ Hz, S(CH₂)₂CH₂), 1,34-1,26 (m, 4H, S(CH₂)₃CH₂CH₂), 0,90 (t, 3H, $J=6,2$ Hz, S(CH₂)₅CH₃); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171,23 (NHCOCH₃), 168,93 (NCOCH₃), 138,89 (C), 138,79 (C), 137,15 (C), 136,87 (C), 134,17 (C), 132,17 (C), 131,01 (3'-ArCH), 130,34 (ArCH), 130,11 (ArCH), 126,62 (ArCH), 116,60 (3-ArCH), 115,69 (5-ArCH), 46,98 (NCH₂), 31,48 (CH₂), 31,38 (SCH₂), 28,75 (S(CH₂)₂CH₂), 28,52 (SCH₂CH₂), 24,70 (NHCOCH₃), 22,64 (CH₂), 22,34 (NCOCH₃), 21,12 (Ar-CH₃), 19,12 (Ar-CH₃), 14,14 (S(CH₂)₅CH₃).

3.1.3.10 *N*-[4-acetamida-2-(metilenociclohexiltio)fenil]-*N*-(2,4-dimetilbenzil)acetamida (3j)



A partir da reação do iodeto de 6-acetamida-3-(2,4-dimetilbenzil)-2-metilbenzotiazol-3-íolo (2e) e do brometo de metilenociclohexilo, na forma de óleo amarelo, com um rendimento de 60% após cromatografia em coluna (diclorometano/etanol 1%); IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3304-3268 (NH), 3176, 3096, 3041, 2921, 2849, 1694, 1662 (C=O), 1633 (C=O), 1598, 1582, 1527, 1484, 1446, 1388, 1302, 1256, 1200, 1121, 1082, 1033, 1007, 962, 872, 824, 779, 749, 649; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,73 (d, 1H, $J=2,3$ Hz, 3-ArH), 7,30 (s, 1H, NH), 6,97 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, ArH), 6,90 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, 2,3 Hz, 5-ArH), 6,86 (s, 1H, 3'-ArH), 6,83 (d, 1H, $J=7,7$ Hz, ArH), 6,44 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, 6-ArH), 5,51 (d, 1H, $J=14,4$ Hz, NCH), 4,16 (d, 1H, $J=14,4$ Hz, NCH), 2,80 (d, 2H, $J=6,7$ Hz, SCH₂), 2,24 (s, 3H, Ar-CH₃), 2,16 (s, 3H, NHCOCH₃), 2,05 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,97-1,86 (m, 2H, CH₂), 1,82 (s, 3H, NCOCH₃), 1,78-1,62 (m, 4H, 2xCH₂), 1,63-1,54 (m, 1H, 1''-CH), 1,32-1,11 (m, 2H, CH₂), 1,10-0,97 (m, 2H, CH₂); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171,11 (NCOCH₃), 168,76 (NHCOCH₃), 139,28 (C), 138,74 (C), 137,13 (C), 136,87 (C), 134,35 (C), 132,27 (C), 131,01 (3'-ArCH), 130,36 (ArCH), 130,13 (ArCH), 126,63 (ArCH), 116,62 (3-ArCH), 115,54 (5-ArCH), 46,93 (NCH₂), 38,64 (SCH₂), 37,30 (1''-CH), 33,12 (CH₂), 33,07 (CH₂), 26,37 (CH₂), 26,15 (2xCH₂), 24,77 (NHCOCH₃), 22,39 (NCOCH₃), 21,14 (Ar-CH₃), 19,13 (Ar-CH₃).

3.1.3.11 *N*-[4-acetamida-2-(2,4-dimetilbenziltio)fenil]-*N*-(2,4-dimetilbenzil)acetamida (3k)



A partir da reação do iodeto de 6-acetamida-3-(2,4-dimetilbenzil)-2-metilbenzotiazol-3-io (2e) e do brometo de 2,4-dimetilbenzilo, na forma de óleo creme, com um rendimento de 19% após cromatografia em coluna (diclorometano/etanol 1%); IV (v_{\max}/cm^{-1}): 3247 (NH), 3175, 3097, 3045, 2950, 2928, 1694 (C=O), 1629, 1605, 1580, 1529, 1506, 1481, 1437, 1410, 1393, 1377, 1363, 1345, 1300, 1288, 1259, 1245, 1227, 1197, 1160, 1122, 1079, 1061, 1032, 1003, 966, 871, 848, 822, 778, 749, 732, 708, 695, 655, 609; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,00 (s, 1H, NH), 7,90 (d, 1H, $J=2,3$ Hz, 3-ArH), 7,14 (d, 1H, $J=7,7$ Hz, ArH), 6,99 (s, 1H, 3''-ArH), 6,95 (dd, 1H, $J=8,5$ Hz, 1,9 Hz, 5-ArH), 6,93 (d, 1H, $J=7,8$ Hz, ArH), 6,85 (s, 1H, 3'-ArH), 6,84 (d, 1H, $J=6,6$, ArH), 6,80 (d, 1H, $J=8,2$ Hz, ArH), 6,43 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, 6-ArH), 5,45 (d, 1H, $J=14,4$ Hz, NCH), 4,10 (s, 2H, SCH₂), 4,03 (d, 1H, $J=14,3$ Hz, NCH), 2,37 (s, 3H, Ar-CH₃), 2,29 (s, 3H, Ar-CH₃), 2,24 (s, 3H, Ar-CH₃), 2,16 (s, 3H, NHCOCH₃), 2,01 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,77 (s, 3H, NCOCH₃); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 170,97 (NCOCH₃), 168,85 (NHCOCH₃), 138,78 (C), 138,54 (C), 137,81 (C), 137,15 (C), 136,85 (2xC), 134,63 (C), 132,12 (C), 131,63 (3''-ArCH), 131,01 (3'-ArCH), 130,60 (C), 130,38 (ArCH), 130,20 (ArCH), 130,04 (ArCH), 126,96 (ArCH), 126,60 (ArCH), 117,84 (3-ArCH), 116,29 (5-ArCH), 47,24 (NCH₂), 34,80 (SCH₂), 24,75 (NHCOCH₃), 22,33 (NCOCH₃), 21,16 (Ar-CH₃), 21,13 (Ar-CH₃), 19,24 (Ar-CH₃), 19,09 (Ar-CH₃).

