



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**



Síntese e Avaliação da Atividade Antichagásica de Novas Hidrazonas

Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso

Recife
2012

Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso⁺

Síntese e Avaliação da Atividade Antichagásica de Novas Hidrazonas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria Rêgo Alves Pereira

⁺Bolsista CAPES

Recife
2012

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Cardoso, Marcos Veríssimo de Oliveira
Síntese e avaliação da atividade antichagásica de novas hidrazonas /
Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso– Recife: O Autor, 2012.

247 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite

Coorientadora: Valéria Rêgo Alves Pereira

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2012.**

Inclui bibliografia e apêndices

- 1. Doença de Chagas 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Tiazóis I. Leite, Ana Cristina
Lima (orientadora) II. Pereira, Valéria Rêgo Alves (coorientadora) III.
Título**

614.533

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 058

Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso⁺

Síntese e Avaliação da Atividade Antichagásica de Novas Hidrazonas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica.

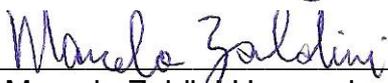
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria Rêgo Alves Pereira

Aprovada em: 06/12/2012

Banca Examinadora



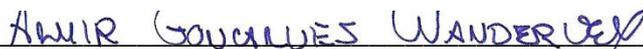
Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite – UFPE



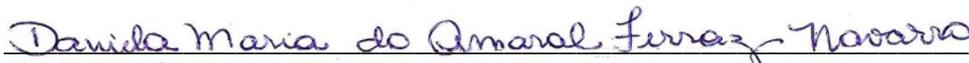
Prof. Dr. Marcelo Zaldini Hernandez – UFPE



Prof.^a Dr.^a Rafaela Salgado Ferreira – UFMG



Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley – UFPE



Prof.^a Dr.^a Daniela do Amaral Ferraz Navarro – UFPE

⁺Bolsista CAPES

Recife
2012

DEDICATÓRIA

A meus pais por todo suporte, paciência, apoio e determinação em me proporcionar um estudo de qualidade e por sempre acreditarem em mim, além de todas as broncas, sem as quais eu não seria quem eu sou hoje;

A minha Família, em especial, os mais próximos, que acompanharam o meu progresso e que sempre me motivaram para sempre querer mais, em especial a meu tio Luís Cardoso Santos (Lula);

A minha namorada, Núbia Alves, por todo incentivo, paciência, amor e apoio concedidos no período em que estamos juntos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha orientadora, Ana Cristina Lima Leite, por sempre me apoiar, incondicionalmente, por me incentivar a “encarar” um estágio de Doutorado sanduiche na Austrália, por todo suporte oferecido e por me proporcionar todo o acesso à pesquisa que desenvolvi até hoje, literalmente é minha Mãe científica, pois já fazem 9 anos que estamos juntos, neste mundo chamado pesquisa;

Ao professor Paul. V. Bernhardt (University of Queensland, Au), por ter me aceitado de braços abertos em um curto estágio de doutorado sanduiche, por toda sua atenção em me dar o suporte adequado, por todas as discussões científicas, e por se dedicar a me ensinar um mundo novo na química, a química inorgânica;

Aos pesquisadores Timothy Zerk, Maran Basha, Kalimuthu Hanjbab, Antony Fallow, Charlotte Villez, Bernoit Chivez, Laurene Marty, Anthon Bavdek por todo o aprendizado conjunto e multicultural na minha estadia na Austrália;

Aos meus “*roomates*” Australianos, Granham Kelsey e Siena Shu por todos os momentos maravilhosos que passamos;

A todos os integrantes da Central Analítica do DQF, em especial Eliete Barros, pelas análises espectroscópicas;

Ao Paulo Germano por todo suporte que me ofereceu em todos os momentos que necessitei, agindo com presteza e velocidade;

A professora Valéria Rego (CPqAM-PE), professora Milena Botelho Soares (CPqGM-BA), Cássio Santana Meire (CPqGM-BA) por terem realizado os ensaios das atividades tripanocidas;

A professora Rafaela Salgado Ferreira (ICB-UFMG) por ter realizado os ensaios na cruzaína;

A meu grande amigo e irmão Diogo Rodrigo, por ter sido incisivo na minha ida a Austrália, me fazendo acreditar que era possível e por toda a ajuda disponibilizada;

Aos alunos do LpQM: Gevanio Filho, Paulo André, Wanderlan Pontes, Ana Daura, Mirian Barbosa e em especial, as alunas Lucianna Rabelo e Elany Barbosa que contribuíram diretamente para o progresso deste trabalho;

Ao CNPq pela grande oportunidade de estudar na Austrália por seis meses de intenso estudo e experiência, através de uma bolsa de doutorado sanduiche;

A CAPES por ter me concedido uma bolsa a qual me proporcionou apoio financeiro para o desenvolvimento dos trabalhos e motivação na área acadêmica, apoio este sem o qual não seria possível a continuidade desta pesquisa.

RESUMO

CARDOSO, Marcos V. de O. Síntese e Avaliação da Atividade Antichagásica de Novas Hidrazonas. Recife, 2012. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A doença de Chagas ainda é um problema concreto e impactante na América Latina, sob múltiplos aspectos vinculados às questões da iniquidade social e ao processo de globalização. Desde a descoberta da doença de Chagas, em 1909, a procura por uma terapia efetiva para os dois estágios da doença, fase aguda e fase crônica, é um desafio para muitos pesquisadores. Nos dias de hoje, somente um fármaco está em uso para o combate da doença de Chagas, o benznidazol. Esta terapia não é efetiva para a fase crônica da doença além de proporcionar vários efeitos adversos. Atualmente, vários trabalhos relatam que compostos que possuem a porção tiossemicarbazona apresentam uma potencial atividade antichagásica devido a uma possível inibição da enzima cruzaina do *Trypanosoma cruzi* (TCC). A cruzaina é uma enzima responsável pela replicação intracelular do *T. cruzi* e, devido a esta função, é um alvo explorado para o desenvolvimento de novas drogas potencialmente antichagásicas. Neste trabalho, objetivou-se a síntese, caracterização e avaliação de novas hidrazonas como protótipos a fármacos antichagásicos. No capítulo 1, foram sintetizados 22 compostos, análogos da tiossemicarbazona, e foram avaliados frente à atividade tripanocida e viabilidade celular. Dos 22 compostos avaliados, 11 apresentaram atividades semelhantes ou superiores ao do benznidazol, fármaco utilizado como referencial. Observaram-se interessantes relações estrutura-atividade acerca da funcionalização da tiocarbonila a tiazol, conferindo um maior potencial tripanocida e melhor viabilidade celular. Estes achados são de grande importância para o planejamento de novos fármacos antichagásicos, confirmando o tiazol como um núcleo promissor frente ao mal de Chagas. No capítulo 2 explorou-se a substituição do anel tiofenólico, utilizado no capítulo 1, pelo anel piridínico, devido a sua grande importância na química medicinal. Com os resultados obtidos foi possível classificar o anel piridina como um ótimo grupo antichagásico, devido a grande atividade tripanocida obtida nas séries TP e TAP. Foram sintetizados 24 compostos dos quais 14 apresentaram atividade tripanocida superior ao benznidazol. Interessantes relações de estrutura-atividade foram propostas para estas duas séries químicas. A substituição do tiofenol pelo anel piridina melhorou a atividade tripanocida, entretanto a viabilidade celular foi prejudicada. Neste trabalho também foi possível observar que a utilização do ultrassom como promotor principal dos protocolos propostos foi superior ao método clássico, por refluxo, devido à diminuição do tempo reacional, maior rendimento e menor formação de subprodutos.

Palavras-chaves: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Cruzaina; Tiossemicarbazonas; Tiazóis; Tiofenol; Piridina.

ABSTRACT

CARDOSO, Marcos V. de O. Synthesis and Evaluation of Anti-chagasic Activity of New Hydrazones. Recife, 2012. Thesis (PhD) – Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Chagas disease is still a specific and impressive problem in Latin America, under many aspects linked to questions related to social inequity and globalization process. Since the discovery of Chagas disease, in 1909, the demand for an effective therapy for both stages of the disease, acute and chronic phase, is a challenge for many researchers. Nowadays, only one drug have been used against Chagas disease, the benznidazole. This therapy, besides causing several adverse effects, is not effective for the chronic stage of the disease. Currently, several studies report that compounds that have the portion thiosemicarbazone have a potential anti chagasic activity due to a possible inhibition of the enzyme *Trypanosoma cruzi cruzain* (TCC). The cruzain enzyme is responsible for replication of intracellular *T. cruzi*, and due to this function, it's a target exploited for the development of new potentially anti-chagasic drugs. This study aimed the synthesis, characterization and evaluation of new hydrazones as anti-chagasic drug prototypes. In chapter 1, were synthesized 22 compounds, thiosemicarbazone analogues, and were assayed against the trypanocidal activity and cell viability. Of the 22 compounds analyzed, 11 showed similar or superior activity to the benznidazole, used as a reference drug. It was observed interesting structure-activity relationships of the thiocarbonyl functionalization to thiazole, giving a greater trypanocidal potential and improved cell viability. These findings are of great importance for the design of new anti-chagasic drugs, confirming the thiazole as a promise core against Chagas disease. In Chapter 2 was explored the substitution of the thiophenol ring, used in Chapter 1, to pyridine ring, due to its great importance in medicinal chemistry. With these results it was possible to classify the pyridine ring as a great anti-chagasic group due to large trypanocidal activity obtained in the TP and TAP series. Were synthesized 24 compounds of which 14 showed superior trypanocidal activity to benznidazole. Interesting structure-activity relationships have been proposed for these two chemical series. The substitution of the thiophenol to pyridine ring improved trypanocidal activity, however, the cell viability was impaired. In this work was also observed that the use of ultrasound as main promoter of the proposed protocols was superior to the classic method, by refluxing, due to decreased reaction time, increased yield and lower formation of sub products.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; Cruzain; Thiosemicarbazones; Thiazoles; Thiophenol; Pyridine.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Estruturas do nifurtimox (Nfx) e benznidazol (Bdz).....	16
Figura 2: Moléculas tripanocidas sintetizadas no LpQM.....	18
Figura 3: Relações bioisósteras entre tiazol, tiossemicarbazona e tiazolinona.	18
Figura 4: Planejamento estrutural.....	19
Figura 5: Incidência da doença de Chagas mundialmente. (http://www.who.int/topics/tropical_diseases/factsheets/neglected/en/index.html)	22
Figura 6: Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> . (1- tripomastigota; 2- epimastigota; 3- amastigota) (http://www.coroflot.com/eschenazi/scientific-and-medical).....	26
Figura 7: Sinal de Romaña.....	27
Figura 8: Estrutura cristalográfica da cruzaina do <i>T. cruzi</i> (PDB ID 1AIM ⁴⁵); inibidores da enzima alvo de diferentes classes químicas.....	31
Figura 9: Estrutura e numeração sistemática da tiossemicarbazona.	32
Figura 10: Relação estrutura-atividade (REA) proposto por Du e col ¹⁴	32
Figura 11: Estruturas da tiossemicarbazona e semicarbazona.....	33
Figura 12: Formas tautoméricas tiona e tiol da tiossemicarbazona.	33
Figura 13: Exemplos de complexos metálicos com atividade tripanocida.....	34
Figura 14: Redução do C=N da posição 4.	39
Figura 15: 3-Amino piridina, Triapina.....	41
Figura 16: Análogos da Triapina.....	42
Figura 17: Núcleo tiazol.....	43
Figura 18: Importantes moléculas bioativas que contém o núcleo Tiazol.	43
Figura 20: Cavitação em sistema homogêneo.	46
Figura 21: Formação do precipitado dos compostos TZ obtidos pelo método tradicional (a- 5 minutos de reação; b- 60 minutos; c- adição posterior de hexano para maior precipitação; * após adição de hexano).....	63
Figura 22: presença de insaturações nas séries TS e TZ.	64
Figura 23: Tiazóis selecionados para avaliação da inibição pelo <i>T. cruzi</i>	73
Figura 24: Principais sinais da série TS (TS-01).	76
Figura 25: Principais sinais da série TZ (TZ-01).....	77
Figura 26: Mudança de coloração e formação de precipitado nos protocolos TP-01 e TAP-01.....	109
Figura 27: Mudança de coloração/estado físico nos protocolos TP-01 e TAP-01.	110
Figura 28: Placa de CCD padrão da obtenção das piridinas tiazólicas.	112
Figura 29: Principais sinais da série TP/TAP (TP-01 e TAP-01).....	131

Lista de Esquemas

<i>Esquema 1: Principais modificações realizadas pelo LpQM.....</i>	<i>17</i>
<i>Esquema 2: As doenças e a abrangência da indústria farmacêutica.....</i>	<i>24</i>
<i>Esquema 3: Ciclo biológico do T. cruzi.</i>	<i>25</i>
<i>Esquema 4: Etapas da obtenção de tiossemicarbazonas.</i>	<i>36</i>
<i>Esquema 5: Mecanismo de inibição na TCC por derivados das aril-tiossemicarbazonas, propostas por Du e col.</i>	<i>38</i>
<i>Esquema 6: Preparação de tiazóis 4 amino condensados, utilizando-se α-bromolactamas e tioamidas via metodologia de Hantzsch.</i>	<i>44</i>
<i>Esquema 7: Obtenção do (2-etoxi-2-propoxietil)(fenil)sulfano.</i>	<i>49</i>
<i>Esquema 8: Obtenção do 2-(feniltio) acetaldeído.</i>	<i>50</i>
<i>Esquema 9: Obtenção das feniltioetilideno tiossemicarbazonas.</i>	<i>51</i>
<i>Esquema 10: Obtenção dos feniltioetilideno tiazóis.</i>	<i>52</i>
<i>Esquema 11: Proposta mecanística global para obtenção das feniltioetilideno-tiossemicarbazonas..</i>	<i>57</i>
<i>Esquema 12: Proposta mecanística para obtenção dos feniltioetilideno tiazóis (TZ-01).</i>	<i>62</i>
<i>Esquema 13: Obtenção da 2-((piridin-2-il)metileno) tiossemicarbazona.</i>	<i>102</i>
<i>Esquema 14: Obtenção da 2-imino-((piridin-2-il)metileno)-1,3-tiazol.</i>	<i>103</i>
<i>Esquema 15: Obtenção da 2-((piridin-2-il)etilideno) tiossemicarbazona.</i>	<i>104</i>
<i>Esquema 16: Obtenção da 2-imino-((piridin-2-il)etilideno)-1,3-tiazol.</i>	<i>105</i>
<i>Esquema 17: Proposta mecanística para a obtenção das tiazol piridinas/ tiazol acetil piridinas (TP/TAP).....</i>	<i>111</i>

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1: Compostos 2b, 2h, 2i, e 3h sintetizados por Du e col.</i>	39
<i>Tabela 2: Derivados tiofenólicos da série TS.</i>	60
<i>Tabela 3: Dados da purificação por recristalização.</i>	65
<i>Tabela 4: Derivados tiazólicos da série TZ.</i>	66
<i>Tabela 5: Avaliação farmacológica, in vitro, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos, para as tiossemicarbazonas e tiazóis tiofenólicos (TS-01 a 12 e TZ-01 a 10).</i>	70
<i>Tabela 6: Compostos obtidos da série TP.</i>	113
<i>Tabela 7: Compostos obtidos da série TAP.</i>	116
<i>Tabela 8: Avaliação farmacológica, in vitro, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para as tiazopiridinas (TP 1-12 e TAP 1-12).</i>	120
<i>Tabela 9: Avaliação farmacológica, in vitro, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para as tiazopiridinas (TP 1-12).</i>	121
<i>Tabela 10: Avaliação farmacológica, in vitro, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para as tiazopiridinas (TAP 1-12).</i>	123
<i>Tabela 11: Comparação da avaliação farmacológica, in vitro, das propriedades tripanocidas das séries TP e TAP.</i>	124
<i>Tabela 12: porcentagem de inibição da atividade catalítica da cruzafina para a série TP.</i>	126
<i>Tabela 13: Porcentagem de inibição da atividade catalítica da cruzafina para a série TAP.</i>	127
<i>Tabela 14: Comparação da taxa de inibição da enzima cruzafina do T. cruzi. para as séries TP e TAP.</i>	129

Lista de Siglas e Abreviaturas

Nfx= Nifurtimox

Bdz= Benznidazol

TCC= Cruzaína do *Trypanosoma cruzi*

TR= Tripanotiona Reductase

T. cruzi= *Trypanosoma cruzi*

Cl₅₀= Concentração inibitória

ERO= Espécies reativas de oxigênio

EtOH= Etanol

Ac₃N= Acetonitrila

MeOH= Metanol

CCD= Cromatografia em camada delgada

AcOEt= Acetato de etila

Hex= Hexano

THF= Tetrahidrofurano

TS= Tiossemicarbazona

TZ= Tiazol

TP= Tiazopiridina

TAP= Tiazoacetilpiridina

3-AP= 3-aminopiridina

TMS= Tetrametil silano

R_f= Fator de retenção

pf= Ponto de fusão

Col.= colaboradores

2-Naft.= 2-naftaleno

REA= Relação estrutura-atividade

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 CICLO BIOLÓGICO DO <i>T. CRUZI</i>	25
3.2 SINTOMATOLOGIA E TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	26
3.3 PROTEASES	29
3.4 TIOSSEMICARBAZONAS: ASPECTOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS	31
3.5 TIOSSEMICARBAZONAS E SEUS COMPLEXOS METÁLICOS:	33
3.6 OBTENÇÃO DIRETA DAS TIOSSEMICARBAZONAS A PARTIR DE TIOSSEMICARBAZIDAS	35
3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS TIOSSEMICARBAZONAS	37
3.8 TIOSSEMICARBAZONAS COMO AGENTES TRIPANOCIDAS	37
3.9 PIRIDINA NA QUÍMICA MEDICINAL	40
3.10 TIAZÓIS	43
3.10.1 Método de obtenção de tiazóis	44
3.11 APLICAÇÕES DO ULTRASSOM COMO PROMOTOR REACIONAL	45
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE INÉDITAS HIDRAZONAS TIOFENÓLICAS COMO AGENTES TRIPANOCIDAS	47
5 MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1 MATERIAIS	48
5.2 MÉTODOS	49
5.2.1 Síntese das tiossemicarbazonas tiofenólicas	49
5.2.2 Síntese dos acetais	49
5.2.3 Síntese dos aldeídos por hidrólise do acetal	50
5.2.4 Síntese das tiossemicarbazonas	51
5.2.5 Síntese dos tiazóis	52
5.3 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA	53
5.3.1 Animais	53
5.3.2 Células, enzimas e inibidores químicos	53
5.3.3 Toxicidade para esplenócitos	53
5.3.4 Atividade antiproliferativa para a forma epimastigota	54

5.3.5 Atividade antiproliferativa para a forma tripomastigota	54
5.3.6 Infecção de tripomastigotas em macrófagos	55
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
6.1 MECANISMOS REACIONAIS	56
6.1.1 Mecanismos de formação dos acetais	56
6.1.2 Mecanismos de formação dos aldeídos	56
6.1.3 Mecanismos de formação das tiossemicarbazonas	57
6.1.4 Mecanismo de formação dos tiazóis	62
6.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA	68
6.2.1 Avaliação, in vitro, das propriedades tripanocidas	69
6.2.2 Ensaios, in vitro, de infecção pelo T. cruzi	73
6.3 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS	75
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NOVOS TIAZÓIS COMO AGENTES TRIPANOCIDAS	100
7 MATERIAIS E MÉTODOS	101
7.1 MATERIAIS	101
7.2 MÉTODOS	102
7.2.1 Síntese das hidrazonas piridínicas	102
7.2.2 Síntese das piridinas tiazólicas	103
7.2.3 Síntese das acetil piridinas tiazólicas	104
7.2.4 Síntese da tiossemicarbazona	104
7.2.5 Síntese dos tiazóis acetilpiridínicos	105
7.3 PROTOCOLOS DA AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA	106
7.3.1 Animais	106
7.3.2 Células, enzimas e inibidores químicos	106
7.3.3 Toxicidade para esplenócitos	106
7.3.4 Atividade antiproliferativa para a forma epimastigota	107
7.3.5 Toxicidade para a forma tripomastigota	107
7.3.6 Inibição da enzima cruzaina	108
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
8.1 MECANISMOS REACIONAIS	109
8.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS TIAZOPIRIDINAS	119
8.2.1 Avaliação, in vitro, das propriedades tripanocidas	119
8.2.2 Inibição da atividade catalítica da cruzaina	125
8.3 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS	130

9 CONCLUSÕES	156
10 PERSPECTIVAS	158
REFERÊNCIAS	159
<u>APÊNDICES</u>	<u>167</u>

1 INTRODUÇÃO

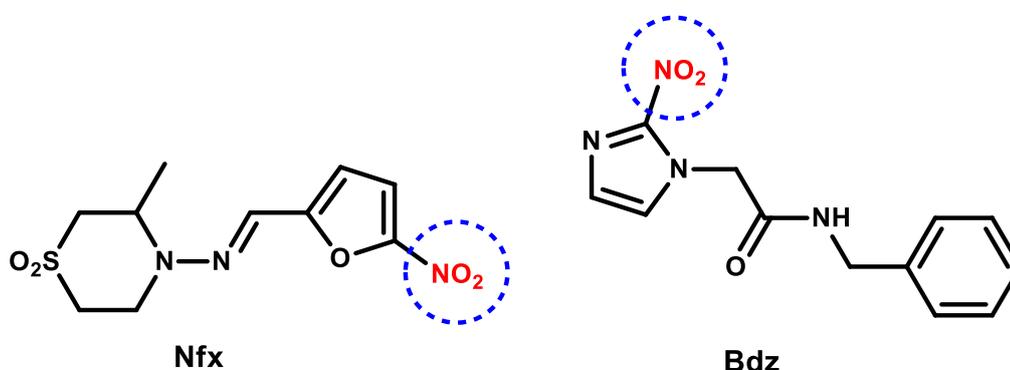
No Brasil, estima-se que de 8 a 10 milhões de pessoas estejam infectadas com o *Trypanosoma cruzi*, dos quais cerca de dois milhões apresentam a sintomatologia da doença de Chagas¹. Em Pernambuco, as estimativas indicam que a doença de Chagas atinge uma importante área rural do sertão, desde o alto do Pajéu até próximo à Zona da Mata litorânea. As condições de moradia precárias, que estão associadas à inexistência de programas de controle vetorial ou assistência farmacêutica, geram um quadro de subdiagnóstico da realidade da doença de Chagas no Estado². Portanto, a necessidade de se desenvolver trabalhos relacionados à doença de Chagas, seja no âmbito de epidemiologia, profilaxia ou quimioterapia, é urgente, assim como um conjunto de estratégias que atuem para elucidar e solucionar a questão da doença de Chagas em Pernambuco e no âmbito nacional.

A quimioterapia da doença de Chagas ainda é um problema irresoluto e a busca por drogas alternativas continua. Duas drogas nitro heterocíclicas foram utilizadas para uso clínico, restringindo severamente sua aplicabilidade em pacientes crônicos, pelo fato de serem altamente tóxicas³ (**Figura 1**). Um grande número de compostos têm apresentado caminhos diferentes na terapia, sendo o mais comum à capacidade de inibir a proliferação da forma tripomastigota do parasita. Entretanto, somente com um conhecimento maior da bioquímica do parasita e detalhamento de suas peculiaridades, será possível deslocar a ênfase da pesquisa de drogas com seleções aleatórias para um fundamento mais racional. Isto é exemplificado pelos estudos realizados usando derivados da purina e inibidores da Tripanotiona Redutase⁴⁻⁶.

Apesar do progresso no estudo da bioquímica e fisiologia do parasita, A quimioterapia desta infecção parasitária permanece sem desenvolvimento, com farmacologia baseada em drogas antigas e inespecíficas, associadas a tratamentos de longo prazo que apresentam severos efeitos colaterais.

O nifurtimox (**4-[(5-nitrofurfurilideno)-amino]-3-metil morfolina-1,1-dióxido**) e o benznidazol (**N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida**) (**Figura 1**) foram às únicas drogas disponibilizadas oficialmente para o tratamento clínico desta doença, porém, o nifurtimox foi descontinuado devido à alta incidência de efeitos adversos, enquanto o benznidazol apresenta efeitos adversos mais leves. Embora o benznidazol (**Bdz**) possa diminuir o nível da parasitemia e reduzir os níveis sorológicos, não é eficaz para todas as variações do *Trypanosoma cruzi* e não garante a cura completa⁷.

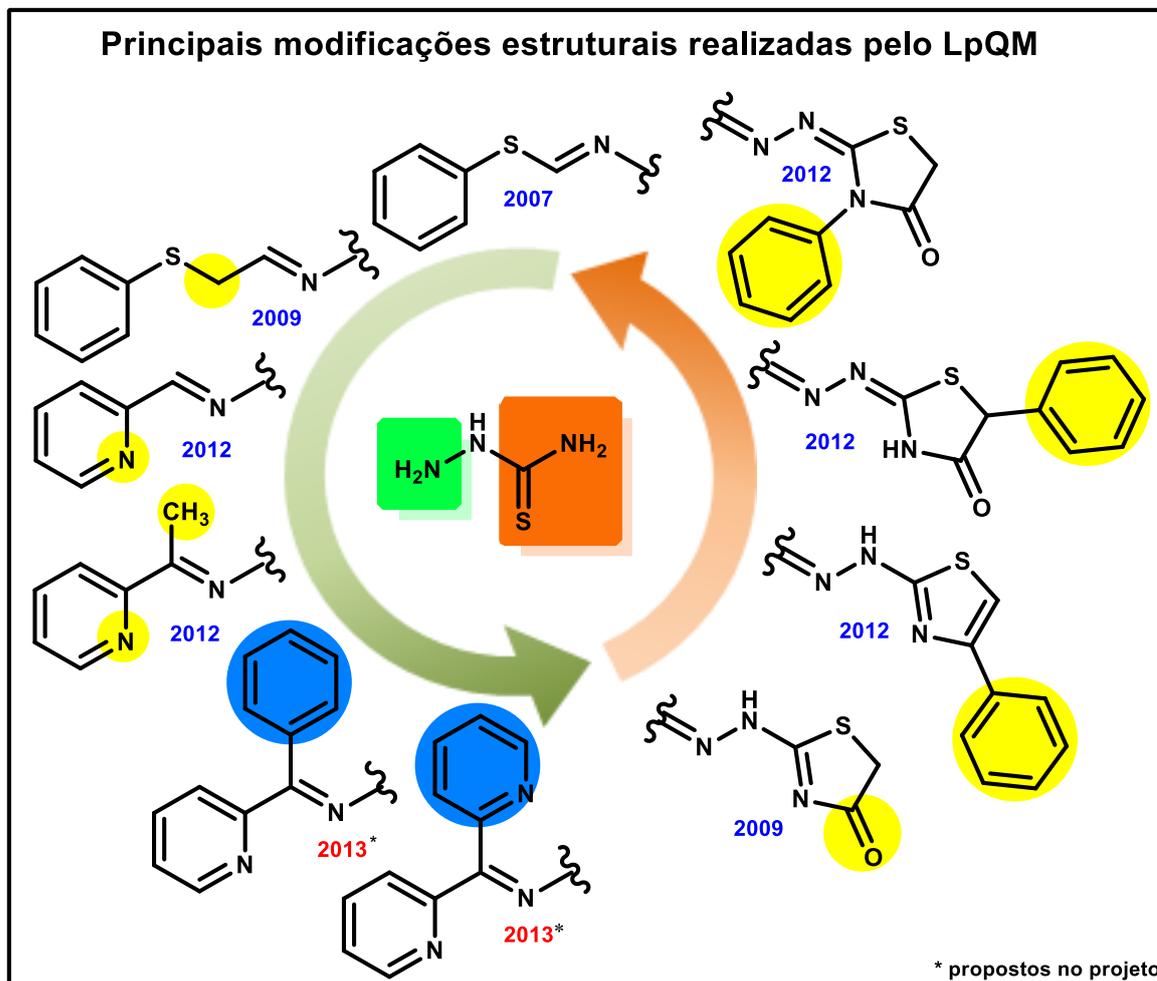
Figura 1: Estruturas do nifurtimox (**Nfx**) e benznidazol (**Bdz**).



Para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos, as pesquisas têm sido direcionadas para a inibição da enzima cruzaina do *Trypanosoma cruzi* (**TCC**)⁸ e tripanotiona redutase (**TR**)⁹, como alvos específicos e promissores. A TCC é a enzima-chave da replicação intracelular do parasita e a TR é a enzima chave do metabolismo anti-oxidativo do *Trypanosoma cruzi*. Vale ressaltar que existem outros alvos bem estabelecidos para o *T. cruzi*, tal qual a CYP51, que estão no “pipeline” clínico para a doença de Chagas¹⁰.

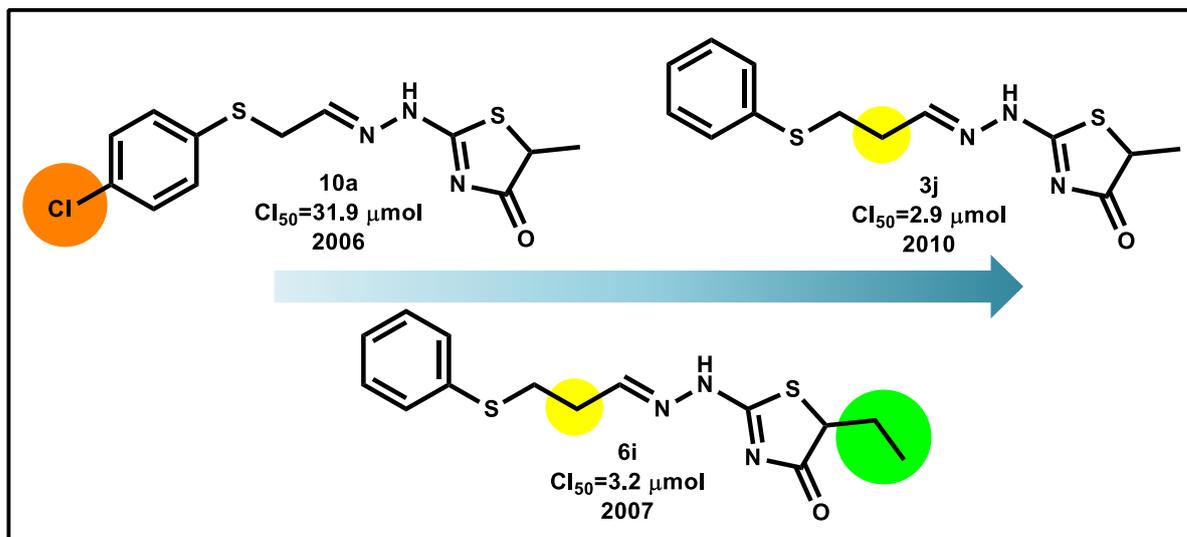
Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa vem se esforçando na busca por novos fármacos antichagásicos mais ativos e menos citotóxicos que o benznidazol, utilizando as semicarbazonas e tiosemicarbazonas como núcleos de base (**Esquema 1**). O resultado de tais esforços reflete-se com a conquista de ótimos resultados antichagásicos observados para estas classes químicas¹¹⁻¹³.

Esquema 1: Principais modificações realizadas pelo LpQM.



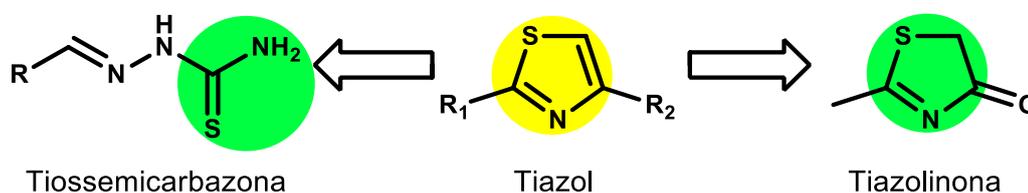
Os resultados obtidos por nosso grupo demonstram o perfil antichagásico dos derivados da tiossemicarbazona com citotoxicidade na escala **nanomolar**, o que nos motiva a continuidade da busca por novos compostos, além de nos comprovar o potencial das tiossemicarbazonas frente ao *T. cruzi* (**Figura 2**). A maior funcionalização desta classe nos rendeu melhores atividades, através da ciclização da tiossemicarbazona em tiazol.

Figura 2: Moléculas tripanocidas sintetizadas no LpQM.



Motivados pelos interessantes resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa, planejou-se a síntese de novos derivados da tiossemicarbazona mais funcionalizados para a avaliação tripanocida. Para tal funcionalização, no capítulo 1 explorou-se a introdução do tiofenol na tiossemicarbazida para avaliar a influência de um enxofre extra na molécula, baseado no fato do enxofre da tiocarbonila estar diretamente relacionado à atividade tripanocida¹⁴. Visando uma maior funcionalização, foi introduzido um novo grupo, o tiazol, bioisótero clássico das tiazolinonas e bioisósteros não clássicos das tiossemicarbazonas (**Figura 3**).

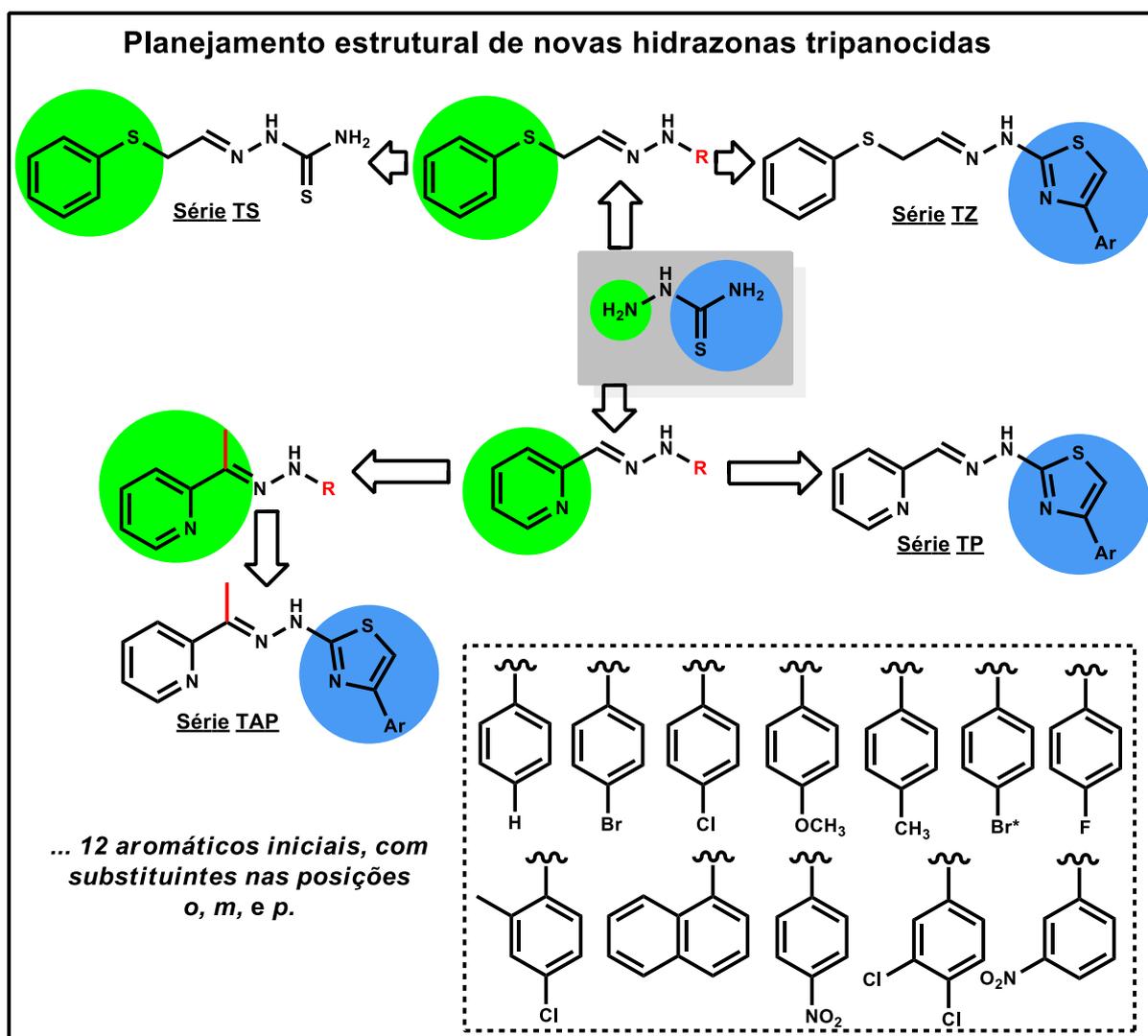
Figura 3: Relações bioisósteras entre tiazol, tiossemicarbazona e tiazolinona.



Baseado nos resultados obtidos na ciclização da tiossemicarbazona em tiazol, decidiu-se expandir a série dos tiazóis, explorando o anel piridina como núcleo condensado em N1, para poder delimitar a importância de cada grupo funcional para a atividade tripanocida, nos subsidiando importantes dados de REA.

O núcleo piridina tem mostrado ser bem promissor devido ao amplo espectro de atividades biológicas concernentes^{15,16} e a alta capacidade de formar quelatos metálicos¹⁷. Com isto no presente trabalho se explorou a obtenção, caracterização e avaliação tripanocida de novas hidrazonas (**Figura 4**).

Figura 4: Planejamento estrutural.



No **capítulo 1**, demonstrou-se a síntese, caracterização e avaliação tripanocida de novos derivados da tiossemicarbazona condensados ao tiofenol, para avaliar se a introdução de um enxofre a mais na molécula potencializaria a atividade tripanocida. Confirmando a teoria proposta por Du e col.¹⁴ de que a tiocarbonila da tiossemicarbazona teria papel crucial na atividade tripanocida através da ligação covalente com a cruzaina do *T. cruzi*. Também foi explorado a funcionalização da tiossemicarbazona através da ciclização para a formação de tiazóis.

No **capítulo 2**, explorou-se a substituição do tiofenol, presente nas moléculas do capítulo 1, pelo anel piridínico como um grupo farmacofórico promissor no aumento da atividade tripanocida. Compostos detentores dos grupamentos piridina e tiossemicarbazona são amplamente estudados como fármacos antitumorais devido à propriedade quelante extremamente favorecida. Entretanto, a pesquisa das piridinas como agentes tripanocidas ainda é pouco explorada. Com a obtenção de 24 moléculas, 12 derivadas da piridina aldeído e 12 da acetilpiridina, foi possível identificar interessantes relações estrutura-atividades entre estas séries.

No decorrer desta pesquisa também foi possível observar que a aplicação do ultrassom como promotor reacional demonstrou ser mais eficiente que o método tradicional (**refluxo**). Esta observação nos motivou a utilizar o ultrassom como promotor reacional padrão para a realização dos protocolos. Pôde-se observar que as sínteses dos compostos propostos no capítulo 1 e 2 foram obtidas com melhores rendimentos e com maior grau de pureza. Pode-se destacar também o papel do ultrassom na purificação dos compostos. Através da solubilização fracionada dos intermediários, por ultrassom, observou-se melhor solubilização e menor dispêndio de solventes utilizados em purificações por coluna, levando a uma síntese e purificação mais eficiente e menos dispendiosa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Síntese, caracterização, avaliação farmacológica e estudo das REA das feniltioetilideno tiossemicarbazonas, 2-imino-1,3-tiazóis e análogos estruturais como protótipos a fármacos antichagásicos.

2.2 Objetivos Específicos

Sintetizar tiossemicarbazonas a partir de tiofenóis substituídos;

Sintetizar inéditos 2-imino-1,3-tiazóis derivados do tiofenol;

Sintetizar inéditos 2-imino-1,3-tiazóis derivados da piridina carbaldeído e acetil piridina;

Caracterizar estruturalmente os compostos obtidos através da análise elementar, espectroscopia de infravermelho (IV) e de Ressonância Magnética Nuclear de Próton ($^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$), bem como a determinação das propriedades físico-químicas dos compostos obtidos;

Avaliar os efeitos antiproliferativo e tóxico frente à cultura do *T. cruzi* e em esplenócitos de camundongos;

Avaliar a eficácia dos compostos em reduzir a parasitemia em modelo de infecção *in vitro* (macrófagos);

Determinar a atividade inibitória da enzima cruzaina do *T. cruzi*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A história natural da doença de Chagas se iniciou há milhões de anos como uma doença enzoótica de animais silvestres. Quando o homem aventurou-se nos ecótopos naturais, a doença começou a ser transmitida acidentalmente ao homem como uma antropozoonose¹⁸. A doença de Chagas endêmica estabeleceu-se como uma zoonose há 200-300 anos, como resultado do desmatamento provocado pela expansão da agricultura e agropecuária, que promoveu a adaptação de insetos silvestres ao ambiente doméstico, na procura de nova fonte alimentar. Hoje, estima-se que na América Latina existam cerca de 12 milhões de pessoas infectadas com o *Trypanosoma cruzi* e que 75 milhões estejam expostas à infecção (**Figura 5**). O protozoário *T. cruzi*, utiliza como reservatório, mamíferos e insetos vetores (**triatomíneos**), existindo na natureza há milhões de anos. O gambá, um dos reservatórios silvestres mais importantes, desempenha um papel relevante na epidemiologia da doença de Chagas, uma vez que este marsupial circula no ambiente silvestre, peridoméstico e doméstico em busca de alimento. Ao mesmo tempo, cães e gatos podem invadir o ambiente silvestre para caçar, adquirindo a infecção e trazendo-a também para o peridomicílio e domicílio. A adaptação dos insetos vetores triatomíneos às moradias certamente é o fator preponderante para o estabelecimento da infecção humana¹⁹.

Figura 5: Incidência da doença de Chagas mundialmente.
(http://www.who.int/topics/tropical_diseases/factsheets/neglected/en/index.html)



Em 15 de abril de 1909, um dia após ter detectado um parasita flagelado na circulação de uma criança, Carlos Chagas escreveu uma nota anunciando a descoberta de uma nova tripanossomíase humana. A acuidade científica de Carlos Chagas permitiu-lhe descrever, em um curto espaço de tempo, o parasita, que ele denominou *Trypanosoma cruzi*, seus reservatórios silvestres, seu desenvolvimento nos triatomíneos e as características clínicas da doença. Em 2009, comemorou-se o centenário desta descoberta memorável²⁰.

Levantamentos epidemiológicos realizados em países da América Latina indicam que a doença de Chagas possui diferentes apresentações clínicas. Cerca de 70% dos indivíduos são assintomáticos, ao passo que cardiomiopatias severas, lesões digestivas e distúrbios neurológicos são observados em 30% dos indivíduos infectados¹⁹.

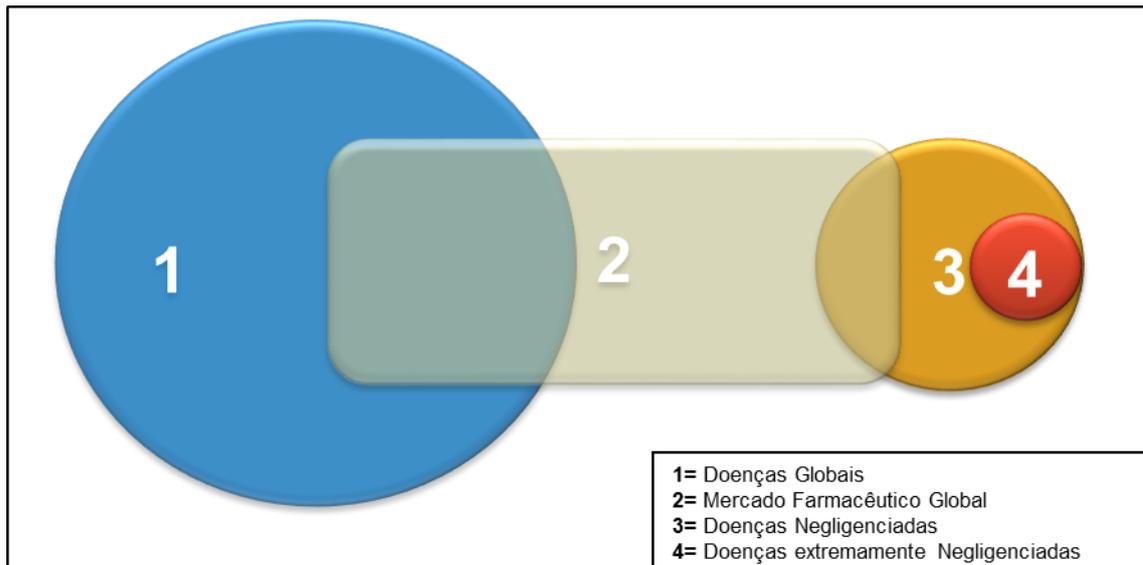
É importante mencionar que, anualmente 2 a 3% dos indivíduos assintomáticos passam a apresentar as manifestações cardíacas e/ou digestivas. Os determinantes desta conversão são desconhecidos. A prevalência das manifestações da doença e sua suscetibilidade ao tratamento variam geograficamente. A comunidade científica há tempo debate se isto é o resultado da variabilidade genética do parasita, da imunogenética do hospedeiro humano, de fatores ambientais ou da ação combinada destes elementos.

A inusitada heterogeneidade biológica do *T. cruzi*, quanto à sua morfologia, conteúdo de DNA, virulência, patogenicidade, suscetibilidade a drogas e outros parâmetros está amplamente documentada na literatura. Desde a década de 70, estas observações estimularam a busca de marcadores moleculares que pudessem correlacionar o genótipo do parasita com as manifestações clínicas da doença de Chagas. Desta forma, o *T. cruzi* tornou-se o modelo favorito para estudos de epidemiologia molecular e genética de população, sendo possivelmente, o patógeno cuja evolução e estrutura populacional sejam mais conhecidas²¹.

Portanto, a crise na pesquisa e desenvolvimento (**P&D**) de medicamentos para doenças negligenciadas não é provocada por falta de conhecimento científico, já que muito se sabe e muitas informações são geradas continuamente sobre a biologia, imunologia e genética dos parasitas que causam a tripanossomíase africana, a leishmaniose e a doença de Chagas²².

Na realidade, a crise é mais o resultado da falha do mercado e de políticas públicas em promover a produção e pesquisa de medicamentos para doenças negligenciadas (**Esquema 2**)²². Como exemplo da crise em P&D para doença de Chagas, podemos observar o Esquema 2, que mostra claramente a intenção da indústria farmacêutica.

Esquema 2: As doenças e a abrangência da indústria farmacêutica.



1- Doenças Globais como câncer ou doenças cardiovasculares, metabólicas, ósseas e de articulação afetam pessoas em todo o mundo e constituem o maior foco da indústria farmacêutica baseada em P&D.

2- representa a parte do mercado farmacêutico para produtos direcionados à condições que não são meramente médicas (como celulite, calvície etc.). Este mercado é altamente lucrativo em países ricos.