3.2 Avaliação Biológica

As células NHDF, LNCaP e MCF-7 utilizadas neste estudo, foram adquiridas à *American Type Culture Collection* (ATCC). Os meios de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) e DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), reagentes e suplementos foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

3.2.1 Cultura de células

As células mantiveram-se em frascos de cultura de 75 ou 150 cm² e incubadas a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂, substituindo-se o meio de cultura a cada 2 a 3 dias.

As células NHDF, utilizadas nas passagens 11 e 12, mantiveram-se em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio e 1% de antibiótico/antimicótico (AB, 10000 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B).

As células LNCaP mantiveram-se em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de FBS e 1% de antibiótico (10000 unidades/mL de penicilina e 25 µg/mL de anfotericina B). Nos ensaios, utilizaram-se as passagens 22 a 26.

As células MCF-7, utilizadas na passagem de 22 a 30 mantiveram-se em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de antibiótico/antimicótico AB.

Após as células atingirem a confluência adequada, tripsinizaram-se e, antes dos ensaios, contaram-se as células viáveis, pelo ensaio de exclusão com azul triptano, e diluíram-se adequadamente em meio de cultura completo.

3.2.2 Preparação das soluções dos compostos

Dissolveram-se as *orto*-(alquiltio)-*N*-alquilacetanilidas **3** em estudo, assim como o 5-fluorouracilo e a Nimesulida, em dimetilsulfóxido numa concentração de 10 mM e armazenadas a 4 °C. Para os ensaios, as soluções foram preparadas no meio de cultura adequado a partir desta solução-mãe. A concentração final do solvente nos ensaios foi inferior a 1%, não apresentando efeito significativo na viabilidade das células (dados não apresentados). Para cada estudo preliminar, preparou-se uma solução fresca de peróxido de hidrogénio, dissolvido em água, a uma concentração de 1 mM.

3.2.3 Ensaios de viabilidade celular

3.2.3.1 Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi avaliada pela quantificação da extensão da redução do MTT. Semeou-se 250 μL de células em placas de 48 poços em meio de cultura com uma concentração celular de 2×10^4 células/mL e incubaram-se as placas a 37 °C numa atmosfera húmida com 5% de CO_2 , durante 48 horas, para a adesão das mesmas. Após a adesão, trataram-se as células com diferentes concentrações dos compostos por diluições adequadas em meio de cultura (30 μM nos estudos preliminares e 0,01 μM e 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 50 μM e 100 μM nos estudos de concentração-resposta) e incubou-se durante 48 horas. As células não tratadas servem como controlo negativo, o 5-fluorouracilo (30 μM) e o peróxido de hidrogénio (1 mM) servem como controlos positivos, enquanto que a nimesulida (30 μM) serve como composto de referência.

No final da incubação, removeu-se o meio lavaram-se as células com solução salina de tampão fosfato e adicionou-se meio fresco sem FBS e solução de MTT (5 mg/mL em solução salina de tampão fosfato) e incubou-se a 37 °C durante 4 horas. De seguida, removeu-se o sobrenadante e dissolveram-se os cristais de formazano em dimetilsulfóxido. Registou-se a absorvância num espectrofotómetro de microplacas Bio-Rad xMark™ a 570 nm, utilizando o *software* Microplate Manager® 6.3. A extensão da morte celular foi expressa por percentagem de viabilidade celular relativamente às células utilizadas como controlo negativo.

3.2.3.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada com o objetivo de analisar a viabilidade celular após estudos de coloração das células mortas com iodeto de propídio. Semeou-se 1 mL de células MCF-7 com densidade de 4×10^4 células/mL em placas de 12 poços e incubaram-se a 37 °C com 5% de CO_2 . Após 48 horas, trataram-se as células com o controlo positivo 5-fluorouracilo, com o composto referência nimesulida e com as acetanilidas **3g** e **3i** a uma concentração de 30 μM e incubaram-se durante 24 horas, tendo-se mantido as células não tratadas como controlo negativo. Após a incubação, realizou-se uma avaliação dos efeitos dos compostos na morfologia das células num microscópio ótico (Olympus CKX41) acoplado a uma câmara digital (Olympus SP-500UZ) e tiraram-se fotografias (Zoom: 100 x). De seguida, recolheu-se o sobrenadante e as células de cada poço para tubos distintos, sendo esta suspensão celular mantida em gelo e sedimentada por centrifugação. Ressuspenderam-se as células em 400 μL de meio de cultura. Da suspensão celular, transferiram-se 397,5 μL para um tubo de FASC, contendo 2,5 μL de uma solução de 1 mg/mL de iodeto de propídio. Após a diluição, foram adquiridos um mínimo de 20000 eventos, utilizando o citómetro de fluxo BD Accuri™ C6 e os canais FSC, SSC (*Side Scatter Characteristics*) e FL3 (PI). A aquisição e análise foi realizada com o *software* BD Accuri™ C6. Na análise de resultados, com base no gráfico de SSC/FSC delineou-se uma região (R1), por forma a excluir restos celulares existentes na população de eventos adquiridos (dados não mostrados). No gráfico de FSC/FL3, definiram-se regiões (quadrantes), correspondendo a células viáveis de maior dimensão (Q1), células viáveis de

menor dimensão, incluindo ainda alguns restos celulares (Q2); células mortas de maior dimensão (Q3) e células mortas de menor dimensão (Q4). Calculou-se a percentagem de eventos relacionados com o número de eventos em cada quadrante a partir do número total de eventos dos quatro quadrantes.

3.2.4 Análise estatística

Os ensaios de MTT e de citometria de fluxo foram realizados, respetivamente, em quintuplicado e triplicado e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD). Todos os resultados apresentados foram representativos de pelo menos dois ensaios independentes, à exceção dos ensaios da acetanilida **3a** e da Nimesulida nas células NHDF e LNCaP e do ensaio de citometria de fluxo. Os valores de IC₅₀, referentes aos ensaios de proliferação celular dos compostos, foram calculados a partir da curva concentração-resposta por cálculos de ajustamento sigmóide (intervalo de confiança de 95%). Nos resultados de citometria de fluxo, calculou-se a viabilidade celular nos quatro quadrantes com intervalo de confiança de 95%.