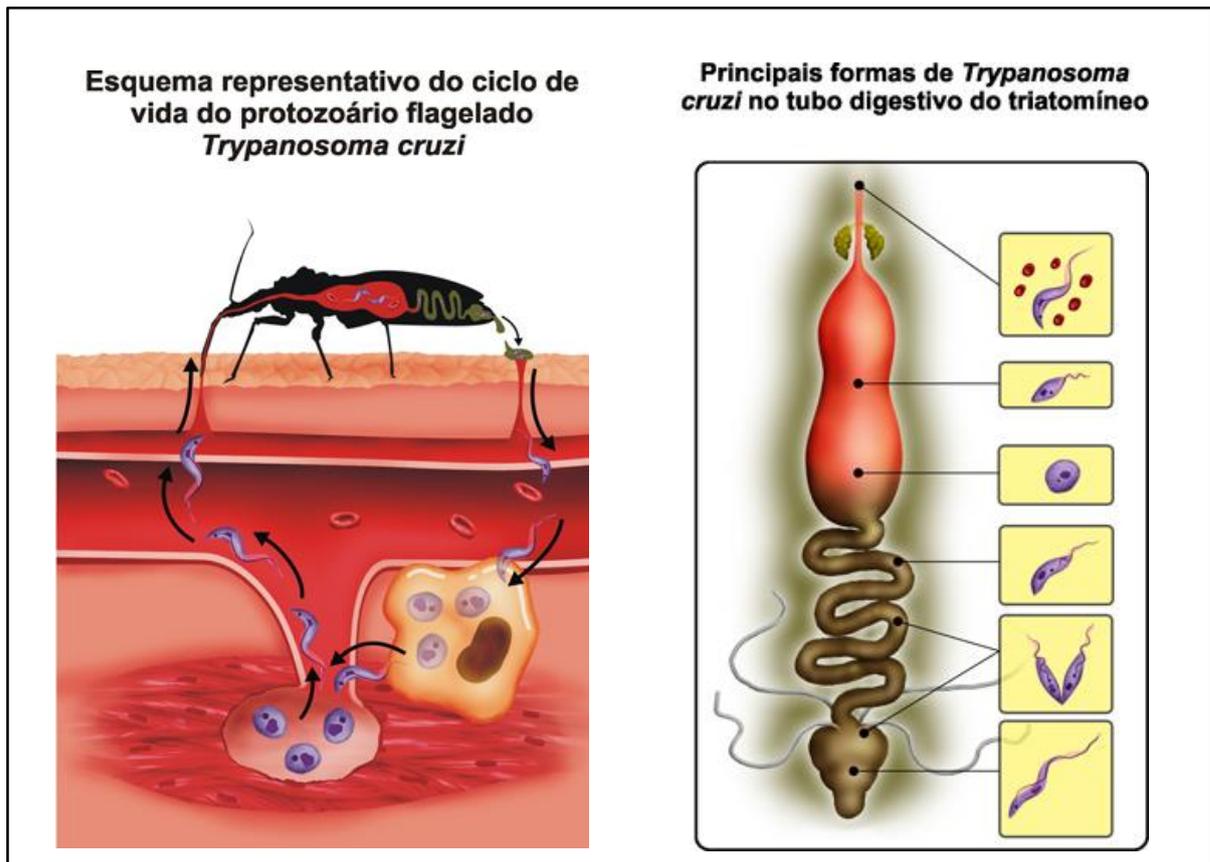
3- Doenças Negligenciadas como malária e tuberculose afetam principalmente pessoas de países pobres, apesar de existir um pequeno mercado em países ricos (por ex. para pessoas que viajam para áreas endêmicas). Portanto, há algum esforço de P&D.

4- Doenças Extremamente Negligenciadas: atingem exclusivamente pessoas em países em desenvolvimento que são muito pobres para pagar por tratamento e é onde a doença de Chagas está classificada. Elas não representam um mercado e estão fora do escopo dos esforços P&D das indústrias.

3.1 Ciclo biológico do *T. cruzi*

O ciclo biológico do *T. cruzi* (**Esquema 3**) inclui três formas fundamentais caracterizadas pela posição relativa do flagelo, citoplasma, e núcleo²³ :

Esquema 3: Ciclo biológico do *T. cruzi*.
(<http://www.coroflot.com/eschenazi/scientific-and-medical>).



(1) Tripomastigotas: 20 μm de comprimento, fusiformes, cinetoplasto (**corpo basal**) subterminal, constituem a forma infectante e são encontrados no sangue de mamíferos e na porção caudal (**abdômen**) dos insetos triatomídeos; eles não se multiplicam. Em mamíferos eles são disseminados por transmissão de sangue infectado²³.

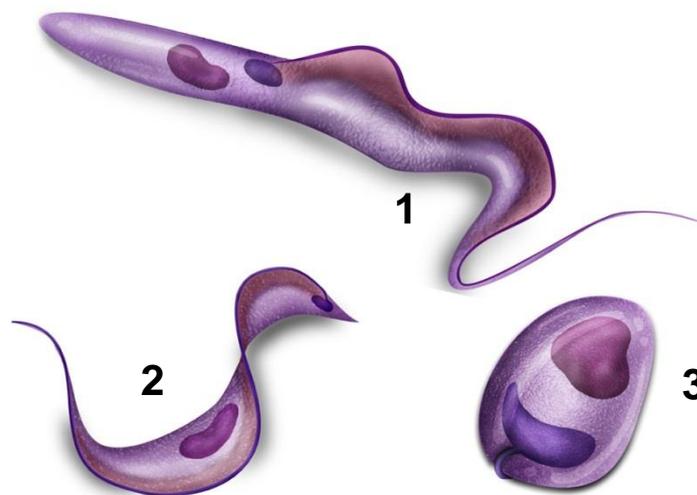
As formas tripomastigotas metacíclicas lembram as formas delgadas dos tripomastigotas (**Figura 6**) (**que não podem evoluir se não penetrarem em hospedeiro vertebrado**), e que exibem capacidade invasiva para atravessar mucosas e conjuntivas e não são suscetíveis ao soro humano, podendo sobreviver a temperaturas mais elevadas.

(2) Epimastigotas: Também possuem 20 μM de comprimento, cinetoplasto (**corpo basal**) anterior ao núcleo, fusiformes. Representam a forma multiplicativa do parasita no intestino do triatomídeo e é a forma predominante na cultura. Por esta razão, é a forma mais comumente utilizada em estudos bioquímicos²³.

Os epimastigotas (**Figura 6**) são originários da diferenciação de tripomastigotas circulantes ingeridos pelo vetor durante a picada e multiplicam-se por divisão binária longitudinal no lúmen do tubo intestinal do inseto.

(3) Amastigotas (**Figura 6**): Aproximadamente 2 μM de diâmetro, redondo, sem um flagelo emergente. Eles se multiplicam através de fissão binária dentro de células hospedeiras nos mamíferos, produzindo sua ruptura, e liberando tripomastigotas pela corrente sanguínea que podem voltar a invadir qualquer célula nucleada²³. Elas podem ser produzidas em cultura de células musculares, fibroblastos, macrófagos entre outras^{24,25}.

Figura 6: Formas evolutivas do *T. cruzi*. (1- tripomastigota; 2- epimastigota; 3- amastigota) (<http://www.coroflot.com/eschenazi/scientific-and-medical>).



3.2 Sintomatologia e tratamento da doença de Chagas

A doença possui uma fase aguda, de curta duração, que em alguns portadores progride para uma fase crônica. A fase aguda é geralmente assintomática, e tem um período de incubação entre uma semana a um mês após a picada. No local da picada pode-se desenvolver uma lesão volumosa, eritematosa (**vermelha**) e edematosa (**inchada**), lesão conhecida como chagoma. Se a picada for perto do olho, é frequentemente observada conjuntivite com edema da pálpebra, também conhecida por sinal de Romaña (**Figura 7**).

Outros sintomas possíveis são febre, linfadenopatia, anorexia, hepatoesplenomegalia, miocardite branda e mais raramente meningoencefalite. Aproximadamente 20 a 60% dos casos agudos evoluem, em 2 a 3 meses, à forma crônica da doença, curando-se os restantes. No entanto, em todos os casos, os sintomas cessam após cerca de dois meses. Muitos, mas não todos os portadores do parasita desenvolvem sintomas devido à doença crônica²⁶.

Figura 7: Sinal de Romana

(1-http://en.wikipedia.org/wiki/Romana's_sign; 2-<http://www.jyi.org/features/ft.php?id=185>; 3-primeiro registro do sinal de romana¹⁸).



O caso crônico permanece assintomático durante dez a vinte anos. No entanto, neste período de bem-estar geral, o parasita está a reproduzir-se continuamente em baixos números, causando danos irreversíveis no hospedeiro principalmente no sistema nervoso e no coração. O fígado também é afetado, mas como é capaz de regeneração, os problemas são raros. O resultado é apenas aparente após uma ou duas décadas de progressão, com aparecimento gradual de demência (**3% dos casos iniciais**), cardiomiopatia (**em 30% dos casos**), ou dilatação do trato digestivo (**megaesôfago ou megacólon, 6%**), devido à destruição da inervação e das células musculares destes órgãos, responsáveis pelo seu tônus muscular.

No cérebro há frequentemente formação de granulomas. Neste estágio a doença é frequentemente fatal, mesmo com tratamento, geralmente devido à cardiomiopatia (**insuficiência cardíaca**). No entanto o tratamento pode aumentar a esperança e qualidade de vida. Os principais compostos desenvolvidos experimentalmente para o tratamento da doença de Chagas, logo após a descoberta da enfermidade foram: atoxil (**arsênico**), fucsina, antimônio pentavalente, e cloridrato de mercúrio, desenvolvidos experimentalmente por Mayer e Rocha Lima (**1912-1914**), porém nenhum deles apresentou resultados eficazes²⁷.

Anos mais tarde, na Alemanha, os laboratórios Bayer e outros laboratórios desenvolveram as primeiras drogas com atividade antichagásica como Bayer 1957, fenatridina carbídiu sulfato, aminoquinolinas, arsênicos trivalentes e vários compostos nitrofurânicos²⁸. Como consequência dos anos de pesquisa, na década de 1960 obtiveram-se as drogas clássicas para o tratamento da doença de Chagas, nifurtimox (**Lampit**) e benznidazol (**Rochagan**).

Desde os anos 80, o nifurtimox teve sua comercialização interrompida, primeiro no Brasil e posteriormente na Argentina, Chile e Uruguai. O modo de ação dos nitrocompostos envolve a geração de um radical nitroânion por nitroredutases que, na presença de oxigênio, leva a formação intermediários reativos e, sendo o *T. cruzi* parcialmente deficiente em mecanismos de desintoxicação por radical livre, é suscetível a tais intermediários²⁹. Por outro lado, esse dano oxidativo não é a ação-chave do Bdz. A detecção do radical nitroânion correspondente ocorre apenas em concentrações muito superiores às que matam o parasita. A ação do Bdz pode envolver ligação covalente ou outras interações de intermediários nitro redutores com componentes do parasita³⁰, ou por ligação ao DNA, lipídios e proteínas³¹.

Os resultados obtidos com ambas as drogas variaram de acordo com a fase da doença, o período de tratamento, da dose, da idade e da origem geográfica dos pacientes. Bons resultados foram alcançados na fase aguda, na infecção crônica recente, infecção congênita e acidentes de laboratório. Para os casos de fase aguda, o tratamento recomendado é 8-10 mg/kg por dia de Nfx ou 5 a 7,5 mg/kg por dia de Bdz durante 30 a 60 dias consecutivamente, divididas em duas ou três doses diárias. Pacientes com menos de 40 kg podem ser tratados com até 12 mg/kg por dia de Nfx e até 7,5 mg/kg por dia para Bdz durante 30 a 60 dias³².

Para a infecção crônica recente (**crianças menores de 12 anos**) ou indivíduos com infecção de até 10 anos, o tratamento deve ser feito com 8 mg/kg por dia de Nfx ou mg/kg por dia de Bdz durante 30 a 60 dias. No caso de infecção acidental o tratamento deve começar imediatamente e dura apenas 10 a 15 dias consecutivos.

Casos de infecções crônicas tardias sem manifestação clínica ou com leves manifestações cardíacas ou digestivas devem ser tratados durante 60 a 90 dias, de acordo com a tolerância às drogas, visando prevenir ou reduzir a evolução da doença de Chagas para formas mais graves, um fato que ainda não está definitivamente comprovado.

De acordo com os requerimentos da organização mundial de saúde³³ a droga ideal para o tratamento da doença de Chagas deve possuir os seguintes requerimentos:

- 1- **Cura na fase aguda e crônica da doença;**
- 2- **Ser efetiva em uma única ou poucas doses;**
- 3- **Ser acessível aos pacientes, ou seja, de baixo custo;**
- 4- **Não Possuir efeitos colaterais e/ou teratogênicos;**
- 5- **Não precisar de internação para o tratamento e;**
- 6- **Não induzir resistência.**

3.3 Proteases

São enzimas que quebram ligações peptídicas entre aminoácidos de proteínas e peptídeos. Estima-se que sem a participação catalítica destas enzimas, a hidrólise de um único peptídeo poderia levar centenas ou milhares de anos, sendo que a reação ocorre em uma escala de milissegundos na presença da protease apropriada³⁴. Em protozoários como o *T. cruzi*, as proteases possuem múltiplas funções que envolvem desde a invasão celular até o escape do parasita do sistema imune do hospedeiro³⁴⁻³⁷.

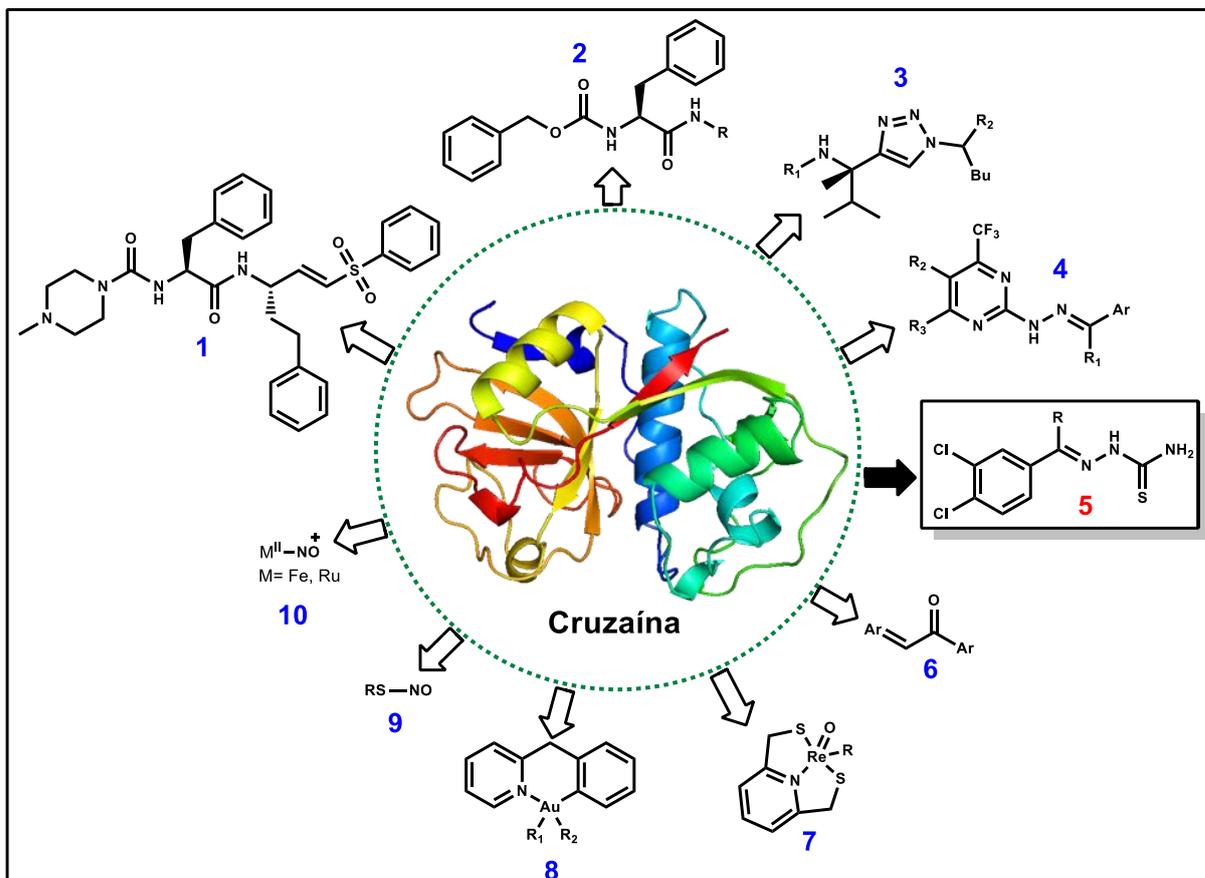
Considerando-se o papel essencial dessa classe de enzimas no ciclo de vida do *T. cruzi*, algumas proteases têm sido selecionadas como alvos para o desenvolvimento de novos agentes antichagásicos. Cisteíno proteases, serino proteases, metalo-proteínas e treonino proteases são exemplos de proteases amplamente estudadas³⁵.

Entre estas, a cruzaina, também chamada cruzipaina ou GP57/51 (**Figura 8**), que constitui a mais abundante proteína da família das cisteíno proteases do *T. cruzi*, tem sido muito explorada, levando à descoberta de vários inibidores potentes e seletivos. Das patentes depositadas através da Organização Mundial da Propriedade Intelectual (**WIPO - World Intellectual Property Organization**) sobre moduladores de rotas metabólicas do *T. cruzi*, os inibidores de cruzaina merecem especial destaque^{8,38,39}.

As principais classes de inibidores desta enzima incluem:

- (i) Derivados peptídicos (**1 e 2**)⁴⁰;
- (ii) Derivados não peptídicos (**triazóis (3), pirimidinas (4), tiossemicarbazonas (5) e chalconas (6)**)^{36,41};
- (iii) Complexos de rênio e ouro (**oxorênios (7) e ciclometalados de ouro (8)**)⁴²;
- (iv) Doadores de óxido nítrico (**nitroso-tióis (9) e nitrosilo complexos de ferro e rutênio (10)**)^{43,44} (**Figura 8**).
- (v) A diversidade química dos inibidores da cruzaina (**Figura 8**) representa o espaço químico biológico que pode ser explorado, valorizando o papel dos produtos naturais e da síntese orgânica como fontes valiosas de moléculas capazes de interagir com sistemas biológicos complexos.

Figura 8: Estrutura cristalográfica da cruzaina do *T. cruzi* (PDB ID 1AIM⁴⁵); inibidores da enzima alvo de diferentes classes químicas.



3.4 Tiossemicarbazonas: aspectos químicos e farmacológicos

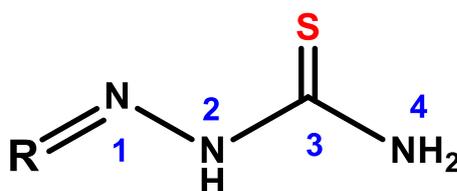
Tiossemicarbazonas são uma interessante classe de compostos com uma ampla gama de aplicações farmacológicas⁴⁶ e foram identificadas como possíveis protótipos a inibidores da cruzaina^{42,47}.

Em muitas circunstâncias, a ação farmacológica das tiossemicarbazonas é incrementada através da coordenação com íons metálicos^{16,48}. Pérez-Rebolledo e col.⁴⁹ demonstraram que nitro-tiossemicarbazonas e seus complexos com cobre (II) e rutênio (II) apresentaram significativa atividade tripanocida *in vitro*, sendo os complexos 5 a 25 vezes mais potentes que os ligantes livres.

Uma investigação sobre o perfil farmacológico de antimônio (III) com tiossemicarbazonas mostrou que estes complexos apresentam alta citotoxicidade frente a linhagens celulares da leucemia humana⁵⁰.

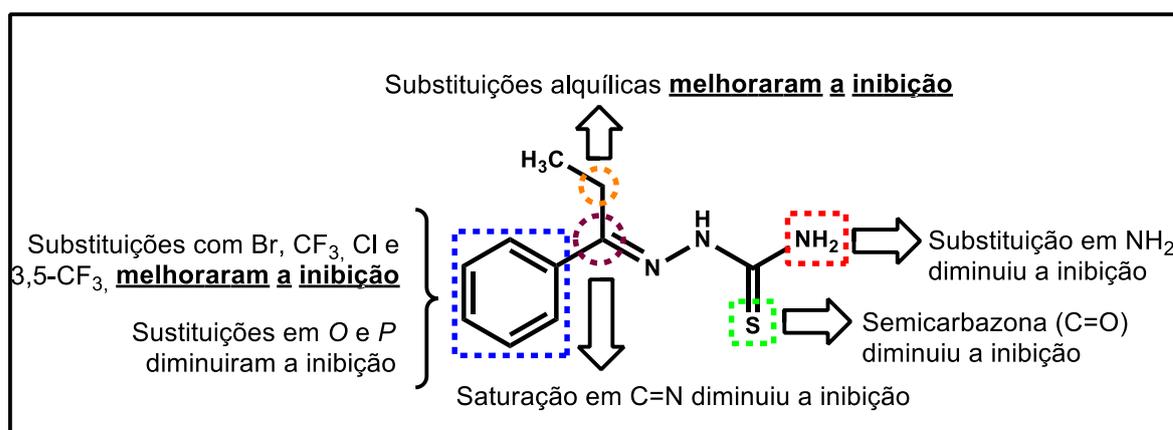
As tiossemicarbazonas são compostos de considerável interesse científico, devido às suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antichagásica^{11–13,51}, antitumoral^{52–55}, antibacteriana⁵⁶, antiprotozoária^{57–59} entre outras. A estrutura química das tiossemicarbazonas e a respectiva numeração dos seus átomos é exposta na **Figura 9**.

Figura 9: Estrutura e numeração sistemática da tiossemicarbazona.



Em 2002, Du e col.¹⁴ realizaram um robusto estudo acerca de uma quimioteca de tiossemicarbazonas com a capacidade de inibir a proteína cruzaina do *T. cruzi* (TCC). Este estudo gerou importantes relações estrutura-atividades (REA) demonstrando as principais modificações em três frações da tiossemicarbazona, tendo como base o núcleo na **Figura 10**. Os autores constataram que halogenetos como o bromo e cloro foram tolerados nos carbonos das posições 3 e/ou 5 no anel aril. Além disso, a mudança do substituinte metil na posição 2 teve pouco efeito e uma mono substituição no nitrogênio da posição 1 e no NH₂ da posição 3 foram deletérios.

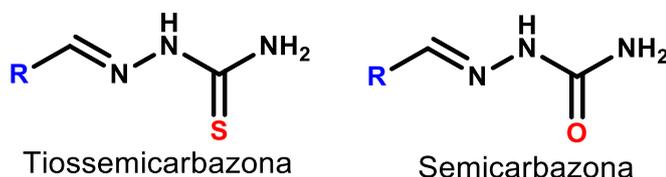
Figura 10: Relação estrutura-atividade (REA) proposto por Du e col¹⁴



3.5 Tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos:

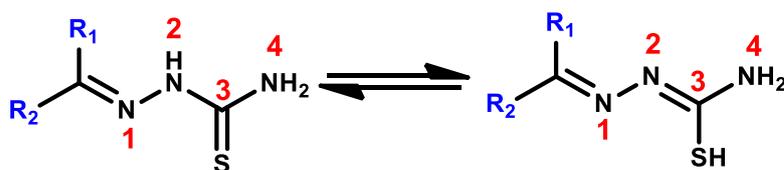
Tiossemicarbazonas e semicarbazonas (**Figura 11**) apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal e Química Medicinal Inorgânica, em razão de sua capacidade quelante. Apesar da ampla versatilidade farmacológica desses compostos como uma classe química, especificidades estruturais podem levar à manifestação de atividades específicas. Para os complexos metálicos, em alguns casos, é possível modular a atividade através do desenho do ligante ou através da escolha do metal.

Figura 11: Estruturas da tiossemicarbazona e semicarbazona.



As atividades biológicas concernentes as tiossemicarbazonas resultam da habilidade de formar quelatos com íons metálicos. Elas existem nas formas tautoméricas tiona e tiol (**Figura 12**). A forma tiona atua como ligante neutro bidentado enquanto a forma tiol se desprotona e atua como um ligante aniônico⁶⁰.

Figura 12: Formas tautoméricas tiona e tiol da tiossemicarbazona.



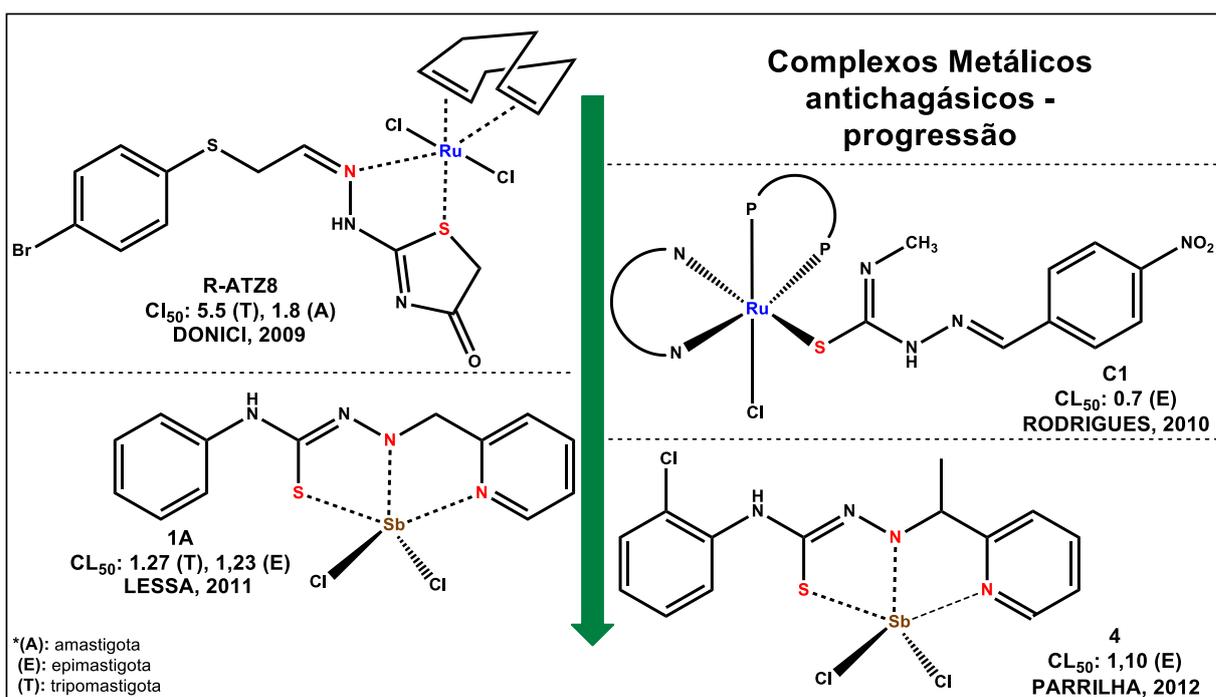
Do ponto de vista da Química Medicinal, a complexação de ligantes bioativos com metais de transição (**Figura 13**) pode resultar em algumas vantagens, como:

- (i) Incremento da atividade biológica, quando comparada somente ao ligante;
- (ii) Modificação no perfil farmacodinâmico e farmacocinético;
- (iii) Habilidade em mimetizar substratos endógenos.

A capacidade das tiossemicarbazonas formarem complexos estáveis com íons metálicos de transição as torna moléculas versáteis. De fato, diversas tiossemicarbazonas têm sido exploradas como agentes antiviral^{61,62}, fungicida⁶³, antibactericida^{64,65} e antitumoral^{66,67}. Inerente ao desenvolvimento de tiossemicarbazonas é a capacidade de formar complexos metálicos com metais de transição como ferro, cobre e zinco⁵¹. A ligação metálica, afinidade e atividade farmacológica variam de acordo com cada composto e diferenças mecanísticas têm sido observadas com base no fato do ferro ou do cobre serem os metais preferidos para quelação⁵⁴. Ambos são metais redox-ativos com potencial geração de espécies reativas de oxigênio (**ERO**). Assim, a entrega intracelular de metais redox-ativos de transição pode ser usada para alterar a homeostase redox para o benefício terapêutico⁶⁸.

Em 2009, nosso grupo de pesquisa⁵¹ publicou um trabalho que demonstrou o incremento da inibição parasitária dos complexos quando comparados com os seus respectivos ligantes. Recentes estudos^{17,51,69,70} têm explorado esta linha de pesquisa com a descoberta de bons resultados (**Figura 13**), o que nos motiva a investigar mais a fundo o efeito dos ligantes complexados.

Figura 13: Exemplos de complexos metálicos com atividade tripanocida.



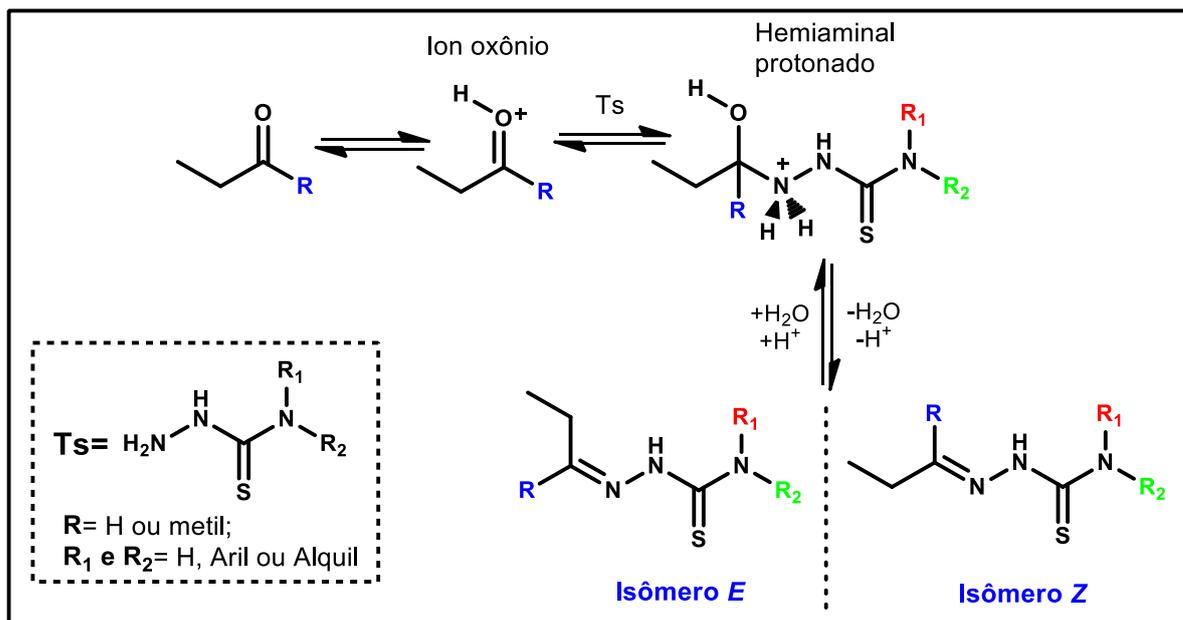
3.6 Obtenção direta das tiossemicarbazonas a partir de tiossemicarbazidas

As tiossemicarbazonas são compostos amplamente explorados na síntese orgânica e podem ser adquiridas comercialmente. A síntese é descrita pela condensação equimolar de um derivado carbonilado, do tipo aldeído ou cetona, com tiossemicarbazidas em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido^{71,72}.

Do ponto de vista sintético, as tiossemicarbazonas apresentam como característica principal, sua versatilidade de obtenção, assim como sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final¹⁴.

O mecanismo reacional é semelhante ao de formação de iminas. Inicia-se com a protonação do oxigênio da carboníla para formar o intermediário íon oxônio, seguida de ataque nucleofílico do nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida para formar o intermediário hemiaminal protonado (**Esquema 4**). Este perde uma molécula de água e, após neutralização, forma-se a tiossemicarbazona⁷³.

Esquema 4: Etapas da obtenção de tiossemicarbazonas.



As tiossemicarbazonas são geralmente obtidas como misturas de isômeros *E* e *Z* no estado sólido⁷⁴. Em solução, há isomerização da configuração *Z* para *E*, devido a sua maior estabilidade termodinâmica⁷⁵. A isomerização é extremamente influenciada pela presença de ácido, pela natureza dos grupos substituintes ligados ao carbono azometina e pelos substituintes ligados ao nitrogênio da tioamida (**N4**).

Karabatsos e col.⁷⁶ mostraram, em estudos utilizando a técnica de ¹H-RMN, que os hidrogênios azometínicos de tiossemicarbazonas na configuração *E* ressonam a campo magnético baixo em relação à tiossemicarbazonas em configuração *Z*, mesmo em diferentes solventes. Resultado semelhante foi obtido por Antonini e col.⁷⁷ alguns anos depois. Como regra geral, as tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos tendem a formar preferencialmente o isômero *E*, termodinamicamente mais estável, enquanto que nas derivadas de cetonas assimétricas a proporção entre *E* e *Z* depende da estrutura dos substituintes ligados à carbonila⁷⁵.

3.7 Atividades biológicas das tiossemicarbazonas

De modo geral pode-se dizer que as tiossemicarbazonas e semicarbazonas agem, ou como inibidores enzimáticos, através da complexação com metais endógenos ou através de reações de redox, ou através de interações/inibição da síntese do DNA. Greenbaum e col.⁴⁷ sugeriram que o mecanismo de ação das tiossemicarbazonas é ainda complexo e deve acontecer através da inibição de múltiplos alvos. Neste sentido, as tiossemicarbazonas apresentam-se como ligantes versáteis tanto na forma neutra quanto na forma aniônica, podendo formar ligação coordenada com metais através do átomo de enxofre e do átomo de nitrogênio azometina (**C=N**)⁵⁸. Esta capacidade de formar ligação coordenada é aumentada se houver grupos doadores de elétrons ligados ao carbono da função azometina⁷⁸.

3.8 Tiossemicarbazonas como agentes tripanocidas

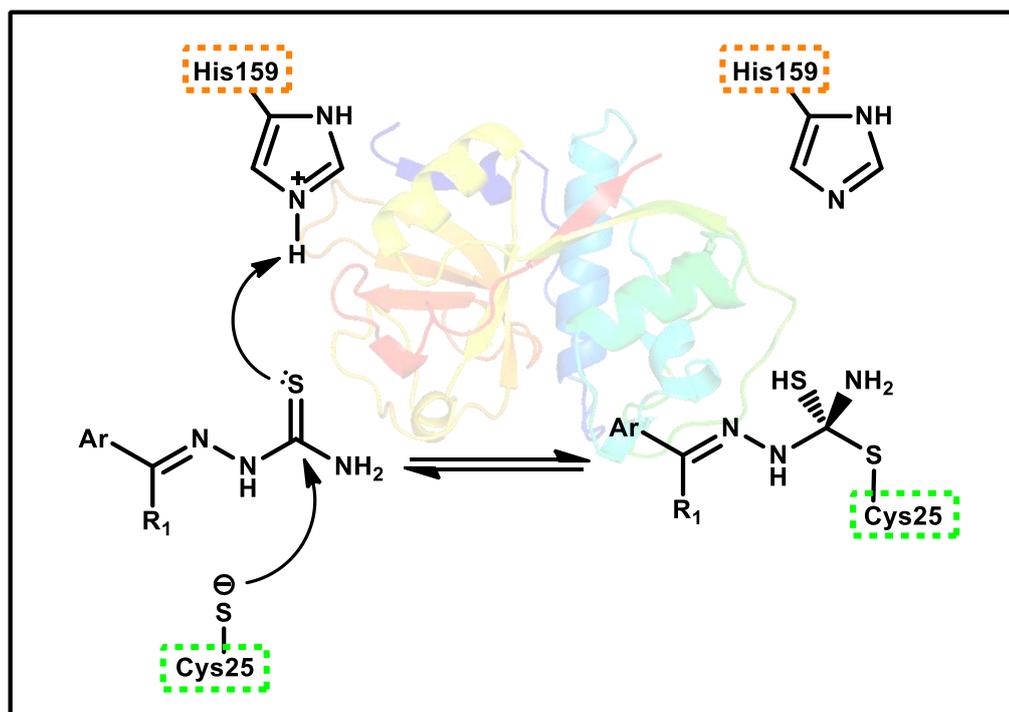
Inúmeros estudos têm evidenciado a importância de derivados das semicarbazonas e tiossemicarbazonas para a obtenção de agentes antiparasitários¹⁴. Diversos inibidores irreversíveis, baseados em peptídeos têm sido desenvolvidos como potentes substratos para a TCC, tais como cetonas halometil, diazometanos, derivados epoxisuccinil e vinil sulfonas, pseudopeptídeos entre outros. Entretanto, uma desvantagem para estes compostos é sua alta reatividade enzimática, e, portanto, pobre seletividade para a TCC⁷⁹.

Para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos, as pesquisas têm sido direcionadas para a inibição das enzimas cruzaina do *Trypanosoma cruzi* (**TCC**)⁸ e a tripanotona redutase (**TR**)⁹, como alvos específicos e promissores. A TCC é a enzima-chave da replicação intracelular do parasita e a TR é a enzima chave do metabolismo antioxidativo do *T. cruzi*. Compostos sintetizados que apresentam uma porção tiossemicarbazona em sua estrutura têm sido descritos como moléculas com potencial atividade inibitória da enzima cruzaina⁴⁶.

Du e col.¹⁴ descreveram que alguns derivados da tiossemicarbazona exibem potente atividade frente à enzima TCC, bem como atividade antiparasitária *in vitro*. Segundo estes mesmos autores, a interação “ligante-TCC” ocorre via ataque covalente do resíduo Cys25 (da TCC) em direção ao carbono tiocarbonilado, que ataca um próton do aminoácido His159, formando um derivado tetraédrico sulfídrico (Esquema 5).

Este mecanismo mostra que a diferença de potência entre as aril-tiossemicarbazonas e aril-semicarbazonas é resultado do volume atômico C=S como parâmetro crucial para o ataque covalente do resíduo Cys25.

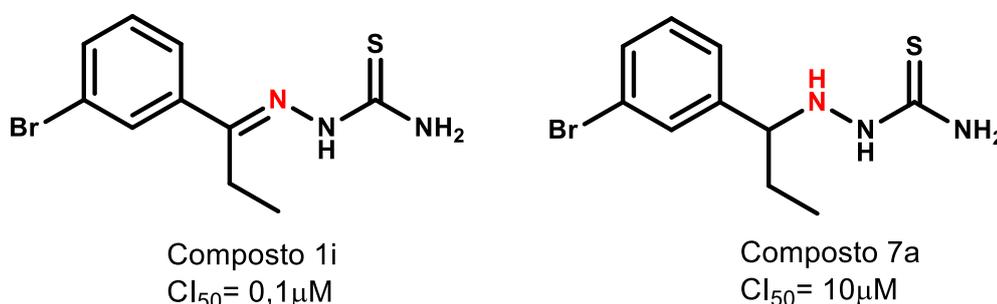
Esquema 5: Mecanismo de inibição na TCC por derivados das aril-tiossemicarbazonas, propostas por Du e col.



Diante destes resultados, Fujii e col.⁸⁰ exploraram a obtenção de aril-tiossemicarbazonas contendo diversas substituições em C1. Os resultados demonstraram que a substituição por grupo fenil, *p*-metil-fenil e alquílicos lineares incrementam a potência desta classe de compostos frente aos ensaios antichagásicos. Entretanto, a simples ramificação ou substituição de fenil por ciclohexil diminuiu drasticamente a potência destes derivados, inativando-os.

Du e col.¹⁴ sintetizaram mais de 100 derivados tiossemicarbazônicos, entre os quais 45 apresentaram eficácia em inibir a TCC. Eles observaram que propriedades físico-químicas como: baixo peso molecular, capacidade de doação e formação de ligações de hidrogênio incrementam a ação antichagásica das tiossemicarbazonas. Neste estudo foi utilizado o derivado tiossemicarbazônico 1i como base para modificações estruturais, apresentando Cl_{50} de 0,1 μ M para a cruzaina do *T. cruzi* e verificaram que o simples fato de reduzir o C=N da posição 4 diminuiu a potência do composto em até duas ordens de grandeza (**Figura 14**).

Figura 14: Redução do C=N da posição 4.



Entre os vários compostos sintetizados, Du e col.¹⁴ obtiveram resultados interessantes chegando a alcançar Cl_{50} de 20nM para a cruzaina. Os compostos mais ativos foram os 2b, 2h, 2i, e 3h com Cl_{50} de 50nM, 20nM, 20nM, e 50nM respectivamente (**Tabela 1**).

Tabela 1: Compostos 2b, 2h, 2i, e 3h sintetizados por Du e col.

Composto	R	R ₁	R ₂	R ₃	Cl_{50} /nM
2b	CH ₂ CH ₃	H	H	CF ₃	50
2h	CH ₂ CH ₃	CF ₃	H	CF ₃	20
2i	CH ₂ CH ₃	H	Cl	Cl	20
3h	CH ₃	H	Cl	Cl	50

3.9 Piridina na Química Medicinal

A química de heterocíclicos é parte integrante das ciências químicas e constitui uma parte considerável de modernas pesquisas que ocorrem atualmente em todo o mundo. A química dos compostos heterocíclicos é tão lógica como a química de compostos aromáticos ou alifáticos⁸¹. O estudo de sistemas heterocíclicos é de grande interesse tanto do ponto de vista teórico como do prático. Heterociclos também desempenham um importante papel na concepção e descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos⁸².

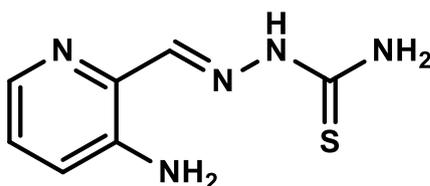
A procura da piridina e seus derivados aumentou nos últimos 50 anos pela descoberta de muitos compostos bioativos contendo piridina por várias indústrias⁸³. Com aplicações específicas desde meados do século passado, a piridina assumiu um papel importante na compreensão da química dos sistemas biológicos. Ela desempenha um papel fundamental ao catalisar ambos sistemas biológicos e químicos. Em muitas enzimas de organismos vivos é o nucleotídeo piridina prostético (**NADP**)⁸⁴, que está envolvido em vários processos de oxidação – redução⁸⁵.

Outra evidência da grande importância da piridina em sistemas biológicos é a sua presença em importantes vitaminas como a niacina e piridoxina (**vitamina B6**) e também em alcaloides altamente tóxicos como a nicotina⁸⁶. Na indústria farmacêutica, a piridina está presente em mais de 7000 núcleos de compostos bioativos⁸⁷.

Dentro da Química Orgânica sintética, piridinas são amplamente utilizadas na química de coordenação (**bipiridinas e terpiridinas que possuem uma excelente capacidade de complexar com diversos íons metálicos, tais como zinco rutênio e cobre**). Estes ligantes funcionais têm encontrado uma infinidade de aplicações como em reagentes analíticos altamente sensíveis, sistemas de sensores, síntese enantioseletiva, agentes luminescentes para a síntese de peptídeos marcados e como blocos de construção para Química Supra molecular⁸⁸.

Entre os derivados piridínicos mais estudados atualmente, temos a triapina (**3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona, 3-AP**) (**Figura 15**), um potente agente antitumoral dotado de boas características para a quelação com metais de transição.

Figura 15: 3-Amino piridina, Triapina.



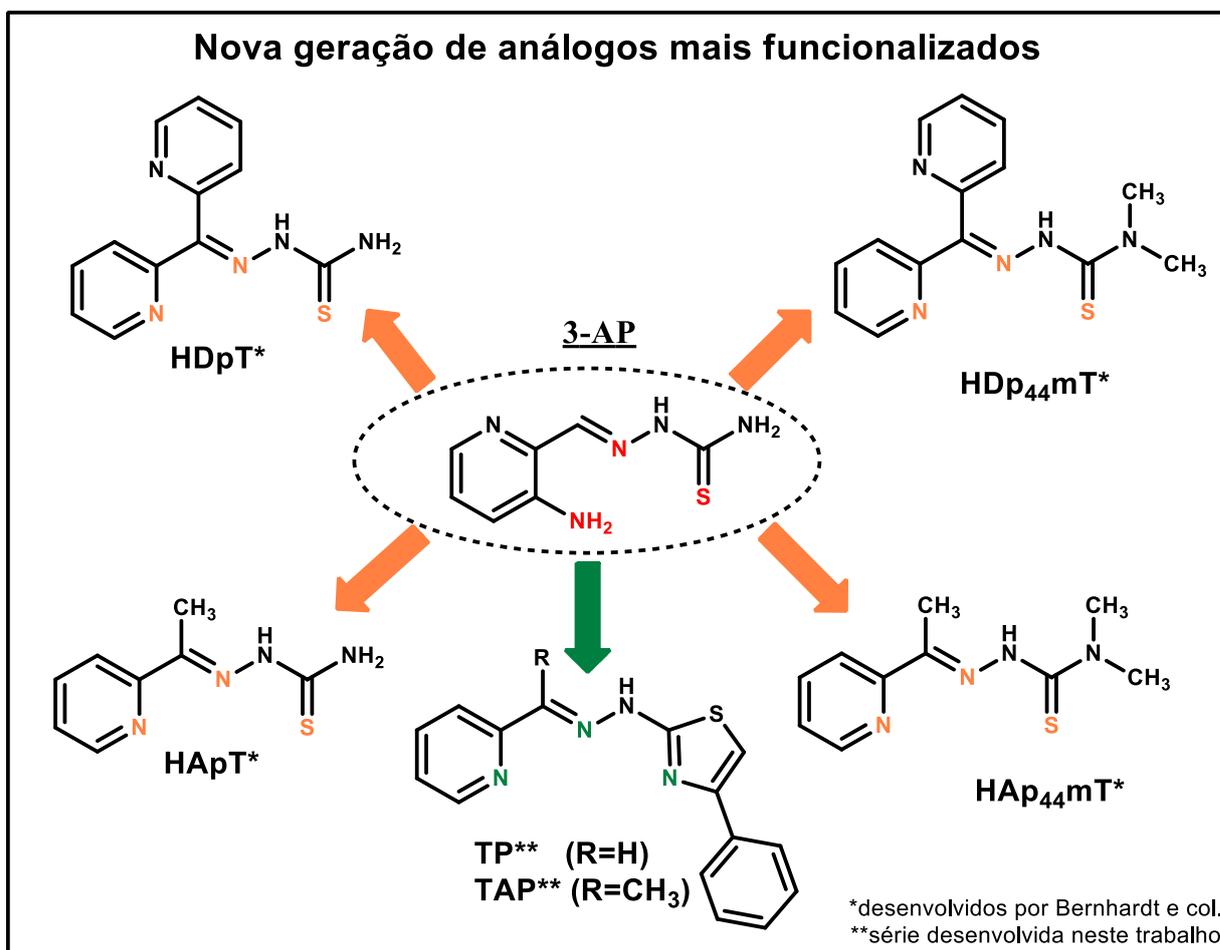
Como consequência da alta afinidade quelante de ferro, a triapina é um potente inibidor de enzimas contendo ferro tais como a ribonucleotídeo redutase (**RR**) e $P_{53}R_2$ ^{89,90}. Considerava-se que a atividade inibitória da 3-AP era devido à remoção direta do Fe das enzimas, porém, evidências recentes sugerem que os efeitos redox do complexo 3-AP-Fe sobre essas enzimas também são importantes ^{91,92}.

As primeiras tentativas de avaliação clínica para câncer da triapina como um único agente ou em combinação com a gemcitabina falharam nitidamente na eficácia. Em estudos mais recentes, a combinação de 3-AP com fludarabina ou citarabina em pacientes com leucemia aguda refratária, desordens mieloproliferativas agressivas, ou leucemia mielóide mostrou alguma promessa⁹³. Os dados preliminares também sugerem que triapina pode melhorar os resultados para pacientes com estágio avançado de câncer de colo uterino em combinação com radiação e cisplatina⁹⁴.

Dez pacientes com estágio IB2 para câncer cervical IVB atingiram uma resposta clínica completa e permaneceram livre da doença, em média, por 18 meses, fornecendo evidências anedóticas para melhores resultados em relação aos tratamentos atuais. O potencial antitumoral das tiossemicarbazonas queladas com o cobre também tem sido explorado. Os primeiros estudos de quelatos cuprosos com tiossemicarbazona 2-formilpiridina e 4-formilpiridina mostrou que ambos os agentes foram capazes de induzir a morte celular associada à geração de ERO e depleção da glutatona celular^{95,96}.

Um grupo de grande projeção na obtenção de análogos da 3-AP é o grupo do Prof. Paul Bernhardt, (**School of Chemistry & Molecular Biosciences – Au**), cujo grupo já publicou diversos artigos referentes a análogos e seus complexos metálicos, demonstrando o potencial terapêutico da condensação do anel piridínico (**e seus análogos**) com a tiossemicarbazona. Motivados pelos resultados obtidos dos análogos da Triapina por Bernhardt e col., planejou-se a substituição do grupo tiofenol pela piridina para avaliar a atividade tripanocida concernente a este grupo. Na **Figura 16** pode-se ver as relações estruturais entre os análogos desenvolvidos por Bernhardt e col.^{97,98} e os compostos propostos no capítulo 2, com a 3-AP.

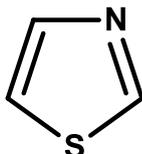
Figura 16: Análogos da Triapina.



3.10 Tiazóis

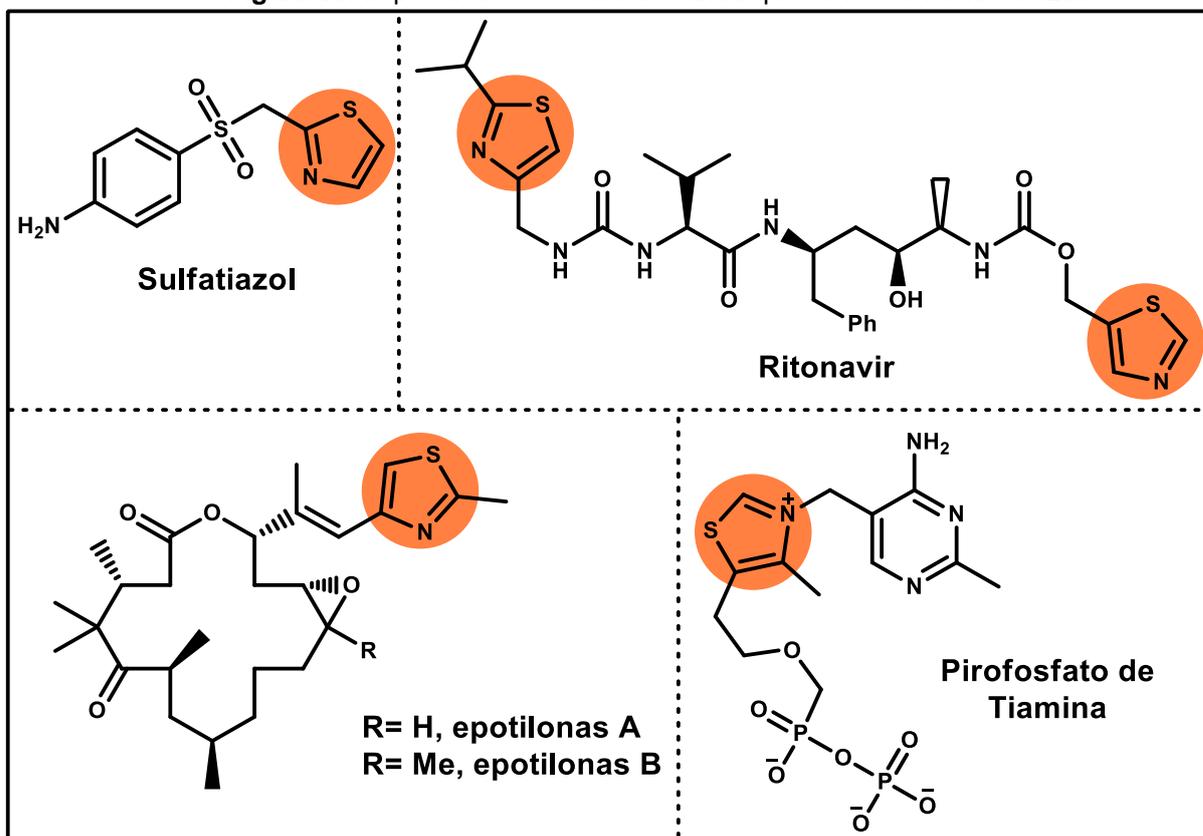
Os tiazóis (**Figura 17**) são uma importante classe de compostos heterocíclicos que apresentam um amplo espectro de atividade biológica, tais como atividades antitumoral^{99,100}, antibacteriana^{101,102}, antidepressiva¹⁰³, anti-inflamatória¹⁰⁴, e antichagásico^{38,105}.

Figura 17: Núcleo tiazol.



O núcleo tiazol está presente como subunidade em diversas moléculas biologicamente ativas, tais como sulfatiazol⁸⁷, um importante fármaco antimicrobiano, o ritonavir (**Norvir**), medicamento utilizado no combate ao vírus HIV¹⁰⁶, eptilonas A e B, produtos naturais que possuem potente atividade antitumoral¹⁰⁷ e o pirofosfato de tiamina¹⁰⁸, presente em uma variedade de enzimas que catalisam reações de descarboxilação (**descarboxilases**) e de condensação do tipo aldólica (**aldolases**) (**Figura 18**).

Figura 18: Importantes moléculas bioativas que contém o núcleo Tiazol.

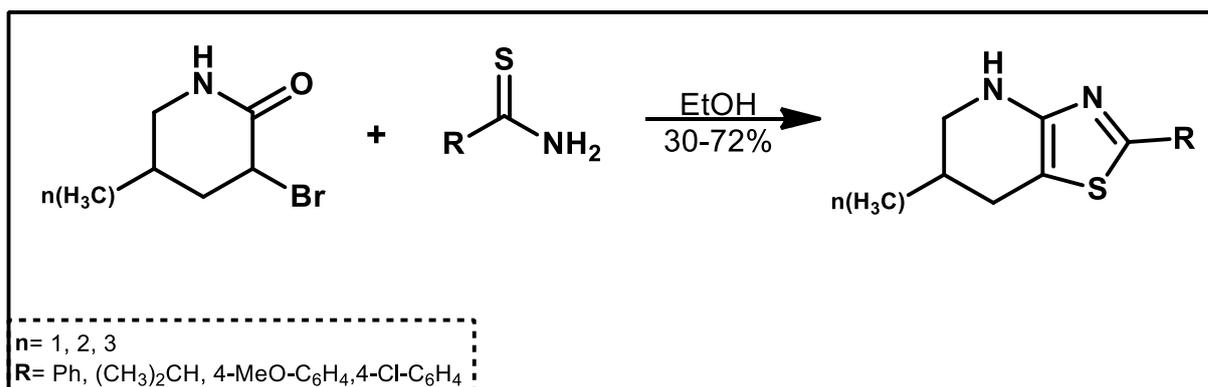


3.10.1 Método de obtenção de tiazóis

Um dos métodos mais antigos, hoje tão popular como sempre, envolve a reação de tioamidas primárias com compostos halocarbonilas.

A metodologia para a obtenção de núcleos tiazolínicos a partir de compostos α halocarbonílicos foi desenvolvida por Hantzsch, em 1887¹⁰⁹. Esta síntese é baseada na condensação de compostos α halocarbonílicos com tioamidas ou tiouréias, substituídas ou não, sendo um dos primeiros e mais amplos métodos sintéticos empregados para obtenção de tiazóis substituídos. Como exemplo, a obtenção de tiazóis-4-amino condensados pode ser facilmente preparada, utilizando α -bromolactamas e tioamidas, (**Esquema 6**).

Esquema 6: Preparação de tiazóis 4 amino condensados, utilizando-se α -bromolactamas e tioamidas via metodologia de Hantzsch.



3.11 Aplicações do ultrassom como promotor reacional

A escolha metodológica por irradiação ultrassônica possui vantagens operacionais convenientes tais como: condições reacionais brandas, curto tempo reacional e alta eficiência. Devido a estas características, tornou-se particularmente popular nos últimos anos e numerosos exemplos deste protocolo reacional para a obtenção de heterociclos com interessantes propriedades têm sido relatados na literatura¹¹⁰.

Hu e col.¹¹¹ realizaram um trabalho acerca de reações de cicloadição 1,3-dipolar e observaram o comportamento das reações ao variar a metodologia através da modificação do meio reacional (**método clássico para ultrassom**), solvente, temperatura e do tempo reacional.

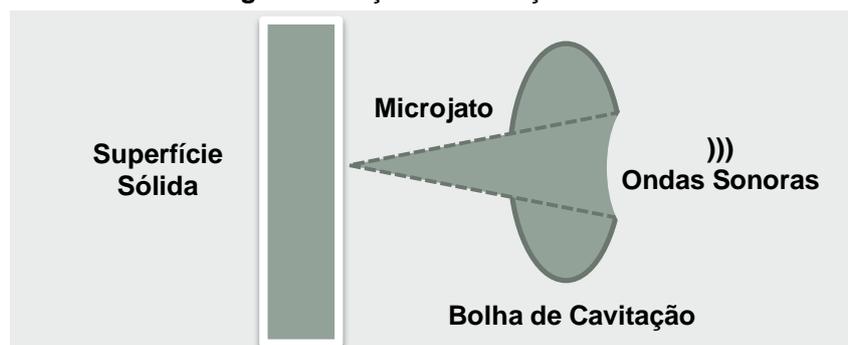
Após separação e análises, tais como ¹H RMN, Hu e col. concluíram que através do protocolo por ultrassom houve uma melhora significativa na cinética reacional. Observado isto, reexecutaram dois experimentos para estudar o mecanismo de aceleração sob sonicação. Após a dissolução de substratos insolúveis que foram irradiados sob sonicação, compararam as reações executadas com e sem ultrassom como protocolo. Após esta análise, Hu e col. concluíram que a reação sem sonicação levou mais tempo e os rendimentos foram relativamente mais baixos. Portanto, classificou o ultrassom como protocolo preferencial por ter apresentado efeito benéfico sobre o comportamento de solubilidade e síntese.

A onda ultrassônica, ao passar através de um meio líquido, provoca vibrações mecânicas no líquido. Além deste efeito, o ultrassom também gera um fluxo de acústica dentro do líquido. Se o meio líquido contiver gás dissolvido, o que é observado em condições normais, ele pode se expandir e colapsar pela ação do ultrassom¹¹². O fenômeno de crescimento e colapso das microbolhas em um campo ultrassônico é conhecido como "cavitação acústica". Duas características importantes da cavitação acústica devem ser mencionadas; A primeira é que geralmente é um processo não linear, em que a mudança no raio da bolha não é proporcional à pressão sonora¹¹².

A segunda é que a alta compressibilidade das bolhas de gás significa que muita energia potencial é obtida a partir da onda sonora quando as bolhas se expandem e que a energia cinética se concentra quando as bolhas colapsam. Na cavitação transitória, esta transformação de energia ocorre devido ao comportamento não linear das bolhas.

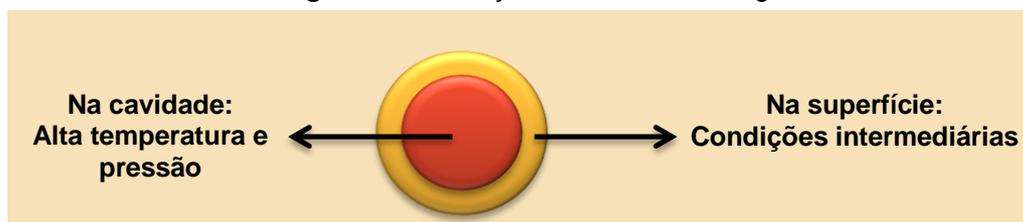
Em volumes muito pequenos, há uma concentração de energia que pode produzir pressão e temperatura muito elevadas, levando a corrosão de sólidos e iniciando reações químicas. Portanto, quando ocorre cavitação próxima a uma superfície sólida, o colapso da cavidade não é esférico e direcionam jatos líquidos de alta velocidade para a superfície sólida, o que leva à aceleração da dissolução e a transformações de calor e massa¹¹³ (**Figura 19**).

Figura 19: Ação da cavitação ultrassônica.



"Hot spots" focais, gerados a partir de um violento colapso das bolhas, criam transientes temperatura e pressão elevadas, induzindo a fragmentação molecular e a produção local de espécies altamente reativas (**Figura 20**).

Figura 20: Cavitação em sistema homogêneo.



A implosão das cavidades estabelece um ambiente inusitado para as reações. Os gases e vapores no interior da cavidade são comprimidos, gerando um intenso calor que aumenta a temperatura do líquido imediatamente ao redor da cavidade e a alta temperatura e pressão produzida durante a cavitação rompem suas ligações químicas¹¹¹.

CAPÍTULO 1

Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Biológica de Inéditas Hidrazonas Tiofenólicas como Agentes Tripanocidas

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

Para a obtenção dos resultados, foram adquiridos reagentes químicos de alto grau de pureza.

Para a obtenção dos derivados tiofenólicos, foram utilizados:

- Bromoacetaldeído dietilacetal, tiofenóis e acetofenonas α -halogenadas diversas (**Sigma-Aldrich**); carbonato de sódio, ácido acético e ácido sulfúrico (**Merk**); tiossemicarbazida (**Flukka**); álcool etílico, álcool isopropílico, acetato de etila e hexano (**Vetec**).
- Os protocolos por agitação magnética e refluxo foram realizados em um agitador magnético da marca Fisaton, modelo 752A;
- As reações lançadas em ultrassom foram realizadas em um aparelho ultrassônico modelo Unique EM-804 TGR com frequência de 40KHz (**180 W**), dotado de aquecimento brando;
- As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (**CCD**) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F₂₅₄. As placas cromatográficas foram visualizadas em uma câmara escura com lâmpada ultravioleta de duplo comprimento de onda, 254 e 365nm;
- As concentrações por pressão reduzida foram realizadas em um Evaporador Rotativo da marca Fisaton, modelo 802;
- Após concentração por pressão reduzida, os produtos foram armazenados em dessecador, contendo sílica gel azul, 4-8mm e CaCO₃ para retirada de umidade residual;
- Todos os protocolos foram realizados em vidrarias específicas e inertes;
- Os pontos de fusão foram realizados no aparelho Fisatom 430D.

5.2 Métodos

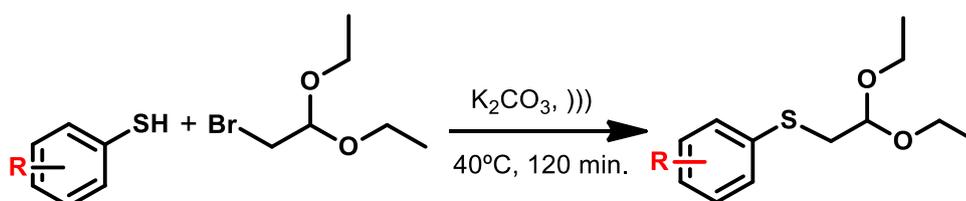
5.2.1 Síntese das tiossemicarbazonas tiofenólicas

Para a obtenção dos protótipos propostos neste capítulo, inicialmente, reagiu-se os variados tiofenóis com o bromoacetaldéido dietilacetil, para a obtenção dos respectivos acetais, com posterior hidrólise para a obtenção dos aldeídos.

5.2.2 Síntese dos acetais

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 3,63 mmol de tiofenol, seguidos de 2,54 mmol de CaCO_3 . Adicionou-se 9,07 mmol de bromoacetaldéido dietil acetil, submeteu-se o sistema à irradiação por ultrassom, com aquecimento brando (40°C), por 120 minutos, confirmando-se a conclusão da reação por CCD em sistema 7:3 hexano/acetato de etila (**Esquema 7**). Filtrou-se o sistema, sob vácuo em funil sinterizado, para a retirada do sal formado e concentrou-se, sob pressão reduzida, o sobrenadante coletado no Büchner. Descartou-se o precipitado branco (sal, confirmado por CCD e testes de solubilidade). Após concentração sob pressão reduzida, guardou-se o produto por 24h, em balão de fundo redondo no dessecador para remoção de humidade/solvente residuais.

Esquema 7: Obtenção do (2-etoxi-2-propoxietil)(fenil)sulfano.

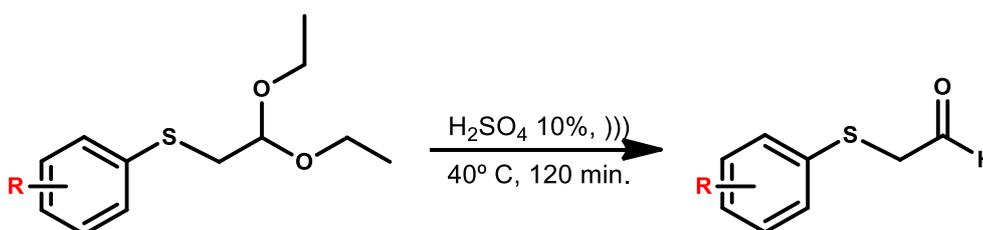


Composto	Substituinte	Composto	Substituinte
DA-01	H	DA-07	4-Me
DA-02	4-F	DA-08	2,5-Me
DA-03	4-Br	DA-09	2-Cl
DA-04	4-OMe	DA-10	3-Cl
DA-05	2-Me	DA-11	4-Cl
DA-06	3-Me	DA-12	2,5-Cl

5.2.3 Síntese dos aldeídos por hidrólise do acetal

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 1,97 mmol do tiofenol acetal, seguido de 25 ml de uma solução a 10% de ácido sulfúrico. Submeteu-se o sistema a irradiação por ultrassom, por 120 min, observou-se um escurecimento do sistema para castanho claro. Confirmou-se a conclusão da reação por placa de CCD no sistema 7:3 hexano/acetato de etila (**Esquema 8**). Ao término da reação, fez-se uma extração do meio orgânico, com auxílio de um funil de separação, utilizando os solventes AcOEt e H₂O. Posteriormente, adicionou-se sulfato de sódio anidro no solvente polar para desidratação do meio, com subsequente concentração, sob pressão reduzida, da fase orgânica. Em seguida, guardou-se o balão previamente pesado, no dessecador para retirada de humidade.

Esquema 8: Obtenção do 2-(feniltio) acetaldeído.

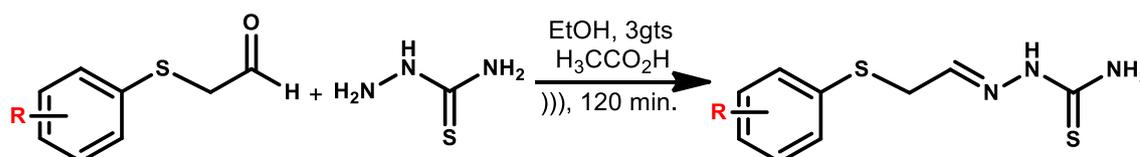


Composto	Substituinte	Composto	Substituinte
TA-01	H	TA-07	4-Me
TA-02	4-F	TA-08	2,5-Me
TA-03	4-Br	TA-09	2-Cl
TA-04	4-OMe	TA-10	3-Cl
TA-05	2-Me	TA-11	4-Cl
TA-06	3-Me	TA-12	2,5-Cl

5.2.4 Síntese das tiossemicarbazonas

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 1,33 mmol de tiofenol acetaldeído, seguido de 25 ml de etanol e 1,97 mmol de tiossemicarbazida. Subsequente adicionou-se 3-4 gotas de ácido acético glacial e submeteu o sistema à irradiação por ultrassom, durante 120 min, com aquecimento moderado (**45°C**) (**Esquema 9**). Confirmou-se o término da reação por CCD, após confirmação, observou-se a formação de um precipitado amarelo claro em quantidade. Subsequente adicionou-se hexano lentamente, sob agitação, para favorecer a precipitação. Guardou-se o sistema sob refrigeração, por 24h, para posterior filtração a vácuo, em funil sinterizado, com sucessivas lavagens do precipitado com hexano. Levou-se o precipitado obtido ao dessecador, e o conservou por 48h para retirada residual de água/solvente. Após a obtenção dos compostos propostos, foram realizadas suas análises espectroscópicas e físico-químicas para comprovar a formação dos produtos bem como a sua pureza. Entre estas análises foram realizadas: espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$) e carbono ($^{13}\text{C-RMN}$), infravermelho (**IV**), espectro de massa acoplado a cromatografia líquida (**EMAR-ESI**), ponto de fusão (**Pf**) e fator de retenção (**Rf**).

Esquema 9: Obtenção das feniltioetilideno tiossemicarbazonas.



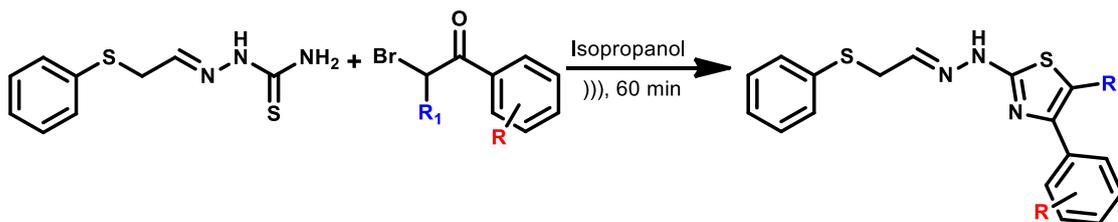
Composto	Substituinte	Composto	Substituinte
TS-01	H	TS-07	4-Me
TS-02	4-F	TS-08	2,5-Me
TS-03	4-Br	TS-09	2-Cl
TS-04	4-OMe	TS-10	3-Cl
TS-05	2-Me	TS-11	4-Cl
TS-06	3-Me	TS-12	2,5-Cl

5.2.5 Síntese dos tiazóis

Para a obtenção dos compostos propostos neste trabalho, reagiu-se a tiossemicarbazona com as respectivas acetofenonas α -halogenadas.

Em balão de fundo redondo, foram adicionados 1,33 mmol da feniltioetilideno tiossemicarbazona, seguidos de 25 ml de álcool isopropílico e de 1,59 mmol da respectiva acetofenona. Submeteu-se o sistema a irradiação por ultrassom durante 60 min, a temperatura ambiente. Observou-se a formação de precipitado amarelo claro, confirmando-se o término da reação por CCD, no sistema 7:3 hexano/acetato de etila (**Esquema 10**). Subsequente, levou-se o balão a refrigeração por 24h para precipitação, com posterior filtração sob vácuo, em filtro sinterizado. Após a obtenção dos compostos propostos, foram realizadas as análises espectroscópicas e físico-químicas dos compostos para comprovação da formação dos produtos bem como sua pureza. Entre estas análises, foram realizadas: espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$) e de carbono ($^{13}\text{C-RMN}$), infravermelho (**IV**), espectroscopia de massa acoplado a cromatografia líquida (**EMAR-ESI**), ponto de fusão (**Pf**) e fator de retenção (**Rf**).

Esquema 10: Obtenção dos feniltioetilideno tiazóis.



Composto	R	R ₁	Composto	R	R ₁
TZ-01	H	H	TZ-06	4-Cl	H
TZ-02	4-Me	H	TZ-07	2,4-Cl	H
TZ-03	4-Br-prop	CH ₃	TZ-08	3,4-Cl	H
TZ-04	4-F	H	TZ-09	3-NO ₂	H
TZ-05	4-OMe	H	TZ-10	4-NO ₂	H

5.3 Avaliação Farmacológica

5.3.1 Animais: para a determinação da citotoxicidade em esplenócitos, camundongos albinos da linhagem BALB/c (**fêmeas entre 6-8 semanas**) foram fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (**CPqAM, Recife, Brasil**). Para os experimentos de infecção *in vitro*, camundongos BALB/c foram fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (**CPqGM, Salvador, Brasil**). Os animais foram mantidos em gaiolas esterilizadas, e receberam alimentação e água à vontade. Os experimentos foram aprovados pelos comitês de ética da FIOCRUZ.

5.3.2 Células, enzimas e inibidores químicos: o baço de camundongo foi macerado e o sobrenadante foi lavado em meio RPMI-1640. O número de esplenócitos foi determinado com o auxílio de um microscópio óptico e ajustado de acordo com o ensaio. Para os ensaios de infecção *in vitro*, macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, foram sensibilizados com tioglicolato de sódio (**3%**) e lavados em meio RPMI-1640 por duas vezes e a densidade celular foi ajustada com o auxílio de um microscópio óptico. Epimastigotas da cepa Y foram coletadas e mantidas em meio axênico usando o meio de cultura "liver infusion triptose" contendo 10% de SBF, 1% de hemina, 1% de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina e mantidas sob 26° C. Tripomastigotas circulantes da cepa Y foram coletadas do sobrenadante de células LLC-MK₂ infectadas. Os parasitas foram então mantidos em ambiente axênico usando o meio RPMI-1640 contendo 10% de SBF, 1 % de hemina, 1 % de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina em estufa sob 37 °C e 5 % de CO₂. Benznidazol foi fornecido pelo LAFEPE (**Recife, Brasil**). Anfotericina B e saponina foram adquiridos na Cultilab (**Campinas, Brasil**).

5.3.3 Toxicidade para esplenócitos: esplenócitos de camundongos BALB/c foram distribuídos em placa de 96 poços com uma densidade de 5x10⁶ células por poço em meio RPMI-1640. Cada inibidor químico foi solubilizado em DMSO na concentração de 10 mg/mL e em seguida a amostra foi diluída serialmente em meio RPMI-1640 nas concentrações de 1.0, 10 e 100 µg/mL, em triplicata. Como controle positivo, usou-se a saponina na concentração de 0.1 µg/mL, enquanto que como controle negativo, os poços receberam somente meio RPMI-1640 e DMSO. A placa foi então cultivada por 24 horas na temperatura de 37° C e 5% CO₂. Então adicionou-se 1.0 µCi de ³H-timidina em cada poço e a placa foi incubada por 6 horas. A placa foi então lida no

contador de irradiação beta (**Multilabel Reader, Finland**) e a porcentagem de incorporação de timidina tritiada foi determinada. Para as células que não foram tratadas com as drogas (**controle negativo**), calculou-se como 100% de incorporação de timidina tritiada (**100% de viabilidade celular**). Para as células tratadas com saponina, a viabilidade celular foi de 5%. Quando o percentual de incorporação foi maior que 90%, a concentração da droga foi considerada como atóxica para os esplenócitos.

5.3.4 Atividade antiproliferativa para a forma epimastigota: epimastigotas das cepas Y ou Dm28c foram distribuídas em uma placa de 96 poços em uma densidade final de 10^6 células por poço. Cada inibidor químico, dissolvidos como descrito no item 5.3.6, foram adicionados nos respectivos poços em triplicatas. Bdz (1) foi usado como controle positivo neste ensaio. A placa foi então cultivada durante 11 (**cepa Y**) ou 5 dias (**cepa Dm28c**) sob 26° C e 5% de CO_2 . Após esse tempo, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas foi calculado em uma câmara de Neubauer. Para as epimastigotas não tratadas com os inibidores químicos (**controle negativo**), assumiu-se como 100% do número de parasitas. As curvas dose-respostas foram determinadas e os valores das CI_{50} foram calculados usando ao menos cinco concentrações ("**data-points**") usando uma equação não-linear (**Prism, versão 4.0**).

5.3.5 Atividade antiproliferativa para a forma tripomastigota: tripomastigotas da cepa Y foram coletadas do sobrenadante de células LLC-MK₂ e distribuídas em uma placa de 96 poços para uma densidade final de 4×10^5 células por poço. Cada inibidor químico, dissolvidos como descrito no item 5.3.6, foram adicionados nos respectivos poços, em triplicatas. Bdz (1) foi usado como controle positivo neste ensaio. A placa foi então cultivada por 24 horas em 37° C contendo 5 % de CO_2 . Após esse tempo, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas viáveis (**ou seja, com motilidade aparente**) foi contado em uma câmara de Neubauer. Para os poços que não receberam os inibidores químicos, assumiu-se como 100% do número de parasitas viáveis. As curvas dose-respostas foram determinadas e os valores das CI_{50} foram calculados usando ao menos sete concentrações ("**data-points**") usando regressão não-linear (**Prism, versão 4.0**).

5.3.6 Infecção de tripomastigotas em macrófagos: Macrófagos coletados do exsudado peritoneal de camundongos BALB/c foram distribuídos em uma placa de 24 poços para uma densidade final de 2×10^5 células por poço, contendo meio RPMI em 10 % de SBF. A placa foi cultivada por 24 horas para obter adesão celular. Em seguida, adicionou-se 2×10^6 tripomastigotas suspensas em meio RPMI em cada poço. A placa foi mantida por 2 horas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. Após esse tempo, a placa foi lavada com soluções de salina, para remover tripomastigotas extracelulares. Logo em seguida, os inibidores químicos foram adicionados na concentração de 10 µM (**previamente dissolvidos em DMSO e meio RPMI**) em duplicatas. Bdz (1) foi usado como controle positivo. Após a adição dos inibidores químicos, a placa foi incubada por 6 horas, então o meio de cultivo foi substituído por um meio de cultivo "fresh", e a placa foi mantida em estufa por 96 horas. As células foram fixadas com metanol e observadas em microscópio ótico (**Olympus, Tóquio, Japão**). A taxa de macrófagos infectados foi contada em cada poço. O percentual de inibição da infecção da cultura tratada com os inibidores foi comparado com o controle negativo. Para a contagem de amastigotas, alíquotas de cada poço foram marcadas com uma solução de Giemsa e as lâminas foram observadas em um microscópio ótico (**Olympus, Tóquio, Japão**). O número de amastigotas/macrófagos foi determinado pela contagem de pelo menos 100 macrófagos por cada lâmina analisada. O mesmo procedimento foi realizado para o cálculo da CI₅₀, usando ao menos cinco concentrações diferentes de cada inibidor químico. Foram realizados dois experimentos independentes para os cálculos da CI₅₀.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Mecanismos reacionais

6.1.1 Mecanismos de formação dos acetais

Para a formação dos acetais, reagiu o respectivo tiofenol, em meio básico, com o bromoacetaldeído dietil acetal em uma reação simples de substituição nucleofílica favorecida pela presença do halogênio bromo, que é um ótimo grupo de saída. Observa-se uma melhora no tempo global reacional devido à presença de base (**carbonato de potássio**), favorecendo a captura do hidrogênio presente no tiol (hidrogênio mais ácido), favorecendo o ataque do enxofre ao carbono α -halogenado do acetal.

Independentemente de ser uma reação simples, buscou-se a otimização da reação, objetivando um menor tempo reacional e um melhor rendimento global. Para isto, foram lançadas reações variando a temperatura, solventes, ordem na adição dos reagentes e protocolos, tais como agitação magnética e irradiação por ultrassom.

Entre os métodos analisados, observou-se que a reação sob irradiação ultrassônica apresentou melhor tempo reacional global, bem como menor presença de subprodutos, comparando-se com o método clássico.

6.1.2 Mecanismos de formação dos aldeídos

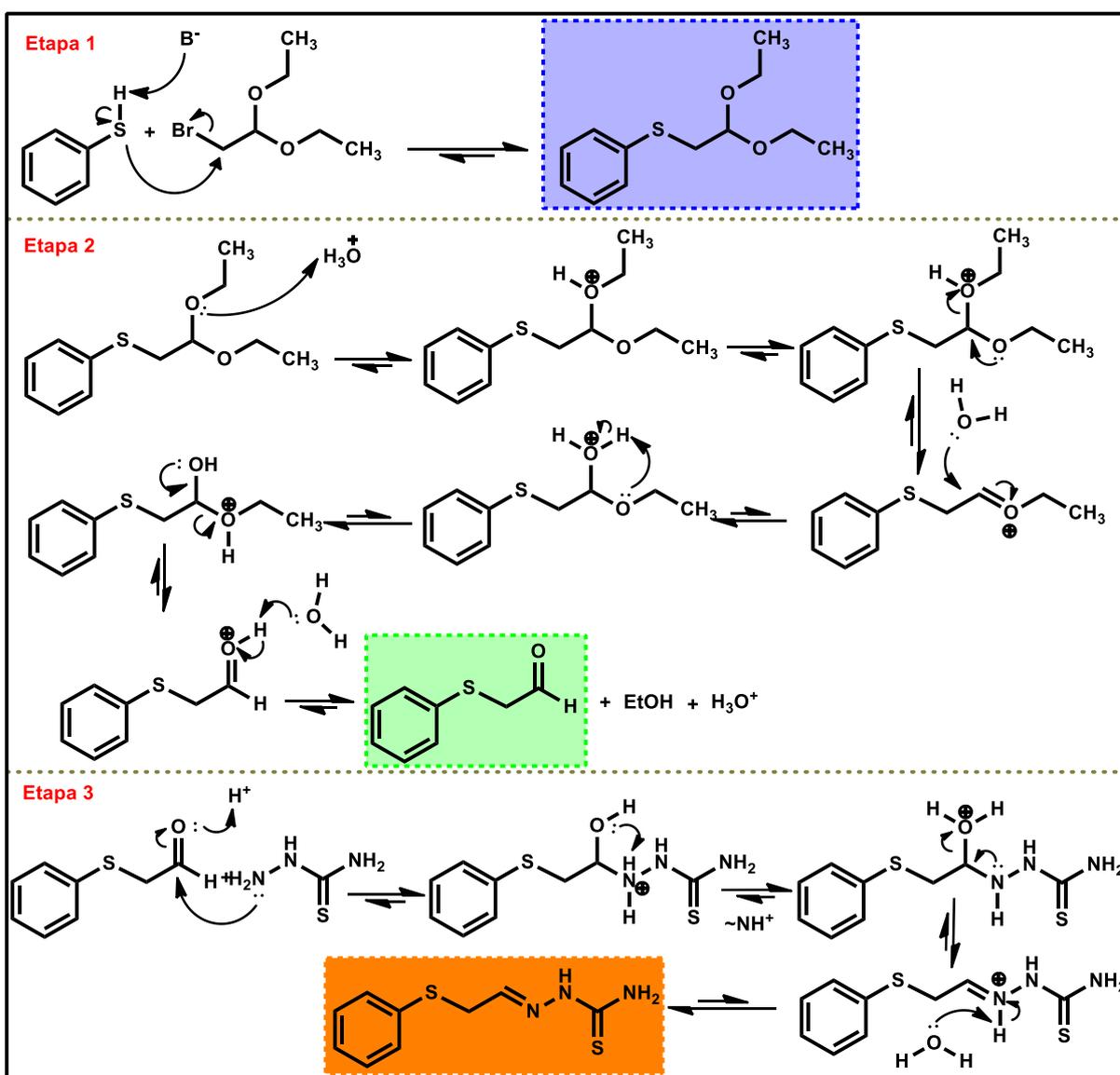
Para a obtenção dos aldeídos, hidrolisou-se o respectivo tiofenol acetilado com ácido sulfúrico a 10%, em ultrassom, por 120 minutos. Concluiu-se como sendo este o melhor método, após uma triagem por substituições nos ácidos (**H₂SO₄, HCl etc.**) e metodologia (**ultrassom e agitação magnética com refluxo, 140°C**). Observou-se que as reações sob refluxo apresentavam uma coloração escura rapidamente e, com o acompanhamento reacional por CCD, observou-se uma maior formação de subprodutos, em relação às reações lançadas em ultrassom.

Observou-se o mesmo fenômeno (**coloração escurecida, maior formação de subprodutos**) nas reações hidrolisadas por ácido clorídrico, em relação ao ácido sulfúrico.

6.1.3 Mecanismos de formação das tiossemicarbazonas

Para a obtenção das tiossemicarbazonas, reagiu-se o aldeído do respectivo tiofenol (**10 mMol**) com a tiossemicarbazida (**10 mMol**), em meio etanólico (**10 ml**) catalisado com 4 gotas de ácido acético. Esta reação decorre de uma condensação, com a protonação do oxigênio da carbonila pelo ácido acético, catalisando assim o ataque nucleofílico do nitrogênio azídico ao carbono da carbonila (**Esquema 11**), formando a respectiva hidrazona.

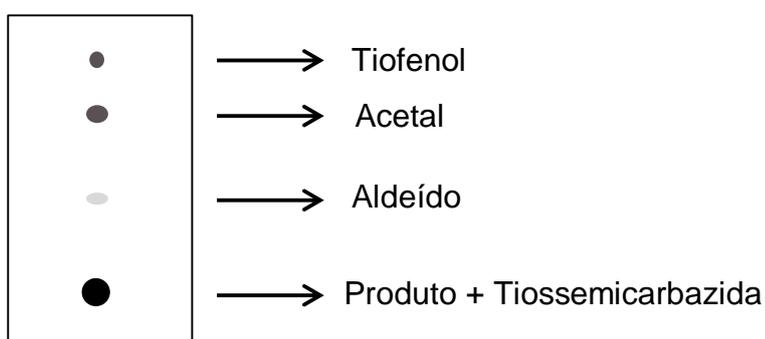
Esquema 11: Proposta mecanística global para obtenção das feniltioetilideno-tiossemicarbazonas.



A prévia solubilização da tiossemicarbazida (**TS**) em etanol a quente é indicada devido à sua baixa solubilidade; este método visa melhorar a cinética reacional, o que não foi observado, em relação à reação lançada com a TS sem prévia solubilização.

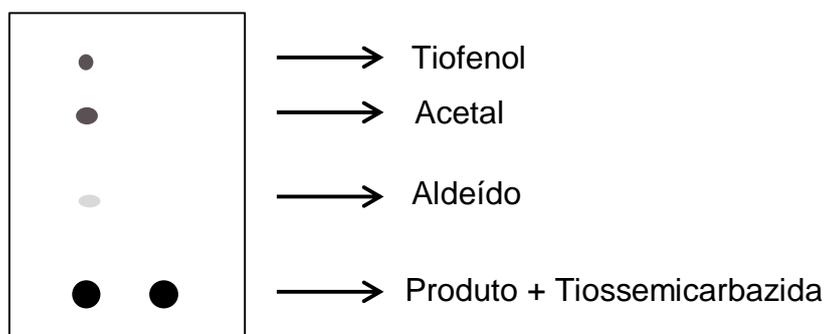
No meio reacional, observa-se, com 30 minutos, a formação de um precipitado granular de cor levemente amarelada, com 120 minutos, observamos um aumento neste precipitado e consumo parcial do aldeído da reação, por placa de CCD.

Como rastreio do produto, observamos na CCD (**sistema 7:3 hexano/acetato de etila**) a presença de 4 pontos distintos, que são:



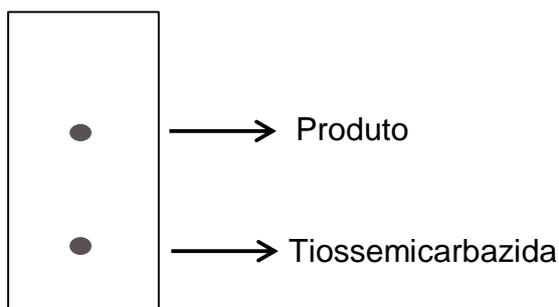
Ao final da reação, se adicionou hexano para favorecer a precipitação, uma vez que o produto almejado é polar, bem como uma prévia purificação, devido ao hexano solvatar os reagentes/produtos apolares e precipitar os reagentes/produtos polares.

Como confirmação da purificação, realizou-se outra CCD do precipitado, e comparou-se com a água de lavagem (**hexano + etanol reacional**) chegando a tal resultado:



Com esta placa, observou-se a remoção dos resquícios de produtos de partida na placa, porém, não se confirmou a pureza do produto final porque o ponto estava na base. Com isso, realizou-se outra CCD, com o meio mais polar para observar a migração do ponto e verificar se ele realmente está isolado.

Como resultado desta CCD, temos:



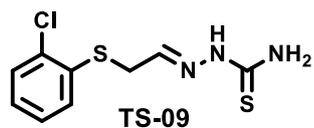
Nesta placa observou-se a separação de dois produtos e, por comparação, confirmou-se que o ponto mais polar é a tiossemicarbazida.

Para purificação do produto final, realizaram-se diversas recristalizações até achar o solvente ideal, que foi meio etanólico a 30%, porém com rendimentos baixos, em torno de 35-40%.

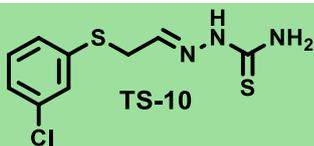
A **Tabela 2** ilustra as estruturas dos compostos da série TS obtidos:

Tabela 2: Derivados tiofenólicos da série TS.

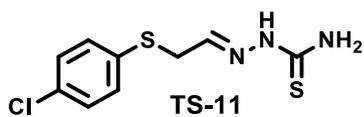
Composto	Fórmula molecular	Peso molecular
<p>TS-01</p>	$C_9H_{11}N_3S_2$	225.33
<p>TS-02</p>	$C_9H_{10}FN_3S_2$	243.32
<p>TS-03</p>	$C_9H_{10}BrN_3S_2$	304.22
<p>TS-04</p>	$C_{10}H_{13}N_3OS_2$	255.35
<p>TS-05</p>	$C_{10}H_{13}N_3S_2$	239.35
<p>TS-06</p>	$C_{10}H_{13}N_3S_2$	239.35
<p>TS-07</p>	$C_{10}H_{13}N_3S_2$	239.35
<p>TS-08</p>	$C_{11}H_{15}N_3S_2$	253.38

 $C_9H_{10}ClN_3S_2$

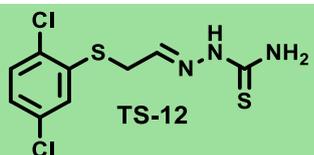
259.77

 $C_9H_{10}ClN_3S_2$

259.77

 $C_9H_{10}ClN_3S_2$

259.77

 $C_9H_9Cl_2N_3S_2$

294.25

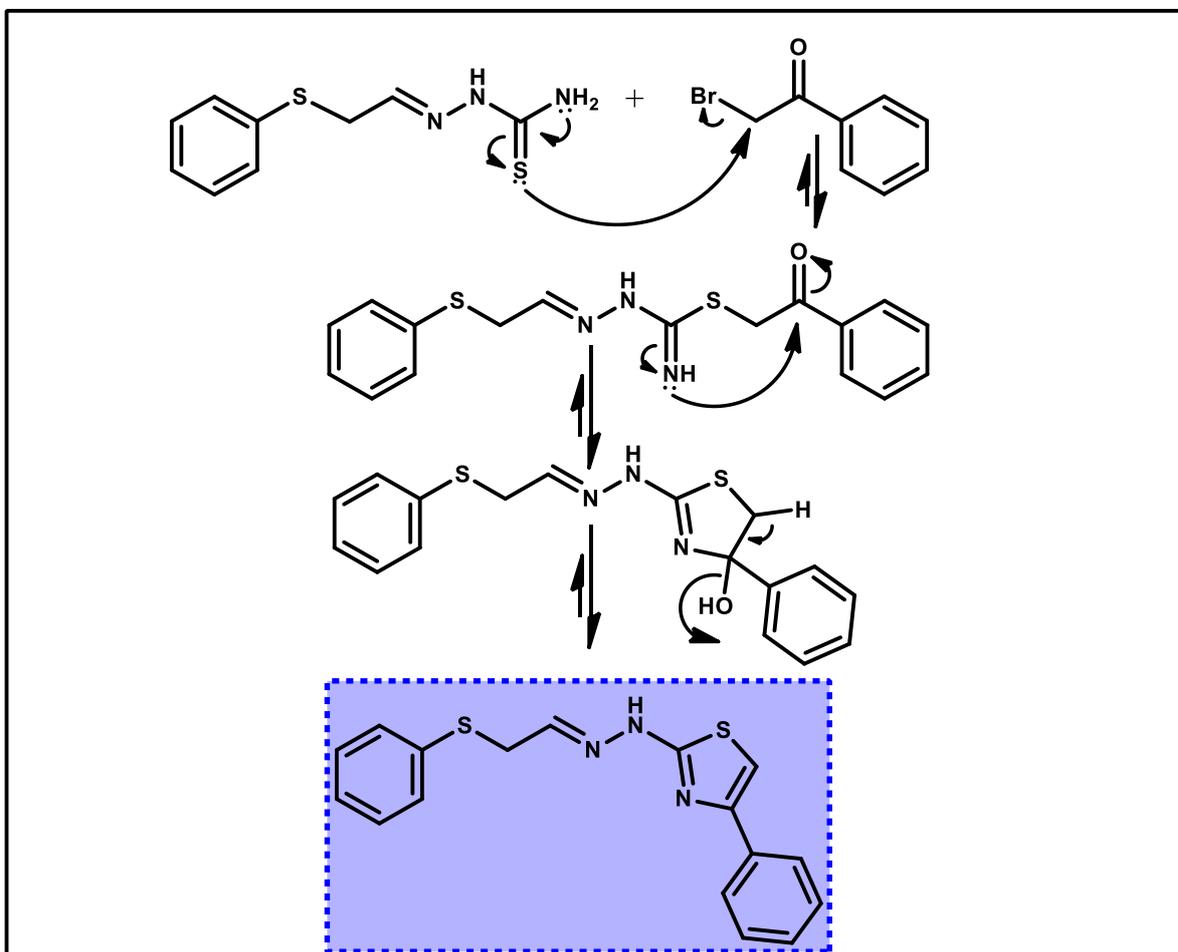
6.1.4 Mecanismo de formação dos tiazóis

Para a obtenção dos tiazóis, inicialmente prepara-se o derivado tiossemicarbazônico do tiofenol sem substituinte.

A partir deste precursor, em balão de fundo redondo, reagiu-se o composto TS-01 (**Esquema 12**) com a respectiva acetofenona α -halogenada, em meio etanólico, sob irradiação por ultrassom, durante 60 minutos, sem aquecimento, para a obtenção do respectivo tiazol.