3.3 Docking molecular

3.3.1 Preparação das proteínas

As estruturas tridimensionais cristalizadas para a COX-2 (código de identificação: 3Q7D), a aromatase (código de identificação: 3EQM), o recetor alfa de estrogénios (código de identificação: 1A52) e o recetor de androgénios (código de identificação: 2AMA) foram obtidas a partir da base de dados PDB (do inglês - *Protein Data Bank*). Removeram-se os ligandos co-cristalizados e as moléculas de água da estrutura da proteína, utilizando o *software* Quimera 1.9. Adicionaram-se os hidrogénios não polares e as cargas parciais Gasteiger, utilizando o *software* AutoDockTolls 1.5.6, sendo as estruturas convertidas para formato pdbqt. Para a proteína COX-2, adicionaram-se os átomos polares e as cargas Kollman utilizando o mesmo *software*.

3.3.2 Preparação dos Ligandos

Para obter o ligando original co-cristalizado, removeu-se a proteína, os restantes ligandos e as moléculas de água pelo Chimera 1.9. Desenharam-se as estruturas em duas dimensões dos ligandos estudados no *software* ChemBioDraw 13.0. Adicionaram-se os hidrogénios e otimizaram-se as estruturas tridimensionais dos ligandos pelo MMFF94, incluído no *software* ChemBio3D 13.0. Guardaram-se os ligandos em formato pdb. Para cada ligando, adicionaram-se os átomos de hidrogénio não polares e as cargas parciais Gasteiger, definiram-se as ligações rotacionais e determinaram-se o número de torções pelo *software* AutoDockTools 1.5.6. Os ligandos foram convertidos em formato pdbqt.

3.3.3 Cálculos da *Grid*

Calcularam-se os mapas da *grid* para cada proteína pelo Autogrid4 incluído no *software* AutoDockTools 1.5.6., baseando-se nas coordenadas do sítio ativo de cada estrutura cristalizada. Definiram-se os parâmetros de dessolvatação e eletrostáticos, com um valor dielétrico de -0,1465. A posição da *grid box* definiu-se no centro do sítio ativo de cada proteína, com as dimensões x,y,z de 50, 50 e 50, com espaçamento de 0,375 Å, considerando que os ligandos estudados apresentam um tamanho semelhante ao do ligando original co-cristalizado.

3.3.4 Simulações de *docking molecular*

Todos os cálculos de *docking* realizaram-se utilizando o algoritmo genético Lamarckian a partir do *software* AutoDockTools 1.5.6., apresentando um tamanho de população de 150 e um total de 10 conformações para cada simulação. Os parâmetros de *docking* foram mantidos como padrão. Visualizaram-se as interações entre os diferentes ligandos e o sítio ativo de cada proteína recorrendo ao *software* Discovery Studio Visualizer 16.1.

Capítulo 4 - Referências

- (1) Imming, P. The Practice of Medicinal Chemistry. In *Medicinal Chemistry: definitions and objectives, drug activity phases, drug classification systems*; Elsevier Ltd, 2015; 63-72.
- (2) Lombardino, J. G.; Lowe, J. A. The Role of the Medicinal Chemist in Drug Discovery - Then and Now. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2004, 3, 853-862.
- (3) Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2004, 3, 935-949.
- (4) Knoke, F.; Redl, S. Molecular Docking. *Proteins* 2007, 69, 139-159.
- (5) de Ruyck, J.; Brysbaert, G.; Blossey, R.; Lensink, M. F. Molecular Docking as a Popular Tool in Drug Design, an in Silico Travel. *Advances and Application in Bioinformatics and Chemistry* 2016, 9, 1-11.
- (6) Hernández-Santoyo, A.; Tenorio-Barajas, A. Y.; Altuzar, V.; Vivanco-Cid, H.; Claudia, M.-B. Protein-Protein and Protein-Ligand Docking. In *Protein Engineering - Technology and Application*; 2013; 64-81.
- (7) Rainsford, K. D. *Nimesulide - Actions and Uses*; Birkhäuser Verlag Basel, 2005, 1-659.
- (8) Prasad, A.; Sharma, M. L.; Kanwar, S.; Rathee, R.; Sharma, S. D. A Practical Large Scale Synthesis of Nimesulide - a Step Ahead. *Journal of Scientific and Industrial Research* 2005, 64, 756-760.
- (9) Singla, A.; Chawla, M.; Singh, A. Review Nimesulide: Some Pharmaceutical and Pharmacological Aspects: An Update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2000, 52, 467-486.
- (10) Sobolewski, C.; Cerella, C.; Dicato, M.; Ghibelli, L.; Diederich, M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *International Journal of Cell Biology* 2010, 2010, 1-21.
- (11) Borne, R; Levi, M.; Wilson, N. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs In Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 7ª edição, Lippincott Williams & Wilkins, 987-1044.
- (12) Julémont, F.; De Leval, X.; Michaux, C.; Renard, J. F.; Winum, J. Y.; Montero, J. L.;

- Damas, J.; Dogné, J. M.; Pirotte, B. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Pyridinic Analogues of Nimesulide as Cyclooxygenase-2 Selective Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004, 47, 6749-6759.
- (13) Renard, J.-F.; Arslan, D.; Garbacki, N.; Pirotte, B.; de Leval, X. Pyridine Analogues of Nimesulide: Design, Synthesis, and in Vitro and in Vivo Pharmacological Evaluation as Promising Cyclooxygenase 1 and 2 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2009, 52, 5864-5871.
- (14) Michaux, C.; Charlier, C.; Julémont, F.; De Leval, X.; Dogné, J. M.; Pirotte, B.; Durant, F. A New Potential Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Pyridinic Analogue of Nimesulide. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2005, 40, 1316-1324.
- (15) Hung, W.-C. Anti-Metastatic Action of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Kaohsiung Journal of Medical Science* 2008, 24, 392-397.
- (16) Su, B.; Diaz-Cruz, E. S.; Landini, S.; Brueggemeier, R. W. Novel Sulfonanilide Analogues Suppress Aromatase Expression and Activity in Breast Cancer Cells Independent of COX-2 Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006, 49, 1413-1419.
- (17) Su, B.; Landini, S.; Davis, D. D.; Brueggemeier, R. W. Synthesis and Biological Evaluation of Selective Aromatase Expression Regulators in Breast Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 2007, 50, 1635-1644.
- (18) Su, B.; Cai, X.; Hong, Y.; Chen, S. COX-2 Inhibitor Nimesulide Analogs Are Aromatase Suppressors in Breast Cancer Cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2010, 122, 232-238.
- (19) Su, B.; Tian, R.; Darby, M. V.; Brueggemeier, R. W. Novel Sulfonanilide Analogs Decrease Aromatase Activity in Breast Cancer Cells: Synthesis, Biological Evaluation, and Ligand-Based Pharmacophore Identification. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008, 51, 1126-1135.
- (20) Brueggemeier, R. W.; Su, B.; Sugimoto, Y.; Diaz-Cruz, E. S.; Davis, D. D. Aromatase and COX in Breast Cancer: Enzyme Inhibitors and beyond. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2007, 106, 16-23.
- (21) Brueggemeier, R. W.; Su, B.; Darby, M. V.; Sugimoto, Y. Selective Regulation of Aromatase Expression for Drug Discovery. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2010, 118, 207-210.
- (22) Rainsford, K. D. Current Status of the Therapeutic Uses and Actions of the Preferential Cyclo-Oxygenase-2 NSAID, Nimesulide. *Inflammopharmacology* 2006, 14, 120-137.