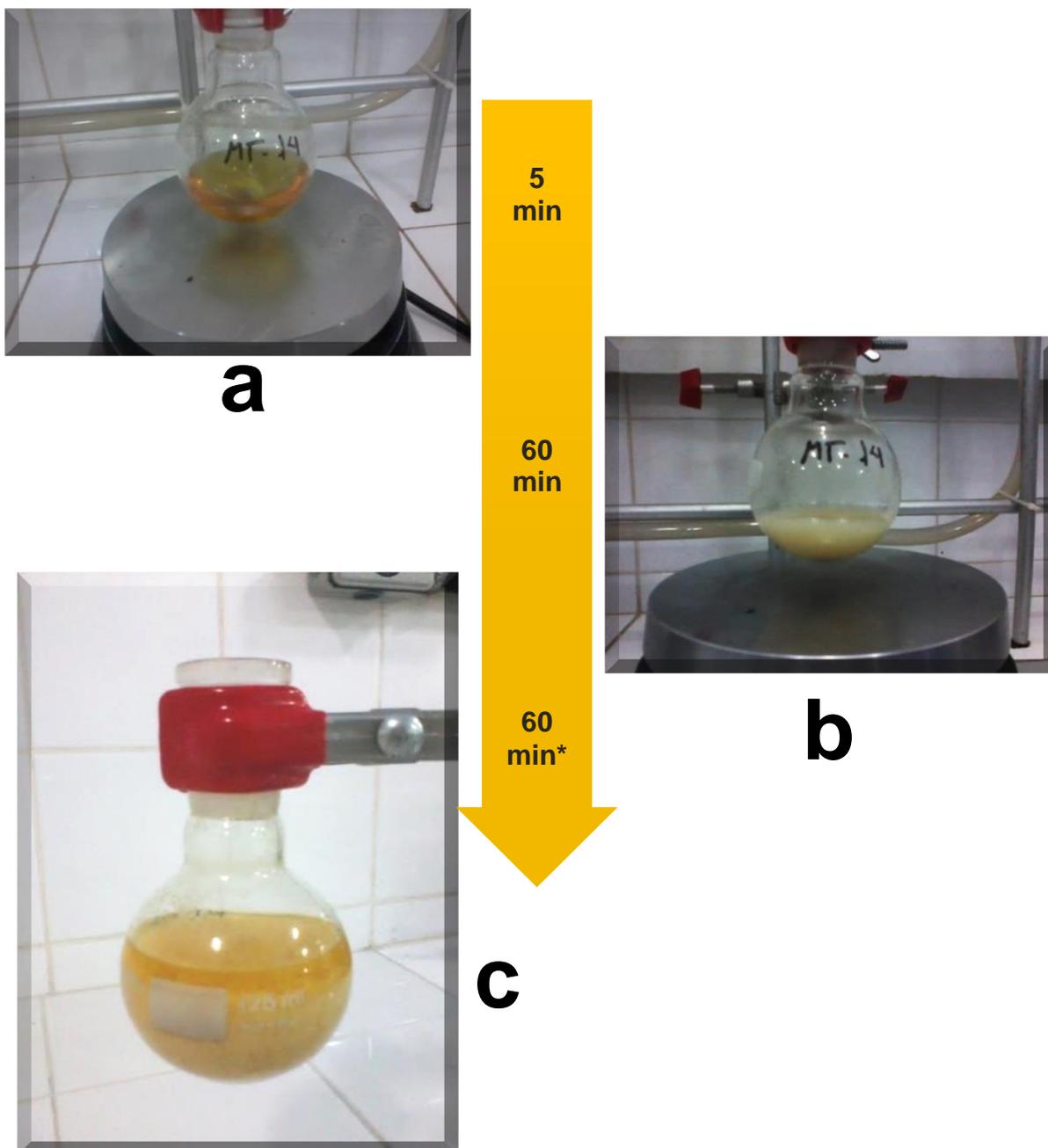
Esta reação já é bastante relatada na literatura como a “**síntese de Hantsch**”. Esta é uma reação de ciclização intramolecular, portanto, a amina terminal primária doa seu par de elétrons para o carbono adjacente (**tioamida**), favorecendo assim o ataque nucleofílico do enxofre ao carbono α -halogenado. Após este ataque, forma-se um intermediário reacional que favorece o ataque nucleofílico da amina terminal, reestruturada após o ataque do enxofre ao carbono da carbonila, levando a uma desidratação, gerando o composto almejado (**Esquema 12**).

Esquema 12: Proposta mecanística para obtenção dos feniltioetilideno tiazóis (TZ-01).



Esta é uma reação rápida execução, que apresenta variação de cor após 5 a 10 minutos reacionais, com turvação e formação de precipitado neste mesmo período (**Figura 21**). Fez-se acompanhamento reacional, com placas de CCD a cada 15 minutos, determinando-se o tempo ótimo reacional entre 60 a 90 minutos, dependendo do substituinte presente na acetofenona.

Figura 21: Formação do precipitado dos compostos TZ obtidos pelo método tradicional (**a**- 5 minutos de reação; **b**- 60 minutos; **c**- adição posterior de hexano para maior precipitação; * após adição de hexano).

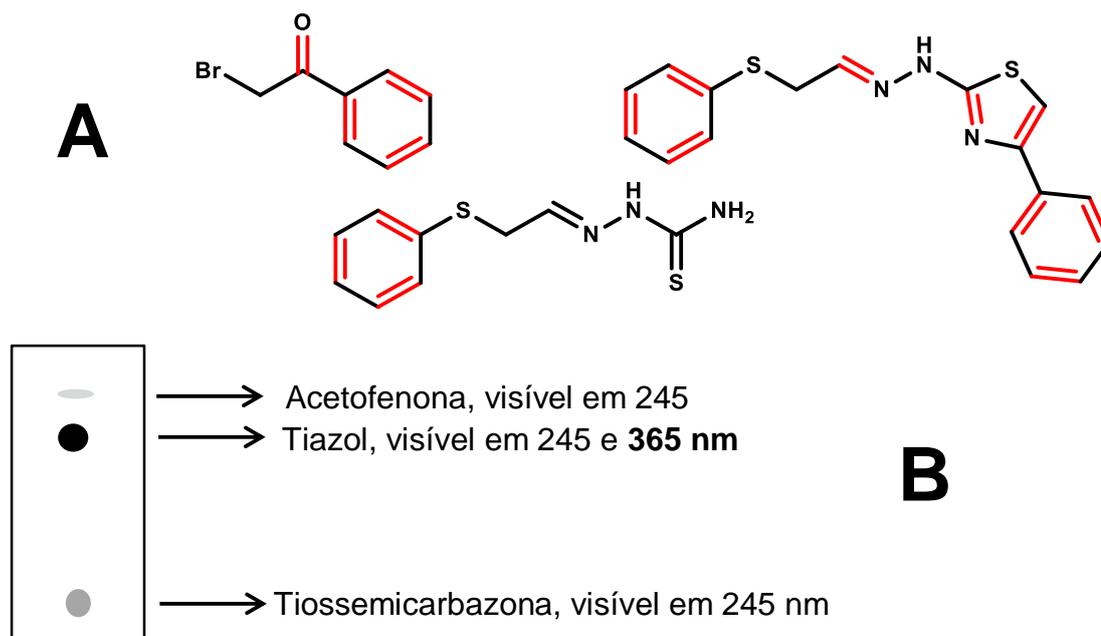


Esta mesma reação foi realizada utilizando-se a metodologia de irradiação por ultrassom, com e sem aquecimento, bem como com agitação magnética, com e sem aquecimento entre 70-100°C a 120°-150°C (**refluxo**). Com o balão acoplado a um condensador, variando-se também os solventes, bem como com a adição de uma base fraca (K_2CO_3). Todas as variáveis testadas tiveram como objetivo a otimização reacional. Das metodologias testadas, a irradiação por ultrassom demonstrou ser a mais adequada, seja por apresentar um tempo reacional menor, seja por menor formação de subprodutos. A presença de base nas reações não demonstrou benefício nem tempo reacional nem no grau de pureza.

Outra observação em relação ao solvente é o favorecimento da precipitação do produto ao término da reação, devido à diferença de polaridade do produto formado (**mais apolar**) com o solvente reacional (**mais polar**), minimizando perdas de produto e solventes no processo de purificação.

Um fato observado que deve ser explicitado é a revelação da CCD do produto final na faixa de onda de 365nm, este fato pode ser devido à maior presença de insaturação no produto final em comparação aos produtos de partida (**Figura 22**).

Figura 22: presença de insaturações nas séries TS e TZ.
(a- insaturações nos produtos de partida e final; b- Placa de CCD padrão da obtenção dos tiazóis, eluente= 1:1 AcOEt/Hex).



Para a purificação destes produtos, realizou-se recristalização, devido a maior facilidade, rendimento e eficácia comprovada, quando comparado com coluna cromatográfica, que ocasionam um grande gasto de solventes e rendimentos baixos.

Para a recristalização, foram realizadas tentativas com vários solventes, tais como: isobutanol, isopropanol, etanol (**30, 50 e 70%**), água, tolueno e hexano, variando de acordo com a impureza a ser retirada; se polar (**tiossemicarbazona**) ou apolar (**acetofenona**).

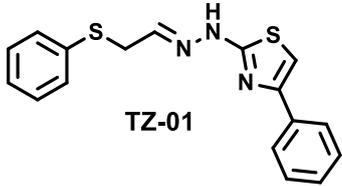
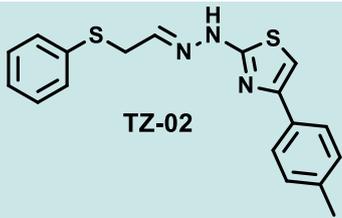
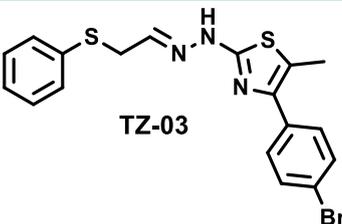
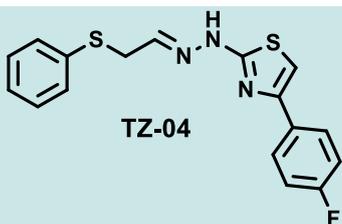
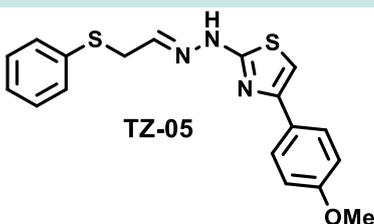
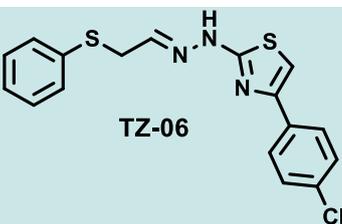
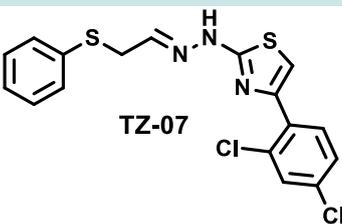
O solvente mais promissor para a retirada da acetofenona foi o sist. 7:3 hexano/tolueno, e para a retirada da tiossemicarbazona foi água, por sonicação. Quando realizado a recristalização em agitação magnética e refluxo, muitas tentativas não precipitaram, tendo que ser realizado uma extração orgânica para recuperação do produto, com o acréscimo de mais subprodutos. Todavia, quando o procedimento de purificação foi realizado em ultrassom, não foi observado a solubilização total do produto contudo, o resultado da purificação foi superior à purificação realizada por refluxo (**Tabela 3**).

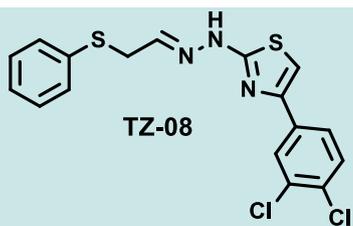
Tabela 3: Dados da purificação por recristalização.

Tipo	Solvente	Rendimento
Ultrassom	H ₂ O	40%
	EtOH	56%
	Toluol	68%
	Hexano	71%
Agitação Magnética	H ₂ O	21%
	EtOH	39%
	Toluol	52%
	Hexano	65%

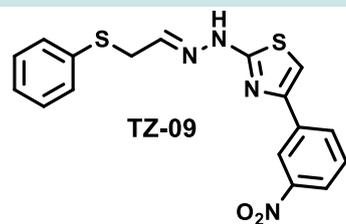
A **Tabela 4** ilustra as estruturas dos compostos obtidos na série TZ:

Tabela 4: Derivados tiazólicos da série TZ.

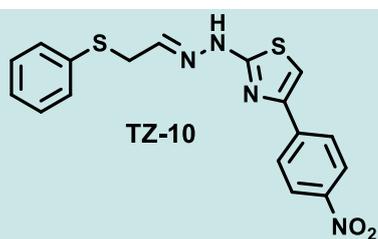
Composto	Peso molecular	Fórmula molecular
 TZ-01	325,45	C ₁₇ H ₁₅ N ₃ S ₂
 TZ-02	339,48	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ S ₂
 TZ-03	418,37	C ₁₈ H ₁₆ BrN ₃ S ₂
 TZ-04	343,44	C ₁₇ H ₁₄ FN ₃ S ₂
 TZ-05	355,48	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ OS ₂
 TZ-06	359,90	C ₁₇ H ₁₄ ClN ₃ S ₂
 TZ-07	394,34	C ₁₇ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ S ₂



394,34

 $C_{17}H_{13}Cl_2N_3S_2$ 

370,45

 $C_{17}H_{14}N_4O_2S_2$ 

370,45

 $C_{17}H_{14}N_4O_2S_2$

6.2 Avaliação farmacológica

As tiossemicarbazonas (**TS-01 a 12**) e os tiazóis derivados do tiofenol (**TZ-01 a 10**) foram inicialmente avaliados, *in vitro*, quanto às propriedades tripanocidas em modelos experimentais frente às formas evolutivas epimastigotas e tripomastigotas das cepas Y ou Dm28c do *T. cruzi*. Nestes ensaios, os valores de CI_{50} (μM) foram calculados.

Nos ensaios com epimastigotas, o valor da CI_{50} reflete a capacidade da droga em inibir 50% a proliferação celular do parasita quando comparado com a cultura celular não tratada (**controle negativo**). Os compostos (**TS-01 a 12**) e (**TZ-01 a 10**) foram incubados na presença de epimastigotas por cinco (**cepa Dm28c**) ou onze dias (**cepa Y**). Já nos ensaios com tripomastigotas, a forma evolutiva infectante em mamíferos, o valor da CI_{50} reflete o efeito da droga em reduzir a viabilidade celular do parasita quando comparado com o controle negativo. Neste ensaio, os compostos (**TS-01 a 12**) e (**TZ-01 a 10**) foram incubados na presença de tripomastigotas da cepa Y por vinte e quatro horas.

Para a triagem dos compostos tripanocidas mais potentes, os valores de CI_{50} foram comparados com a droga de referência Bdz (**1**). Seguindo os critérios preconizados pelo Programa Integrado de Doença de Chagas da Fiocruz (**Brasil**)¹¹⁴, compostos da série TZ com valores de CI_{50} igual ou menor que o Bdz (**1**) foram selecionados para a avaliação em ensaios com amastigotas do *T. cruzi*.

No modelo de desenvolvimento da infecção, macrófagos de camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com tripomastigotas da cepa Y. Após infecção, os compostos foram adicionados na cultura celular e incubados por quatro dias. Neste modelo, o controle negativo apresenta uma taxa de macrófagos infectados elevada, e como consequência do desenvolvimento da infecção, o número de amastigotas intracelulares é alto¹¹⁴. Portanto, a eficácia de um composto neste modelo se reflete na capacidade em reduzir a diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, interrompendo o curso da infecção. Os valores de CI_{50} foram calculados tendo como droga de referência o Bdz (**1**).

6.2.1 Avaliação, *in vitro*, das propriedades tripanocidas

A **Tabela 5** apresenta os resultados da avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e da toxicidade em esplenócitos para as tiossemicarbazonas tiofenólicas (**TS-01 a 12 e TZ-01 a 10**).

Primeiramente, podemos analisar a toxicidade dos compostos (**TS-01 a 12**) para esplenócitos de camundongos BALB/c. Os compostos (**TS-10 e 12**) apresentaram toxicidade equivalente ao do Bdz (**1**). A maioria dos compostos da série TZ não afetou a viabilidade celular de esplenócitos na concentração de 50 µg/mL, enquanto que o Bdz (**1**) afetou em 25 µg/mL.

De fato, a toxicidade observada para as tiossemicarbazonas (**TS-01 a 12**) em esplenócitos é consistente com os resultados descritos anteriormente por nosso grupo de pesquisa¹¹⁻¹³. Na série TZ observou-se uma menor toxicidade, em comparação com a série TS, possivelmente devido à ciclização da tiocarbonila. Uma vez que a toxicidade em esplenócitos foi determinada, as propriedades tripanocidas para as formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* foram realizadas.

A **Tabela 5** expõe todos os resultados biológicos mensurados neste trabalho. Ao longo do texto as tabelas irão se repetir para facilitar a interpretação e entendimento dos resultados obtidos.

Tabela 5: Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos, para as tiossemicarbazonas e tiazóis tioenólicos (TS-01 a 12 e TZ-01 a 10).

Composto	Subs.	<i>T. cruzi</i> , Cl ₅₀ (μM), cepa Y		esplenócitos BALB/c (μg/mL) ^[c]
		tripomastigota ^[a]	epimastigota ^[b]	
TS-01	H	88.98	101.89	ND ^[d]
TS-02	4-F	5.75	6.08	5
TS-03	4-Br	6.57	15.42	<1
TS-04	4-OMe	39.71	32.11	<1
TS-05	2-Me	6.10	15.33	10
TS-06	3-Me	1.80	6.26	<1
TS-07	4-Me	ND ^[d]	9.60	1
TS-08	2,5-Me	5.92	6.16	<1
TS-09	2-Cl	6.16	47.73	<1
TS-10	3-Cl	14.13	5.47	25
TS-11	4-Cl	14.13	6.20	<1
TS-12	2,5-Cl	8.16	6.08	25
TZ-01	H	5.16	59.36	50
TZ-02	4-Me	ND ^[d]	9.37	50
TZ-03	4-Br-prop	14.34	5.43	>100
TZ-04	4-F	ND ^[d]	ND ^[d]	>100
TZ-05	4-OMe	18.51	62.73	>100
TZ-06	4-Cl	4.06	6.81	>100
TZ-07	2,4-Cl	4.06	7.89	50
TZ-08	3,4-Cl	15.22	56.55	50
TZ-09	3-NO ₂	19.22	8.37	50
TZ-10	4-NO ₂	8.45	16.03	25
Bdz (1)	---	6.2	6.6	25

^[a] Após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[b] Após 11 dias de incubação na presença dos compostos. ^{[a],[b]} Cl₅₀ com valores de desvio padrão < ±10 %. ^[c] Maior concentração atóxica (sem efeitos na viabilidade celular). Valores determinados após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[d] ND, não determinado, inibição de 100% em todas concentrações testadas.

Na série TS, o composto mais ativo foi o TS-06, com Cl₅₀ para tripomastigotas de 1.80 μM, sendo este mais citotóxico (<1 μg/ml) que o Bdz (25 μg/ml). Entretanto, o composto TS-12 apresentou atividade tripanocida (8.16 μM) e citotoxicidade (25 μg/ml) equivalentes ao Bdz, tornando-o o mais promissor desta série.

Analisando as propriedades tripanocidas comparando os compostos com substituintes na posição C4 (*para*) no anel tiofenólico (**TS-02, 03, 04, 07, e 11**) em comparação com o composto não substituído (**TS-01**) temos:

A tiossemicarbazona tiofenólica não substituída (**TS-01**) apresentou Cl_{50} para tripomastigotas de 88.98 μM , sendo até 14 vezes menos potente do que o Bdz (**1**). Os compostos TS-04 (**4-OMe, 39.71 μM**), TS-10 (**3-Cl, 14.13 μM**) e TS-11 (**4-Cl, 14.13 μM**) também apresentaram eficácia inferior ao Bdz (**1**), contudo, os compostos TS-02 (**4-F, 5.75 μM**), TS-03 (**4-Br, 6.57 μM**), TS-05 (**2-Me, 6.10 μM**), TS-08 (**2,5-Me, 5.92 μM**), TS-09 (**2-Cl, 6.16 μM**) e TS-12 (**2,5-Cl, 8.16 μM**) demonstraram equipotência ao Bdz, já o composto TS-06 (**3-Me, 1.80 μM**) foi mais ativo que o Bdz (**1**) e o mais ativo da série TS, contudo apresentou toxicidade elevada.

Uma análise das propriedades tripanocidas para os compostos TS-02, 03, 04, 07 e 11 nos mostra que a inserção de substituintes na posição C4 leva a um aumento significativo da atividade em relação ao composto não substituído, cuja inserção do flúor no C4 incrementa a Cl_{50} 15 vezes mais que o composto sem substituinte em C4.

Analisando os compostos monosubstituídos em posições variadas (*orto, meta e para*), podemos observar a importância da orientação dos substituintes na atividade tripanocida. Nos compostos TS-05 a 08 temos variações no posicionamento da metila no anel tiofenólico nas posições 2, 3, 4, e 2,5 respectivamente.

Comparando com o derivado sem substituinte (**AF, TS-01, 88.98 μM**) observamos um aumento significativo na Cl_{50} , em até 15 vezes, sendo o derivado metilado na posição 3 (**TS-06, 1.80 μM**) o mais ativo dos compostos substituídos com metila e o mais ativo da série TS. O derivado 2-metil (**TS-05, 6.10 μM**) possui potencialidade equivalente ao derivado dimetilado TS-08 (**2,5-Me, 5.92 μM**), porém uma citotoxicidade 10 vezes menor.

Para os compostos substituídos com o cloro (**TS-09 a 12**), observou-se um grande incremento na atividade tripanocida, com destaque para o composto TS-09 (**2-Cl**), o mais ativo da série frente à forma epimastigota.

Comparando-se os derivados TS-08 (**2,5-Me, 5.92 μM**) e TS-12 (**2,5-Cl, 8.16 μM**), ambos dissustituídos nas posições 2 e 5, com metil e cloro respectivamente, observou-se que a atividade tripanocida é equivalente, mas a viabilidade celular foi incrementada nos derivados com cloro.

Para a série TZ, os compostos mais ativos foram o TZ-06 e o TZ-07, por apresentarem boa viabilidade celular (**>100 $\mu\text{g/ml}$, TZ-06 e 50 $\mu\text{g/ml}$, TZ-07**) e boa atividade tripanocida para tripomastigota (**4.06 μM , ambos compostos**), tornando-os mais potentes e menos citotóxicos que o Bdz (**1**).

Para a série TZ, compararam-se inicialmente as atividades tripanocidas para tripomastigotas dos derivados substituídos na posição *para* do anel fenila ligado ao tiazol com o derivado sem substituinte, com isto observou-se:

O derivado sem substituinte (**TZ-01, 5.16 μM**) apresentou uma atividade tripanocida um pouco superior ao Bdz (**1**), com uma melhor viabilidade celular (**50 $\mu\text{g/ml}$**). Comparando-se com os compostos substituídos na posição *para*, observou-se uma melhora na viabilidade celular nos compostos substituídos, com ressalva para os compostos TZ-02 (**50 $\mu\text{g/ml}$**), que não variou, e TZ-10 (**25 $\mu\text{g/ml}$**) que reduziu a metade. Acerca da atividade tripanocida, observou-se uma melhora substancial somente no derivado TZ-06 (**4.06 μM**), sendo os derivados TZ-03 (**14.34 μM**) e TZ-09 (**19.22 μM**) menos eficazes que o composto-base (**5.16 μM**).

De modo geral, a inserção de substituintes na posição *para* não incrementou a atividade tripanocida, bem como manteve ou melhorou a viabilidade celular, com destaque para o composto substituído com cloro (**TZ-06**), por apresentar ótima viabilidade celular (**>100 $\mu\text{g/ml}$**) e atividade tripanocida para tripomastigota (**4.06 μM**).

Os derivados substituídos com nitro nas posições *meta* (**TZ-10**) e *para* (**TZ-09**) apresentaram um decréscimo na atividade tripanocida em relação ao composto sem substituinte, demonstrando a importância na orientação do substituinte, já que o derivado TZ-10 (*meta*) apresentou melhor viabilidade celular (**50 $\mu\text{g/mL}$ contra 25 $\mu\text{g/mL}$) e menor atividade tripanocida (**19.22 μM contra 8.45 μM**) que o derivado TZ-09 (*para*).**

Comparando-se a importância da funcionalização da tiossemicarbazona da série TS em tiazol, da série TZ, pode-se citar:

A série TZ apresentou melhores índices de viabilidade celular;

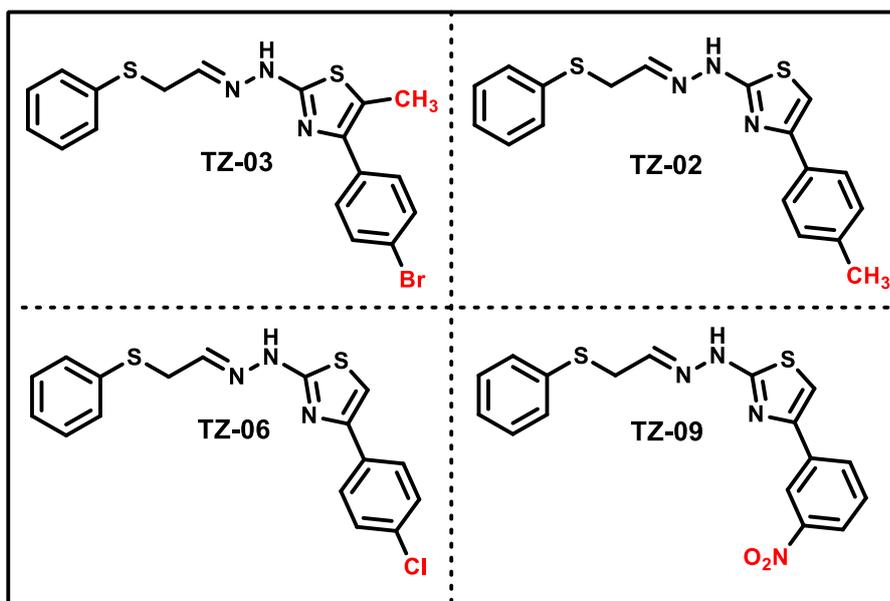
Para os compostos sem substituintes (**TS-01 e TZ-01**), observa-se um aumento na escala de 18 vezes a mais na atividade tripanocida para tripomastigotas na série TZ.

A ciclização da tiocarbonila em tiazol apresentou, de maneira geral, uma melhora significativa na viabilidade celular e na atividade tripanocida, demonstrando a importância da funcionalização da tiossemicarbazonas.

6.2.2 Ensaios, *in vitro*, de infecção pelo *T. cruzi*

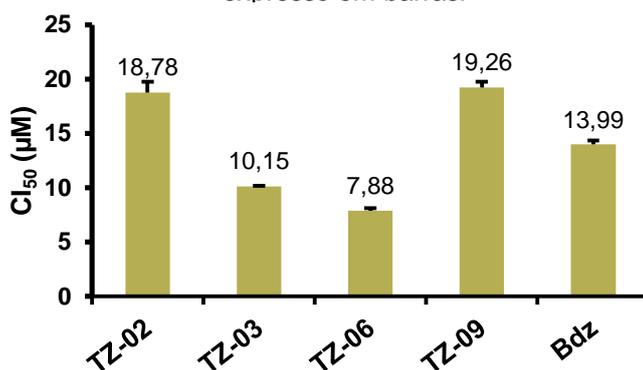
Os compostos com atividade tripanocida igual ou melhor que o Bdz (**1**) foram selecionados para a avaliação em ensaios, *in vitro*, de infecção pelo *T. cruzi* (**Figura 23**).

Figura 23: Tiazóis selecionados para avaliação da inibição pelo *T. cruzi*.



Para os ensaios de infecção, macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com tripomastigotas da cepa Y numa proporção de 1/10 (**macrófagos / tripomastigotas**). Após infecção, os compostos selecionados foram adicionados ao meio celular e incubados por 6 horas. Todos os compostos foram inicialmente testados na concentração de 20 μM (**gráfico 1**).

Gráfico 1: Concentração inibitória dos compostos na infecção de tripomastigotas da cepa Y em macrófagos. Compostos foram adicionados na concentração de 20 μM , em triplicatas. Desvio padrão expresso em barras.



Acerca dos compostos testados, o TZ-03 e o TZ-06 apresentaram uma CI₅₀ de 10.15 (± 0.98) μM e 7.88 (± 0.03) μM respectivamente, demonstrando uma eficácia um pouco superior a do Bdz [13.99 (± 0.39) μM] em inibir a infecção. Já os compostos TZ-02 e TZ-09 apresentaram boa inibição de infecção, com CI₅₀ de 18.78 (± 0.03) μM e 19.26 (± 0.53) μM respectivamente.

6.3 Análises espectroscópicas

Todas as análises espectroscópicas deste trabalho foram realizadas no Departamento de Química Fundamental, DQF-UFPE, utilizando-se dos seguintes equipamentos:

Para os espectros de ^1H e ^{13}C , utilizou-se o equipamento Varian modelo Unity Plus (**300 ou 400 Mhz para ^1H e 75.5 ou 100.5 Mhz para ^{13}C**) sempre utilizando DMSO- d_6 como solvente e TMS como padrão interno;

Para os espectros de IV, utilizou-se pastilhas de KBr no instrumento Brucker modelo IFS 66;

Para a obtenção dos espectros, todos os compostos foram pesados (**30 mg para ^{13}C e ^1H , e 10 mg para IV e LC-MS**) e enviados com seu respectivo solvente (DMSO- d_6).

Para o fator de retenção, o sistema padrão utilizado foi 7:3 AcOEt/Hex para a série TS e 1:1 AcOEt/Hex para a série TZ.

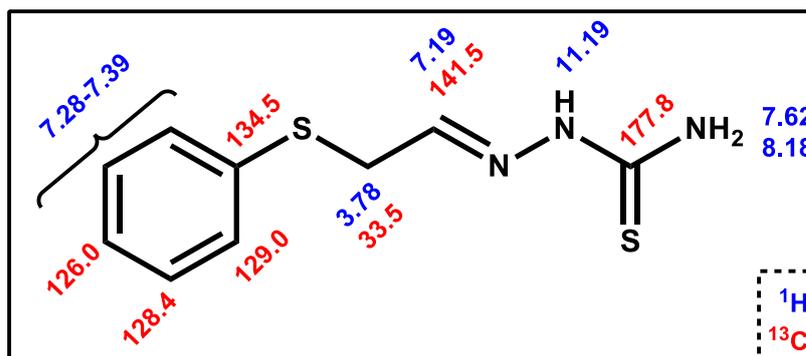
Como análise dos espectros da **série TS**, podemos propor:

Na análise dos espectros de infravermelho, podemos supor que a ausência de banda de absorção entre 1700-1750, típica de carbonila, comprova a conversão do aldeído tiofenólico em hidrazona;

Na análise dos espectros de hidrogênio, observa-se que todos os compostos apresentaram boa correlação entre si, confirmando a formação dos produtos através do aparecimento de um tripleto na faixa entre 7.19-7.33, referente ao hidrogênio do carbono azometínico. Para os espectros de carbono, podemos observar a presença de um pico entre 140-142.4, indicativo da formação do carbono azometínico, confirmando a formação da tiossemicarbazona.

Podemos analisar os principais sinais da série TS, através do composto TS-01.

Figura 24: Principais sinais da série TS (TS-01).



Através da análise dos espectros da **série TZ**, podemos citar como confirmação das estruturas a ausência de bandas de absorção entre 3380-4390, característicos de amins primárias, confirmando a formação do tiazol. A ausência de banda de absorção entre 1670-1820 indica ausência de carbonila da cetona, sugestivo da conversão da carbonila da acetofenona no carbono azometínico.

Nos espectros de ¹H-RMN, podemos observar:

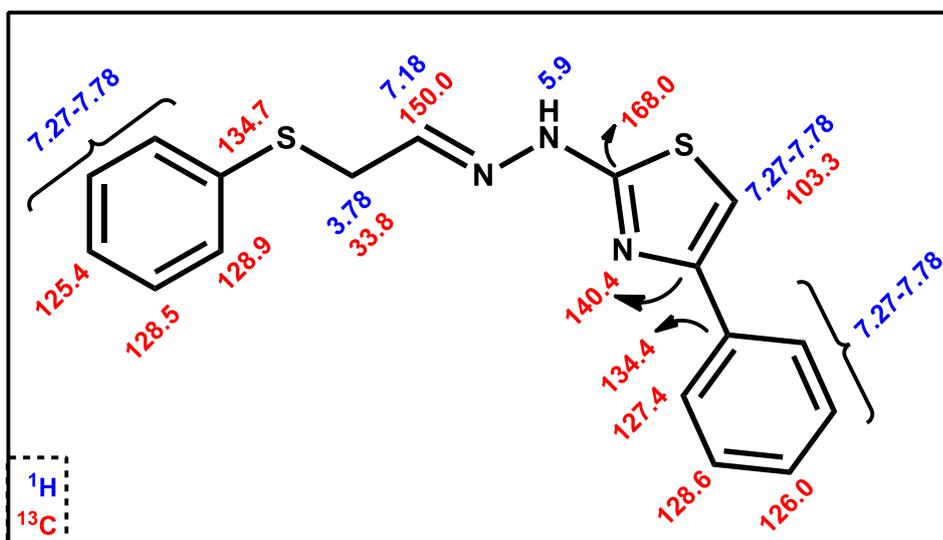
Nos espectros analisados, observou-se a presença de um pico largo em torno de 4,5-5,5 ppm, e ausência do pico do NH em 10,5-12ppm, o que nos induz a dizer que este pico largo é referente ao NH. Para confirmação, submeteu alguns compostos para aquisição de RMN-¹H com adição de algumas gotas de D₂O.

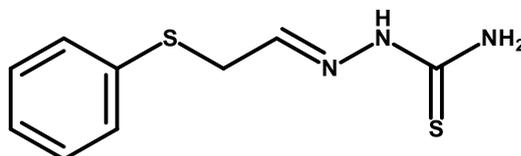
Como principais indícios da formação do anel tiazólico, pode-se citar a ausência do pico da carbonila da cetona, bem como da tiocarbonila da tiossemicarbazona, em aprox. 190 ppm, sugestivo da formação do anel tiazólico;

A mudança do pico de absorção em 180-185 para 165-170, indicativo da conversão do carbono da tiocarbonila, presente na tiossemicarbazida, para o carbono aromático do tiazol;

A mudança do pico de absorção de 30-38ppm para 105-120ppm é indicativo da conversão do carbono alfa da acetofenona, para carbono aromático do tiazol, sendo este o **maior indicativo da formação do tiazol**.

Figura 25: Principais sinais da série TZ (TZ-01).



TS-01**1-(2-feniltioetilideno)tiossemicarbazona**

Rendimento: 46%

P.F.: 125-126°C

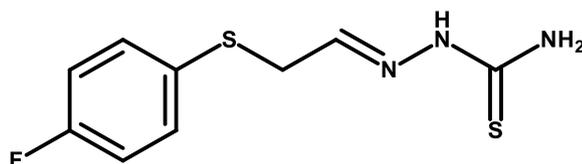
Rf: 0.71 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1595 (C=N), 3247 (NH), 3390 (NH₂).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.78 (d, 2H, S-CH₂), 7.19 (t, 1H, N=CH), 7.28-7.39 (m, 5H, Ar), 7.54 (s, 1H, NH₂), 8.09 (s, 1H, NH₂), 11.19 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 33.5 (S-CH₂), 126.0 (C-Ar), 128.4 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 134.5 (C-Ar), 141.5 (C=N), 177.8 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₉H₁₁N₃S₂ [M+H]⁺: 225.0394; encontrado: 226.0491.

TS-02**1-(2-*p*-fluorofeniltioetilideno)tiossemicarbazona**

Rendimento: 39 %

P.F.: 106-108°C

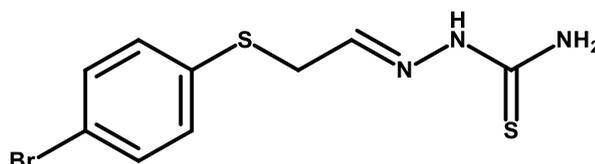
Rf: 0.68 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1591 (C=N), 3258 (NH), 3404 (NH₂).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3,74 (d, 2H, S-CH₂), 7,16-7,45 (m, 4H, Ar), 7,32 (t, 1H, N=CH), 7,48 (s, 1H, NH₂), 8,08 (s, 1H, NH₂), 11,18 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 34,5 (S-CH₂), 115,9 (C-Ar), 116,2 (C-Ar), 129,7 (C-Ar), 131,5 (C-Ar), 131,6 (C-S), 141,4 (C=N), 162,6 (C-Ar), 177,8 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₉H₁₀FN₃S₂ [M+H]⁺: 243,0300; encontrado: 244,0405.

TS-03**1-(2-*p*-bromofeniltioetilideno)tiossemicarbazona**

Rendimento: 37 %

P.F.: 104-106°C

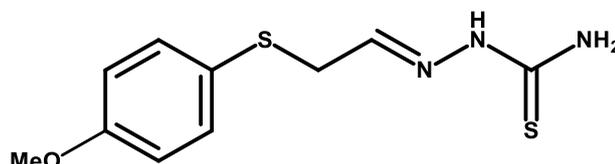
Rf: 0.44 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1594 (C=N), 3239 (NH), 3387 (NH₂).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.74 (d, 2H, S-CH₂), 7.17 (t, 2H, Ar), 7.31 (t, 1H, N=C), 7.42 (dd, 2H, Ar), 7.49 (s, 1H, NH₂), 8.09 (s, 1H, NH₂), 11.18 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 34.5 (S-CH₂), 118.9 (C-Ar), 130.1 (C-Ar), 131.7 (C-Ar), 133.7 (C-Ar), 134.2 (C-Ar), 135.4 (C-Ar), 140.9 (C=N), 177.8 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₉H₁₀BrN₃S₂ [M+H]⁺: 302.9500; encontrado: 303.9504.

TS-04**1-(2-*p*-anisiltioetilideno)tiossemicarbazona**

Rendimento: 30 %

P.F.: 124°C

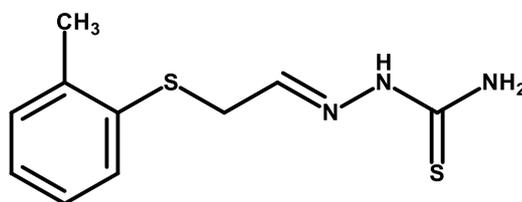
Rf: 0.63 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1598 (C=N), 3255 (NH), 3404 (NH₂).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.64 (d, 2H, S-CH₂), 3.73 (s, 3H, CH₃), 6.90-7.35 (m, 4H, Ar), 7.33 (t, 1H, N=CH), 7.41 (s, 1H, NH₂), 8.04 (s, 1H, NH₂), 11.16 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 35.7 (S-CH₂), 55.2 (O-CH₃), 114.7 (C-Ar), 124.0 (C-Ar), 132.5 (C-S), 158.6 (C-Ar), 142.1 (C=N), 177.7 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₀H₁₃N₃OS₂ [M+H]⁺: 255.0500; encontrado: 256.0612.

TS-05**1-[2-(*o*-toluilitioetilideno)]tiossemicarbazona**

Rendimento: 33 %

P.F.: 104-105°C

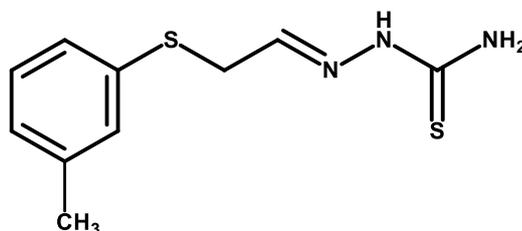
Rf: 0.54 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1599 (C=N), 3260 (NH), 3375 (NH₂).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.28 (3H, CH₃), 3.76 (d, 2H, S-CH₂), 7.08-7.21 (m, 3H, Ar), 7.33 (t, 1H, N=C), 7.40 (d, 1H, Ar), 7.51 (s, 1H, NH₂), 8.04 (s, 1H, NH₂), 11.16 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 19.8 (CH₃), 33.2 (S-CH₂), 125.9 (C-Ar), 126.5 (C-Ar), 127.9 (C-Ar), 130.0 (C-Ar), 133.7 (C-Ar), 136.5 (C-Ar), 141.5 (C=N), 177.8 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₀H₁₃N₃S₂ [M+H]⁺: 239.0551; encontrado: 240.0663.

TS-06**1-[2-(*m*-toluilitioetilideno)]tiossemicarbazona**

Rendimento: 32 %

P.F.: 118-119°C

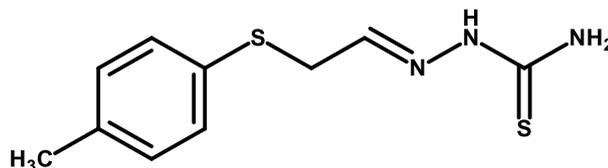
Rf: 0.53 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1604 (C=N), 3266 (NH), 3422 (NH₂).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.26 (3H, CH₃), 3.76 (d, 2H, S-CH₂), 7.00 (d, 1H, Ar), 7.17 (d, 1H, Ar), 7.18 (t, 1H, Ar), 7.19 (s, 1H, Ar), 7.33 (t, 1H, N=C), 7.51 (s, 1H, NH₂), 8.07 (s, 1H, NH₂), 11.17 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 20.8 (CH₃), 33.5 (S-CH₂), 125.4 (C-Ar), 126.8 (C-Ar), 128.8 (C-Ar), 134.2 (C-Ar), 138.3 (C-Ar), 141.5 (C=N), 177.8 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₀H₁₃N₃S₂ [M+H]⁺: 239,0551; encontrado: 240,0638.

TS-07**1-[2-(*p*-toluilitioetilideno)]tiossemicarbazona**

Rendimento: 36 %

P.F.: 99-101°C

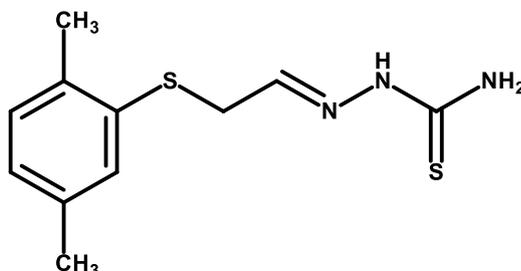
Rf: 0.62 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1602 (C=N), 3261 (NH), 3412 (NH₂).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.25 (3H, CH₃), 3.72 (d, 2H, S-CH₂), 7.19 (dd, 4H, Ar), 7.31 (t, 1H, N=C), 7.51 (s, 1H, NH₂), 8.08 (s, 1H, NH₂), 11.18 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 20.6 (CH₃), 34.1 (S-CH₂), 129.2 (C-Ar), 129.7 (C-Ar), 130.7 (C-Ar), 135.8 (C-S), 141.8 (C=N), 177.8 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₀H₁₃N₃S₂ [M+H]⁺: 239,0551; encontrado: 240,0643.

TS-08**1-[2-(2,5-dimetilfeniltioetilideno)]tiossemicarbazona**

Rendimento: 35 %

P.F.: 119-120°C

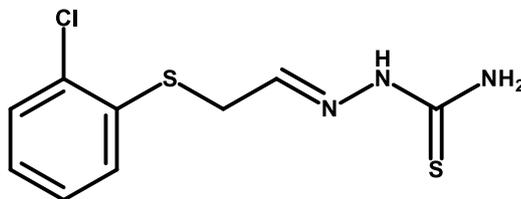
Rf: 0.52 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1243 (C=S), 1597 (C=N), 3252 (NH), 3377 (NH₂).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.23 (6H, CH₃), 3.75 (d, 2H, S-CH₂), 6.99 (dd, 2H, Ar), 7.22 (s, 1H, Ar), 7.31 (t, 1H, N=C), 7.54 (s, 1H, NH₂), 8.11 (s, 1H, NH₂), 11,19 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): 19.4 (CH₃), 20.5 (CH₃), 33.1 (S-CH₂), 126.2 (C-Ar), 128.3 (C-Ar), 129.9 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 135.6 (C-Ar), 141.3 (C=N), 177.8 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₁H₁₅N₃S₂ [M+H]⁺: 253,0707; encontrado: 254,0823.

TS-09**1-(2-o-clorofeniltioetilideno)tiossemicarbazona**

Rendimento: 31 %

P.F.: 125-126°C

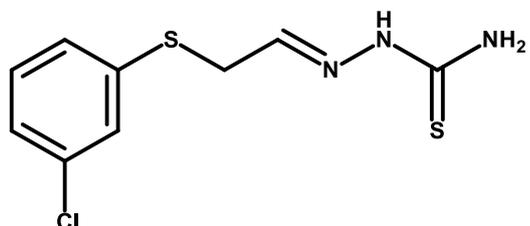
Rf: 0.47 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1601 (C=N), 3241 (NH), 3376 (NH₂).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.86 (d, 2H, S-CH₂), 7.17 (t, 1H, N=CH), 7.29 (t, 2H, Ar), 7.46 (d, 1H, Ar), 7.55 (d, 1H, Ar), 7.66 (s, 1H, NH₂), 8.14 (s, 1H, NH₂), 11.23 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 32.4 (S-CH₂), 126.8 (C-Ar), 127.7 (C-Ar), 127.9 (C-Ar), 129.5 (C-Ar), 131.1 (C-Ar), 134.1 (C-Ar), 140.6 (C=N), 177.9 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₉H₁₀ClN₃S₂ [M+H]⁺: 259.0005; encontrado: 260.0119.

TS-10**1-(2-*m*-clorofeniltioetilideno)tiossemicarbazona**

Rendimento: 32 %

P.F.: 111°C

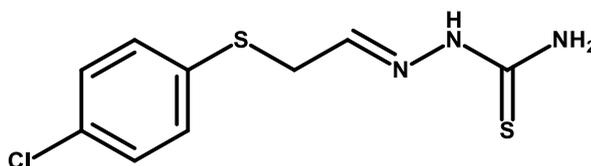
Rf: 0.58 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1598 (C=N), 3245 (NH), 3439 (NH₂).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.84 (d, 2H, S-CH₂), 7.25 (t, 1H, N=CH), 7.29 (t, 1H, Ar), 7.32 (d, 2H, Ar), 7.44 (s, 1H, Ar), 7.53 (s, 1H, NH₂), 8.14 (s, 1H, NH₂), 11.22 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 33.1 (S-CH₂), 125.8 (C-Ar), 126.5 (C-Ar), 127.0 (C-Ar), 130.5 (C-Ar), 133.6 (C-Ar), 137.3 (C-Ar), 140.9 (C=N), 177.9 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₉H₁₀ClN₃S₂ [M+H]⁺: 259,0005; encontrado: 260,0017.

TS-11**1-(2-*p*-clorofeniltioetilideno)tiossemicarbazona**

Rendimento: 38 %

P.F.: 133-135°C

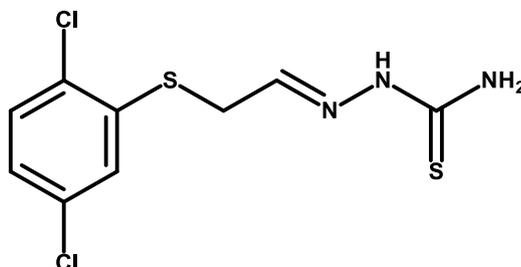
Rf: 0.50 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1606 (C=N), 3249 (NH), 3411 (NH₂).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.79 (d, 2H, S-CH₂), 7.29-7.41 (m, 4H, Ar), 7.31 (t, 1H, N=CH), 7.55 (s, 1H, NH₂), 8.11 (s, 1H, NH₂), 11.20 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 33.5 (S-CH₂), 128.0 (C-Ar), 130.7 (C-Ar), 133.7 (C-S), 141.0 (C=N), 177.9 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₉H₁₀ClN₃S₂ [M+H]⁺: 259,0005; encontrado: 260,0119.

TS-12**1-[2-(2,5-diclorofeniltioetilideno)tiossemicarbazona**

Rendimento: 36 %

P.F.: 149-150°C

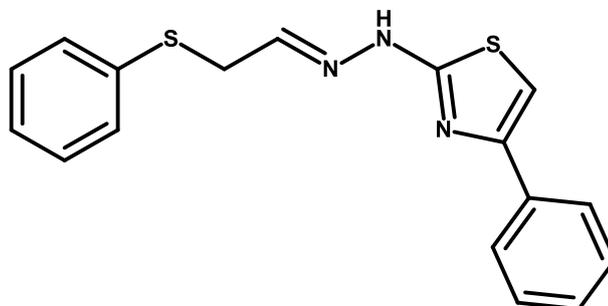
Rf: 0.73 (Hexano/acetato de etila 6:4)

I.V. Principais sinais: 1601 (C=N), 3241 (NH), 3402 (NH₂).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.94 (d, 2H, S-CH₂), 7.27 (d, 1H, Ar), 7.32 (t, 1H, N=CH), 7.50 (s, 1H, Ar), 7.57 (d, 1H, Ar), 8.22 (s, 1H, NH₂), 8.64 (s, 1H, NH₂), 11,28 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 32.3 (S-CH₂), 126.4 (C-Ar), 126.7 (C-Ar), 129.5 (C-Ar), 130.8 (C-Ar), 132.4 (C-Ar), 136.7 (C-Ar), 140.0 (C=N), 178.0 (C=S).

EMAR (ESI) Calculado para C₉H₉Cl₂N₃S₂ [M+H]⁺: 292.9615; encontrado: 293.8745.

TZ-01***N*-(feniltioetilideno)-*N'*-(feniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 72%

P.F.: 148-149°C

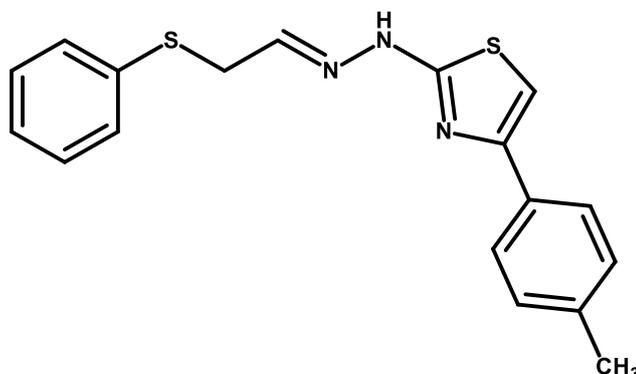
Rf: 0.71 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1581 (C=N), 1611 (C=N), 3089 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.85 (d, 2H, S-CH₂), 5.9 (sl, 1H, NH), 7.18 (t, 1H, N=CH), 7.27-7.78 (m, 11H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 33.8 (S-CH₃), 103.3 (S-CH), 125.4 (C-Ar), 126.0 (C-Ar), 127.4 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 134.4 (C-Ar), 134.7 (S-C), 140.4 (C-Ar), 150.0 (N=CH), 168.0 (N=C).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₇H₁₅N₃S₂ [M+H]⁺: 325.0707; encontrado: 326.0610.

TZ-02***N*-(feniltioetilideno)-*N'*-(*p*-toluiltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 68 %

P.F.: 148-149°C

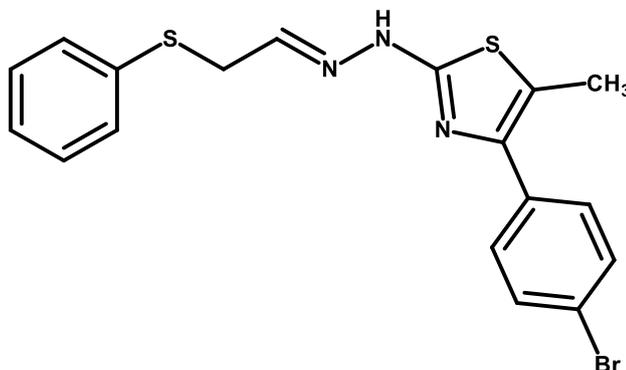
Rf: 0.71 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1568 (C=N), 1625 (C=N), 3083 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.36 (s, 3H, CH₃), 3.84 (d, 2H, S-CH₂), 5.04 (sl, 1H, NH), 7.31 (t, 1H, N=CH), 7.18-7.83 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 20.8 (CH₃), 33.8 (S-CH₂), 102.6 (S-CH), 125.5 (C-Ar), 126.1 (C-Ar), 126.9 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 131.3 (C-Ar), 134.7 (S-C), 136.9 (C-Ar), 141.6 (C-Ar), 151.2 (N=CH), 168.0 (N=C).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₇H₁₅N₃S₂ [M+H]⁺: 339.0884; encontrado 340.0950.

TZ-03***N*-(feniltioetilideno)-*N'*-[5-metil-(*p*-bromofenil)tiazol-2-il]-hidrazina**

Rendimento: 61 %

P.F.: 202°C

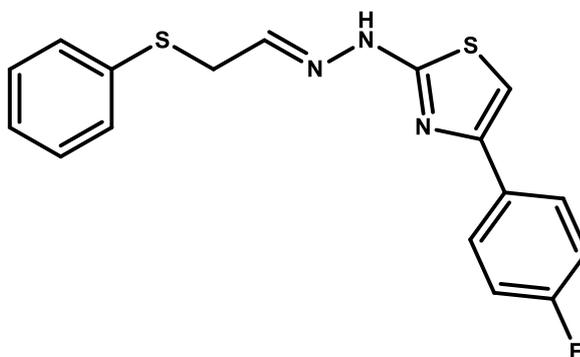
Rf: 0.48 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1608 (C=N), 3123 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.35 (s, 3H, CH₃), 3.84 (d, 2H, S-CH₂), 5.39 (sl, 1H, NH), 7.19 (t, 1H, N=CH), 7.29-7.63 (m, 9H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 12.1 (CH₃), 33.7 (S-CH₂), 117.5 (S-CH), 120.7 (C-Ar), 126.1 (C-Ar), 128.5 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 130.0 (C-Ar), 131.2 (C-Ar), 134.7 (S-C), 141.9 (C-Ar), 151.2 (N=CH), 164.6 (N=C).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₃BrN₄S [M+H]⁺: 416.9969; encontrado 417.9842.

TZ-04***N*-(feniltioetilideno)-*N'*-(*P*-fluorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 63 %

P.F.: 228°C

Rf: 0.77 (acetato de etila/hexano 1:1)

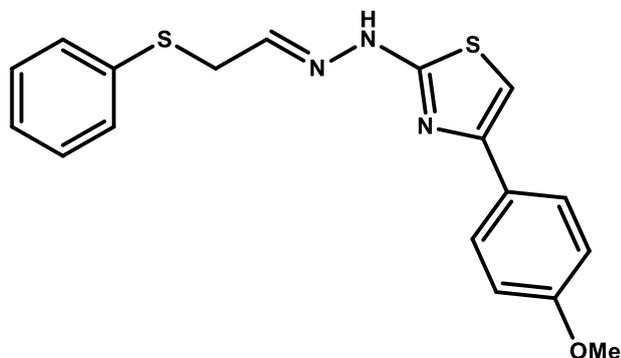
I.V. Principais sinais: 1508 (C=C), 1614 (C=N), 3082 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.84 (d, 2H, S-CH₂), 5.15 (sl, 1H, NH), 7.21 (t, 1H, N=CH), 7.16-7.85 (m, 9H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 35.0 (S-CH₂), 103.0 (S-CH), 115.6 (C-Ar), 126.1 (C-Ar), 127.5 (C-Ar), 127.6 (C-Ar), 138.6 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 130.9 (C-Ar), 134.7 (S-C), 140.8 (C-Ar), 148.7 (N=CH), 168.2 (N=C).

DEPT: 33.8, 103.3, 115.3, 115.5, 126.1, 127.5, 127.6, 128.3, 128.6, 128.9, 130.9, 134.7, 140.9, 148.6.

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₁FN₄S [M+H]⁺: 343.0613; encontrado 344.0702.

TZ-05***N*-(feniltioetilideno)-*N'*-(*p*-anisaltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 62 %

P.F.: 187°C

Rf: 0.44 (acetato de etila/hexano 1:1)

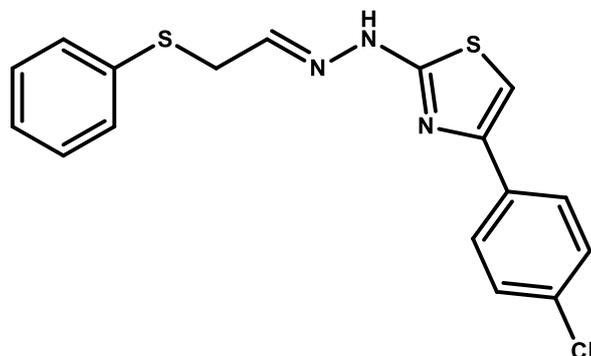
I.V. Principais sinais: 1530 (C=N), 1606 (C=N), 3203 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.76 (s, 3H, CH₃), 3.84 (d, 2H, S-CH₂), 5.02 (sl, 1H, NH), 7.19 (t, 1H, N=CH), 7.08-7.71 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 33.8 (S-CH₂), 55.2 (CH₃), 101.4 (S-CH), 113.9 (C-Ar), 126.1 (C-Ar), 126.9 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 134.7 (S-C), 141.2 (C-Ar), 148.9 (N=CH), 168.9 (N=C).

DEPT (75.5MHz): 55.2, 101.4, 113.9, 126.1, 126.9, 128.6, 128.9, 128.9, 140.9

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₄FN₄OS [M+H]⁺: 355.0843; encontrado 356.0944.

TZ-06***N*-(feniltioetilideno)-*N'*-(*p*-clorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 68 %

P.F.: 226°C

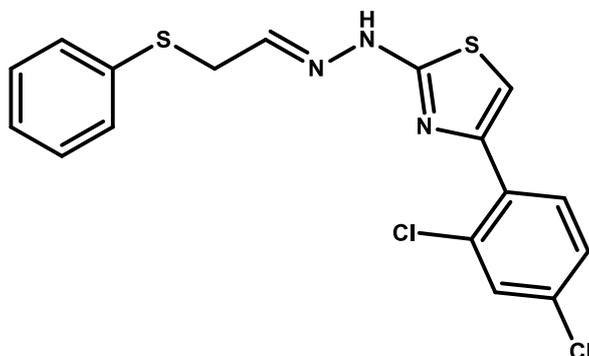
Rf: 0.69 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1581 (C=N), 1628 (C=N), 3147 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.84 (d, 2H, S-CH₂), 4.38 (sl, 1H, NH), 7.21 (t, 1H, N=CH), 7.22-7.84 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 33.8 (S-CH₂), 103.4 (S-CH), 116.4 (C-Ar), 127.1 (C-Ar), 127.5 (C-Ar), 127.7 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 130.9 (C-Ar), 134.7 (S-C), 137.6 (C-Ar), 140.8 (C-Ar), 148.7 (N=CH), 168.7 (N=C).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₁ClN₄S [M+H]⁺: 359.0318; encontrado 360.0282.

TZ-07***N*-(feniltioetilideno)-*N'*-(2,4-diclorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 62 %

P.F.: 211°C

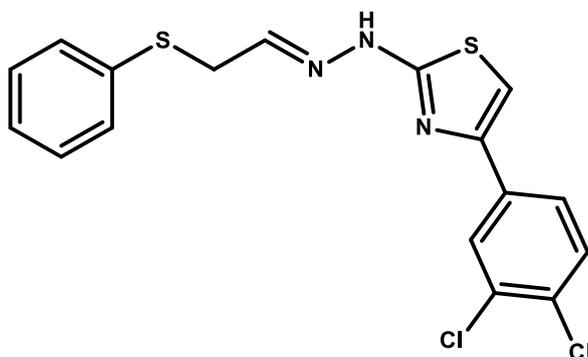
Rf: 0.70 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1549 (C=N), 1621 (C=N), 3129 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.83 (d, 2H, S-CH₂), 4.99 (sl, 1H, NH), 7.18 (t, 1H, N=CH), 7.28-7.83 (m, 9H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 34.2 (S-CH₂), 105.4 (S-CH), 124.6 (C-Ar), 125.7 (C-Ar), 127.8 (C-Ar), 128.8 (C-Ar), 134.4 (C-Ar), 141.3 (C-Ar), 143.2 (C-Ar), 145.6 (C-Ar), 151.8 (C=N), 169.2 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₀Cl₂N₄S [M+H]⁺: 392.9928; encontrado 393.9929.

TZ-08***N*-(feniltioetilideno)-*N'*-(3,4-diclorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 61 %

P.F.: 217°C

Rf: 0. (acetato de etila/hexano 1:1)

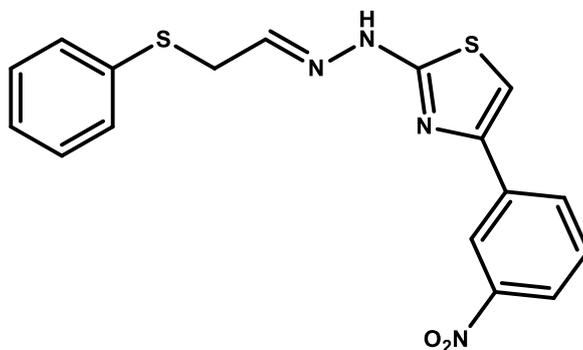
I.V. Principais sinais: 1578 (C=N), 1614 (C=N), 3087 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.84 (d, 2H, S-CH₂), 5.07 (sl, 1H, NH), 7.18 (t, 1H, N=CH), 7.28-7.80 (m, 9H, Ar).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): 34.6 (S-CH₂), 105.5 (S-CH), 126.1 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 130.8 (C-Ar), 131.4 (C-Ar), 134.7 (S-C), 135.1 (C-Ar), 140.8 (C-Ar), 147.6 (N=CH), 168.3 (N=C).

DEPT (100MHz) 33.7, 105.5, 126.1, 128.6, 128.9, 130.8, 140.8

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₀Cl₂N₄S [M+H]⁺: 392.9928; encontrado 393.9823.

TZ-09***N*-(feniltioetilideno)-*N'*-(*m*-nitrofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 59 %

P.F.: 226°C

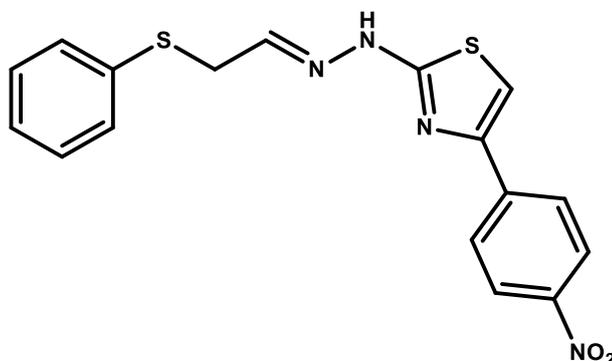
Rf: 0.57 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1354 (NO₂), 1524 (C=N), 1639 (C=N), 3135 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.42 (d, 2H, S-CH₂), 3.55 (sl, 1H, NH), 7.72 (t, 1H, N=CH), 7.83-8.74 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): 33.7 (S-CH₂), 103.2 (S-CH), 119.9 (C-Ar), 122.1 (C-Ar), 126.1 (C-Ar), 128.7 (C-Ar), 129.0 (C-Ar), 130.2 (C-Ar), 131.6 (C-Ar), 134.7 (S-C), 140.8 (C-Ar), 144.9 (C-Ar), 148.2 (N=CH), 168.4 (N=C).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₁N₅O₂S [M+H]⁺: 370.0558; encontrado 371.0558.

TZ-10***N*-(feniltioetilideno)-*N'*-(*p*-nitrofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 60 %

P.F.: 220°C

Rf: 0.60 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1339 (NO₂), 1596 (C=N), 3048 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.83 (d, 2H, S-CH₂), 4.37 (sl, 1H, NH), 7.83 (t, 1H, N=CH), 8.09-8.69 (m, 9H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 22.0 (S-CH₂), 107.2 (S-CH), 115.6 (C-Ar), 119.9 (C-Ar), 121.4 (C-Ar), 123.0 (C-Ar), 125.7 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 130.2 (C-Ar), 131.5 (C-Ar), 133.1 (C-Ar), 148.1 (C-Ar), 134.7 (S-C), 139.4 (C-Ar), 149.3 (N=CH), 169.7 (N=C).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₁N₅O₂S [M+H]⁺: 370,0558; encontrado 371,0692.

CAPITULO 2

Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Biológica de Novos Tiazóis como Agentes Tripanocidas

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Materiais

Para a obtenção dos resultados obtidos, foram adquiridos reagentes químicos de alto grau de pureza.

Para a obtenção dos derivados piridínicos, foram utilizados:

2-piridina carboxialdeído, 2-acetilpiridina e acetofenonas α -halogenadas diversas (**Sigma-Aldrich**); carbonato de sódio, ácido acético e ácido sulfúrico (**Merk**); tiossemicarbazida (**Flukka**); álcool etílico, álcool isopropílico, acetato de etila e hexano (**Vetec**).

Como equipamentos, foram utilizados:

Os protocolos por agitação magnética e refluxo foram realizados em agitador magnético da marca Fisaton, modelo 752A;

As reações lançadas em ultrassom foram realizadas em um aparelho ultrassônico modelo Unique EM-804 TGR com frequência de 40KHz (**180 W**), dotado de aquecimento brando;

As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (**CCD**) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F₂₅₄. As placas cromatográficas foram visualizadas em uma câmara escura com lâmpada ultravioleta (**com duplo comprimento de onda, 254 ou 365nm**).

As concentrações reacionais por pressão reduzida foram realizadas em um Evaporador Rotativo da marca Fisaton, modelo 802;

Após concentração por pressão reduzida, os produtos foram armazenados em um dessecador, contendo sílica gel azul, 4-8mm e CaCO₃ para retirada de umidade residual;

Todos os protocolos foram realizados em vidrarias específicas e inertes;

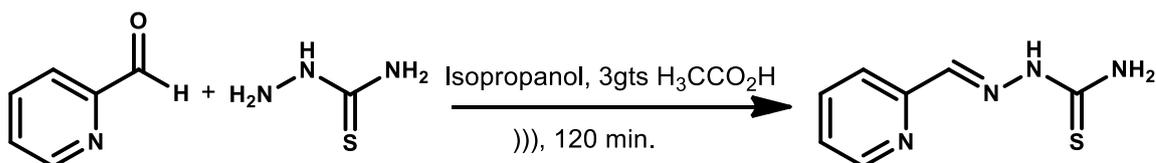
Os pontos de fusão foram medidos em capilares usando um aparelho de Thomas Hoover.

7.2 Métodos

7.2.1 Síntese das hidrazonas piridínicas

Para a obtenção dos compostos da série TP, inicialmente reagiu-se a 2-piridina carboxialdeído com a tiossemicarbazida, em meio etanólico, acidificado cataliticamente, para a obtenção da hidrazona piridínica **2-((piridin-2-il)metileno) tiossemicarbazona** (**Esquema 13**). Em balão de fundo redondo, adicionaram-se 2,80 mmol de piridina carboxialdeído, seguido de 25 ml de isopropanol e 2,80 mmol de tiossemicarbazida. Consequente adicionou-se 3-4 gotas de ácido acético glacial e submeteu o sistema a irradiação por ultrassom, por 120 min, com aquecimento moderado (**45°C**), confirmando-se o término da reação por CCD. Posteriormente observou-se a formação de um precipitado amarelo claro em boa quantidade. Consequente adicionou-se hexano lentamente, sob agitação branda, para favorecer a precipitação. Guardou-se o sistema sob refrigeração, por 24h, para posterior filtração sob vácuo, em funil sinterizado, com sucessivas lavagens do precipitado com hexano. Guardou-se o precipitado no dessecador e o conservou por 48h para retirada residual de água e solventes.

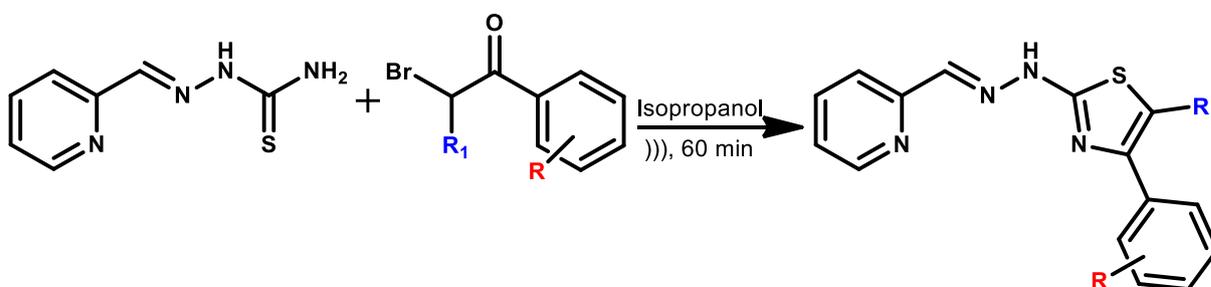
Esquema 13: Obtenção da 2-((piridin-2-il)metileno) tiossemicarbazona.



7.2.2 Síntese das piridinas tiazólicas

Para a obtenção dos tiazóis derivados da piridina, reagiu-se a hidrazona piridínica com diversas α -halocetonas aromáticas, em meio alcoólico, para a obtenção dos respectivos tiazóis. Em balão de fundo redondo, adicionou-se 1,66 mmol de piridina tiossemicarbazona, seguido de 1,99 mmol da respectiva α -haloacetofenona em meio isopropanólico. Submeteu-se o sistema a irradiação por ultrassom durante 60 min. Para confirmação do término reacional, fez-se uma CCD no sistema 7:3 Hexano/AcOEt. Ao término da reação, observou-se grande formação de precipitado laranja avermelhado, o qual foi submetido à refrigeração por 24h. Posteriormente o precipitado foi filtrado sob vácuo, em funil sinterizado, e lavado 4 vezes com hexano, ainda no funil. Coletou-se o sobrenadante, concentrou-o sob baixa pressão e conseguinte adicionou-se hexano lentamente, sob agitação manual branda, para favorecer a precipitação, posteriormente filtrada sob vácuo. O segundo precipitado, oriundo da adição de hexano no sobrenadante, possuía uma boa concentração de produto, porém também possuía grande quantidade de produtos de partida.

Esquema 14: Obtenção da 2-imino-((piridin-2-il)metileno)-1,3-tiazol.



Composto	R	R1	Composto	R	R1
TP-01	H	H	TP-07	4-F	H
TP-02	4-Br	H	TP-08	2,4-Cl	H
TP-03	4-Cl	H	TP-09	2-Naf.	H
TP-04	4-OMe	H	TP-10	4-NO ₂	H
TP-05	4-Me	H	TP-11	3,4-Cl	H
TP-06	4-Br-Prop.	CH ₃	TP-12	3-NO ₂	H

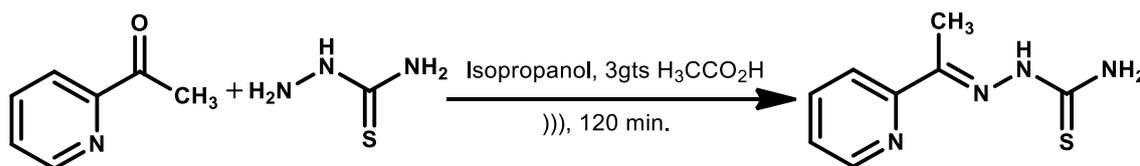
7.2.3 Síntese das acetil piridinas tiazólicas

Dando sequência, realizou-se a obtenção da hidrazona oriunda da reação entre a acetil piridina e a tiossemicarbazida, em meio etanólico e sob irradiação por ultrassom.

7.2.4 Síntese da tiossemicarbazona

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 2,47 mmol de acetil piridina, seguido de 25 ml de isopropanol e 2,47 mmol de tiossemicarbazida. Consequente adicionou-se 3 a 4 gotas de ácido acético glacial e submeteu-se o sistema a irradiação por ultrassom, durante 120 min, com aquecimento brando (**Esquema 15**). Confirmou-se o término da reação por placa de CCD, observando-se a formação de um precipitado amarelo claro em quantidade. Consequente adicionou-se hexano lentamente, sob agitação branda, para o favorecimento de precipitação. Guardou-se o sistema sob refrigeração, por 24h, para posterior filtração sob vácuo, em funil sinterizado, com sucessivas lavagens com hexano. Levou-se o precipitado obtido ao dessecador, e o conservou por 48h para retirada residual de água e solventes.

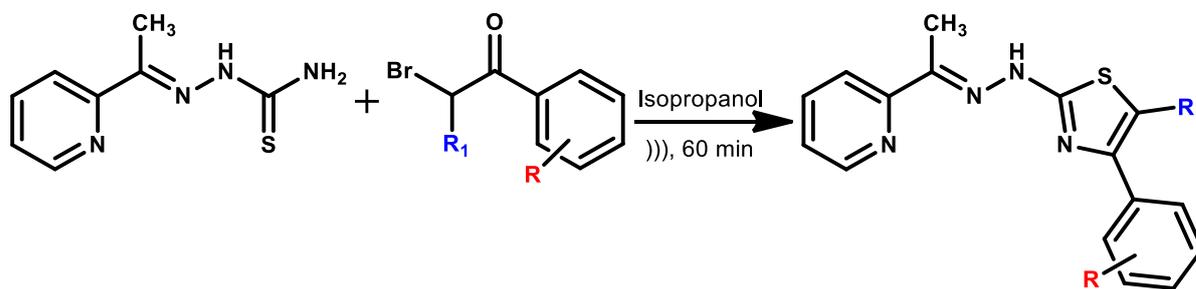
Esquema 15: Obtenção da 2-((piridin-2-il)etilideno) tiossemicarbazona.



7.2.5 Síntese dos tiazóis acetilpiridínicos

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 1,54 mmol de acetilpiridina tiossemicarbazona, seguido de 1,85 mmol da respectiva α -haloacetofenona em meio isopropanólico (**Esquema 16**). Submeteu-se o sistema a irradiação por ultrassom durante 60 min. Para confirmação da conclusão reacional, fez-se uma CCD no sistema 7:3 Hexano/AcOEt. Ao término da reação, observou-se uma grande formação de precipitado amarelo alaranjado, o qual foi submetido à refrigeração por 24h. Posteriormente o precipitado foi filtrado sob vácuo, em funil sinterizado, e lavado quatro vezes com hexano, ainda no funil. Coletou-se o sobrenadante, concentrou-o sob baixa pressão e conseguinte adicionou-se hexano lentamente, sob agitação manual branda, para o favorecimento da precipitação, posteriormente filtrada sob vácuo. O segundo precipitado, oriundo da adição de hexano no sobrenadante, possui uma boa concentração de produto, porém também possui grande quantidade de produtos de partida. Após a obtenção dos compostos propostos, eles foram submetidos a análises espectroscópicas e físico-químicas para comprovar a formação dos produtos bem como a pureza. Entre estas análises, foram realizadas: espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons ($^1\text{H-RMN}$), de carbono-13 ($^{13}\text{C-RMN}$), infravermelho (IV), espectro de massa acoplado a cromatografia líquida (**EMAR-ESI**), ponto de fusão (**Pf**) e fator de retenção (**Rf**).

Esquema 16: Obtenção da 2-imino-((piridin-2-il)etilideno)-1,3-tiazol.



Composto	R	R1	Composto	R	R1
TAP-01	H	H	TAP-07	4-Cl	H
TAP-02	4-Me	H	TAP-08	2,4-Cl	H
TAP-03	4- Br-Prop.	H	TAP-09	3,4-Cl	H
TAP-04	4-Br	H	TAP-10	3-NO ₂	H
TAP-05	4-F	H	TAP-11	4-NO ₂	H
TAP-06	4-OMe	CH ₃	TAP-12	2-Naf.	H

7.3 Protocolos da avaliação farmacológica

7.3.1 Animais

Para a determinação da citotoxicidade em esplenócitos, camundongos albinos da linhagem BALB/c (**fêmeas entre 6-8 semanas**) foram fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (**CPqAM, Recife, Brasil**).

7.3.2 Células, enzimas e inibidores químicos

O baço de camundongo foi macerado e o sobrenadante foi lavado em meio RPMI-1640. O número de esplenócitos foi determinado com o auxílio de um microscópio óptico e ajustado de acordo com o ensaio. Para os ensaios de infecção *in vitro*, macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, foram sensibilizados com tioglicolato de sódio (**3%**) e lavados em meio RPMI-1640 por duas vezes e a densidade celular foi ajustada com o auxílio de um microscópio óptico. Epimastigotas da cepa Y foram coletadas e mantidas em meio axênico usando o meio de cultura "liver infusion triptose" contendo 10% de SBF, 1% de hemina, 1% de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina e mantidas sob 26° C. Tripomastigotas circulantes da cepa Y foram coletadas do sobrenadante de células LLC-MK₂ infectadas. Os parasitas foram então mantidos em ambiente axênico usando o meio RPMI-1640 contendo 10% de SBF, 1% de hemina, 1 % de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina em estufa sob 37 °C e 5 % de CO₂. Cruzaína recombinante foi expressa e purificada seguindo o protocolo descrito ¹¹⁵ e gentilmente fornecida pelo Prof. James H. McKerrow do Departamento de Patologia da Universidade da Califórnia (**São Francisco, CA, EUA**). Benznidazol foi fornecido pelo LAFEPE (**Recife, Brasil**). Anfotericina B e saponina foram adquiridos na Cultilab (**Campinas, Brasil**). Cloridrato de Cbz-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina (**registro no Chemical Abstracts Service: 65147-22-0**) foi adquirido na Sigma-Aldrich (**St. Louis, EUA**).

7.3.3 Toxicidade para esplenócitos

Esplenócitos de camundongos BALB/c foram distribuídos em placa de 96 poços com uma densidade de 5x10⁶ células por poço em meio RPMI-1640. Cada inibidor químico foi solubilizado em DMSO na concentração de 10 mg/mL e em seguida a amostra foi diluída serialmente em meio RPMI-1640 nas concentrações de 1.0, 10 e 100 µg/mL, em triplicata. Como controle positivo, usou-se a saponina na

concentração de 0.1 µg/mL, enquanto que como controle negativo, os poços receberam somente meio RPMI-1640 e DMSO. A placa foi então cultivada por 24 horas na temperatura de 37° C e 5% CO₂. Então se adicionou 1.0 µCi de ³H-timidina em cada poço e a placa foi incubada por 6 horas. A placa foi então lida no contador de irradiação beta (**Multilabel Reader, Finland**) e a porcentagem de incorporação de timidina tritiada foi determinada. Para as células que não foram tratadas com as drogas (**controle negativo**), calculou-se como 100% de incorporação de timidina tritiada (**100% de viabilidade celular**). Para as células tratadas com saponina, a viabilidade celular foi de 5%. Quando o percentual de incorporação foi maior que 90%, a concentração da droga foi considerada como atóxica para os esplenócitos.

7.3.4 Atividade antiproliferativa para a forma epimastigota

Epimastigotas das cepas Y ou Dm28c foram distribuídas em uma placa de 96 poços em uma densidade final de 10⁶ células por poço. Cada inibidor químico, dissolvidos como descrito no item 7.3.3., foram adicionadas nos respectivos poços em triplicatas. Bdz (**1**) foi usado como controle positivo neste ensaio. A placa foi então cultivada durante 11 (**cepa Y**) ou 5 dias (**cepa Dm28c**) sob 26° C e 5% de CO₂. Após esse tempo, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas foi calculado em uma câmara de Neubauer. Para as epimastigotas não tratadas com os inibidores químicos (**controle negativo**), assumiu-se como 100% do número de parasitas. As curvas dose-respostas foram determinadas e os valores das CI₅₀ foram calculados usando ao menos cinco concentrações ("**data-points**") usando uma equação não-linear (**Prism, versão 4.0**).

7.3.5 Toxicidade para a forma tripomastigota

Tripomastigotas da cepa Y foram coletadas do sobrenadante de células LLC-MK₂ e distribuídas em uma placa de 96 poços para uma densidade final de 4x10⁵ células por poço. Cada inibidor químico, dissolvidos como descrito no item 7.3.3., foram adicionados nos respectivos poços, em triplicatas. Bdz (**1**) foi usado como controle positivo neste ensaio. A placa foi então cultivada por 24 horas em 37° C contendo 5 % de CO₂. Após esse tempo, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas viáveis (**ou seja, com motilidade aparente**) foi contado em uma câmara de Neubauer. Para os poços que não receberam os inibidores químicos, assumiu-se como 100% do número de parasitas viáveis. As curvas dose-respostas

foram determinadas e os valores das CI_{50} foram calculados usando ao menos sete concentrações (**data-points**) usando regressão não-linear (**Prism, versão 4.0**).

7.3.6 Inibição da enzima cruzaina

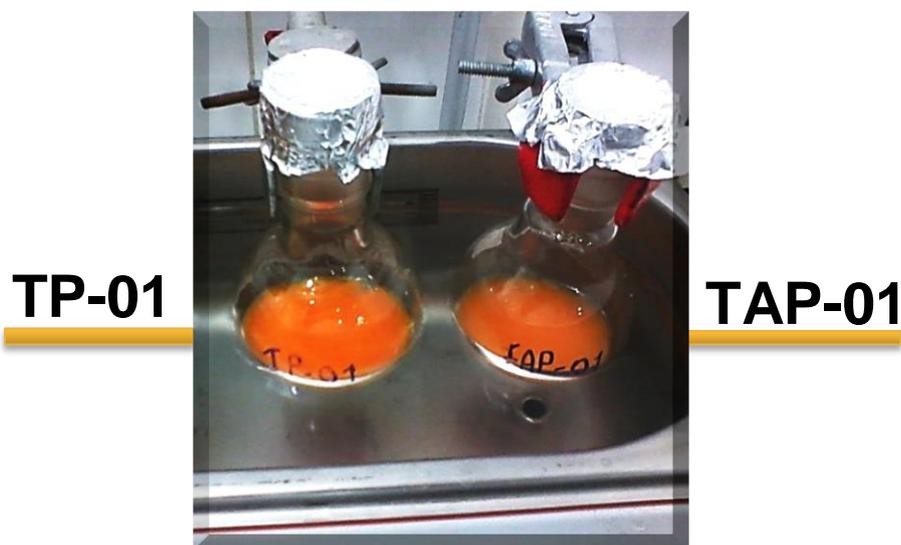
Cruzaína recombinante foi ativada com DTT e então dissolvida em tampão acetato (**0.1 M; pH 5.5**) A enzima foi ajustada para obter uma concentração final de 0.005 μM nos ensaios. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. O meio reacional utilizado foi tampão fosfato contendo NaCl, ditiotreitol, e 0.001 % de EDTA. No ensaio de competição não covalente, 490 μL de uma solução do inibidor químico (**20 μM**) e 10 μL do substrato Cbz-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina (**4.0 μM**) foram adicionados na placa. Cada inibidor químico foi testado em duplicata. A reação enzimática foi iniciada com a adição de 10 μL de uma solução da cruzaina contendo 5 mM de DTT. Já para o ensaio de competição covalente, 150 μL de uma solução de cada inibidor químico (**40 μM**) e 10 μL da enzima em 5 mM de DTT foram adicionados nos respectivos poços e a reação foi incubada por 10 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 340 μL do substrato Cbz-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina (**3 μM**) e a reação foi incubada por 5 minutos. Em ambos os experimentos, a placa foi incubada a temperatura ambiente e lida (λ **excitação = 355 nm e λ emissão = 450 nm**) em diferentes tempos reacionais. A porcentagem de inibição da cruzaina foi calculada usando a equação $100 - (A1/Ax100)$, onde "A1" corresponde à fluorescência relativa (**RFU**) da enzima na presença do inibidor químico (**20 ou 100 μM**) e "A" corresponde a RFU da enzima na ausência do inibidor químico (**tampão e DMSO**) e a média de cada duplicata foi calculada. Para os inibidores químicos que apresentaram inibição > 40 %, os experimentos foram repetidos e uma curva dose-resposta foi determinada (**competição covalente com 10 minutos de pré-incubação**), variando as concentrações do inibidor químico entre 1.5 nM até 100 μM . A curva dose-resposta foi determinada usando ao menos oito pontos e a CI_{50} foi estimada usando regressão não linear no Origin (**versão 8.8**) usando o "logistic fit".

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Mecanismos reacionais

Esta é uma reação de rápida execução (**Esquema 17**), com variação de cor entre 5 a 10 minutos de lançada, com turvação e formação de precipitado neste mesmo período (**Figura 24**). Fez-se o acompanhamento reacional com placas de CCD a cada 15 minutos, determinando-se o tempo ótimo reacional entre 30 a 60 minutos, dependendo do substituinte presente na acetofenona.

Figura 26: Mudança de coloração e formação de precipitado nos protocolos TP-01 e TAP-01.



Ao se adicionar os reagentes no balão sem solvente, unicamente com o contato entre a hidrazona piridínica e as α -haloacetofenonas, observou-se a mudança de coloração bem como do estado físico, de sólido (**ambas**) para líquido (**viscoso**) de coloração castanho-escuro (**Figura 25**).

Figura 27: Mudança de coloração/estado físico nos protocolos TP-01 e TAP-01.



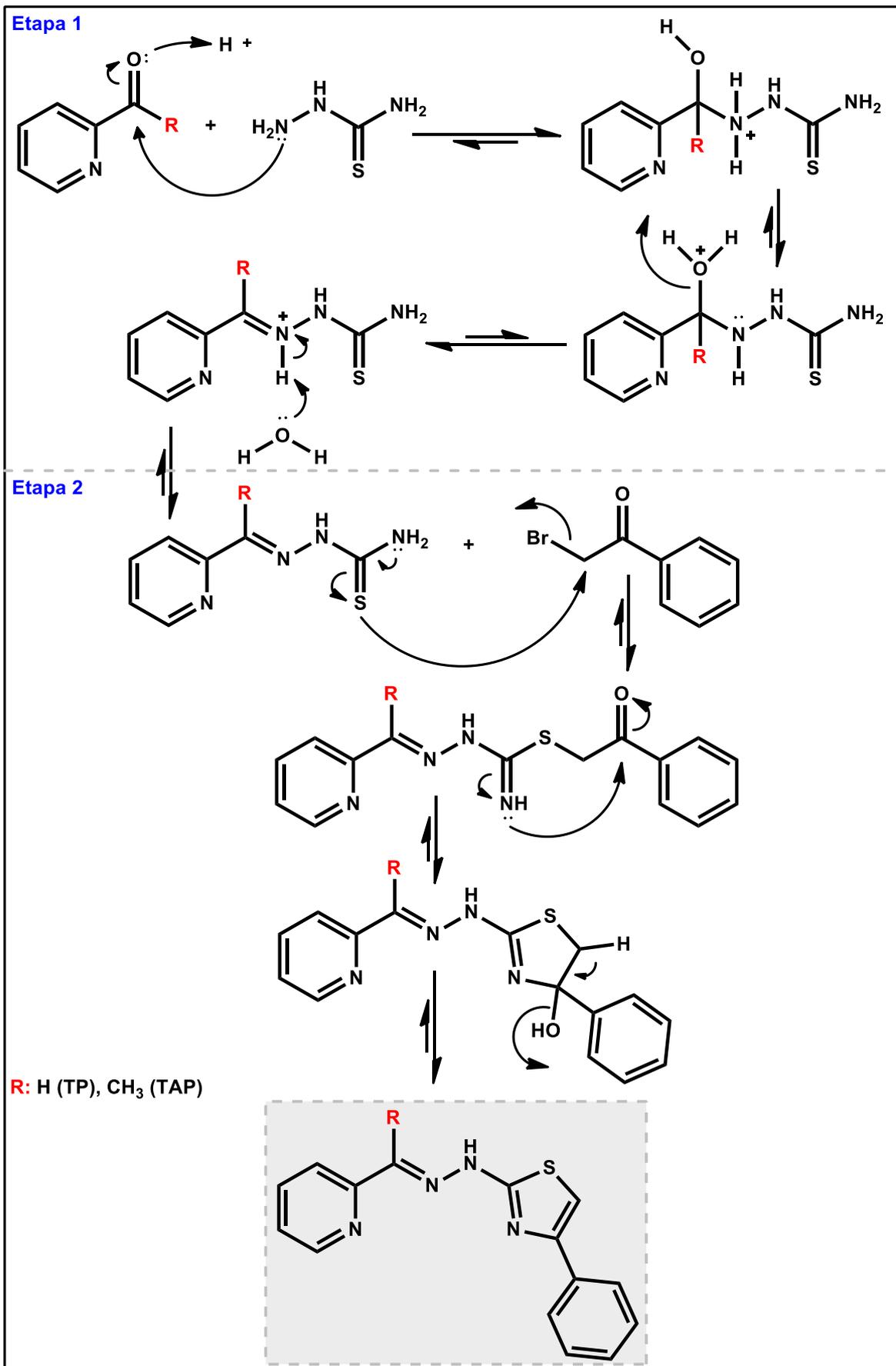
Porém, ao dar continuidade nesta reação, observou-se que a mesma apresentou mais subprodutos que o habitual; o que nos fez concluir a série pelo protocolo por ultrassom, já que foi o de melhor rendimento, bem como o de menor formação de subprodutos.

Para a escolha da melhor metodologia, variou-se o solvente, adicionou-se base (ou não), e modificou-se o sistema reacional (**aquecimento, ultrassom etc.**) onde se chegou à conclusão de que as reações se processaram muito bem utilizando:

- Ultrassom como sistema reacional;
- Álcool isopropílico como solvente;
- Ausência de base;
- Tempo reacional de 60 minutos.

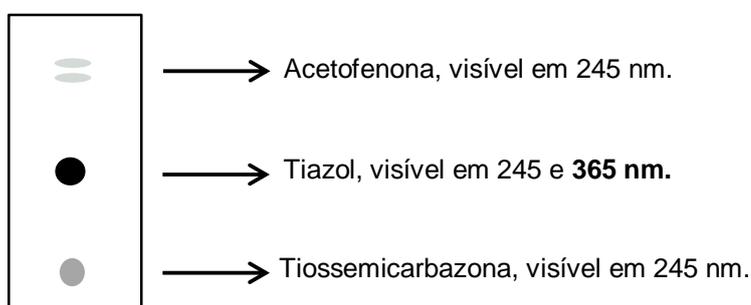
Porém, observou-se que as reações com as α -haloacetofenonas 2-bromo-3'-nitroacetofenona e 2-bromo-3',4'-dicloroacetofenona não apresentaram bons rendimentos, bem como um aumento no tempo reacional e na formação de subprodutos. Com isso, lançou-se estas reações em meio isopropanólico, sob agitação magnética e refluxo (**140°C**) e observou-se uma melhora bastante significativa no rendimento, pureza e cinética reacional. Pode-se atribuir esta peculiaridade a menor dissociabilidade do grupamento cloro em relação ao grupamento bromo, comparando-se a reação com o 2-bromo-2',4'-dicloroacetofenona, que apresenta excelente reatividade sob irradiação ultrassônica.

Esquema 17: Proposta mecanística para a obtenção das tiazopiridinas/ tiazopiridinas acetil (TP/TAP).



Ao analisar previamente a placa de CCD (**Figura 26**), observou-se duas principais impurezas no meio reacional, que foram determinadas como produtos de partida (**respectiva piridina hidrazona e acetofenona**). Para purificação das mesmas, utilizou-se a metodologia de sonicação com solventes de polaridades variadas, de acordo com a polaridade da impureza. Tem-se este método como preferencial sobre a recristalização padrão, sob aquecimento, pelo fato de haver um maior rendimento e uma melhor extração da impureza.

Figura 28: Placa de CCD padrão da obtenção das piridinas tiazólicas.

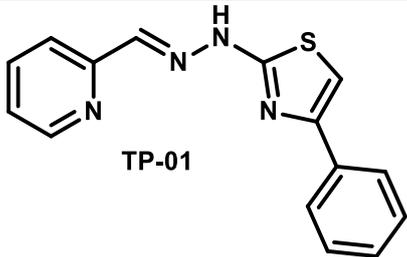
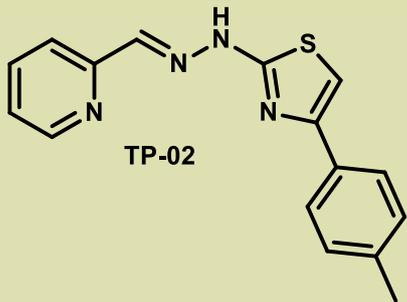
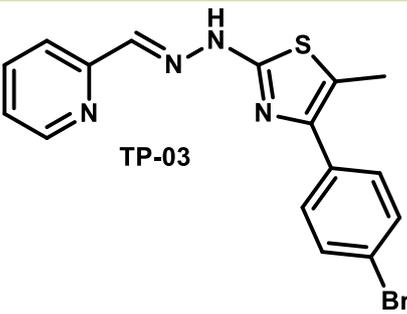
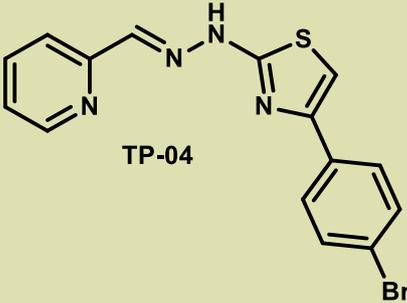
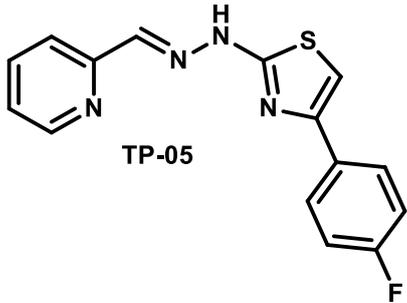


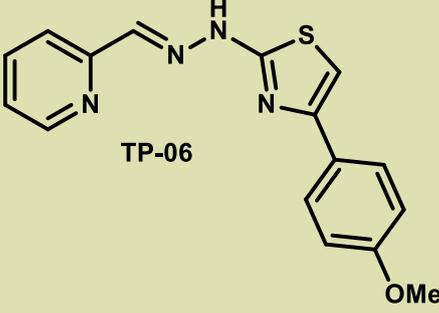
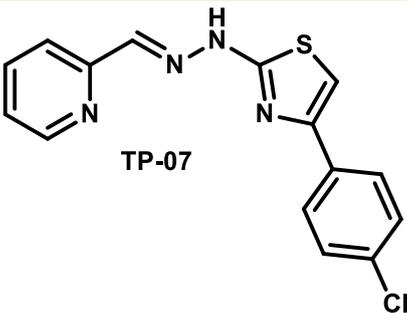
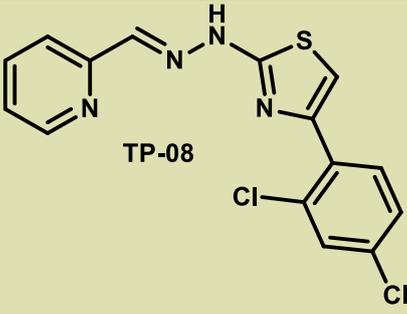
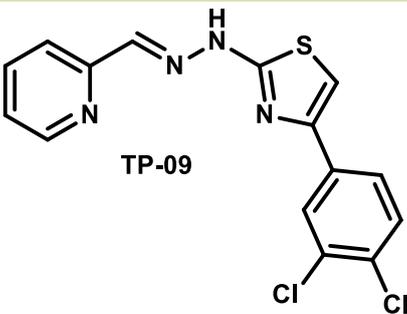
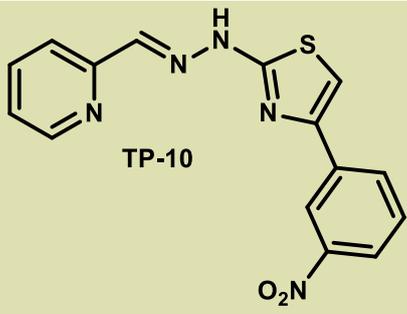
A revelação dos tiazóis piridínicos no comprimento de onda de 365nm é mais evidenciada do que nos tiazóis tiofenólicos, provavelmente devido à presença da piridina, exaltando a aromaticidade do anel base.

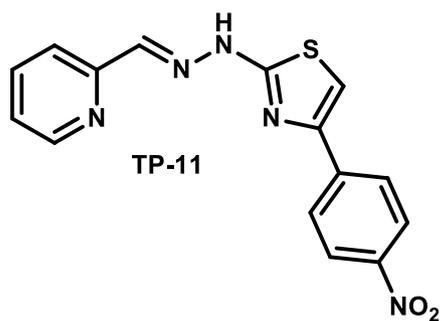
Na purificação para extração da tiossemicarbazona, utilizou-se água como solvente e, para a extração da acetofenona, utilizou-se uma mistura de tolueno/hexano, na proporção 7:3. Antes de chegar a estes meios como padrões na purificação foram feitos testes com outros sistemas.