- (23) Pan, Y.; Zhang, J. S.; Gazi, M. H.; Young, C. Y. F. The Cyclooxygenase 2-Specific Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Celecoxib and Nimesulide Inhibit Androgen Receptor Activity via Induction of c-Jun in Prostate Cancer Cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2003, 12, 769-774.
- (24) Nakamura, K.; Tsuji, K.; Konishi, N.; Okumura, H.; Matsuo, M. Studies on Antiinflammatory Agents II. Synthesis and Pharmacological Properties of 2'-(Phenylthio)methanesulfonanilides and Related Derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1993, 41, 894-906.
- (25) Klein, T.; Nüsing, R. M.; Pfeilschifter, J.; Ullrich, V. Selective Inhibition of Cyclooxygenase 2. *Biochemical Pharmacology* 1994, 48, 1605-1610.
- (26) Burgers A. COX-2 Inhibitors and Leukotriene Modulators. In *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*; Abraham, D. J., Ed.; Wiley, 2003; 1-885.
- (27) Futaki, N.; Yoshikawa, K.; Hamasaka, Y.; Arai, I.; Higuchi, S.; Iizuka, H.; Otomo, S. NS-398, a Novel Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug with Potent Analgesic and Antipyretic Effects, Which Causes Minimal Stomach Lesions. *General Pharmacology* 1993, 24, 105-110.
- (28) Su, B.; Diaz-Cruz, E. S.; Landini, S.; Brueggemeier, R. W. Suppression of Aromatase in Human Breast Cells by a Cyclooxygenase-2 Inhibitor and Its Analog Involves Multiple Mechanisms Independent of Cyclooxygenase-2 Inhibition. *Steroids* 2008, 73, 104-111.
- (29) Renard, J.-F. O.; Julemont, F.; de Leval, X.; Pirotte, B. The Use of Nimesulide and Its Analogues in Cancer Chemoprevention. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 2006, 6, 233-237.
- (30) Cerella, C.; Sobolewski, C.; Chateauvieux, S.; Henry, E.; Schnekenburger, M.; Ghelfi, J.; Dicato, M.; Diederich, M. COX-2 Inhibitors Block Chemotherapeutic Agent-Induced Apoptosis prior to Commitment in Hematopoietic Cancer Cells. *Biochemical Pharmacology* 2011, 82, 1277-1290.
- (31) Chen, B.; Su, B.; Chen, S. A COX-2 Inhibitor Nimesulide Analog Selectively Induces Apoptosis in Her2 Overexpressing Breast Cancer Cells via Cytochrome c Dependent Mechanisms. *Biochemical Pharmacology* 2009, 77, 1787-1794.
- (32) Su, B.; Cai, X.; Hong, Y.; Chen, S. COX-2 Inhibitor Nimesulide Analogs Are Aromatase Suppressors in Breast Cancer Cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2010, 122, 232-238.
- (33) Su, B.; Darby, M. V.; Brueggerneier, R. W. Synthesis and Biological Evaluation of Novel

Sulfonanilide Compounds as Antiproliferative Agents for Breast Cancer. *Journal of Combinatorial Chemistry* 2008, 10, 475-483.

- (34) Tsuji, K.; Nakamura, K.; Konishi, N.; Okumura, H.; Matsuo, M. Studies on Antiinflammatory Agents I. Synthesis and Pharmacological Properties of 2'-Phenoxy-Methanesulfonanilide Derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1992, 40, 2399-2409.
- (35) Zhong, B.; Lama, R.; Smith, K. M.; Xu, Y.; Su, B. Design and Synthesis of a Biotinylated Probe of COX-2 Inhibitor Nimesulide Analog JCC76. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2011, 21, 5324-5327.
- (36) Zhong, B.; Cai, X.; Chennamaneni, S.; Yi, X.; Liu, L.; Pink, J. J.; Dowlati, A.; Xu, Y.; Zhou, A.; Su, B. From COX-2 Inhibitor Nimesulide to Potent Anti-Cancer Agent: Synthesis, in Vitro, in Vivo and Pharmacokinetic Evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2012, 47, 432-444.
- (37) Karakus, S.; Kucukguzel, S. G.; Kucukguzel, I.; De Clercq, E.; Pannecoque, C.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Sahin, F.; Bayrak, O. F. Synthesis, Antiviral and Anticancer Activity of Some Novel Thioureas Derived from *N*-(4-Nitro-2-Phenoxyphenyl)-Methanesulfonamide. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009, 44, 3591-3595.
- (38) Su, B.; Chen, S. Lead Optimization of COX-2 Inhibitor Nimesulide Analogs to Overcome Aromatase Inhibitor Resistance in Breast Cancer Cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2009, 19, 6733-6735.
- (39) Kankanala, K.; Reddy, V. R.; Devi, Y. P.; Mangamoori, L. N.; Mukkanti, K.; Pal, S. Nimesulide Based Novel Glycolamide Esters: Their Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation. *Journal of Chemistry* 2013, 1-8.
- (40) Mareddy, J.; Nallapati, S. B.; Anireddy, J.; Devi, Y. P.; Mangamoori, L. N.; Kapavarapu, R.; Pal, S. Synthesis and Biological Evaluation of Nimesulide Based New Class of Triazole Derivatives as Potential PDE4B Inhibitors against Cancer Cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2013, 23, 6721-6727.
- (41) Reddy, L. V.; Nakka, M.; Suman, A.; Ghosh, S.; Helliwell, M.; Mukkanti, K.; Mukherjee, A. K.; Pal, S. Synthesis of Novel Quinoline Analogues of Nimesulide: An Unusual Observation. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 2011, 48, 555-562.
- (42) Reddy, L. V.; Kethavath, M.; Nakka, M.; Beevi, S. S.; Mangamoori, L. N.; Mukkanti, K.; Pal, S. Design and Synthesis of Novel Cytotoxic Agents Based on Combined Framework of Quinoline and Nimesulide. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 2011, 49, 80-87.

- (43) Praveena, K. S. S.; Durgadas, S.; Babu, N. S.; Akkenapally, S.; Kumar, C. G.; Deora, G. S.; Murthy, N. Y. S.; Mukkanti, K.; Pal, S. Synthesis of 2,2,4-Trimethyl-1,2-Dihydroquinolinyl Substituted 1,2,3-Triazole Derivatives: Their Evaluation as Potential PDE 4B Inhibitors Possessing Cytotoxic Properties against Cancer Cells. *Bioorganic Chemistry* 2014, 53, 8-14.
- (44) Julemont, F.; de Leval, X.; Michaux, C.; Renard, J. F.; Winum, J. Y.; Montero, J. L.; Damas, J.; Dogne, J. M.; Pirotte, B. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Pyridinic Analogues of Nimesulide as Cyclooxygenase-2 Selective Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004, 47, 6749-6759.
- (45) Lu, X.; Zhang, H.; Li, X.; Chen, G.; Li, Q. S.; Luo, Y.; Ruan, B. F.; Chen, X. W.; Zhu, H. L. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Pyridine Acyl Sulfonamide Derivatives as Novel COX-2 Inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2011, 19, 6827-6832.
- (46) Almeida, P. Cianinas, a Cor Não Visível Da Fotografia. *Química - Boletim da Sociedade Portuguesa de Química* 1999, 73, 9-12.
- (47) Santos, R.; Fernandes, L. M.; Boto, R. F.; Simões, R.; Almeida, P. NMR Spectroscopy Study of 2-Methylbenzoxazolium Salts Hydroxylation in DMSO-*d*₆ Solution. *Tetrahedron Letters* 2006, 47, 6723-6725.
- (48) Ramos, S. S.; Reis, L. V.; Boto, R. E. F.; Santos, P. F.; Almeida, P. Synthesis and Dynamic Study of New *Ortho*-(Alkylchalcogen)acetanilide Atropisomers. A Second Look at the Hydrolysis of Quaternary 2-Methylbenzazol-3-ium Salts. *Tetrahedron Letters* 2013, 54, 5441-5444.
- (49) Ramos, S. S.; Almeida, S. S.; Leite, P. M.; Boto, R. E. F.; Silvestre, S.; Almeida, P. VT-NMR and Cytotoxic Evaluation of Some New *Ortho*-(Alkylchalcogen)acetanilides. *Tetrahedron* 2014, 70, 8930-8937.
- (50) Dos Santos, A. R.; Pinheiro, A. C.; Soderro, A. C. R.; Da Cunha, A. S.; Padilha, M. C.; De Sousa, P. M.; Fontes, S. P.; Veloso, M. P.; Fraga, C. A. M. Atropoisomerismo: O Efeito Da Quiralidade Axial Em Substâncias Bioativas. *Química Nova* 2007, 30, 125-135.
- (51) Viteva, L.; Gospodova, T.; Rashkova, J.; Abrahams, I.; Timtcheva, I.; Simova, S.; Mazieres, M. R.; Wolf, J. G. Synthesis and Photophysical Properties of Some Rigidized Hepta- and Nonamethine Mono- and Bis(merocyanines): Ring-Opening of Quaternized 2-Methylbenzothiazole. *European Journal of Organic Chemistry* 2007, 2007, 3102-3114.
- (52) Minuso, Y.; Adachi, K. Benzothiazoles. V¹). Nitration of 2-Methyl- and 2-Methyl-6acetylaminobenzothiazoles. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 1952, 745, 2-4.

- (53) Caleta, I.; Grdisa, M.; Mrvos-Sermek, D.; Cetina, M.; Tralic-Kulenovic, V.; Pavelic, K.; Karminski-Zamola, G. Synthesis, Crystal Structure and Antiproliferative Evaluation of Some New Substituted Benzothiazoles and Styrylbenzothiazoles. *Il Farmaco* 2004, 59, 297-305.
- (54) Fries, K.; Wolter, A. Untersuchungen in Der Reihe Des Benzothiazols. *European Journal of Medicinal Chemistry* 1927, 527, 60-71.
- (55) Katritzky, A. R.; Takeuchi, Y. Proton Resonance Spectra of Heterocycles-VII: Proton NMR Spectra of 2-Methyl -Benzoxazoles, -Benzothiazoles and -Benzoselenazoles. *Organic Magnetic Resonance* 1970, 2, 569-575.
- (56) Sawhney, S. N.; Boykin, D. W. Transmission of Substituent Effects in Heterocyclic Systems by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. Benzothiazoles. *Journal of Organic Chemistry* 1979, 44, 1136-1142.
- (57) Pardal, A. C.; Ramos, S. S.; Santos, P. F.; Reis, L. V; Almeida, P. Synthesis and Spectroscopic Characterisation of *N*-Alkyl Quaternary Ammonium Salts Typical Precursors of Cyanines. *Molecules* 2002, 7, 320-330.
- (58) Freshney, R. I. Cytotoxicity. In *Culture of animal cells - a manual of basic technique and specialized applications*; Jonh Wiley and Sons, Inc., 2010; Vol. 82, 373-375.
- (59) Santos, D.; Medeiros-Silva, J.; Cegonho, S.; Alves, E.; Ramilo-Gomes, F.; Santos, A. O.; Silvestre, S.; Cruz, C. Cell Proliferation Effects of calix[4]arene Derivatives. *Tetrahedron* 2015, 71, 7593-7599.
- (60) Cruz, C.; Cairrao, E.; Silvestre, S.; Breitenfeld, L.; Almeida, P.; Queiroz, J. A. Targeting of Mitochondria-Endoplasmic Reticulum by Fluorescent Macrocyclic Compounds. *PLoS One* 2011, 6, 1-9.
- (61) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, 65, 55-63.
- (62) Arosa, F. A.; Cardoso, E. M.; Pacheco, F. C. Técnicas de Imunologia. In *Fundamentos de Imunologia*; LIDEL, Ed.; 2012; 575-596.
- (63) Riccardi, C.; Nicoletti, I. Analysis of Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. *Nature Protocols* 2006, 1, 1458-1461.
- (64) Henry, C. M.; Hollville, E.; Martin, S. J. Measuring Apoptosis by Microscopy and Flow Cytometry. *Methods* 2013, 61, 90-97.