As **Tabelas 6 e 7** ilustram as estruturas dos compostos obtidos nas séries TP e TAP:

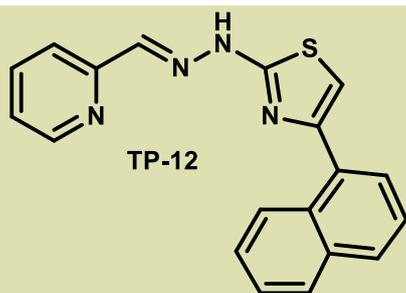
Tabela 6: Compostos obtidos da série TP.

Série TP		
Composto	Peso molecular	Fórmula molecular
 TP-01	280.08	C ₁₅ H ₁₂ N ₄ S
 TP-02	294.09	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ S
 TP-03	372.00	C ₁₆ H ₁₃ BrN ₄ S
 TP-04	357.99	C ₁₅ H ₁₁ BrN ₄ S
 TP-05	298.07	C ₁₅ H ₁₁ FN ₄ S

 <p>TP-06</p>	310.09	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ OS
 <p>TP-07</p>	314.04	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₄ S
 <p>TP-08</p>	348.00	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₄ S
 <p>TP-09</p>	348.00	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₄ S
 <p>TP-10</p>	325.06	C ₁₅ H ₁₁ N ₅ O ₂ S



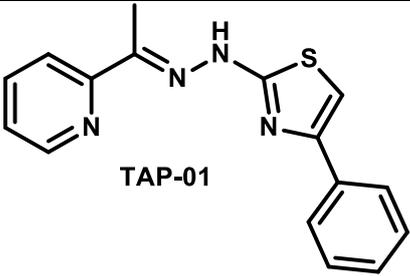
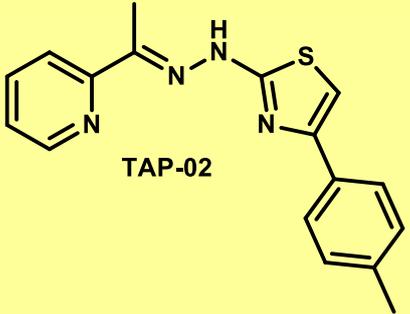
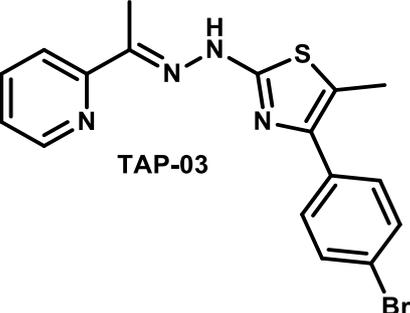
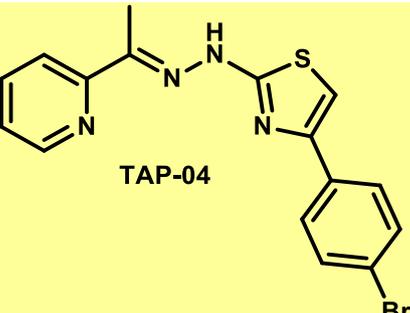
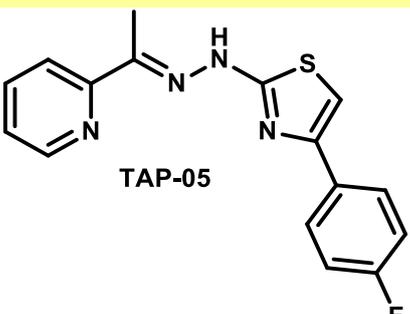
325.06

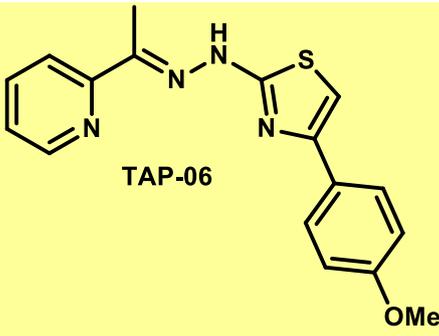
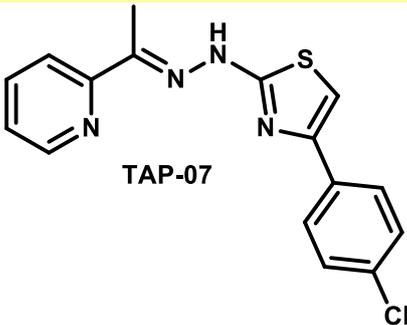
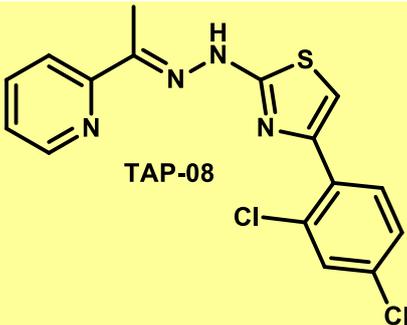
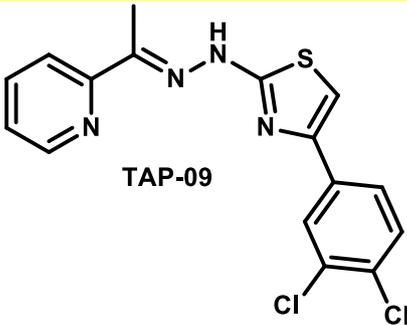
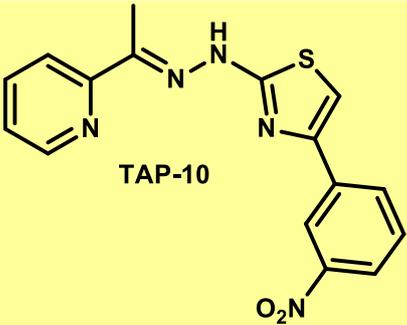
 $C_{15}H_{11}N_5O_2S$ 

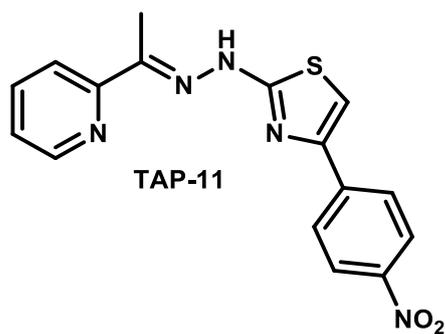
330.09

 $C_{19}H_{14}N_4S$

Tabela 7: Compostos obtidos da série TAP.

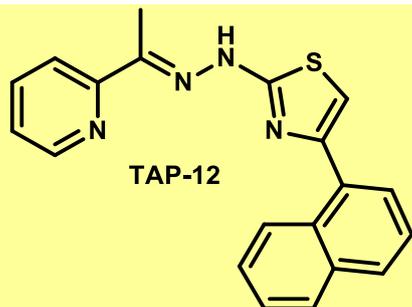
Composto	Série TAP	Peso molecular	Fórmula molecular
 TAP-01		294.09	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ S
 TAP-02		308.10	C ₁₇ H ₁₆ N ₄ S
 TAP-03		386.01	C ₁₇ H ₁₅ BrN ₄ S
 TAP-04		372.00	C ₁₆ H ₁₃ BrN ₄ S
 TAP-05		312.08	C ₁₆ H ₁₃ FN ₄ S

 <p>TAP-06</p>	324.10	$C_{17}H_{16}N_4OS$
 <p>TAP-07</p>	328.05	$C_{16}H_{13}ClN_4S$
 <p>TAP-08</p>	362.01	$C_{16}H_{12}Cl_2N_4S$
 <p>TAP-09</p>	362.02	$C_{16}H_{13}Cl_2N_4S$
 <p>TAP-10</p>	339.08	$C_{16}H_{13}N_5O_2S$



TAP-11

339.08

 $C_{16}H_{13}N_5O_2S$ 

TAP-12

344.11

 $C_{20}H_{16}N_4S$

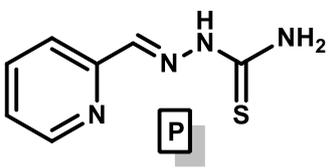
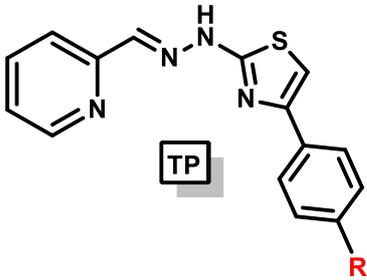
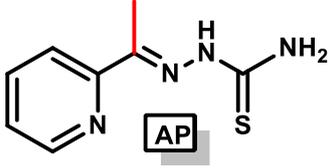
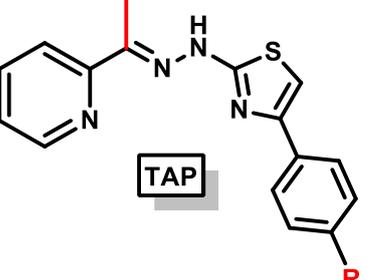
8.2 Avaliação farmacológica das tiazopiridinas

Com o objetivo de identificar o mecanismo de ação dos compostos (**TP-01 a 12**) e (**TAP-01 a 12**) no *T. cruzi*, a inibição da atividade catalítica da cruzaina pelos compostos foi determinada. Este ensaio é fluorométrico e baseado na competição de substratos pelo sítio catalítico da enzima¹¹⁶. A incubação da cruzaina com o peptídeo ZFR-AMC resulta em clivagem deste peptídeo, produzindo 4-metilcumarina que possui fluorescência diferente do ZFR-AMC. Compostos com afinidade pela cruzaina competem com o peptídeo ZFR-AMC pelo sítio catalítico, diminuindo assim a quantidade de 4-metilcumarina formada¹¹⁶. Neste ensaio, a inibição da atividade catalítica da cruzaina se reflete na capacidade de um composto em impedir a ligação da enzima pelo seu substrato ZFR-AMC. Devido ao grande número de compostos, os compostos (**TP-01 a 12**) e (**TAP-01 a 12**) foram testados em uma única concentração (de **100 ou 20 µM**), e após a triagem dos mais ativos, os valores de CI_{50} (**µM**) foram calculados.

8.2.1 Avaliação, *in vitro*, das propriedades tripanocidas

A **Tabela 8** apresenta todos os resultados da avaliação farmacológica, *in vitro*, para as séries TP e TAP. Ao longo do texto as tabelas irão se repetir para facilitar a interpretação e entendimento dos resultados obtidos.

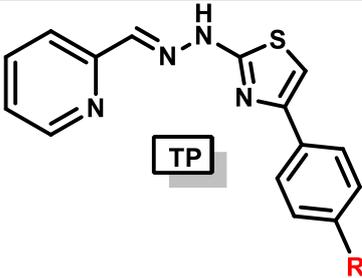
Tabela 8: Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para as tiazopiridinas (TP 1-12 e TAP 1-12).

Comp.	Subs.	<i>T. cruzi</i> , Cl_{50} (μ M), cepa Y		esplenócitos BALB/c (μ g/mL) ^[c]	% inibição cruzaina \pm DP ^[d]
		tripomastigota ^[a]	epimastigota ^[b]		
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>P</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>TP</p> </div> </div>					
P	---	17.26	119.46	ND	3 \pm 3
TP-01	H	5.39	8.28	<1	10 \pm 1*
TP-02	4-Me	16.76	3.77	<1	24 \pm 5
TP-03	4-Br-Prop.	ND ^[e]	2.20	<1	18 \pm 2
TP-04	4-Br	2.60	18.32	<1	99,8 \pm 0,3
TP-05	4-F	72.73	3.52	<1	16 \pm 2**
TP-06	4-OMe	4.81	5.61	<1	21 \pm 2*
TP-07	4-Cl	3.85	3.85	<1	6 \pm 3*
TP-08	2,4-Cl	1.24	4.83	<1	7 \pm 2*
TP-09	3,4-Cl	1.24	3.97	<1	12 \pm 1
TP-10	3-NO ₂	74.20	2.46	<1	89 \pm 1
TP-11	4-NO ₂	152.95	4.40	<1	9 \pm 4
TP-12	2-Naf	2.09	8.27	<1	0,7 \pm 1,5
Bdz (1)	---	6.2	6.6	25	ND ^[e]
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>AP</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>TAP</p> </div> </div>					
AP	---	2.83	4.53	ND ^[e]	17 \pm 3
TAP-01	H	ND ^[e]	2.75	<1	99,3 \pm 0,5
TAP-02	4-Me	ND ^[e]	2.53	<1	98 \pm 1
TAP-03	4-Br-Prop.	ND ^[e]	2.04	<1	34 \pm 4
TAP-04	4-Br	ND ^[e]	2.28	<1	-4 \pm 6
TAP-05	4-F	ND ^[e]	2.81	<1	99,4 \pm 0,7
TAP-06	4-OMe	2.13	14.72	<1	99 \pm 1
TAP-07	4-Cl	2.10	2.53	<1	-4 \pm 4
TAP-08	2,4-Cl	1.91	14.88	<1	97 \pm 1
TAP-09	3,4-Cl	3.04	5.02	<1	99 \pm 1
TAP-10	3-NO ₂	3.95	2.44	<1	21 \pm 2*
TAP-11	4-NO ₂	36.66	5.24	<1	22 \pm 6*
TAP-12	2-Naf	2.01	3.98	<1	99,9 \pm 0,2
Bdz (1)	---	6.2	6.6	25	ND ^[e]

^[a] Após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[b] Após 11 dias de incubação na presença dos compostos. ^[c] Maior concentração atóxica. Valores determinados após 24 horas de incubação na presença dos compostos ^[d]. Porcentagem de inibição após 10 minutos de incubação dos compostos (20 μ M) com a enzima, Cl_{50} com valores de desvio padrão $< \pm 10$ %. ^[e] ND, não determinado, inibição de 100% em todas concentrações testadas.

Dentre todos os compostos da série TP, os mais potentes foram o TP-08 e TP-09, sendo equipotentes (**1.24 μM**). Deve-se ressaltar que os compostos TP-04, 06, 07, 08, 09 e 12 (**2.60, 4.81, 3.85, 1.24, 1.24 e 2.09 μM , respectivamente**) apresentaram atividade tripanocida superior ao Bdz (**6.2 μM**) (Tabela 9), entretanto, demonstraram uma alta citotoxicidade, prejudicando a viabilidade celular.

Tabela 9: Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para as tiazopiridinas (TP 1-12).

Comp.	Subs.	<i>T. cruzi</i> , Cl_{50} (μM), cepa Y		Espenócitos BALB/c ($\mu\text{g/mL}$) ^[c]	
		tripomastigota ^[a]	epimastigota ^[b]		
					
TP-01	H	5.39	8.28	<1	
TP-02	4-Me	16.76	3.77	<1	
TP-03	4-Br-Prop.	ND ^[d]	2.20	<1	
TP-04	4-Br	2.60	18.32	<1	
TP-05	4-F	72.73	3.52	<1	
TP-06	4-OMe	4.81	5.61	<1	
TP-07	4-Cl	3.85	3.85	<1	
TP-08	2,4-Cl	1.24	4.83	<1	
TP-09	3,4-Cl	1.24	3.97	<1	
TP-10	3-NO ₂	74.20	2.46	<1	
TP-11	4-NO ₂	152.95	4.40	<1	
TP-12	2-Naf	2.09	8.27	<1	
Bdz (1)	---	6.2	6.6	25	

^[a] Após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[b] Após 11 dias de incubação na presença dos compostos. ^[c] Maior concentração atóxica. Valores determinados após 24 horas de incubação na presença dos compostos ^[d] ND, não determinado, inibição de 100% em todas concentrações testadas.

Para a série TP, iniciamos a análise comparando-se o composto-base, sem substituinte (TP-01, **5.39 μM**), com os compostos *para* substituídos. Observa-se que dos compostos *para* substituídos (**7 no total**), os compostos TP-04 (**Br**), TP-06 (**OMe**) e TP-07 (**Cl**) apresentaram melhora na atividade tripanocida (**Cl_{50} de 2.60, 4.81 e 3.85 μM respectivamente**), Sendo os compostos TP-02 (**Me**), TP-05 (**F**) e TP-11 (**NO₂**) menos potentes que o TP-01, com Cl_{50} de 16.76, 72.73 e 152.95 μM respectivamente.

Para os compostos clorados (**TP-07, 08 e 09**) observa-se que os compostos diclorados (**TP-08 e TP-09; 2,4-Cl e 3,4-Cl respectivamente**), apresentaram equipotência tripanocida, sendo ambos 3 vezes mais potente que o composto monoclorado (**TP-07, 1.24 contra 3.85 μM**).

Comparando-se os compostos bromados (**TP-03 e TP-04**), observamos que para a forma epimastigota, a metila localizada no tiazol do composto TP-03 incrementou a atividade tripanocida em até 8 vezes mais (**2.20 μM contra 18.32 μM**).

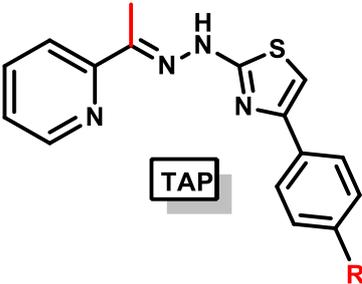
Partindo do princípio de que a melhora na lipofilia incrementa diretamente a atividade tripanocida, podemos analisar a comparação do composto TP-12 (**2-Naf.**) com o composto sem substituinte (**TP-01**), no que diferem pela maior lipofilia e volume do composto TP-12. Observa-se que o composto TP-12 foi mais ativo (**2.09 μM contra 5.39 μM**), confirmando a importância do incremento do volume e lipofilia para esta classe química.

Acerca dos compostos nitrados (**TP-10 e 11**), observa-se que o composto *meta* substituído (**TP-10, 74.20 μM**) foi 2 vezes mais potente que o composto *para* substituído (**TP-11, 152.95 μM**), demonstrando a importância de substituições na posição *meta* do fenil tiazol.

Para a série TAP, todos os compostos se destacam pela sua alta atividade tripanocida, sendo mais potentes que a droga de referência, o Bdz (**1**). Somente o composto TAP-11 (**4-NO₂, 36.66 μM**) foi menos eficaz que o Bdz (**1**), contrastando com o composto TAP-08, que demonstrou ser o mais ativo da série com CI_{50} de 1.91 μM .

Para esta série, compararam-se inicialmente os compostos *para* substituídos de modo a avaliar a importância de seus substituintes. Dentre os compostos com a atividade tripanocida determinada para tripomastigotas, observou-se que o composto mais potente o TAP-07 (**Cl**), seguido pelos compostos TAP-06 (**4-OMe, 14.72 μM**) e TAP-11 (**4-NO₂, 36.66 μM**).

Tabela 10: Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para as tiazopiridinas (TAP 1-12).

Comp.	Subs.	<i>T. cruzi</i> , CI ₅₀ (µM), cepa Y		Esplenócitos BALB/c (µg/mL) ^[c]
		tripomastigota ^[a]	epimastigota ^[b]	
				
TAP-01	H	ND ^[d]	2.75	<1
TAP-02	4-Me	ND ^[d]	2.53	<1
TAP-03	4-Br-Prop.	ND ^[d]	2.04	<1
TAP-04	4-Br	ND ^[d]	2.28	<1
TAP-05	4-F	ND ^[d]	2.81	<1
TAP-06	4-OMe	2.13	1.47	<1
TAP-07	4-Cl	2.10	2.53	<1
TAP-08	2,4-Cl	1.91	14.88	<1
TAP-09	3,4-Cl	3.04	5.02	<1
TAP-10	3-NO ₂	3.95	2.44	<1
TAP-11	4-NO ₂	36.66	5.24	<1
TAP-12	2-Naf	2.01	3.98	<1
Bdz (1)	---	6.2	6.6	25

^[a] Após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[b] Após 11 dias de incubação na presença dos compostos. ^[c] Maior concentração atóxica. Valores determinados após 24 horas de incubação na presença dos compostos ^[d] ND, não determinado, inibição de 100% em todas concentrações testadas.

Para os derivados diclorados TAP-08 (**2,4-Cl**) e TAP-09 (**3,4-Cl**), observou-se uma pequena diferença na atividade tripanocida, sendo o composto TAP-08 um pouco mais ativo que o composto TAP-09 (**1.91 µM contra 3.04 µM**) (Tabela 10), denotando assim a importância da posição do substituinte na atividade tripanocida.

Já para os nitrocompostos, observou-se que o composto *meta* substituído (TAP-10) é nove vezes mais potente que o composto *para* substituído (TAP-11) (**3.95 µM contra 36.66 µM**).

Mais uma vez constatou-se a alta citotoxicidade para os derivados tiazopiridínicos, possivelmente devido a presença do anel piridina, já que demonstramos que o grupamento tiazol não é tóxico e que o mesmo melhorou a viabilidade celular das tiossemicarbazonas através da funcionalização da tiocarbonila a tiazol, conferindo assim a alta citotoxicidade observada nas séries TP e TAP ao anel piridínico.

De acordo com a **Tabela 11**, podemos observar que a presença da metilhidrazona na série TAP incrementou a atividade antichagásica tanto para a forma tripomastigota como para a epimastigota. A melhora observada é mínima, na maioria dos casos, sem mudanças na viabilidade celular, que continua sendo a grande problemática desta série.

Tabela 11: Comparação da avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas das séries TP e TAP.

Comp.	Subs.	<i>T. cruzi</i> , CI ₅₀ (µM), cepa Y		esplenócitos BALB/c (µg/mL) ^[c]
		tripomastigota ^[a]	epimastigota ^[b]	
TP-01	H	5.39	8.28	<1
TAP-01	H	ND ^[d]	2.83	<1
TP-02	4-Me	16.76	3.77	<1
TAP-02	4-Me	ND ^[d]	2.53	<1
TP-03	4-Br-Prop.	ND ^[d]	2.20	<1
TAP-03	4-Br-Prop.	ND ^[d]	2.04	<1
TP-04	4-Br	2.60	18.32	<1
TAP-04	4-Br	ND ^[d]	2.28	<1
TP-05	4-F	72.73	3.52	<1
TAP-05	4-F	ND ^[d]	2.81	<1
TP-06	4-OMe	4.81	5.61	<1
TAP-06	4-OMe	2.13	14.72	<1
TP-07	4-Cl	3.85	3.85	<1
TAP-07	4-Cl	2.10	2.53	<1
TP-08	2,4-Cl	1.24	4.83	<1
TAP-08	2,4-Cl	1.91	14.89	<1
TP-09	3,4-Cl	1.24	3.97	<1
TAP-09	3,4-Cl	3.04	5.03	<1
TP-10	3-NO ₂	74.20	2.46	<1
TAP-10	3-NO ₂	3.95	2.45	<1
TP-11	4-NO ₂	152.95	4.40	<1
TAP-11	4-NO ₂	36.66	5.25	<1
TP-12	2-Naf.	2.09	8.27	<1
TAP-12	2-Naf.	2.01	3.98	<1
Bdz (1)	---	6.2	6.6	25

^[a] Após 24 horas de incubação na presença dos compostos. ^[b] Após 11 dias de incubação na presença dos compostos. ^[c] Maior concentração atóxica. Valores determinados após 24 horas de incubação na presença dos compostos ^[d] ND, não determinado, inibição de 100% em todas concentrações testadas.

Dos 26 compostos obtidos nas séries TP e TAP, 20 compostos demonstraram ser agentes tripanocidas mais potentes que o Bdz (1), a droga referencial para a doença de Chagas. Este resultado é bastante animador, pois demonstra que o planejamento de drogas antichagásicas baseados nos núcleos tiossemicarbazona, tiazol e piridina são realmente eficazes. A inserção do anel piridina aumentou notavelmente a atividade tripanocida, com a ressalva de aumento na citotoxicidade em esplenócitos.

Dentre todos os compostos das séries TP e TAP, os que mais apresentaram discrepância de potencialidade foram TP/TAP-10 (**3-NO₂**) e TP/TAP-11 (**4-NO₂**), sendo o composto TAP-10 dezoito vezes mais potente que o composto TP-10 (**3.95 µM contra 74.20 µM**) e o composto TAP-11 quatro vezes mais potente que o composto TP-11 (**36.66 µM contra 152.95 µM**).

De todos os substituintes, os que apresentaram maior potencial tripanocida foram os compostos diclorados nas posições 2 e 4 (**TP/TAP-08, 1.24 e 1.91 µM respectivamente**).

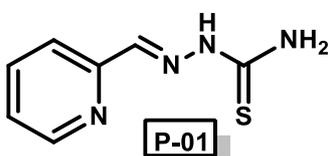
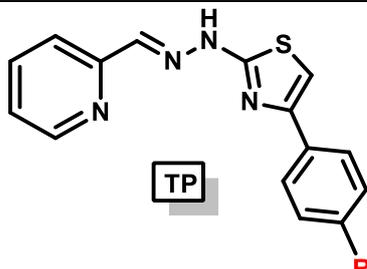
8.2.2 Inibição da atividade catalítica da cruzaina

A **Tabela 12** apresenta os dados de inibição da atividade catalítica da cruzaina do *T. cruzi* para a série TP. O protocolo experimental descrito por Ferreira e col.¹¹⁶ foi utilizado neste ensaio com a enzima. Inicialmente, todos os compostos foram testados na concentração de 20 ou 100 µM.

Desta série, o composto mais ativo foi o TP-04, que demonstrou uma boa atividade inibitória da enzima (**99,8 ± 0,3**), inibindo-a **quase que por completo**, sendo seguido pelo composto TP-10 (**3-NO₂**), que apresentou atividade inibitória de 89 ± 1%, sendo considerado um ótimo índice de inibição.

Comparando-se os compostos substituídos na posição *para*, observa-se que o composto substituído com bromo (**TP-04, 99,8 ± 0,3%**) foi mais ativo que os compostos substituídos por cloro (**TP-07, 18 ± 2%**), metoxi (**TP-06, 21 ± 2%**), metil (**TP-02, 24 ± 5%**), flúor (**TP-05, 16 ± 2%**), nitro (**TP-11, 9 ± 4%**) e até pelo bromo propiônico (**TP-03, 18 ± 2%**), que possui uma metila no anel tiazólico, diferença que incrementou a atividade tripanocida frente a cepas Y para a forma epimastigota.

Tabela 12: porcentagem de inibição da atividade catalítica da cruzaina para a série TP.

Composto	Substituinte	% inibição cruzaina \pm DP
		
		
P-01		3 \pm 3
TP-01	H	10 \pm 1*
TP-02	4-Me	24 \pm 5
TP-03	4-Br-prop.	18 \pm 2
TP-04	4-Br	99,8 \pm 0,3
TP-05	4-F	16 \pm 2**
TP-06	4-OMe	21 \pm 2*
TP-07	4-Cl	6 \pm 3*
TP-08	2,4-Cl	7 \pm 2*
TP-09	3,4-Cl	12 \pm 1
TP-10	3-NO ₂	89 \pm 1
TP-11	4-NO ₂	9 \pm 4
TP-12	2-Naf.	0,7 \pm 1,5

Inibição da enzima cruzaina do *T. cruzi*. Valores de Cl_{50} (μ M) (\pm desvio padrão) calculados após 10 minutos de incubação com a enzima. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0,05$.

Acerca dos compostos substituídos com cloro, observa-se que o dissubstituído nas posições 3 e 4 (TP-09, 12 \pm 1%) apresentou eficácia 2 vezes mais que os substituídos nas posições 4 (TP-07, 6 \pm 3%) e 2,4 (TP-08, 7 \pm 2%). Isto demonstra a importância de investigar a importância da orientação das moléculas no sitio ativo, pois a diferença estrutural é mínima, com diferenças de potencialidade tripanocida evidentes, o que motiva a investigação de “*docking*” dos compostos na enzima para um melhor entendimento no mecanismo de ação.

A simples mudança da posição do grupo nitro da posição *para* (TP-11) a *meta* (TP-10) foi suficiente para incrementar em quase **dez vezes mais** a atividade inibitória (89 \pm 1% contra 9 \pm 4%).

Seguindo os mesmos parâmetros adotados para a análise de REA da série TP, comparamos inicialmente o precursor AP-01 com o tiazol sem substituinte (**TAP-01**), no qual se observa um notável incremento na atividade tripanocida na escala de 5:1 (**17 ± 3% contra 99.3 ± 0.5%**). Quando observamos os números, vê-se que o composto AP-01 apresentou uma modesta atividade inibitória na cruzaina, enquanto que o derivado tiazólico apresentou inibição quase que absoluta, demonstrando a importância da ciclização da tiocarbonila para a atividade tripanocida. Extrapolando-se a análise ao comparar com a série TP (**Tabela 14**), observa-se que a metil hidrazona incrementa consideravelmente a inibição enzimática, confirmado pelos precursores (**P-01 e AP-01**) e seus respectivos tiazóis sem substituintes (**TP-01 e TAP-01**) nas escalas de **1:6** (**17 ± 3% contra 3 ± 3%**) e **1:10** (**99.3 ± 0.5% contra 10 ± 1%**) respectivamente.

Na **Tabela 13** podemos verificar que sete dos doze compostos da série TAP foram hábeis em inibir a cruzaina com percentuais de inibição entre 97 a 99,9%.

Tabela 13: Porcentagem de inibição da atividade catalítica da cruzaina para a série TAP.

Composto	Substituinte	% inibição cruzaina ±DP ^[d]
AP-01		17 ± 3
TAP-01	H	99,3 ± 0,5
TAP-02	4-Me	98 ± 1
TAP-03	4-Br-prop.	34 ± 4
TAP-04	4-Br	-4 ± 6
TAP-05	4-F	99,4 ± 0,7
TAP-06	4-OMe	99 ± 1
TAP-07	4-Cl	-4 ± 4
TAP-08	2,4-Cl	97 ± 1
TAP-09	3,4-Cl	99 ± 1
TAP-10	3-NO ₂	21 ± 2*
TAP-11	4-NO ₂	22 ± 6*
TAP-12	2-Naf.	99,9 ± 0,2

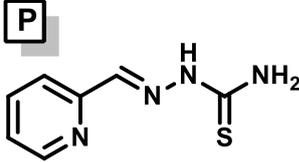
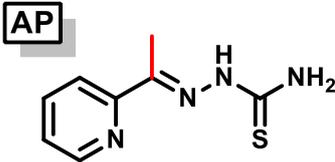
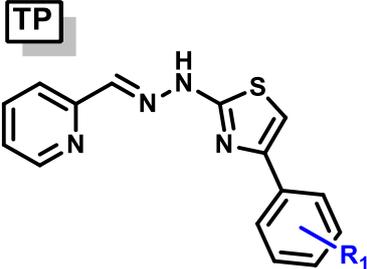
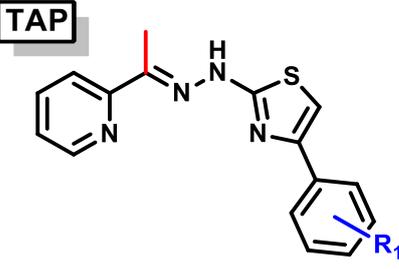
Inibição da enzima cruzaina do *T. cruzi*. Valores de CI_{50} (μM) (\pm desvio padrão) calculados após 10 minutos de incubação com a enzima. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0,05$.

Dentre os compostos substituídos na posição *para*, observa-se uma equivalência no potencial inibitório entre os compostos TAP-01 (**H, 99,3± 0,5%**), TAP-06 (**OMe, 99± 1%**), TAP-02 (**Me, 98± 1%**) e TAP-05 (**F, 99,4± 0,7%**), potencial este capaz de inibir 100% da atividade enzimática da cruzaina. Os compostos *para* substituídos com bromo propiônico (**TAP-03**) e nitro (**TAP-11**) apresentaram atividade modica de 34 ± 4 e 22 ± 6 respectivamente. Já os compostos *para* substituídos com bromo (**TAP-04**) e cloro (**TAP-07**) foram inativos. Para os compostos substituídos com cloro (**TAP 07, 08 e 09**), observa-se que os dissubstituídos apresentaram um incremento de quase 100% na inibição enzimática quando comparado com o composto monosubstituído. Dos compostos dissubstituídos, ambos apresentaram equipotência na inibição da cruzaina, demonstrando assim que os compostos clorados devem possuir dissubstituição para serem ativos na inibição enzimática.

Comparando-se a mudança da posição do grupo dos compostos nitroderivados TAP-10 (**meta**) e TAP-11 (**para**) não se observa mudança significativa na inibição enzimática, os quais exibiram fraca atividade inibitória. Desta série, o composto TAP-12 (**2-Naf.**) foi considerado o mais potente (**99,8± 0,2%**), sendo equiparado com os compostos TAP 01, 02, 05, 06, 08 e 09. Isto demonstra que a série TAP é detentora de excelente atividade na cruzaina, motivando-nos a investigação dos compostos mais ativos no sítio ativo da enzima, através de estudos de “docking”. Na **Tabela 14** podemos comparar o efeito inibitório enzimático na cruzaina, da metila ligada a hidrazona, presente na série TAP, com os compostos sem a metil hidrazona, da série TP, observando-se que:

A maioria dos compostos da série TAP apresentou atividade inibitória na cruzaina maior que os compostos da série TP, inclusive nos percussores (**P e AP**). Estes resultados demonstram a importância da metilhidrazona para a atividade antichagásica. De fato a presença de metilas na estrutura química tende a melhorar a lipossolubilidade, com isso a biodisponibilidade e conseguinte incremento na atividade. Porém ao analisarmos a diferença entre os compostos TAP-03 e TAP-04, ambos para substituídos com bromo, diferindo somente na presença da metila no anel tiazólico para o composto TAP-03, observa-se novamente um incremento na inibição enzimática, com ressalva para a série TP, onde a presença de uma metila extra diminuiu a inibição da cruzaina.

Tabela 14: Comparação da taxa de inibição da enzima cruzaina do *T. cruzi*. para as séries TP e TAP.

composto	R ₁	% de inibição da cruzaina (compostos 20 μM) ^{[a],[b]}	Cl ₅₀ ±DP (μM) na cruzaina ^{[a],[c]}
P			
AP			
P		3 ± 3	NT
AP		17 ± 3	NT
TP			
TAP			
TP-01	H	10 ± 1*	17.04
TAP-01		99,3 ± 0,5	1.57
TP-02	4-Me	24 ± 5	ND
TAP-02		98 ± 1	0.30
TP-03	4-Br-prop.	18 ± 2	ND
TAP-03		34 ± 4	ND
TP-04	4-Br	99,8 ± 0,3	ND
TAP-04		-4 ± 6	ND
TP-05	4-F	16 ± 2**	ND
TAP-05		99,4 ± 0,7	0.58
TP-06	4-OMe	21 ± 2*	ND
TAP-06		99 ± 1	0.09
TP-07	4-Cl	6 ± 3*	ND
TAP-07		-4 ± 4	ND
TP-08	2,4-Cl	7 ± 2*	ND
TAP-08		97 ± 1	8.51
TP-09	3,4-Cl	12 ± 1	ND
TAP-09		99 ± 1	11.84
TP-10	3-NO ₂	89 ± 1	1.61
TAP-10		21 ± 2*	ND
TP-11	4-NO ₂	9 ± 4	ND
TAP-11		22 ± 6*	ND
TP-12	2-Naf	0,7 ± 1,5	ND
TAP-12		99,9 ± 0,2	0.19

^[a]Após 10 minutos de incubação com a enzima cruzaina. ^[b]Cada composto foi testado na concentração de 20 μM, em triplicata. ^[c]Valores estimados usando ao menos oito concentrações diferentes. ND, não determinado. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

8.3 Análises espectroscópicas

Todas as análises espectroscópicas deste trabalho foram realizadas no Departamento de Química Fundamental, DQF-UFPE, utilizando-se dos seguintes equipamentos:

Para os espectros de ^1H e ^{13}C , utilizou-se o equipamento Varian modelo Unity Plus (**300 ou 400 Mhz para ^1H e 100 Mhz para ^{13}C**) sempre utilizando $\text{DMSO-}d_6$ como solvente e TMS como padrão interno;

Para os espectros de IV, utilizou-se pastilhas de KBr no instrumento Brucker modelo IFS 66;

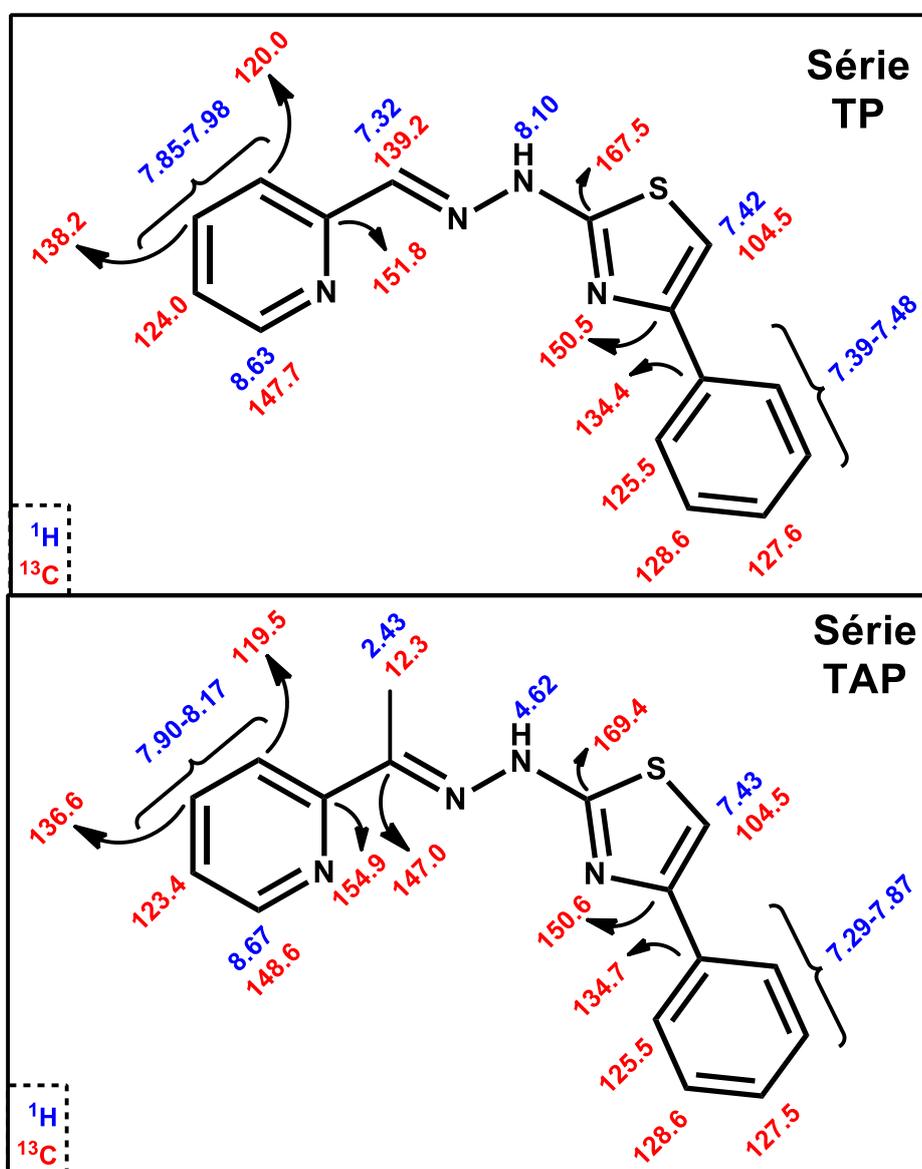
Para a obtenção dos espectros, todos os compostos foram pesados (**30 mg para ^{13}C e ^1H , e 10 mg para IV e EMAR-ESI**) e enviados com seus respectivos solventes (**$\text{DMSO-}d_6$**).

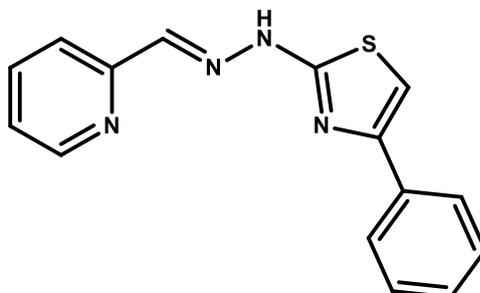
Através da observação dos dados espectroscópicos das séries TP / TAP, podemos citar:

- A ausência de bandas de absorção entre 1670-1820 e 3380-4390, característicos de carbonila da cetona e aminas primárias, confirmam o consumo dos produtos de partida para a formação do tiazol.
- Nos espectros de ^1H -RMN, podemos observar:
- Ausência do singlete agudo em 4,5 ppm, típico de CH_2 ligado a halogênio, presente na acetofenona;
- Presença de singlete agudo em 7,28, indicando presença do CH tiazólico, pois possui características de aromático;
- Ausência de pico em 31,6, referente ao carbono alfa do bromo ($\text{CH}_2\text{-Br}$), da bromoacetofenona, sendo convertido a 105;
- Ausência do pico em 192 (carbonila da acetofenona), sendo convertido a 150.
- Conversão do pico em 178,5 (C=S) para 168 (C-S-tiazol);
- Nos espectros analisados, também foi observado na maioria dos compostos a presença de um pico largo em torno de 4,5-5,5 ppm, e ausência do pico do NH em 10,5-12 ppm, semelhante a obtenção dos tiazóis do capítulo 1.

- Como principais indícios da formação do anel tiazólico, podemos citar a ausência do pico da carbonila da cetona, bem como da tiocarbonila da tiossemicarbazona, em aprox. 190 ppm, sugestivo da formação do anel tiazólico;
- Mudança do pico de absorção em 180-185 para 165-170, indicativo da conversão do carbono da tiocarbonila, presente na tiossemicarbazida, para o carbono aromático do tiazol;
- Mudança do pico de absorção em 30-38 para 105-120, indicativo da conversão do carbono ligado a heteroátomo (carbono alfa da acetofenona) para carbono aromático do tiazol, sendo este o maior indicativo da formação do referido anel.

Figura 29: Principais sinais da série TP/TAP (TP-01 e TAP-01).



TP-01***N*-(2-metil-piridina)-*N*'-(feniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 86 %

P.F.: 170°C

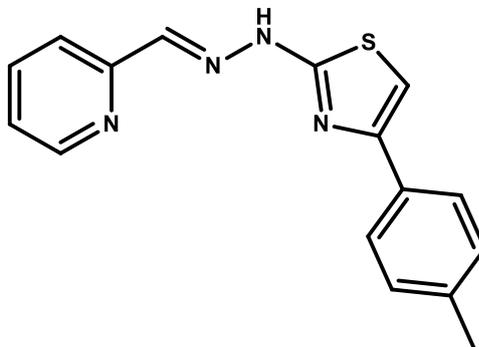
Rf: 0.46 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1553 (C=C), 1612 (C=N), 3066 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 4.48 (s, 1H, NH), 7.42 (s, 1H, S-CH), 7,31-7,48 (m, 5H, Ar), 7.85-7.98 (m, 3H, Ar), 8.10 (1H, CH), 8.63 (1H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 104.5 (S-CH), 120.0 (C-Ar), 124.0 (C-Ar), 125.5 (C-Ar), 127.6 (C-Ar), 128.7 (C-Ar), 139.2 (C-Ar), 147.7 (C-Ar), 150.6 (C-Ar), 151.8 (C=N), 167.5 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₂N₄S [M+H]⁺: 280.0783; encontrado 281.0842.

TP-02***N*-(2-metil-piridina)-*N'*-(*p*-toluiltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 79 %

P.F.: 197°C

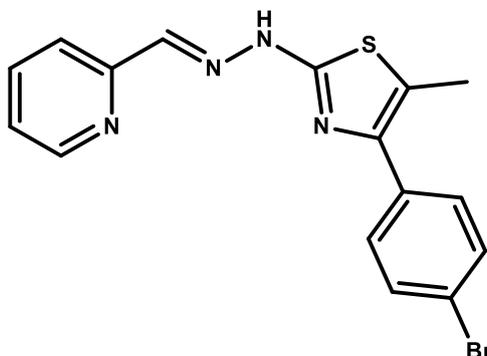
Rf: 0.48 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1554 (C=N), 1612 (C=N), 3154 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2,31 (s, 3H, CH₃), 7,37 (s, 1H, S-CH), 7,22-7,74 (m, 4H, Ar), 8,19-8,74 (m, 4H, Ar), 8.56 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 20.80 (CH₃), 104.00 (S-CH), 119.13 (C-Ar), 123.60 (C-Ar), 125.47 (C-Ar), 125.75 (C-Ar), 129.19 (C-Ar), 131.91 (C-Ar), 136.75 (C-Ar), 141.44 (C-Ar), 149.46 (Ar), 153.24 (C=N), 167.69 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₄N₄S [M+H]⁺: 294.0939; encontrado: 295.0991.

TP-03***N*-(2-metil-piridina)-*N'*-[5-metil-(*p*-bromofenil)tiazol-2-il]-hidrazina**

Rendimento: 58 %

P.F.: 202°C

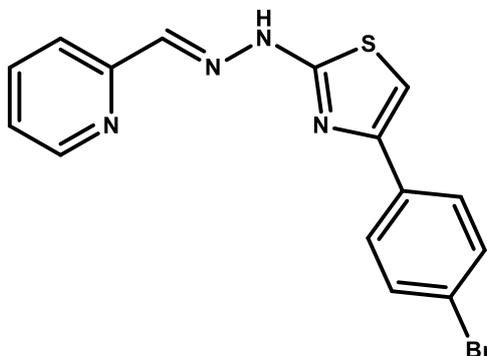
Rf: 0.48 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1554 (C=N), 1609 (C=N), 3152 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2,43 (s, 3H, CH₃), 7,91 (s, 1H, C=N), 7,41-7,60 (4m, H, Ar), 8,03-8,58 (4m, H, Ar), 13,05 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 12,28 (CH₃), 118,67 (S-CH), 119,62 (C-Ar), 120,29 (C-Ar), 123,77 (C-Ar), 129,82 (C-Ar), 131,27 (C-Ar), 134,13 (C-Ar), 138,01 (C-Ar), 139,65 (C-Ar), 148,41 (C=N), 167,05 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₃BrN₄S [M+H]⁺: 372.0044; encontrado: 373.0162.

TP-04***N*-(2-metil-piridina)-*N'*-(*p*-bromofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 74 %

P.F.: 205°C

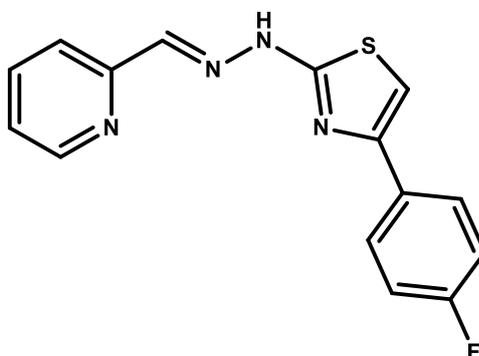
Rf: 0.81 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1569 (C=N), 1574 (C=N), 3151 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.48 (sl, 1H, NH), 7.28 (s, 1H, N=CH), 7.44 (s, 1H, S-CH), 7.65-7.94 (m, 4H, Ar), 8.12-8.64 (m, 4H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 105.59 (S-CH), 119.71 (C-Ar), 121.06 (C-Ar), 127.07 (C-Ar), 127.99 (C-Ar), 129.64 (C-Ar), 134.19 (C-Ar), 137.34 (C-Ar), 137.46 (C-Ar), 141.88 (C-Ar), 149.72 (C-Ar), 153.43 (C=N), 168.35 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₁BrN₄S [M+H]⁺: 357.9888; encontrado: 358.9972.