- (65) Barone, M.; Pannuzzo, G.; Santagati, A.; Catalfo, A.; De Guidi, G.; Cardile, V. Molecular Docking and Fluorescence Characterization of benzothieno[3,2-*d*]pyrimidin-4-One Sulphonamide Thio- Derivatives, a Novel Class of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Molecules* 2014, 19, 6106-6122.
- (66) Ajdukovi, J. J.; Djurendi, E. A.; Petri, E. T.; Klisuri, O. R.; Eli, A. S.; Sakač, M. N.; Jakimov, D. S.; Penov Gaši, K. M. 17(*E*)-Picolinylidene Androstane Derivatives as Potential Inhibitors of Prostate Cancer Cell Growth: Antiproliferative Activity and Molecular Docking Studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2013, 21, 7257-7266.

Capítulo 5 - Publicações

5.1 Comunicações em painel no âmbito desta dissertação

Ramos S. S., Catarro M., Cavalheiro E., Serrano J., Silvestre S., Almeida P., Looking to new 2-(alkylthio)-*N*-formyl-4-nitroanilines resembling Nimesulide analogues as potential anticancer drugs, III Jornadas da Química e Bioquímica, Universidade da Beira Interior (2015) (Anexo 1).

Catarro M., Cavalheiro E., Serrano J., Silvestre S., Almeida P., Development of new *ortho*-(alkylthio)-*N*-acetanilides as potencial anticancer drugs, Abstracts book do *XI Annual CICS-UBI Symposium* (2016) 120 (Anexo 2).

Capítulo 6 - Anexos

Anexo 1 - Resumo e Póster da comunicação oral nas III Jornadas da Química e Bioquímica, Universidade da Beira Interior 2015

Looking to new 2-(alkylthio)-N-formyl-4-nitroanilines resembling Nimesulide analogues as potential anticancer drugs

Ramos S.S.(1,2), Catarro M.(3), Cavalheiro E.(3), Serrano J.(3), Silvestre S.(1), Almeida P.(1,3)

(1) CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal; (2) UMT-UBI - Unit of Textile and Paper Materials, University of Beira Interior, 6200-001 Covilhã, Portugal; (3) Department of Chemistry, University of Beira Interior, 6200-001 Covilhã, Portugal.

Nimesulide is a widely used nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) having also analgesic and antipyretic properties.

Several studies have demonstrated an overexpression of COX-2 in solid cancer malignancies, increasing the producing of Prostaglandin-2 (PGE₂) and therefore potentiating the development of the cancer cells. Since NSAIDs including Nimesulide and its derivatives inhibited COX-2, it is expectable that these compounds are potentially benefit in both cancer development prevention and anticancer once developed. Nimesulide itself is known to possess anticancer properties.

Even before its discovery and until nowadays, a lot of work has been developed to modify the different moieties constituting the nimesulide skeleton, looking for new potent and more selective COX-2 inhibitors and, more recently, for new anticancer agents.

Recently, as part of our efforts to definitively clarify the identity of the products resulting from the hydroxylation of 2-methylbenzoazolium iodides, we described a new synthesis of *ortho*-(alkylchalcogen)-*N*-ethylacetanilides resembling Nimesulide analogues. [1]

Thus, looking for new Nimesulide analogues with potentially anti-cancer properties and taking in mind this new synthetic approach to prepare *ortho*-(alkylchalcogen)-*N*-alkylanilides, we ended a simple way to obtain 2-(alkylthio)-*N*-formyl-4-nitroanilines starting from 6-nitrobenzothiazole. The formilanilides so obtained already protected with a formyl group can be easily converted in other anilides by hydrolysis followed by acylation.

All this new anilides were structurally characterized by ¹H and ¹³C NMR and FTIR. The *in vitro* cytotoxicity of this anilides against human breast (MCF-7) and prostate (LNCaP) cancer cell lines as well as normal human dermal fibroblasts (NHDF) will be evaluated looking for new and potent anti-cancer drugs.

Keywords: Nimesulide analogous, anticancer activity, new synthetic approach

References: [1] S. S. Ramos, L. V. Reis, R. E. F. Boto, P. F. Santos, P. Almeida, "Synthesis and Dynamic Study of New *ortho*-(alkylchalcogen)acetanilide atropisomers. A second look at the hydrolysis of quaternary 2-methylbenzazol-3-ium salts", *Tetrahedron Letters*, 2013, 54(40), 5441-5444.

Acknowledgments: This work was financed by COMPETE (Project Pest-C/SAU/UI0709/2011).



Looking to new 2-(alkylthio)-*N*-formyl-4-nitroanilines resembling Nimesulide analogues as potential anticancer drugs

Ramos S.S.(2,3), Catarro M.(3), Cavalheiro E.(3), Serrano J.(3), Silvestre S.(1), Almeida P.(1,3)

(1) CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal;

(2) UMTP-UBI - Unit of Textile and Paper Materials, University of Beira Interior, 6200-001 Covilhã, Portugal;

(3) Department of Chemistry, University of Beira Interior, 6200-001 Covilhã, Portugal.

INTRODUCTION

Nimesulide is a widely used nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) having also analgesic and antipyretic properties.