TP-05***N*-(2-metil-piridina)-*N'*-(*P*-fluorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 78 %

P.F.: 228°C

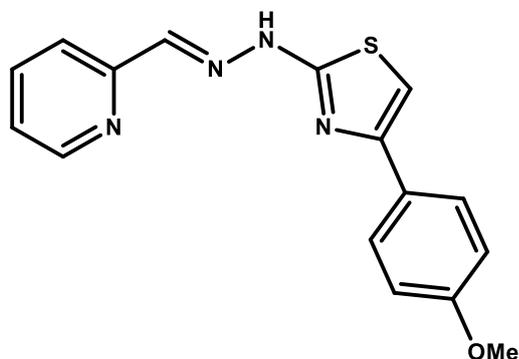
Rf: 0.76 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1552 (C=N), 1613 (C=N), 3029 (N-H)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 4.90 (sl, 1H, NH), 7.22-8.37 (m, 7H, Ar), 7.69 (s, 1H, S-CH), 8.17 (CH, 1H), 8.71 (d, 1H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 104.9 (S-CH), 115.4 (C-Ar), 121.3 (C-Ar), 124.6 (C-Ar), 127.5 (C-Ar), 127.6 (C-Ar), 130.9 (C-Ar), 136.3 (C-Ar), 141.5 (C-Ar), 145.5 (C-Ar), 149.9 (C=N), 160.1 (C-Ar), 163.3 (C-F), 167.1 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₁FN₄S [M+H]⁺: 298.0688; encontrado 299.0741.

TP-06***N*-(2-metil-piridina)-*N*'-(*p*-anisaltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 61 %

P.F.: 187°C

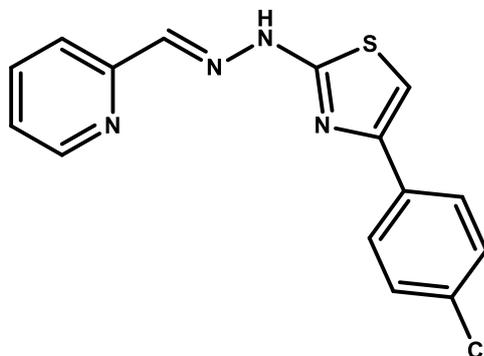
Rf: 0.44 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1587 (C=N), 1610 (C=N), 3069 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.77 (s, 3H, CH₃), 7.29 (s, 1H, S-CH), 6.96-7.78 (m, 5H, Ar), 8.16-8.71 (4m, H, Ar), 12.14 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 55.2 (CH₃), 103.3 (S-CH), 114.1 (C-Ar), 122.1 (C-Ar), 124.9 (C-Ar), 126.9 (C-Ar), 134.3 (C-Ar), 143.2 (C-Ar), 144.1 (C-Ar), 148.8 (C-Ar), 150.4 (C=N), 167.1 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₄FN₄OS [M+H]⁺: 310,0888; encontrado 311,0928.

TP-07***N*-(2-metil-piridina)-*N'*-(*p*-clorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 74 %

P.F.: 226°C

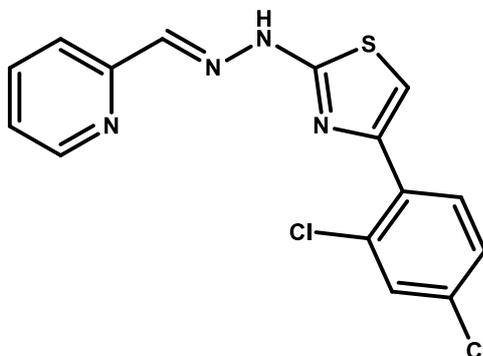
Rf: 0.69 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1552 (C=N), 1612 (C=N), 3030 (N-H).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 3.52 (sl, 1H, NH), 7.46 (s, 1H, S-CH), 7.38-7.48 (m, 4H, Ar), 7.86-7.90 (m, 3H, Ar), 8.08 (CH, 1H), 8.59 (d, 1H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 105.1 (S-CH), 119.4 (C-Ar), 123.7 (C-Ar), 127.2 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 132.0 (C-Ar), 133.4 (C-Ar), 137.2 (C-Ar), 141.2 (C-Ar), 149.1 (C-Ar), 149.4 (C-Ar), 152.8 (C=N), 167.8 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₁ClN₄S [M+H]⁺: 314,0393; encontrado 315,0441.

TP-08***N*-(2-metil-piridina)-*N'*-(2,4-diclorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 68 %

P.F.: 211°C

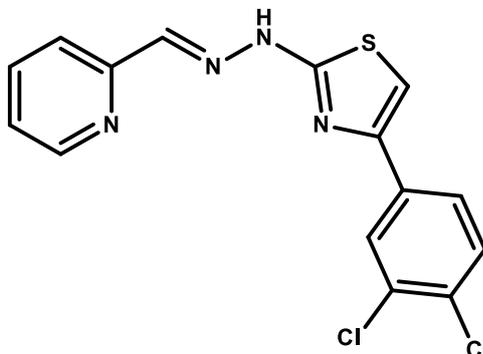
Rf: 0.70 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1551 (C=N), 1615 (C=N), 3058 (N-H)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7.52-7.91 (m, 5H, Ar), 8.15-8.82 (m, 4H, Ar), 12.18 (sl, 1H, NH).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 111.3 (S-CH), 121.9 (C-Ar), 125.3 (C-Ar), 126.3 (C-Ar), 128.1 (C-Ar), 130.2 (C-Ar), 132.1 (C-Ar), 132.7 (C-Ar), 135.8 (C-Ar), 142.6 (C-Ar), 144.2 (C-Ar), 146.5 (C-Ar), 149.8 (C=N pir), 166.9 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₀Cl₂N₄S [M+H]⁺: 348.0003; encontrado 349.0204.

TP-09***N*-(2-metil-piridina)-*N'*-(3,4-diclorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 59 %

P.F.: 217°C

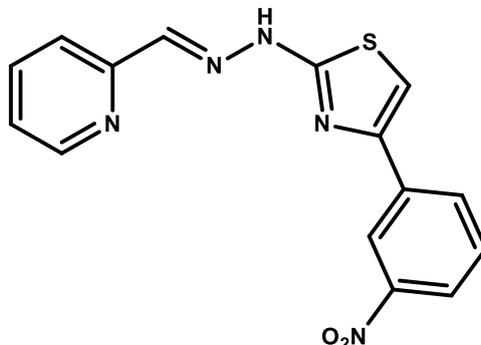
Rf: 0.71 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1563 (C=N), 1614 (C=N), 3154 (N-H)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 5,22 (sl,1H, NH), 7,54-7,88 (m, 5H, Ar), 8,15-8,71 (m, 4H, Ar).

RMN ¹³C (100,5 MHz, DMSO-*d*₆): 110.9 (S-CH), 121.6 (C-Ar), 124.9 (C-Ar), 127.5 (C-Ar), 129.7 (C-Ar), 131.7 (C-Cl), 132.2 (C-Ar), 132.7 (C-Cl), 134.6 (C-Ar), 142,74 (C-Ar), 143.9 (C-Ar), 146.0 (C-Ar), 149.0 (C=N pir), 166.4 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₀Cl₂N₄S [M+H]⁺: 348.0003; encontrado 349.0068.

TP-10***N*-(2-metil-piridina)-*N'*-(*m*-nitrofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 31 %

P.F.: 226°C

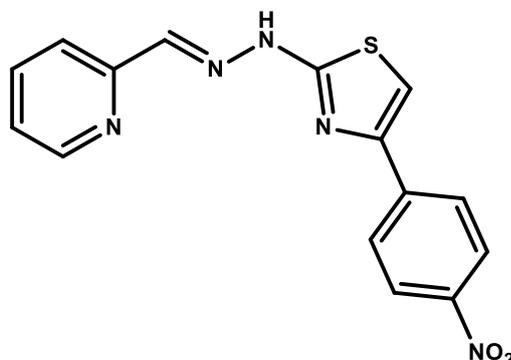
Rf: 0.57 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1355 (NO₂), 1560 (C=N), 1596 (C=N), 3413 (N-H)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 4.32 (sl, 1H, NH), 7.81 (s, 1H, S-CH), 7.72-7.74 (m, 3H, Ar), 8.15-8.74 (m, 6H, Ar).

RMN ¹³C (100,5 MHz, DMSO-*d*₆): 108.1 (S-CH), 119.9 (C-Ar), 121.9 (C-Ar), 125.0 (C-Ar), 130.3 (C-Ar), 131.6 (C-Ar), 135.0 (C-Ar), 135.7 (C-Ar), 142.8 (C-Ar), 144,39 (C-Ar), 148.2 (C-Ar), 148.8 (C-NO₂), 167.4 (C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₁N₅O₂S [M+H]⁺: 325.0633; encontrado 326.0680.

TP-11***N*-(2-metil-piridina)-*N'*-(*p*-nitrofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 42 %

P.F.: 220°C

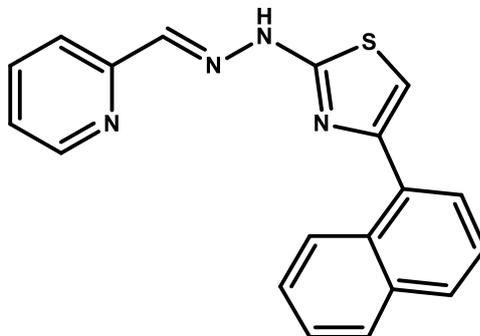
Rf: 0.60 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1338 (NO₂), 1539 (C=C), 1598 (C=N), 3148 (N-H)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 4.76 (sl, 1H, NH), 7.70 (s, 1H, S-CH), 7.78 (s, 1H, Ar), 8.12-8.73 (m, 8H, Ar).

RMN ¹³C (100,5 MHz, DMSO-*d*₆): 110.0 (S-CH), 121.6 (C-Ar), 124.1 (C-Ar), 124.8 (C-Ar), 125.7 (C-Ar), 126.4 (C-Ar), 135.9 (C-Ar), 140.2 (CH₂), 142.1 (C-Ar), 144,98 (C-Ar), 146.3 (C-Ar), 148.6 (C-Ar), 149.3 (C-NO₂), 167.6 (C=N) 168.9 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₅H₁₁N₅O₂S [M+H]⁺: 325.0633; encontrado 326.0696.

TP-12***N*-(2-metil-piridina)-*N'*-(α -naftiltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 87 %

P.F.: 216°C

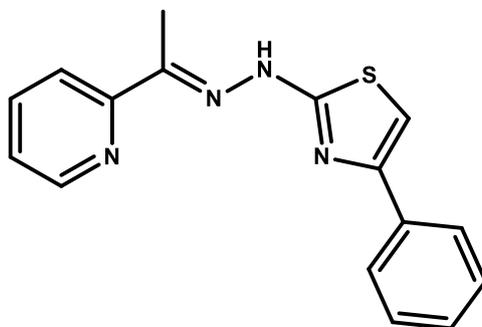
Rf: 0.72 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1540 (C=N), 1602 (C=N), 3112 (N-H)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 6.64 (sl, 1H, NH), 7.50-7.51 (m, 2H, Ar), 7.66 (s, 1H, S-CH), 7.81-8.01 (m, 5H, Ar), 8.19-8.79 (m, 5H, Ar).

RMN ¹³C (100,5 MHz, DMSO-*d*₆): 106.5 (S-CH), 122.5 (C-Ar), 123.8 (C-Ar), 124.2 (C-Ar), 125.2 (C-Ar), 126.1 (C-Ar), 126.4 (C-Ar), 127.5 (C-Ar), 128.1 (C-Ar), 128,21 (C-Ar), 131.5 (C-Ar), 132.5 (C-Ar), 132.7 (C-Ar), 133.0 (C-Ar), 142.8 (CH₂), 144.4 (C-Ar), 147.7 (C-Ar), 150.5 (C=N), 167.0 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₉H₁₄N₄S [M+H]⁺: 330.0939; encontrado 331.1007.

TAP-01***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N'*-(feniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 79 %

P.F.: 151°C

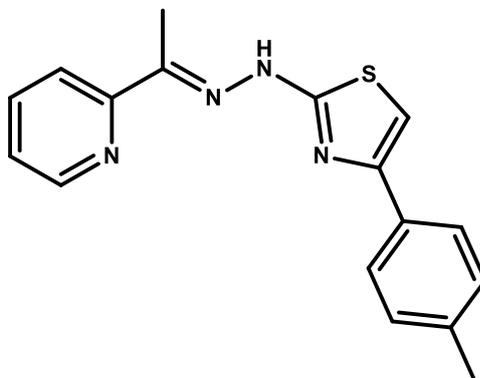
Rf: 0.64 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1575 (C=N), 1615 (C=N), 3058 (N-H)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.43 (s, 3H, CH₃), 4.62 (sl, 1H, NH), 7.32 (t, 1H, Ar), 7.43 (s, 1H, CH tiazol), 7.66 (t, 2H, Ar), 7.88 (d, 2H, Ar), 8.19 (t, 2H, Ar), 8.68 (d, 1H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 12.81 (CH₃), 104.4 (S-CH), 119.5 (C-Ar), 123.4 (C-Ar), 125.5 (C-Ar), 127.5 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 134.7 (C-Ar), 136.5 (C-Ar), 147.0 (C-Ar), 148.5 (C-Ar), 150.6 (C=Ar), 154.9 (C=N), 169.05 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₄N₄S [M+H]⁺: 294.0939; encontrado 295.0985.

TAP-02***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N'*-(*p*-toluiltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 68 %

P.F.: 143°C

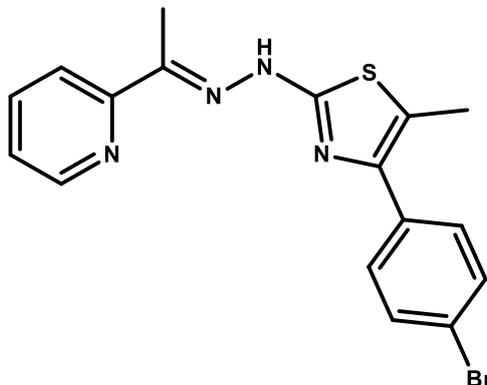
Rf: 0.78 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1496 (C=N), 1613 (C=N), 3058 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 7.32 (s, 1H, S-CH), 7.23-7.92 (m, 4H, Ar), 8.42-8.69 (m, 4H, Ar), 10.85 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 12.7 (CH₃), 20.7 (CH₃), 103.9 (S-CH), 121.7 (C-Ar), 124.4 (C-Ar), 125.8 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 136.9 (C-Ar), 141.0 (C-Ar), 143.6 (C-Ar), 145.3 (C-Ar), 148.3 (Ar), 151.7 (C=N), 168.9 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₇H₁₆N₄S [M+H]⁺: 308.1096; encontrado 309.1064.

TAP-03***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N*'-[5-metil-(*p*-bromofenil)tiazol-2-il]-hidrazina**

Rendimento: 52 %

P.F.: 198°C

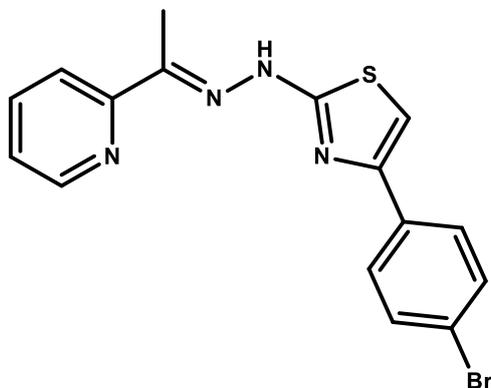
Rf: 0.70 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1565 (C=N), 1604 (C=N), 3164 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.45 (s, 3H, CH₃), 3.38 (s, 3H, CH₃), 7.04 (s, 1H, S-CH), 7.66-7.87 (m, 3H, Ar), 8.06-8.61 (m, 4H, Ar), 11.37 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 12.6 (CH₃), 12.7 (CH₃), 119.0 (S-CH), 119.9 (C-Ar), 120.6 (C-Ar), 123.7 (C-Ar), 130.3 (C-Ar), 131.7 (C-Ar), 134.8 (C-Ar), 136.9 (C-Ar), 155.4 (C-Ar), 149.0 (C=N), 166.0 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₇H₁₅BrN₄S [M+H]⁺: 386.0201; encontrado 387.0183.

TAP-04***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N'*-(*p*-bromofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 61 %

P.F.: 202°C

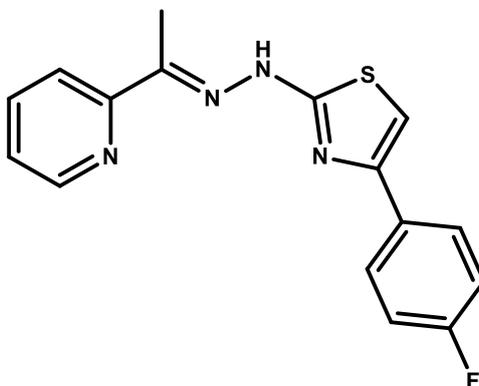
Rf: 0.68 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1567 (C=N), 1615 (C=N), 3029 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.39 (s, 3H, CH₃), 7.45 (s, 1H, S-CH), 7.34-7.84 (m, 6H, Ar), 8.02 (d, 1H, Ar), 8.54 (d, 1H, Ar), 10.32 (sl, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): 12.76 (CH₃), 105.86 (S-CH), 120.03 (C-Ar), 120.98 (C-Ar), 123.92 (C-Ar), 127.44 (C-Ar), 128.02 (C-Ar), 132.01 (C-Ar), 134.38 (C-Ar), 137.06 (C-Ar), 147.59 (C-Ar), 149.00 (C-Ar), 155.26 (C=N), 169.96 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₃BrN₄S [M+H]⁺: 372.0044; encontrado 373.0102.

TAP-05***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N'*-(*P*-fluorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 73 %

P.F.: 209°C

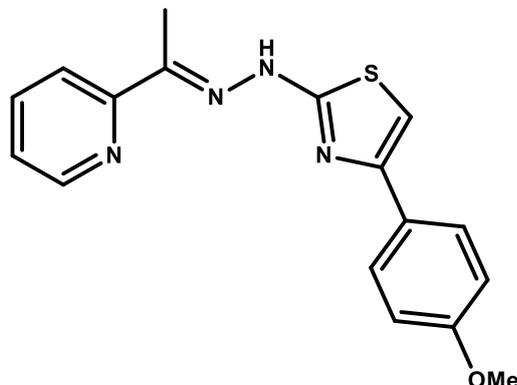
Rf: 0.62 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1560 (C=N), 3060 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.41 (s, 3H, CH₃), 3.60 (sl, 1H, NH), 7.37 (s, 1H, S-CH), 7.22-7.46 (m, 4H, Ar), 7.90-8.08 (m, 3H, Ar), 8.60 (d, 1H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 12.4 (CH₃), 104.4 (S-CH), 115.4 (C-Ar), 120.2 (C-Ar), 123.7 (C-Ar), 127.5 (C-Ar), 131.2 (C-Ar), 137.8 (C-Ar), 146.0 (C-Ar), 147.7 (C-Ar), 154.0 (C-Ar), 160.0 (C=N), 169.3 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₃FN₄S [M+H]⁺: 312.0845; encontrado 313.0932.

TAP-06***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N'*-(*p*-anisaltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 58 %

P.F.: 216°C

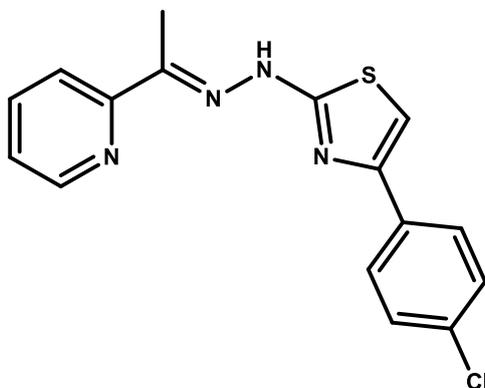
Rf: 0.63 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1496 (C=C), 1610 (C=N), 3359 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.42 (s, 3H, CH₃), 3.78 (s, 3H, CH₃), 7.25 (s, 1H, S-CH), 6.98-7.93 (m, 4H, Ar), 8.19-8.83 (m, 4H, Ar), 10.90 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 12.7 (CH₃), 55.1 (CH₃), 102.7 (S-CH), 114.0 (C-Ar), 121.7 (C-Ar), 124.4 (C-Ar), 124.5 (C-Ar), 125.9 (C-Ar), 126.9 (C-Ar), 143.6 (C-Ar), 145.4 (C-Ar), 158.9 (C=N), 169.5 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₇H₁₆N₄OS [M+H]⁺: 324.1045; encontrado: 325.0982.

TAP-07***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N'*-(*p*-clorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 73 %

P.F.: 222°C

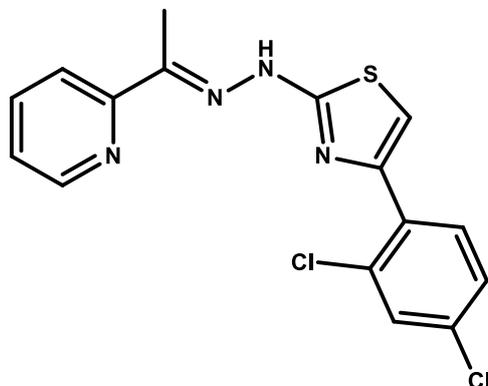
Rf: 0.72 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1574 (C=N), 1603 (C=N), 3359 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.39 (s, 3H, CH₃), 7.39 (s, 1H, S-CH), 7.34-7.48 (m, 4H, Ar), 7.80-8.04 (m, 4H, Ar), 8.56 (d, 1H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 13.4 (CH₃), 106.5 (S-CH), 122.6 (C-Ar), 125.3 (C-Ar), 127.7 (C-Ar), 129.2 (C-Ar), 132.6 (C-Ar), 133.6 (C-Ar), 143.0 (C-Ar), 145.5 (C-Ar), 151.7 (C=N), 169.4 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₃ClN₄S [M+H]⁺: 328.0549; encontrado 329.0484.

TAP-08***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N'*-(2,4-diclorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 62 %

P.F.: 227°C

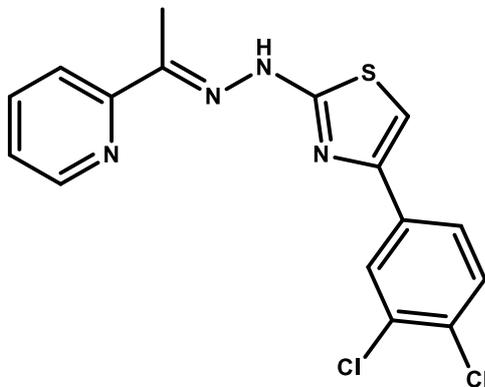
Rf: 0.69 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1521 (C=N), 1609 (C=N), 3058 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.43 (s, 3H, CH₃), 4.04 (sl, 1H, NH), 7.43 (s, 1H, S-CH), 7.32-7.88 (m, 3H, Ar), 8.19-8.69 (m, 4H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 12.8 (CH₃), 105.0 (S-CH), 124.4 (C-Ar), 125.5 (C-Ar), 127.7 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 134.2 (C-Ar), 141.2 (C-Ar), 143.1 (C-Ar), 145.4 (C-Ar), 151.7 (C=N), 169.0 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₂Cl₂N₄S [M+H]⁺: 362.0160; encontrado 363.0132.

TAP-09***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N'*-(3,4-diclorofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 69 %

P.F.: 209°C

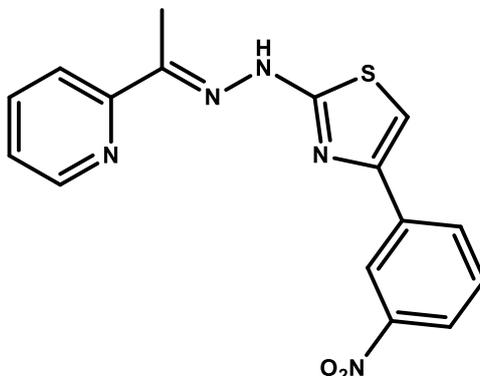
Rf: 0.54 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1554 (C=N), 1614 (C=N), 3061 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.43 (s, 3H, CH₃), 4.04 (sl, 1H, NH), 7.43 (s, 1H, S-CH), 7.32-7.88 (m, 3H, Ar), 8.19-8.69 (m, 4H, Ar).

RMN ¹³C (100,5 MHz, DMSO-*d*₆): 12.8 (CH₃), 110.4 (S-CH), 121.3 (C-Ar), 124.3 (C-Ar), 127.4 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 145.4 (C-Ar), 145.8 (C-Ar), 146.3 (C-Ar), 152.2 (C-Ar), 168.1 (C=N), 179.4 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₂Cl₂N₄S [M+H]⁺: 362.0160; encontrado 363.0220.

TAP-10***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N'*-(*m*-nitrofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 49 %

P.F.: 229°C

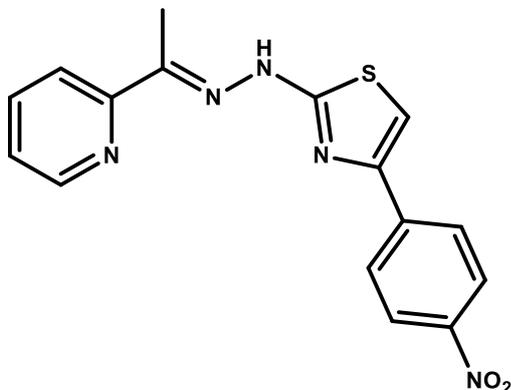
Rf: 0.72 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1345 (NO₂), 1453 (C=C), 1601 (C=N), 3054 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.43 (s, 3H, CH₃), 4.04 (sl, 1H, NH), 7.43 (s, 1H, S-CH), 7.32-7.88 (m, 4H, Ar), 8.19-8.69 (m, 4H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 12.8 (CH₃), 105.0 (S-CH), 124.4 (C-Ar), 125.5 (C-Ar), 127.7 (C-Ar), 128.6 (C-Ar), 134.2 (C-Ar), 141.2 (C-Ar), 143.1 (C-Ar), 145.4 (C-Ar), 151.7 (C=N), 169.0 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₃N₅O₂S [M+H]⁺: 339.0790; encontrado 340.0851.

TAP-11***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N'*-(*p*-nitrofeniltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 58 %

P.F.: 245°C

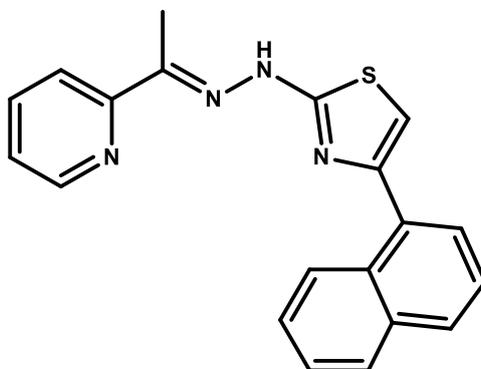
Rf: 0.78 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1577 (C=N), 1596 (C=N), 3342 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.38 (s, 3H, CH₃), 3.52 (sl, 1H, NH), 7.31 (m, 1H, Ar), 7.64 (s, 1H, S-CH), 7.75-8.27 (m, 6H, Ar), 8.54 (d, 1H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 12.4 (CH₃), 108.6 (S-CH), 119.4 (C-Ar), 122.9 (C-Ar), 124.2 (C-Ar), 126.3 (C-Ar), 136.4 (C-Ar), 141.2 (C-Ar), 146.1 (C-Ar), 148.6 (C-Ar), 155.5 (C=N), 172.0 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₁₆H₁₃N₅O₂S [M+H]⁺: 339.0790; encontrado: 340.0851.

TAP-12***N*-(1-metil-2-metil-piridina)-*N'*-(α -naftiltiazol-2-il)-hidrazina**

Rendimento: 89 %

P.F.: 203°C

Rf: 0.81 (acetato de etila/hexano 1:1)

I.V. Principais sinais: 1556 (C=N), 1614 (C=N), 3035 (N-H)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 1.70 (s, 3H, CH₃), 3.66 (sl, 1H, NH), 7.48 (s, 1H, S-CH), 7.30-7.52 (m, 3H, Ar), 7.81-8.00 (m, 6H, Ar), 8.55 (d, 1H, Ar).

RMN ¹³C (75,5 MHz, DMSO-*d*₆): 24.0 (CH₃), 104.5 (S-CH), 119.0 (C-Ar), 124.0 (C-Ar), 124.1 (C-Ar), 126.4 (C-Ar), 127.6 (C-Ar), 128.0 (C-Ar), 128.1 (C-Ar), 136.7 (C-Ar), 144.3 (C-Ar), 149.4 (C-Ar), 150.3 (C-Ar), 153.7 (C=N), 169.3 (S-C=N).

EMAR (ESI) Calculado para C₂₀H₁₆N₄S [M+H]⁺: 344.1096; encontrado 345.1143.

9 CONCLUSÕES

As metodologias planejadas foram satisfatórias, 46 novos compostos foram sintetizados com rendimentos satisfatórios e síntese acessível (“**one-pot**”). Todos os compostos tiveram sua elucidação estrutural e triagem farmacológica executadas, fornecendo-nos interessantes resultados de REA;

Todas as moléculas obtidas tiveram seu perfil antichagásico avaliado, pelo ensaio antiproliferativo frente a culturas do *T. cruzi* e ensaio de citotoxicidade frente a esplenócitos de camundongos. Para as séries TP e TAP foi realizado a avaliação inibitória dos compostos frente a cruzaina, nos fornecendo bons resultados;

Os resultados farmacológicos demonstraram que o planejamento almejado nesta Tese, norteado pela química medicinal, de fato incrementou a atividade tripanocida, nos fornecendo importantes dados para um melhor entendimento e planejamento futuro de novas moléculas tripanocidas;

Dos 46 compostos obtidos, 26 compostos apresentaram atividade tripanocida igual ou superior ao benznidazol, tendo como mais ativos os compostos TS-06 (**3-Me – 1.80 μ M**), TZ-06 (**4-Cl – 4.06 μ M**), TZ-07 (**2,4-Cl – 4.06 μ M**), TP-08 (**2,4-Cl – 1.24 μ M**), TP-09 (**3,4-Cl – 1.24 μ M**) e TAP-07 (**4-Cl – 2.10 μ M**) e TAP-08 (**2,4-Cl – 1.91 μ M**). De modo geral, os compostos clorados apresentaram melhores atividades tripanocidas, principalmente os diclorados;

Vale ressaltar que os compostos que apresentaram atividade inibitória frente a forma tripomastigota como “não determinado”, inibiram em 100% a proliferação parasitária em todas as concentrações testadas, o que confirma a alta capacidade tripanocida dos compostos explorados. Adicionando os compostos que não foram determinados a classe dos compostos com atividade tripanocida igual ou superior ao benznidazol, o número de compostos aumenta para 35 compostos, (**76,08% da amostragem total**);

Observou-se que a ciclização da tiossemicarbazona incrementou a atividade tripanocida e diminuiu a citotoxicidade, demonstrando o anel tiazol como um núcleo promissor. Já a substituição do tiofenol pela piridina incrementou significativamente a

atividade tripanocida, porém agregou uma alta citotoxicidade aos compostos das séries TP e TAP.

Apesar da alta toxicidade aliada ao anel piridina, foi possível determinar esta classe química com excelentes propriedades tripanocidas, inclusive em inibir a cruzaina, alvo abordado nesta Tese.

10 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este trabalho, temos:

- A avaliação da atividade inibitória na cruzáina para as séries TS e TZ;
- Obtenção de monocristais para melhor entendimento da geometria das moléculas em questão;
- Estudos de “docking” na cruzáina de todas as séries para um melhor entendimento do mecanismo de ação;
- Aumentar o número da amostragem molecular para uma melhor análise de REA;
- Realizar ensaios de inibição para a forma amastigota do T. cruzi das séries TP e TAP;
- Explorar os resultados obtidos das séries TP e TAP para uma melhor funcionalização, objetivando um decréscimo na alta toxicidade e manutenção ou incremento da atividade tripanocida.

REFERÊNCIAS

1. Coura, J. R.; Viñas, P. A. *Nature* **2010**, *465*, S6–7.
2. Pierre, G.; Melo, M. G. A.; Albuquerque, A. L. T.; Oliveira, W. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **1999**, *32*, 112.
3. FERREIRA, H. O. et al *Rev. do Inst. Med. Trop.* **1961**, *3*, 287–289.
4. Duyzend, M. H.; Clark, C. T.; Simmons, S. L.; Johnson, W. B.; Larson, A. M.; Leconte, A. M.; Wills, A. W.; Ginder-Vogel, M.; Wilhelm, A. K.; Czechowicz, J. A.; Alberg, D. G. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2011**.
5. Patterson, S.; Alphey, M. S.; Jones, D. C.; Shanks, E. J.; Street, I. P.; Frearson, J. A.; Wyatt, P. G.; Gilbert, I. H.; Fairlamb, A. H. *Journal of medicinal chemistry* **2011**, *54*, 6514–30.
6. Martyn, D. C.; Jones, D. C.; Fairlamb, A. H.; Clardy, J. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2007**, *17*, 1280–3.
7. Ravaschino, E. L.; Docampo, R.; Rodriguez, J. B. *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49*, 426–35.
8. Trawick, M. L.; Chen, S.-E.; Arispe, M.; Siles, R.; Zhou, M.; Pinney, K. G. *The FASEB Journal* **2006**, *a51*, 20.
9. Augustyns, K.; Amssoms, K.; Yamani, A.; Rajan, P. K.; Haemers, A. *Current Pharmaceutical Design* **2001**, *7*, 1117–1141.
10. Clayton, J. *Nature* **2010**, *465*, S12–5.
11. Leite, A. C. L.; De Lima, R. S.; Moreira, D. R. D. M.; Cardoso, M. V. D. O.; Gouveia de Brito, A. C.; Farias Dos Santos, L. M.; Hernandez, M. Z.; Kiperstok, A. C.; De Lima, R. S.; Soares, M. B. P. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2006**, *14*, 3749–57.
12. Leite, A. C. L.; Moreira, D. R. de M.; Cardoso, M. V. de O.; Hernandez, M. Z.; Alves Pereira, V. R.; Silva, R. O.; Kiperstok, A. C.; Lima, M. da S.; Soares, M. B. P. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1339–45.
13. Hernandez, M. Z.; Rabello, M. M.; Leite, A. C. L.; Cardoso, M. V. O.; Moreira, D. R. M.; Brondani, D. J.; Simone, C. A.; Reis, L. C.; Souza, M. A.; Pereira, V. R. A.; Ferreira, R. S.; McKerrow, J. H. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, *18*, 7826–35.
14. Du, X.; Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; Caffrey, C. R.; Holler, T. P.; McKerrow, J. H.; Cohen, F. E. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 2695–2707.

15. Keenan, M.; Abbott, M. J.; Alexander, P. W.; Armstrong, T.; Best, W. M.; Berven, B.; Botero, A.; Chaplin, J. H.; Charman, S. A.; Chatelain, E.; Von Geldern, T. W.; Kerfoot, M.; Khong, A.; Nguyen, T.; McManus, J. D.; Morizzi, J.; Ryan, E.; Scandale, I.; Thompson, R. A.; Wang, S. Z.; White, K. L. *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 4189–204.
16. Mendes, I. C.; Moreira, J. P.; Mangrich, A. S.; Balena, S. P.; Rodrigues, B. L.; Beraldo, H. *Polyhedron* **2007**, *26*, 3263–3270.
17. Parrilha, G. L.; Dias, R. P.; Rocha, W. R.; Mendes, I. C.; Benítez, D.; Varela, J.; Cerecetto, H.; González, M.; Melo, C. M. L.; Neves, J. K. a. L.; Pereira, V. R. a.; Beraldo, H. *Polyhedron* **2012**, *31*, 614–621.
18. Prata, A.; Dias, J. C. P.; Coura, J. R. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2011**, *44*, 6–11.
19. Zingales, B. *Revista da Biologia* **2011**, 44–48.
20. Coura, J. R.; Dias, J. C. P. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, *104 Suppl*, 31–40.
21. MILES, M. A.; LLEWELLYN, M. S.; LEWIS, M. D.; YEO, M.; BALEELA, R.; FITZPATRICK, S.; GAUNT, M. W.; MAURICIO, I. L. *Parasitology* **2009**, *136*, 1509–1528.
22. DNDi Drugs for neglected disease initiative. *DNDi Newsletter* **2006**.
23. Prata, A. *The Lancet infectious diseases* **2001**, *1*, 92–100.
24. Faundez, M.; Pino, L.; Letelier, P.; Ortiz, C.; López, R.; Seguel, C.; Ferreira, J.; Pavani, M.; Morello, A.; Maya, J. D. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2005**, *49*, 126–30.
25. Morello, A. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology* **1988**, *90*, 1–12.
26. Almeida, C. *Cad. Saúde Pública* **2002**, *18*, 905–925.
27. Coura, J. R.; Castro, S. L. de *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 3–24.
28. De Pahn, E. M.; Molina Portela, M. P.; Stoppani, A. O. *Revista Argentina de microbiología* **1988**, *20*, 107–18.
29. Docampo, R.; Moreno, S. N. *Federation proceedings* **1986**, *45*, 2471–6.
30. Polak, A.; Richle, R. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **1978**, *72*, 45–54.

31. Díaz de Toranzo, E. G.; Castro, J. A.; Franke de Cazzulo, B. M.; Cazzulo, J. J. *Experientia* **1988**, *44*, 880–881.
32. OPS/MSF *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2005**, *38*, 538–541.
33. WHO *Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee*; Geneve, **2002**; p. v905.
34. Sajid, M.; McKerrow, J. H. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2002**, *120*, 1–21.
35. Dias, L. C.; Dessoy, M. A.; Silva, J. J. N.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. *Química Nova* **2009**, *32*, 2444–2457.
36. Duschak, V. G.; Couto, A. S. *Recent patents on anti-infective drug discovery* **2007**, *2*, 19–51.
37. Soeiro, M. N. C.; De Castro, S. L. *Expert opinion on therapeutic targets* **2009**, *13*, 105–21.
38. Caputto, M. E.; Ciccarelli, A.; Frank, F.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Vega, D.; Lombardo, E.; Finkielstein, L. M. *European journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 155–63.
39. Zucca, M.; Savoia, D. *The open medicinal chemistry journal* **2011**, *5*, 4–10.
40. Wiggers, H. J.; Rocha, J. R.; Cheleski, J.; Montanari, C. A. *Molecular Informatics* **2011**, *30*, 565–578.
41. Zanatta, N.; Amaral, S. S.; Dos Santos, J. M.; De Mello, D. L.; Fernandes, L. D. S.; Bonacorso, H. G.; Martins, M. A. P.; Andricopulo, A. D.; Borchhardt, D. M. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16*, 10236–43.
42. Fricker, S. P.; Mosi, R. M.; Cameron, B. R.; Baird, I.; Zhu, Y.; Anastassov, V.; Cox, J.; Doyle, P. S.; Hansell, E.; Lau, G.; Langille, J.; Olsen, M.; Qin, L.; Skerlj, R.; Wong, R. S. Y.; Santucci, Z.; McKerrow, J. H. *Journal of inorganic biochemistry* **2008**, *102*, 1839–45.
43. Ascenzi, P.; Salvati, L.; Bolognesi, M.; Colasanti, M.; Polticelli, F.; Venturini, G. *Current protein & peptide science* **2001**, *2*, 137–53.
44. Silva, J. J. N.; Osakabe, A. L.; Pavanelli, W. R.; Silva, J. S.; Franco, D. W. *British journal of pharmacology* **2007**, *152*, 112–21.
45. Gillmor, S. A.; Craik, C. S.; Fletterick, R. J. *Protein science : a publication of the Protein Society* **1997**, *6*, 1603–11.

46. Aguirre, G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Fernández, M.; González, M.; Denicola, A.; Otero, L.; Gambino, D.; Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Faundez, M. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2004**, *12*, 4885–93.
47. Greenbaum, D. C.; Mackey, Z.; Hansell, E.; Doyle, P.; Gut, J.; Caffrey, C. R.; Lehrman, J.; Rosenthal, P. J.; McKerrow, J. H.; Chibale, K. *Journal of medicinal chemistry* **2004**, *47*, 3212–9.
48. Da Silva, J. G.; Azzolini, L. S.; Wardell, S. M. S. V.; Wardell, J. L.; Beraldo, H. *Polyhedron* **2009**, *28*, 2301–2305.
49. Pérez-Rebolledo, A.; Teixeira, L. R.; Batista, A. a; Mangrich, A. S.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; González, M.; Hernández, P.; Ferreira, A. M.; Speziali, N. L.; Beraldo, H. *European journal of medicinal chemistry* **2008**, *43*, 939–48.
50. Reis, D. C.; Pinto, M. C. X.; Souza-Fagundes, E. M.; Wardell, S. M. S. V.; Wardell, J. L.; Beraldo, H. *European journal of medicinal chemistry* **2010**, *45*, 3904–10.
51. Donnici, C. L.; Araújo, M. H.; Oliveira, H. S.; Moreira, D. R. M.; Pereira, V. R. A.; De Assis Souza, M.; De Castro, M. C. A. B.; Leite, A. C. L. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2009**, *17*, 5038–43.
52. Bernhardt, P. V; Sharpe, P. C.; Islam, M.; Lovejoy, D. B.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52*, 407–15.
53. Richardson, D. R.; Sharpe, P. C.; Lovejoy, D. B.; Senaratne, D.; Kalinowski, D. S.; Islam, M.; Bernhardt, P. V *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49*, 6510–21.
54. Bernhardt, P. V; Chin, P.; Sharpe, P. C.; Richardson, D. R. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2007**, 9226, 3232–44.
55. Quach, P.; Gutierrez, E.; Basha, M. T.; Kalinowski, D. S.; Sharpe, P. C.; Lovejoy, D. B.; Bernhardt, P. V; Jansson, P. J.; Richardson, D. R. *Molecular pharmacology* **2012**, *82*, 105–14.
56. Kasuga, N. C.; Sekino, K.; Ishikawa, M.; Honda, A.; Yokoyama, M.; Nakano, S.; Shimada, N.; Koumo, C.; Nomiya, K. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2003**, *96*, 298–310.
57. Bharti, N.; Athar, F.; Maurya, M. R.; Azam, A. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2004**, *12*, 4679–84.
58. Bharti, Shailendra, N.; Naqvi, F.; Azam, A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 689–692.
59. Bharti, N.; Husain, K.; Gonzalez Garza, M. .; Cruz-Vega, D. E.; Castro-Garza, J.; Mata-Cardenas, B. D.; Naqvi, F.; Azam, A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12*, 3475–3478.

60. Prathapachandra Kurup, M. R.; Joseph, M. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry* **2003**, 33, 1275–1287.
61. Karaküçük-İyidoğan, A.; Taşdemir, D.; Oruç-Emre, E. E.; Balzarini, J. *European journal of medicinal chemistry* **2011**, 46, 5616–24.
62. Glisoni, R. J.; Cuestas, M. L.; Mathet, V. L.; Oubiña, J. R.; Moglioni, A. G.; Sosnik, A. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2012**, 47, 596–603.
63. Chandra, S.; Gupta, L. K. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* **2005**, 62, 1089–94.
64. Pavan, F. R.; Da S Maia, P. I.; Leite, S. R. A.; Deflon, V. M.; Batista, A. A.; Sato, D. N.; Franzblau, S. G.; Leite, C. Q. F. *European journal of medicinal chemistry* **2010**, 45, 1898–905.
65. Rodríguez-Argüelles, M. C.; Tourón-Touceda, P.; Cao, R.; García-Deibe, A. M.; Pelagatti, P.; Pelizzi, C.; Zani, F. *Journal of inorganic biochemistry* **2009**, 103, 35–42.
66. Kovala-Demertzi, D.; Galani, A.; Miller, J. R.; Frampton, C. S.; Demertzis, M. a. *Polyhedron* **2012**, 16–18.
67. Lima Leite, A. C.; Santos, L. M. F.; Barbosa, F. F.; De Oliveira Cardoso, M. V; Moreira, D. R. M.; De Souza, I. A. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie* **2006**, 60, 121–6.
68. Beraldo, H.; Gambinob, D.; Gambino, D. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2004**, 4, 31–39.
69. Rodrigues, C.; Batista, A. a; Ellena, J.; Castellano, E. E.; Benítez, D.; Cerecetto, H.; González, M.; Teixeira, L. R.; Beraldo, H. *European journal of medicinal chemistry* **2010**, 45, 2847–53.
70. Lessa, J. A.; Reis, D. C.; Mendes, I. C.; Speziali, N. L.; Rocha, L. F.; Pereira, V. R. a.; Melo, C. M. L.; Beraldo, H. *Polyhedron* **2011**, 30, 372–380.
71. Holla, B. S.; Malini, K. V.; Rao, B. S.; Sarojini, B. K.; Kumari, N. S. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, 38, 313–318.
72. Sarodnick, G.; Heydenreich, M.; Linker, T.; Kleinpeter, E. *Tetrahedron* **2003**, 59, 6311–6321.
73. COSTA, P. *Substâncias carboniladas e seus derivados*; 1ª Ed.; Bookman: Porto Alegre/MG, **2003**.
74. Lemke, T. L.; Shek, T. W.; Cates, L. A.; Smith, L. K.; Cosby, L. A.; Sartorelli, A. C. *Journal of Medicinal Chemistry* **1977**, 20, 1351–1354.

75. Ota, A. T.; Temperini, M. L. .; Arêas, E. P. .; Loos, M. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **1998**, *451*, 269–275.
76. Karabatsos, G. J.; Vane, F. M.; Taller, R. A.; Hsi, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3351–3357.
77. Antonini, I.; Claudi, F.; Franchetti, P.; Grifantini, M.; Martelli, S. *Journal of Medicinal Chemistry* **1977**, *20*, 447–449.
78. Casas, J. S.; García-Tasende, M. S.; Sordo, J. *Coordination Chemistry Reviews* **2000**, *209*, 197–261.
79. Roush, W. R.; Hernandez, A. A.; McKerrow, J. H.; Selzer, P. M.; Hansell, E.; Engel, J. C. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9747–9762.
80. Fujii, N.; Mallari, J. P.; Hansell, E. J.; Mackey, Z.; Doyle, P.; Zhou, Y. M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; McKerrow, J. H.; Guy, R. K. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2005**, *15*, 121–3.
81. Yusuf, M.; Jain, P. *Arabian Journal of Chemistry* **2011**, null.
82. Hetzheim, A.; Möckel, K. *Advances in Heterocyclic Chemistry Volume 7*; Elsevier, **1967**; Vol. 7.
83. Scriven, E.; Berry, D. *Speciality Chem. Mag.*; **2001**.
84. Li, A. H.; Moro, S.; Forsyth, N.; Melman, N.; Ji, X. D.; Jacobson, K. A. *Journal of medicinal chemistry* **1999**, *42*, 706–21.
85. Farhanullah, F.; Agarwal, N.; Goel, A.; Ram, V. J. *The Journal of organic chemistry* **2003**, *68*, 2983–5.
86. Joule, J. .; Smith, G.; Mills, K. *Heterocyclic chemistry*; 3rd ed.; Chapman and Hall: London, **1995**; pp. 72–119.
87. Roth, H. J.; Kleemann, A. *Pharmaceutical Chemistry: Drug Synthesis*; Europe, P. H., Ed.; 1st ed.; London, **1988**; p. 407.
88. Kozhevnikov, V. N.; Kozhevnikov, D. N.; Nikitina, T. V.; Rusinov, V. L.; Chupakhin, O. N.; Zabel, M.; König, B. *The Journal of organic chemistry* **2003**, *68*, 2882–8.
89. Wadler, S.; Makower, D.; Clairmont, C.; Lambert, P.; Fehn, K.; Sznol, M. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2004**, *22*, 1553–63.
90. Shao, J. *Cancer Research* **2004**, *64*, 1–6.