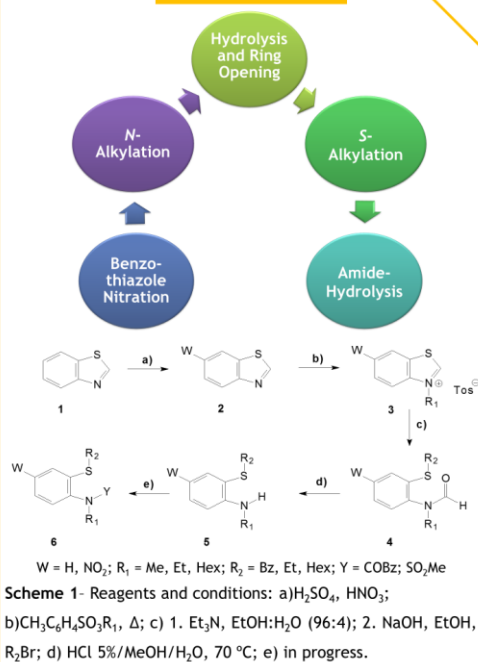
Several studies have demonstrated an overexpression of COX-2 in solid cancer malignancies, increasing the production of Prostaglandin-2 (PGE2) and therefore potentiating the development of the cancer cells. Since NSAIDs including Nimesulide and its derivatives inhibited COX-2, it is expectable that these compounds are potentially benefit in both cancer development prevention and anticancer once developed.

Even before its discovery and until nowadays, a lot of work has been developed to modify the different moieties constituting the nimesulide skeleton, looking for new potent and more selective COX-2 inhibitors and, more recently, for new anticancer agents.

Recently, as part of our efforts to definitively clarify the identity of the products resulting from the hydroxylation of 2-methylbenzozolium iodides, we described a new synthesis of *ortho*-(alkylchalcogen)-*N*-ethylacetanilides resembling Nimesulide analogues. [1]

Looking for new Nimesulide analogues with potentially anticancer properties and taking in mind this new synthetic approach to prepare *ortho*-(alkylchalcogen)-*N*-alkylanilides, we ended a simple way to obtain 2-(alkylthio)-*N*-formyl-4-nitroanilines starting from 6-nitrobenzothiazole.

EXPERIMENTAL



RESULTS

All new formylanilides **4** synthesized in moderate yields (35-60%) were structurally characterized by ¹H and ¹³C NMR and FTIR. The anilides **5** were obtained in good yields by hydrolysis of the relatively labile amide **4** in the presence of a hydrazine hydrate. The mesylation and benzyl acylation of the resulting anilines are actually in progress. The *in vitro* cytotoxicity of all anilides **4** (Y = COH) and methanesulfonamides **6** (Y = SO₂Me) against human breast (MCF-7) and prostate (LNCaP) cancer cell lines, as well as normal human dermal fibroblasts (NHDF), will be evaluated looking for new and potent anticancer drugs.

CONCLUSION

A new synthetic way to prepare compounds resembling nimesulide was started looking for new anticancer drugs.

REFERENCES

[1] S. S. Ramos, L. V. Reis, R. E. F. Boto, P. F. Santos, P. Almeida, "Synthesis and dynamic study of new *ortho*-(alkylchalcogen)acetanilide atropisomers. A second look at the hydrolysis of quaternary 2-methylbenzazol-3-ium salts", *Tetrahedron Letters* **2013**, *54*(40), 5441-5444.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by COMPETE (Project Pest-C/SAU/UI0709/2011).

Anexo 2 - Resumo e Póster da comunicação oral no *XI Annual CICS-UBI Symposium 2016* (30 de junho e 1 de julho).

DEVELOPMENT OF NEW *ORTHO*-(ALKYLTHIO)-*N*-ACETANILIDES AS POTENTIAL ANTICANCER DRUGS

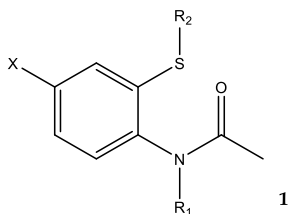
Catarro M.¹, Cavalheiro E.¹, Serrano J.¹, Silvestre S.¹, Almeida P.¹

¹ CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

Several studies have demonstrated an overexpression of ciclooxigenase-2 (COX-2) in solid cancers. COX-2 is responsible, namely, for the production of prostaglandin-E₂ (PGE-2), which has been associated with tumor progression, invasiveness and angiogenesis. Thus, it is expectable that COX-2 inhibitors including nimesulide and its analogues can exhibit anticancer properties by targeting COX-2.¹

Recently, several *ortho*-(alkylchalcogen)-*N*-acetanilides structurally resembling nimesulide were synthesized and their potential anticancer activity was evaluated. In fact, *in vitro* cell proliferation studies in human breast (MCF-7) and prostate (LNCaP) cancer cell lines as well as on normal human dermal fibroblasts (NHDF) showed a selective antiproliferative activity for tumoral cells with prominence to the LNCaP cell line and the most potent compounds were *O*- and/or *N*-benzylic and -hexyl acetanilides.²

In the present work and taking in mind already known groups that potentiate the antiproliferation activity of nimesulide analogues,² a set of new 6-nitro and 6-acetamide *ortho*-(alkylthio)-*N*-acetanilides **1** were prepared, in which 2,4-dimethylbenzyl, methylcyclohexyl and/or hexyl are linked to thio and/or to amide group.



X = NO₂, NHCOCH₃

R₁ and/or R₂ = Hexyl, 2,4-dimethylbenzyl, methylcyclohexyl

The COX-2 docking studies and biological evaluation through the MTT cell proliferation assay in MCF-7, LNCaP and NHDF cell lines were performed, confirming the potential interest of these new nimesulide analogues as anticancer drugs.

Keywords: *ortho*-(alkylthio)-*N*-acetanilides, nimesulide analogues, anticancer activity

References: [1] Zhong B. *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 5324-5327.

[2] Ramos S. S *et al.*, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 8930-8937.

Acknowledgements: This work is supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Programme Competitiveness and Internationalisation in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project No. 007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709).

Development of new *ortho*-(alkylthio)-*N*-acetanilides as potential anticancer drugs

Catarro M.¹, Cavalheiro E.¹, Serrano J.¹, Silvestre S.^{1,2}, Almeida P.¹

(1) CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, 6200-506 Covilhã, Portugal
(2) CNC – Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.

Introduction

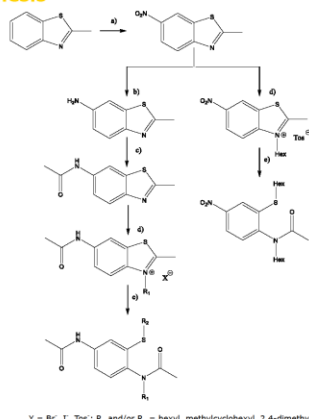
COX-2 is responsible, namely, for the production of PGE-2, which has been associated with tumor progression, invasiveness and angiogenesis. Thus, it is expectable that COX-2 inhibitors including nimesulide and its analogues can exhibit anticancer properties by targeting COX-2.¹

Recently, several *ortho*-(alkylchalcogen)-*N*-acetanilides structurally resembling nimesulide were synthesized and their potential anticancer activity was evaluated, which showed a selective antiproliferative activity for tumoral cells with prominence to the LNCaP cell line and the most potent compounds were *O*- and/or *N*-benzyllic and -hexyl acetanilides.²

In this work a set of new 6-nitro and 6-acetamide *ortho*-(alkylthio)-*N*-acetanilides were prepared and biologically evaluated through the MTT cell proliferation assay in MCF-7, LNCaP and NHDF cell lines, to confirm the potential interest of these new nimesulide analogues as anticancer drugs.

Experimental

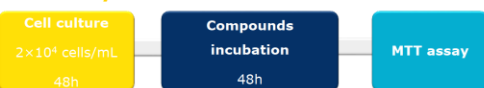
Synthesis



Y = Br, I, Tos; R₁ and/or R₂ = hexyl, methylcyclohexyl, 2,4-dimethylbenzyl.

Scheme 1 – Reagents and conditions. a) HNO₃, H₂SO₄, 0°C to r.t.; b) SnCl₄, 2H₂O, HCl, MeOH, Δ; c) CHCl₃, C₆H₅O₂, 0°C; d) R₁X; e) 1. Et₃N, EtOH:H₂O (96:4), Δ; 2. EtOH, NaOH, R₂X, Δ.

MTT assay



[1] Zhong B. et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 5324-5327.
[2] Ramos S. S. et al., *Tetrahedron* **2014**, *70*, 8930-8937.

This work is supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Programme Competitiveness and Internationalisation in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project No. 007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709).

Results

Table 1 - Relative cell proliferation (% of the control).

Compound (30 μM)	X	R1	R2	LNCaP	MCF-7	NHDF
1	NO ₂	Hex	Hex	116.81 ± 25.01	65.94 ± 2.66	110.69 ± 10.39
2	NHCOCH ₃	Hex	Hex	153.88 ± 29.89	36.56 ± 11.83	93.64 ± 5.37
3		Hex	Hex	117.05 ± 15.70	35.89 ± 8.34	98.22 ± 9.77
4		Hex	Hex	87.59 ± 27.26	11.13 ± 2.95	82.95 ± 4.76
5		Hex	Hex	49.83 ± 10.32	24.17 ± 3.06	82.81 ± 10.88
6		Hex	Hex	29.70 ± 4.42	7.52 ± 0.93	86.16 ± 11.47
7		Hex	Hex	22.98 ± 3.52	9.08 ± 1.79	79.66 ± 8.33
8		Hex	Hex	19.14 ± 4.69	6.86 ± 2.77	80.08 ± 7.06
9		Hex	Hex	40.44 ± 12.44	13.59 ± 2.34	80.50 ± 8.35
10		Hex	Hex	48.02 ± 6.89	15.27 ± 1.65	89.94 ± 8.64
H ₂ O ₂		—	—	—	2.15 ± 4.37	4.44 ± 0.99
5-Fluorouracil	—	—	—	70.90 ± 11.56	28.28 ± 3.99	86.77 ± 5.62

Mean ± SD: < 10% < 20% < 30%

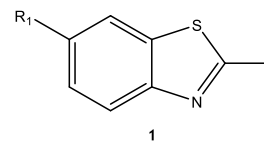
Conclusions

The *ortho*-(alkylthio)-*N*-acetanilides were obtained in medium to good overall yields (27-69%) starting from 2-methylbenzothiazolium salts.

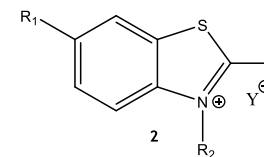
In general, these synthesized compounds, specially molecules **6**, **7** and **8**, have relevant antiproliferative effects in both cancer cell lines, especially against MCF-7 cells, and have low cytotoxicity against normal cells (NHDF). Interestingly, the 6-acetamide moiety (e.g. in compound **2**) is associated to a higher antiproliferative effect against MCF-7 cells than the observed with the congener **1**, possessing a 6-nitro group.

Following these studies, the IC₅₀ evaluation of the more cytotoxic compounds and flow cytometry assays are currently being carried out.

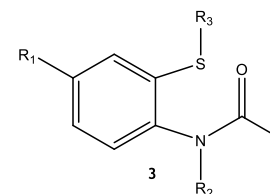
Anexo 2 - Auxiliar de estruturas.



- 1a R₁ = H
- b R₁ = NO₂
- c R₁ = NH₂
- d R₁ = NHCOCH₃



- 2a R₁ = H; R₂ = Hex
- b R₁ = NO₂; R₂ = Hex
- c R₁ = NHCOCH₃; R₂ = Hex
- d R₁ = NHCOCH₃; R₂ = MeCy
- e R₁ = NHCOCH₃; R₂ = 2,4-diMeBn



- 3a R₁ = H; R₂ = Hex; R₃ = Hex
- b R₁ = NO₂; R₂ = Hex; R₃ = Hex
- c R₁ = NHCOCH₃; R₂ = Hex; R₃ = Hex
- d R₁ = NHCOCH₃; R₂ = Hex; R₃ = MeCy
- e R₁ = NHCOCH₃; R₂ = Hex; R₃ = 2,4-diMeBn
- f R₁ = NHCOCH₃; R₂ = MeCy; R₃ = Hex
- g R₁ = NHCOCH₃; R₂ = MeCy; R₃ = MeCy
- h R₁ = NHCOCH₃; R₂ = MeCy; R₃ = 2,4-diMeBn
- i R₁ = NHCOCH₃; R₂ = 2,4-diMeBn; R₃ = Hex
- j R₁ = NHCOCH₃; R₂ = 2,4-diMeBn; R₃ = MeCy
- k R₁ = NHCOCH₃; R₂ = 2,4-diMeBn; R₃ = 2,4-diMeBn