91. Chaston, T. B.; Lovejoy, D. B.; Watts, R. N.; Richardson, D. R. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **2003**, *9*, 402–14.
92. Shao, J.; Zhou, B.; Di Bilio, A. J.; Zhu, L.; Wang, T.; Qi, C.; Shih, J.; Yen, Y. *Molecular cancer therapeutics* **2006**, *5*, 586–92.
93. Yee, K. W. L.; Cortes, J.; Ferrajoli, A.; Garcia-Manero, G.; Verstovsek, S.; Wierda, W.; Thomas, D.; Faderl, S.; King, I.; O'Brien, S. M.; Jeha, S.; Andreeff, M.; Cahill, A.; Sznol, M.; Giles, F. J. *Leukemia research* **2006**, *30*, 813–22.
94. Kunos, C. A.; Waggoner, S.; Von Gruenigen, V.; Eldermire, E.; Pink, J.; Dowlati, A.; Kinsella, T. J. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **2010**, *16*, 1298–306.
95. Saryan, L. A.; Mailer, K.; Krishnamurti, C.; Antholine, W.; Petering, D. H. *Biochemical Pharmacology* **1981**, *30*, 1595–1604.
96. Byrnes, R. W.; Mohan, M.; Antholine, W. E.; Xu, R. X.; Petering, D. H. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7046–7053.
97. Jansson, P. J.; Sharpe, P. C.; Bernhardt, P. V.; Richardson, D. R. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 5759–69.
98. Richardson, D. R.; Kalinowski, D. S.; Richardson, V.; Sharpe, P. C.; Lovejoy, D. B.; Islam, M.; Bernhardt, P. V. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52*, 1459–70.
99. Vicini, P.; Geronikaki, A.; Incerti, M.; Busonera, B.; Poni, G.; Cabras, C. A.; La Colla, P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11*, 4785–4789.
100. Popsavin, M.; Spaić, S.; Svirčev, M.; Kojić, V.; Bogdanović, G.; Popsavin, V. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2012**, *22*, 6700–4.
101. Lu, X.; Liu, X.; Wan, B.; Franzblau, S. G.; Chen, L.; Zhou, C.; You, Q. *European journal of medicinal chemistry* **2012**, *49*, 164–71.
102. Maccioni, E.; Cardia, M. .; Bonsignore, L.; Plumitallo, A.; Pellerano, M. .; De Logu, A. *Il Farmaco* **2002**, *57*, 809–817.
103. Funakoshi, T.; Chaki, S.; Kawashima, N.; Suzuki, Y.; Yoshikawa, R.; Kumagai, T.; Nakazato, A.; Kameo, K.; Goto, M.; Okuyama, S. *Life Sciences* **2002**, *71*, 1371–1384.
104. Shafi, S.; Alam, M. M.; Mulakayala, N.; Mulakayala, C.; Vanaja, G.; Kalle, A. M.; Pallu, R.; Alam, M. S. *European journal of medicinal chemistry* **2012**, *49*, 324–33.
105. Navarrete-Vazquez, G.; Chávez-Silva, F.; Argotte-Ramos, R.; Rodríguez-Gutiérrez, M. D. C.; Chan-Bacab, M. J.; Cedillo-Rivera, R.; Moo-Puc, R.;

- Hernández-Núñez, E. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2011**, *21*, 3168–71.
106. Souza, M. V. N. de; Almeida, M. V. de *Química Nova* **2003**, *26*, 366–372.
107. Kamath, K.; Jordan, M. A. *Cancer research* **2003**, *63*, 6026–31.
108. Tokui, M.; Kubodera, T.; Gomi, K.; Yamashita, N.; Nishimura, A. *Journal of bioscience and bioengineering* **2011**, *111*, 388–90.
109. Hantzsch, A.; Weber, J. H. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1887**, *20*, 3118–3132.
110. Gouvêa, D. P.; Bareño, V. D. O.; Bosenbecker, J.; Drawanz, B. B.; Neuenfeldt, P. D.; Siqueira, G. M.; Cunico, W. *Ultrasonics sonochemistry* **2012**, *19*, 1127–31.
111. Hu, Y.; Zou, Y.; Wu, H.; Shi, D. *Ultrasonics sonochemistry* **2012**, *19*, 264–9.
112. Koda, S.; Kimura, T.; Kondo, T.; Mitome, H. *Ultrasonics sonochemistry* **2003**, *10*, 149–56.
113. Chung, D. J.; Cho, S. H.; Lee, J. M.; Hahn, S.-T. *European journal of radiology* **2012**, *81*, e519–23.
114. Romanha, A. J.; Castro, S. L. De; Soeiro, M. D. N. C.; Lannes-Vieira, J.; Ribeiro, I.; Talvani, A.; Bourdin, B.; Blum, B.; Olivieri, B.; Zani, C.; Spadafora, C.; Chiari, E.; Chatelain, E.; Chaves, G.; Calzada, J. E.; Bustamante, J. M.; Freitas-Junior, L. H.; Romero, L. I.; Bahia, M. T.; Lotrowska, M.; Soares, M.; Andrade, S. G.; Armstrong, T.; Degrave, W.; Andrade, Z. D. A. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 233–8.
115. McKerrow, J. H.; Doyle, P. S.; Engel, J. C.; Podust, L. M.; Robertson, S. a; Ferreira, R.; Saxton, T.; Arkin, M.; Kerr, I. D.; Brinen, L. S.; Craik, C. S. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, *104 Suppl*, 263–9.
116. Ferreira, R. S.; Bryant, C.; Ang, K. K. H.; McKerrow, J. H.; Shoichet, B. K.; Renslo, A. R. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52*, 5005–8.

| APÊNDICES



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents

Marcelo Zaldini Hernandes^a, Marcelo Montenegro Rabello^a, Ana Cristina Lima Leite^{a,*}, Marcos Veríssimo Oliveira Cardoso^a, Diogo Rodrigo Magalhaes Moreira^a, Dalci José Brondani^a, Carlos Alberto Simone^b, Luiza Campos Reis^c, Marina Assis Souza^c, Valéria Rego Alves Pereira^c, Rafaela Salgado Ferreira^d, James Hobson Mckerrow^d

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Centre for Health Science, Federal University of Pernambuco, 50740-520 Recife, PE, Brazil

^b Department of Physics and Informatics, Institute of Physics, University of São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^c Department of Immunology, Aggeu Magalhães Center for Research, Oswaldo Cruz Foundation, 50670-420 Recife, PE, Brazil

^d Sandler Center for Drug Discovery in Parasitic Diseases, University of California, QB3 1700 4th St, 94158 San Francisco, CA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2010

Revised 16 September 2010

Accepted 22 September 2010

Available online 29 September 2010

Keywords:

Bioisosterism

Cysteine protease cruzain

Hydrazones

Molecular docking

Thiazoles

Thiosemicarbazones

Trypanosoma cruzi

ABSTRACT

In previous studies, we identified promising anti-*Trypanosoma cruzi* cruzain inhibitors based on thiazolylhydrazones. To optimize this series, a number of medicinal chemistry directions were explored and new thiazolylhydrazones and thiosemicarbazones were thus synthesized. Potent cruzain inhibitors were identified, such as thiazolylhydrazones **3b** and **3j**, which exhibited IC₅₀ of 200–400 nM. Furthermore, molecular docking studies showed concordance with experimentally derived structure–activity relationships (SAR) data. In the course of this work, lead compounds exhibiting in vitro activity against both the epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* were identified and in vivo general toxicity analysis was subsequently performed. Novel SAR were documented, including the importance of the thiocarbonyl carbon attached to the thiazolyl ring and the direct comparison between thiosemicarbazones and thiazolylhydrazones.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas' disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), affects millions of people in Latin American and results in significant mortality, with devastating social and economic consequences. Even though public health programs and vector elimination have decreased the incidence of new infections, Chagas' disease is still endemic in many areas.¹ Additionally, the drug available to treat it (Benznidazole) is decades-old and limited in efficacy, and is plagued by significant side effects and impractical dosing regimens. Therefore, there is an urgent need for new, effective and safer drugs for treatment of Chagas' disease.²

The discovery of enzymes implicated in pathogenesis and host cell invasion of *T. cruzi* has allowed the application of target-based drug design efforts.³ Given the key role they play at various stages in the life cycle of the parasite and the lack of redundancy of these enzymes compared with the homologous human enzymes, the cysteine protease cruzain,⁴ trypanothione reductase,⁵ and trans-

sialidase⁶ of *T. cruzi* have thereby emerged as promising drug targets. Cruzain is essential for intracellular replication and differentiation, and is thus involved in all stages of the parasite's life cycle.⁷ This enzyme also contributes to immune evasion, hydrolysis of host proteins and cellular invasion in parasites.⁸ High-affinity peptidomimetic cruzain inhibitors have been shown to cure *T. cruzi* infection in an immunodeficient-mouse model of infection even in the absence of a functioning adaptive immune response,⁹ indicating that this enzyme offers a scientific rationale for (druggable) chemical intervention.¹⁰

A number of structurally diverse cruzain inhibitors have been reported. Recently, an especial emphasis has been applied to identify nonpeptidic inhibitors (Fig. 1). Based on the known bioisosteric relation between peptide bonds and ureas, the first nonpeptidic cruzain inhibitors identified were aryl ureas and thioureas, which displayed moderate affinity against cruzain and antiproliferative activity against amastigote cell cultures.¹¹ Following these findings, thiosemicarbazones and their pyrazoline-1-thiocarboxamide bioisosteres were explored as potential cruzain inhibitors,^{12,13} since thioureas and thiosemicarbazones are classically deemed as bioisosteres. This approach yielded highly effective agents against both the enzyme and parasite cell cultures. Inspired by the potency

* Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 8511; fax: (+55) 81 2126 8510.
E-mail address: ana.leite@pq.cnpq.br (A.C.L. Leite).

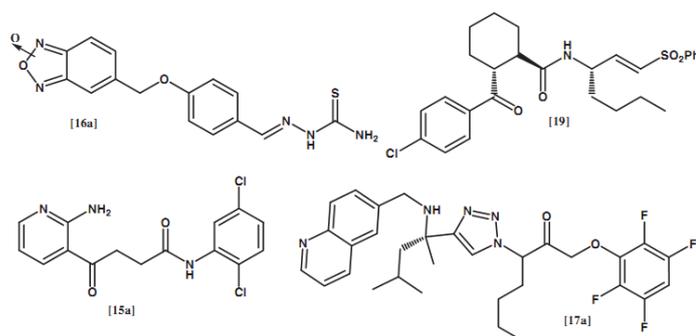


Figure 1. Representative examples of nonpeptidic cruzain inhibitors.

of thiosemicarbazones,¹⁴ other classes of nonpeptidic cruzain inhibitors have been developed, exploring functionalized amides,¹⁵ hydrazones,¹⁶ triazoles/triazines,¹⁷ *N*-acylhydrazones,¹⁸ vinylsulfones,¹⁹ and chalcones²⁰ as structural prototypes.

Our group has previously described the design and anti-*T. cruzi* screening of a series of *N*-acylthiosemicarbazides and their *N*-acylhydrazide-4-thiazolidone bioisosteres.²¹ In our first attempt, the *N*-acyl-4-thiazolidones showed only moderate activity against both trypomastigote and epimastigote forms of the parasite, while *N*-acyl-thiosemicarbazones were inactive.²¹ Later, we opted for the structural replacement of the aryl instead of the acyl group in the 4-thiazolidone subunit, and this molecular modification yielded a new congener series of thiazolyhydrazones.²² The most potent compound in this series inhibited epimastigote replication ($IC_{50} = 0.3 \mu M$) exhibited greater potency when compared with Benznidazole ($IC_{50} = 1.8 \mu M$). In silico studies for these thiazolyhydrazones suggested cruzain was the drug molecular target. Unfortunately, all of our most potent anti-*T. cruzi* agents displayed only low potency when assayed against trypomastigotes (blood-stream form)²² and subsequently failed when assayed in an in vivo model of acute infection (M. B. P. Soares, D. R. M. Moreira, A. C. L. Leite, unpublished data). Ruthenium complexes with a selected number of these thiazolyhydrazones were also prepared by us. While improved potency against the parasite was noted when compared to their Ru-free thiazolyhydrazones counterparts, undesirable mammal toxicity was observed.²³

In light of these findings, we turned our attention towards the structural optimization and further identification of improved anti-*T. cruzi* thiosemicarbazones and thiazolyhydrazones. Inspection of the structural features of the most potent anti-*T. cruzi* agents previously identified were used to guide the design of the inhibitors reported here. A number of medicinal chemistry directions were also explored, such as the bioisosterism and conformational restriction.²⁴ For example, to confirm the importance of the thiazolyl ring, direct comparison of the biological activity of thiazolyhydrazones and thiosemicarbazones was attempted. In addition, the carbonyl of the heterocyclic ring (**3f** and **3j**) was bioisosterically replaced by thiocarbonyl (**6a** and **6b**), since this modification eventually could result in distinct classes of trypanocidal agents. Variable spacer groups, that is, changing the thioether (**2a**) to ethylenic (**4a**) or ethyl (**4b**) were also investigated, resulting in molecules with different conformational restrictions. Finally, a small set of substituents were examined, enabling us to explore a congener series of thiazolyhydrazones (Fig. 2). By employing these strategies, we aimed to identify new small nonpeptidic cruzain inhibitors of optimized potency against the parasite.

2. Results

2.1. Synthesis

Aromatic aldehydes were obtained by a mild *S*-alkylation of the 4-substituted thiophenols using bromoacetals, with subsequent deprotection of diethyl acetals under acid hydrolysis; while aromatic ketones were prepared using chloroacetone.^{21,26b} These procedures allowed reagents for condensation with thiosemicarbazides to be prepared. Under these same conditions, alkylation of 4-nitrobenzenethiol and of 4-(*N,N*-dimethylamino)benzenethiol with bromoacetaldehyde diethyl acetal did not afford the expected alkylated products, and only complex mixtures were recovered. Thiosemicarbazones (**2a–j**, **4a**, **4b**) were synthesized by condensation of aldehydes or ketones with thiosemicarbazide, producing the crystalline products in very good yields with short reaction times.²⁵ Subsequently, the cyclic products (thiazolyhydrazones **3a–j** and **5a**) were synthesized in accordance with a recently reported method,²⁶ treating the appropriate aromatic thiosemicarbazones (**2a–j**, **4a**) with α -bromocarboxylic acids, anhydrous sodium acetate and dry ethanol in reflux (Scheme 1).

Thiazolyhydrazones **3a–j** and **5a** were obtained as single isomers and as racemate. No further effort was made to separate the enantiomers, because a rapid epimerization is expected for asymmetric carbons adjacent to carbonyl carbons. Crystallographic data for the compound **3g** is summarized in Supplementary data. The structure determination of **3g** shows that in the solid state this hydrazone adopts the *E* geometry in relation to the C8=N2 bond (Fig. S1). It is in accordance to the literature.²⁷

Finally, Lawesson's reagent²⁸ was used as the thionation agent to the conversion of carbonyl into thiocarbonyl derivatives (**6a** and **6b**) with respective yields of 38 and 34% without optimization (Scheme 2). The chemical structure of these products was established using NMR (¹H, ¹³C and DEPT), HRMS, IR spectral and elemental analysis (for C, H, N, S).

2.2. Biological evaluation

All compounds were preliminarily screened against purified recombinant cruzain at 100 μM ; and the subset of active inhibitors had their IC_{50} determined (Table 1). For comparison, two previously described cruzain inhibitors, structurally-related to the thiazolyhydrazones described here, were prepared and screened against cruzain.¹² These inhibitors are 3'-bromopropiophenonethiosemicarbazone and 3',4'-dichloroacetophenonethiosemicarbazone, designated here **TCC-01** and **TCC-02**, respectively

7828

M. Z. Hernandez et al. / Bioorg. Med. Chem. 18 (2010) 7826–7835

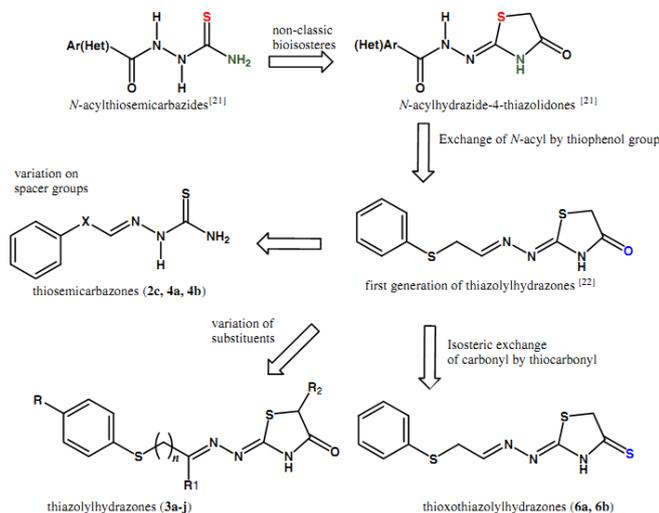
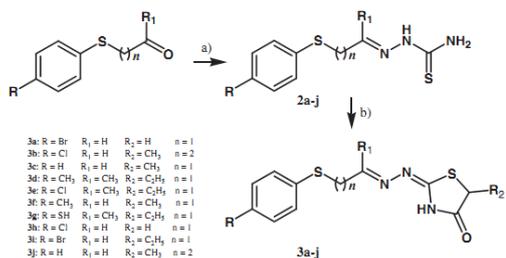


Figure 2. Our design concept for thiosemicarbazones and thiazolylhydrazones as anti-*Trypanosoma cruzi* drug prototypes. This figure also summarizes the molecular optimization strategy developed here.



Scheme 1. Synthesis of the thiazolylhydrazones (**3a–j**). Reagents and conditions: (a) thiosemicarbazide, H₂O/EtOH, AcOH (three drops), ultrasound irradiation (40 kHz), 60 min; (b) α -bromocarboxylic acids, AcONa, EtOH, reflux, 24 h.

(Fig. 3). Inhibition levels were compared for assays without incubation versus with a 10 min pre-incubation with enzyme. Cruzain inhibition was time-dependent, as expected for covalent inhibitors. To investigate for artifactual promiscuous inhibition by aggregation,²⁹ enzyme inhibition was compared in presence of 0.01% Triton or in the absence of this detergent.³⁰ Similar activity was observed in both detergent concentrations, for all active compounds.

The activity of the compounds against *T. cruzi* growth was also determined. To this end, mammal cytotoxicity was firstly evaluated in BALB/c mouse splenocytes and the highest concentration non cytotoxic for the mammalian cells was determined. All compounds were then tested against cultures of the epimastigote and trypomastigote forms of the *T. cruzi* Y strain. Table 2 shows the percentage inhibition at 40 μ M and the IC₅₀ values, using Benznidazole (**Bdz**) as the reference drug for the cell culture assays. A subset of compounds was tested for time-dependent activity against Y strain epimastigotes. In addition, the in vivo toxicity for selected compounds was measured using female Swiss mice and treated by ip injection with 100 mg kg⁻¹ (Table 3).

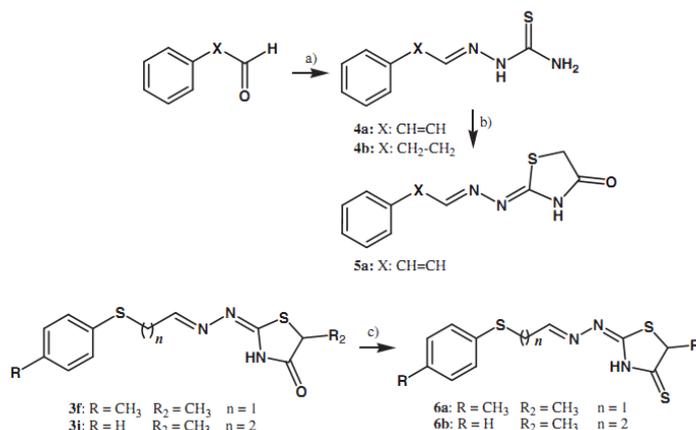
2.3. Molecular modeling

The optimized structures of compounds **3b**, **3f**, **3j** and **6b** were obtained by application of the RM1³¹ method, available as part of the SPARTAN 08³² program, using internal default settings for convergence criteria. These new molecules, which had been shown to inhibit cruzain, were synthesized as racemic mixtures, so the molecular modeling treated the two enantiomers (*R* and *S*) independently, and the docking procedure used both isomers for each compound. Docking analysis was carried out on the cruzain binding site (PDB code 1U9Q, available at the RCSB Protein Data Bank, <http://www.pdb.org>),³³ in which cruzain was co-crystallized in complex with a covalent inhibitor (referred as '186'). The active site was defined as all atoms within a radius of 5.0 Å from the co-crystallized ligand. The GOLD 4.0 program³⁴ was used for docking calculations.

3. Discussion

The first round of optimization explored various substitution patterns on the aryl and thiazole rings. The compound with a methyl in the R₂ position, **3c**, was inactive against cruzain and parasite cells, while the concomitant insertion of a methyl at the R and R₂ positions led to the discovery of compound **3f**—one of most active cruzain inhibitors and trypanocidal agents. Comparison of *p*-bromophenyl derivatives **3a** and **3i**, revealed that the replacement of hydrogen by the ethyl group at R₂ doubles potency against epimastigote and generates some inhibition against cruzain, although this exchange does not contribute to inhibition of the trypomastigotes. Shortening of the propyl spacer at C1 in compound **3j** to ethyl (compound **3c**) clearly reduces trypanocidal activity and it is deleterious for cruzain affinity.

Next, we exploited the importance of molecular modification of the aryl ring. Compounds **3e** and **3d** inhibited cruzain at similar levels, being weak inhibitors in both cases while compound **3b** was twofold more potent than **3j**. Analyzing the SAR data for these compounds, it can be inferred that the insertion of substituents at



Scheme 2. Top: synthesis of the compounds **4a**, **4b** and **5a**. Bottom: synthesis of 4-thioxothiazolylhydrazones (**6a**, **6b**). Reagents and conditions: (a) thiosemicarbazide, H₂O/EtOH, AcOH (three drops), ultrasound irradiation (40 kHz), 60 min; (b) α -bromoacetic acid, AcONa, EtOH, reflux, 24 h; (c) Lawesson' reagent, toluene, reflux, 24 h.

Table 1
Inhibition of cruzain by inhibitor compounds

Inhibitors	Inhibition (%) at 100 μ M	IC ₅₀ ^a (μ M)
2c	28	ND
3a	8	ND
3b	98	0.2
3c	5	ND
3d	22	ND
3e	31	ND
3f	80	20.4
3g	11	ND
3h	11	ND
3i	38	ND
3j	93	0.4
4a	35	ND
4b	ND	ND
5a	8	ND
6a	6	ND
6b	92	0.06
TCC-01	92	0.04
TCC-02	96	0.1

^a Calculated from ten compound concentrations in duplicates. ND = not determined.

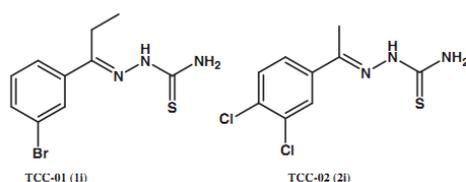


Figure 3. Chemical structures of cruzain ligands previously described as potent cruzain inhibitors. Codes in parenthesis are the same as the original reference.¹²

the *p*-position on the aromatic ring does not significantly contribute to improving the potency for this class of compounds. In addition, for the first round of optimization it was observed that, in general, attaching substituents at the R₁ position in congener series **3a–j** does not contribute to trypanocidal activity.

Based on their anti-parasitic activity, the most active compounds for series **3a–j** were the derivatives **3f** and **3j**, which exhibited potency similar to that of **Bdz**. For both compounds, efficacy against the parasite was remarkably higher when compared with

the thiazolylhydrazones previously described by us.²² Compound **3j** inhibited the protease with affinity similar to that of **TCC-1**,¹² which constitutes one of the most potent previously described cruzain inhibitors. It is worthwhile remarking that compound **3j** was able to reduce the number of parasites at different points in time after treatment, as summarized in Table 3, and that its efficacy was very similar when compared with Benznidazole (**Bdz**).

The second round of optimization explored the bioisosteric relationship within thiosemicarbazones and thiazolylhydrazones. Clearly, thiosemicarbazones **2c**, **4a** and **4b** are antitrypanosomal agents more potent than the correspondent thiazolylhydrazones. For example, the thiosemicarbazone **2c** is ten times more potent than thiazolylhydrazone **3c** against epimastigotes. These results indicate that the thioamide subunit represents a pharmacophoric point for assessment of antitrypanosomal activity. However, the undesired cytotoxicity of thiosemicarbazones was observed when using spleen cell cultures, while the thiazolylhydrazones **3a–j** did not display cytotoxicity at high concentrations (100 μ g mL⁻¹).

It was also possible to investigate the effect of molecular flexibility on anti-parasitic activity by comparing compounds **2c** and **4a** or **3c** and **5a**. The replacement of thioether (**2c**) by ethylenic (**4a**) enhanced the potency, but compound **4a** loses selectivity over parasite. It would thus seem that restricted flexibility has an impact on trypanocidal activity. Although both compounds appear to possess very similar geometric conformations, replacing the thioether (**2c**) with ethyl (**4b**) increases potency against the parasite.

The third round of optimization explored bioisosterism.^{24a} Replacing the carbonyl group (**3f** and **3j**) with a thiocarbonyl group (**6a** and **6b**) respectively resulted in a 20- and 5-fold increase in potency against the trypomastigote form. From **3j** to **6b** a sevenfold improvement in potency against cruzain was also noted. However, improved antitrypanosomal activity for thioxothiazolylhydrazones **6a** and **6b** was accompanied by cytotoxic properties for mammalian cells at concentrations of lower than 1.0 μ g mL⁻¹. This cytotoxicity is not necessarily inconsistent with the molecular modification performed and may, in part, be responsible for the action against other nonspecific intracellular targets, because thiocarbonyl carbon is more reactive and more likely to react as nucleophilic species than carbonyl carbon.

To confirm the *in vitro* cytotoxicity observed for **6a** and **6b**, the general toxicity in mice was assessed (Table 3). In this short assay, **6a** and **6b** were toxic at single dose of 100 mg kg⁻¹ weight, while at the same dose **6b** bioisosters (i.e., **3j**) was not (with 100% survival

7830

M. Z. Hernandez et al. / Bioorg. Med. Chem. 18 (2010) 7826–7835

Table 2
Evaluation of efficacy and cytotoxicity of inhibitors in cell culture

Compd	Epimastigotes after 11 days		Trypomastigotes after 24 h IC ₅₀ ^b (μM)	BALB/c cytotoxicity ^c in μg mL ⁻¹
	Inhibition ^a (%)	IC ₅₀ ^b (μM)		
2c	100	13.4	158	5 (22 μM)
3a	31.5	42.9	ND	>100
3b	10	32.1	ND	>100
3c	4.0	166.9	44.2	>100
3d	40	45.1	76.9	>100
3e	24	62.9	148.1	>100
3f	97	6.7	84.8	>100
3g	41	40.8	54.6	>100
3h	8.0	43.9	82.4	>100
3i	77	26.9	ND	>100
3j	100	2.9	10.0	>100
4a	99	7.3	7.4	<1.0
4b	ND	3.7	3.7	<1.0
5a	ND	2.3	10.1	<1.0
6a	ND	6.1	4.5	<1.0
6b	ND	8.1	2.3	1.0
TCC-01	ND	15.4	11.1	1.0 (3.6 μM)
TCC-02	ND	8.5	39.5	1.0 (3.8 μM)
Bdz	97	6.6	5.0	25

ND is not determined at tested concentrations. Bdz is Benznidazole, the reference drug.

^a Percent growth inhibition determined for each compound at 40 μM.^b Calculated from six concentrations using data obtained from at least three independent experiments. S.D. less than 10%.^c Expressed as the highest concentration tested that was not cytotoxic for BALB/c mouse splenocytes. In parenthesis, values are quoted in micromolar.**Table 3**
Time-dependent growth inhibition of the Y strain *T. cruzi* and animal toxicity for the most active compounds

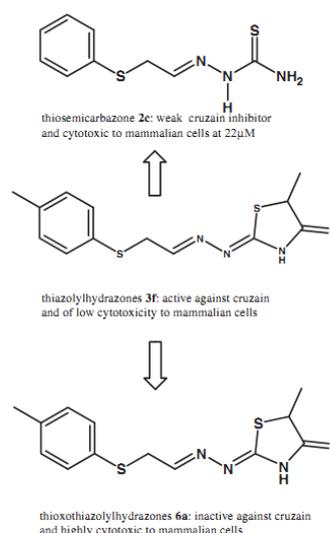
Compd	Inhibition (%) against epimastigote ^a		In vivo toxicity ^b (n = 6 per treatment)
	15 h	7 days	
2c	NT	NT	4/(√)
3f	85	97	NT
3i	0	61	6/(√)
3j	75	100	6/(√)
6b	NT	94	0/(√)
Bdz	43	85	NT

^a Percent growth inhibition determined for each compound at 40 μM.^b Number of animals survive after ip treatment (at single dose of 100 mg kg⁻¹ weight). The control group received only solvent and no deaths were observed. NT = not tested.

of animals). Relevant SAR emerges from these data. The trypanocidal activity was quite different between the sub-series: thioxothiazolyhydrazones (**6a**, **6b**), thiosemicarbazones (**2c**, **4a**, **4b**), and thiazolyhydrazones (**3a–j**). Both thioxothiazolyhydrazones and thiosemicarbazones showed higher mammal cytotoxicity than thiazolyhydrazones. This suggests that the presence of a thiocarbonyl group contributes to unspecific cytotoxicity in both parasite and mammalian cells (Fig. 4). Therefore, an important contribution from this study is to show for the first time that the bioisosteric relation between thiosemicarbazones, thiazolyhydrazones, and thioxothiazolyhydrazones clearly produce distinct bioactive compounds. Du and co-workers¹² have observed that the bioisosteres thiosemicarbazones and pyrazoline-1-thiocarboxamide also are distinct regarding cruzain inhibition.

To illuminate the SAR obtained against cruzain, these compounds were investigated by molecular docking. The proposed binding mode for these ligands was determined as the highest (most positive) score among the possible solutions for each ligand generated according to the GoldScore Fitness Function. Figure 5 shows the superimposition of the best docking solutions for compounds **3b**, **3f**, **3j** and **6b** and the crystallographic structure of the '186' co-crystallized ligand. Furthermore, Fig. 6 illustrates the trend observed between the in silico docking scores and the

in vitro pIC₅₀ data, which indicates that the most potent molecules, or the compounds with the higher values for pIC₅₀ (equals $-\log$ IC₅₀ for cruzain inhibition, in molar concentration), are those ones with the higher docking scores, demonstrating that the molecules with more stable or positive docking scores (*i.e.*, greater in silico affinity to cruzain) are also the most potent cruzain inhibitors. Only the new molecules **3b**, **3f**, **3j** and **6b**, with known IC₅₀ values for cruzain inhibition (see Table 1) were used, in order to allow a comparative discussion. Moreover, it should also be pointed out that while the (*R*) enantiomer for molecule **6b** seems to be the most potent in silico, in the case of molecule **3b**, the (*S*) isomer seems to have higher affinity for the target, in comparison with the opposite enantiomer. After a detailed comparative

**Figure 4.** Summary of important SAR.

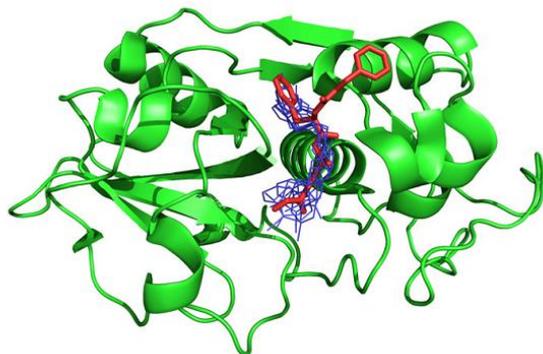


Figure 5. Superimposition of the best docking solutions for the (*R*) and (*S*) enantiomers of the compounds **3b**, **3f**, **3j** and **6b** (wireframe model) and the co-crystallized ligand '186' (stick model) in PDB structure 1U9Q of cruzain (ribbons model). Figure generated with Pymol.³⁵

analysis of the docking results between the enantiomers for each molecule, it seems that while the (*R*) isomers occupies the binding site of cruzain with the thiazolyhydrazone portion of the molecule oriented toward the Cys-25 residue, the (*S*) enantiomer is positioned in an opposite way, with the thiazolyhydrazone moiety oriented to the Gly-66 side. Therefore, these differences in ligand position depending upon the chirality of the compounds seem to affect the binding affinity of molecules **6b** and **3b** in an opposite manner, for example.

The molecular interactions for these compounds in the binding mode predicted by docking were compared to the ones previously observed in ligands co-crystallized with cruzain. For illustration, we compare the inhibitor **6bR** and the co-crystallized ligand '186'. According to the docking prediction, ligand **6bR** hydrogen bonds to the Gln-19, Cys-25 and Trp-177 residues (Fig. 7, Table 4). The co-crystallized ligand '186' also forms hydrogen bonds (HB) with the Gln-19 residue, but this ligand also interacts with Gly-66 and Asp-158 residues. A detailed mapping of the most important intermolecular interactions between cruzain and molecules **3fR**, **6bR** and '186' can be found in Table 4, with hydrophobic and hydrophilic (hydrogen bond) contributions. The molecule **3fR** was included in this analysis because it has an inhibitory potency more than 300 times lower in comparison with **6bR**, and the rea-

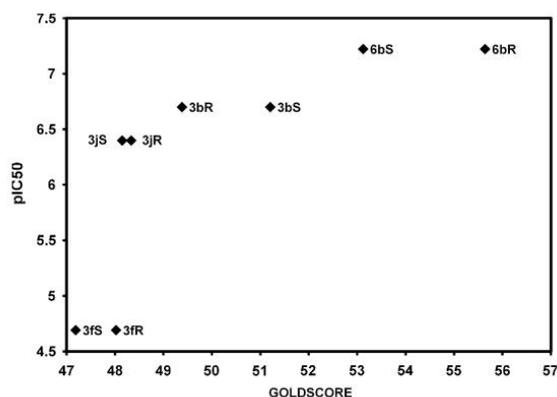


Figure 6. Trend between the GOLD docking score and the pIC₅₀ (equals $-\log IC_{50}$ for cruzain inhibition, in molar concentration) values for **3b**, **3f**, **3j** and **6b**. The (*S*) and the (*R*) symbols stand for the respective enantiomers.

son for this result, in the molecular level, seems to be two additional strong hydrogen bonding interactions that **6bR** establishes with Gln-19 and Trp-177 residues.

4. Conclusions

This paper describes optimization of antitrypanosomal properties of a family of thiazolyhydrazones. As a result of our efforts, new potent cruzain inhibitors and *T. cruzi* growth inhibitors were identified, such as thiazolyhydrazones **3b** and **3j**. Compound **3j** exhibits at least 30-fold selectivity to parasites versus mammalian cells, meriting further evaluation in animal model. Furthermore, our docking results (GOLD scores) show a trend that is consistent with the in vitro data (pIC₅₀), revealing the reliability of the theoretical models applied here. The binding patterns observed for all docked molecules, particularly for **3b**, **3f**, **3j** and **6b**, are quite similar to those of the '186' co-crystallized inhibitor, showing important hydrogen bonds with the same residues on the active site. Thus, insights gained from this present study could be useful for subsequent design of cruzain and anti-*T. cruzi* inhibitors.

5. Experimental section

5.1. Chemistry

All common laboratory chemicals were purchased from commercial sources and used without further purification. Melting points were determined using a Thomas Hoover apparatus and are uncorrected. FTIR spectra were obtained using KBr pellets. ¹H NMR, ¹³C NMR and DEPT spectra were measured on a Varian UNITYplus-300 NMR spectrometer (at 300 MHz for ¹H and 75.5 MHz for ¹³C) using DMSO-*d*₆ or D₂O as solvents and TMS as an internal standard. Coupling constants (*J*) are given in hertz. Microanalysis (C, H, N, S) of the new compounds was performed on a Carlo Erba instrument model E-1110 and results agreed with the theoretical values within (0.4%). High-resolution mass spectra (electrospray ionization) were recorded at IP-TOF equipment (Shimatzu). Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on silica gel plates with a fluorescence indicator of F₂₅₄ (0.2 mm, E. Merck); the spots were visualized in UV light, whilst, for compounds **2c**, **4b**, **5a**, the plates were exposed in a chamber containing iodine vapor which revealed the spots. Column chromatography was performed on silica using Kiesegel 60 (230–400 mesh, E. Merck). The obtained spectral of ¹H NMR and elemental analysis of **TCC-01** and **TCC-02** were in agreement with the reported data¹² and their original codes are **1i** and **2i**, respectively.

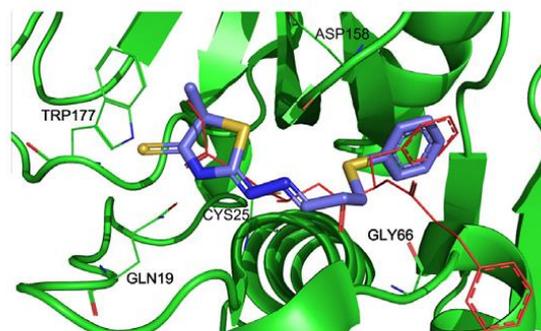


Figure 7. Detailed view of the docking solution for the (*R*) enantiomer of the molecule **6b** (stick model) in comparison with the position of the '186' co-crystallized ligand (wireframe model). The most important residues involved in specific interactions (hydrogen bonds) are labeled. Figure generated with Pymol.³⁵

7832

M. Z. Hernandez et al./Bioorg. Med. Chem. 18 (2010) 7826–7835

Table 4
Details of the intermolecular interactions of compounds **3fR** and **6bR** with cruzain, in comparison with the '186' co-crystallized ligand

Cruzain residues	Ligands and intermolecular interactions with cruzain ^{a,b}					
	'186'		3fR		6bR	
	HB	HP	HB	HP	HB	HP
Gln-19	2.84	–	–	–	2.49	–
Cys-25	–	Yes	3.24	–	3.21	–
Gly-65	–	Yes	–	–	–	–
Gly-66	3.05	Yes	–	–	–	–
Leu-67	–	Yes	–	Yes	–	Yes
Met-68	–	Yes	–	Yes	–	Yes
Ala-133	–	Yes	–	Yes	–	Yes
Leu-157	–	Yes	–	Yes	–	Yes
Asp-158	3.12	Yes	–	–	–	–
His-159	–	Yes	–	–	–	–
Trp-177	–	–	–	–	3.28	–

^a HB stands for hydrogen bonds and HP for hydrophobic interactions, respectively.

^b All distance values are given in Å.

5.1.1. Starting materials

The corresponding diethyl acetals or ketones were prepared according to reference ²¹, while subsequently deprotection of acetals to aldehydes was performed using classical acid hydrolysis. Thiosemicarbazones **2c**, **4a** and **4b** were obtained by reaction of aromatic aldehydes (1.0 mmol) with thiosemicarbazide (1.2 mmol) in acid medium (20 mL of EtOH and five drops of glacial acetic acid).²⁶ The mixture was then maintained under sonication (40 kHz) for 60 min. leading to the end of the reaction a powder solid that was filtered and washed with diethyl ether. Purification was carried out by way of recrystallization using absolute ethanol or water/ethanol (1:2).

5.1.1.1. N¹-[Phenylthioethylidene]thiosemicarbazide (2c). 80% yield, mp 116–17 °C (from ethanol); lit²⁶ mp 112–113 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) and ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz) spectra agreed with the proposed structure.

5.1.1.2. N¹-[3-(phenyl)propenylidene]thiosemicarbazide (4a). 77% yield, mp 111–112 °C (from ethanol); lit²⁶ mp 113–115 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) and ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz) spectra agreed with the proposed structure.

5.1.1.3. N¹-[3-(Phenyl)propylidene-2-ene]thiosemicarbazide (4b). 62% yield, mp 101 °C (from ethanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.5 (m, 2H, CH₂); 2.5 (dt, *J* = 10 and *J* = 17 Hz, 2H, CH₂); 7.11 (t, *J* = 17 Hz, 1H, CH=N); 7.18–7.23 (m, 6H, 5H for Ar and 1H for NH₂); 8.32 (s, 1H, NH₂); 10.23 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 31.7 (CH₂), 40.3 (CH₂, near of DMSO' signal), 130.5 (Ar); 132.4 (Ar); 135.3 (Ar); 137.0 (Ar); 147.9 (CH=N); 173.4 (C=S). IR (KBr, cm⁻¹) ν 3411 (NH₂), 3297 (NH); 1677 (C=N). Anal. Calcd for C₁₀H₁₃N₃S: C, 57.94; H, 6.32; N, 20.27; S, 15.47. Found: C, 57.81; H, 6.48; N, 20.34; S, 15.37.

5.1.2. General procedure for the synthesis of compounds **3a–j** and **5a**

A solution of arylthiosemicarbazone (2 mmol) in EtOH (20 mL) was added to a suspension of anhydrous AcONa (2.2 mmol) in 10 mL of EtOH and stirred for 15 min. Subsequently, α-bromocarbonylic acid (3.0 mmol) was added at room temperature and the reaction stirred on reflux for 24 h. After this time, the solvent was completely removed and ice was added. The precipitate formed was filtered and washed with 0.1 M of KHSO₄ and water. The impure product was recrystallized in absolute ethanol to obtain the compounds in 42–70% yields.

5.1.2.1. 2-[(p-Bromophenyl)thioethylidenehydrazinyl] thiazolidin-4-one (3a)²³. 56% yield, mp 116–17 °C (from water); lit²⁶ mp 115–116 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) and ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz) spectra agreed with the proposed structure.

5.1.2.2. 2-[(p-Chlorophenylthio)propylidene-1-enehydrazinyl]-5-methylthiazolidin-4-one (3b). 53% yield, mp 128 °C (from ethanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 1.62 (d, 3H, CH₃); 3.32 (t, *J* = 8 Hz, 2H, S-CH₂-CH₂); 3.60 (m, 2H, S-CH₂-C=); 3.90 (m, 1H, S-CH); 7.43 (d, 2H, Ar); 7.88 (d, 2H, Ar); 7.90 (t, 1H, CH=N); 9.70 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 17.2 (CH₃), 36.2 (CH₂), 37.1 (CH-S-C=); 42.4 (S-CH₂), 44.0 (CH₂-C=), 128.9 (Ar); 129.0 (Ar); 134.5 (Ar), 137.7 (Ar); 139.5 (CH=N); 157.2 (C=N), 173.1 (C=O). IR (KBr, cm⁻¹) ν = 3132 (NH); 1750 (C=O), 1615 and 1596 (C=N).

5.1.2.3. 2-[(phenylthio)ethylidenehydrazinyl] thiazolidin-4-one (3c). 70% yield, mp 131 °C (from ethanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 3.72 (d, 2H, *J* = 5 Hz, S-CH₂-CH=); 3.95 (s, 2H, S-CH₂-C=O); 7.20–7.43 (m, 5H, Ar); 7.51 (t, 1H, *J* = 5 Hz, CH=N); 10.96 (br, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 31.2 (S-CH₂-C=), 43.1 (S-CH₂-C=O); 126.3 (Ar); 127.0 (Ar); 128.2 (Ar); 129.8 (Ar); 133.0 (Ar); 146.5 (CH=N); 151.8 (C=N), 175.3 (C=O). IR (KBr, cm⁻¹) ν = 3132 (NH); 1725 (C=O), 1615 and 1596 (C=N). Anal. Calcd for C₁₁H₁₁N₃O₂S: C, 49.79; H, 4.18; N, 15.84; S, 24.16. Found: C, 50.03; H, 4.38; N, 15.64; S, 24.26.

5.1.2.4. 2-[(p-Methylphenylthio)propylidene-2-enehydrazinyl]-5-ethylthiazolidin-4-one (3d). 59% yield, mp 115 °C (from ethanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.89–0.93 (t, 3H, *J* = 15 Hz, CH₃); 1.66–1.76 (m, 1H, CH₂-CH₃); 1.88–1.92 (m, 1H, CH₂-CH₃); 2.03 (s, 3H, CH₃); 3.38 (s, 3H, CH₃-Ar); 3.83 (s, 2H, CH₂-S); 4.11–4.15 (m, 1H, CH), 7.34 (m, 2H, Ar) 7.40 (m, 2H, Ar); 11.80 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 10.2 (CH₃), 16.0 (CH₃); 19.7 (CH₃); 25.4 (CH₂), 48.8 (S-CH₂); 128.8 (Ar); 130.3 (Ar); 130.6 (Ar); 134.5 (Ar); 161.4 (C=N); 175.8 (C=O). IR (KBr, cm⁻¹) ν = 3052 (NH); 1722 (C=O), 1634 and 1587 (C=N).

5.1.2.5. 2-[(p-Chlorophenylthio)propylidene-2-enehydrazinyl]-5-ethylthiazolidin-4-one (3e). 62% yield, mp 140 °C (from ethanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 0.93–0.98 (t, 3H, *J* = 15 Hz, CH₃); 1.05–1.16 (m, 1H, CH₂-CH₃); 1.20–1.30 (m, 1H, CH₂-CH₃); 2.13 (s, 3H, CH₃); 3.83 (s, 2H, CH₂-S); 3.91–3.98 (m, 1H, CH), 7.47 (m, 2H, Ar) 7.72 (m, 2H, Ar); 11.10 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): δ 11.2 (CH₃), 15.1 (CH₃); 27.2 (CH₂), 43.0 (S-CH₂); 126.0 (Ar); 128.2 (Ar); 128.8 (Ar); 139.2 (Ar); 140.2

(Ar); 153.4 (C=N); 177.3 (C=O). IR (KBr, cm^{-1}) ν = 3062 (NH); 1725 (C=O), 1630 and 1590 (C=N).

5.1.2.6. 2-[(*p*-Methylphenylthio)ethylidenehydrazinyl]-5-methylthiazolidin-4-one (3f). 49% yield, mp 146 °C (from ethanol); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 1.02–1.10 (m, 3H, CH_3); 3.47 (s, 3H, CH_3); 3.82 (d, 2H, J = 8 Hz, CH_2 -S); 4.31–4.39 (m, 1H, CH), 7.29 (m, 2H, Ar) 7.41 (m, 2H, Ar); 7.75 (t, 1H, J = 8 Hz, CH=N); 10.79 (br s, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 14.1 (CH_3), 29.4 (CH_3), 43.4 (CH_2), 48.2 (S- CH_2); 127.3 (Ar); 128.0 (Ar); 134.1 (Ar); 134.8 (Ar); 142.4 (CH=N); 165.2 (C=N); 175.2 (C=O). IR (KBr, cm^{-1}) ν = 3100 (NH); 1725 (C=O), 1670 and 1630 (C=N).

5.1.2.7. 2-[(4-Mercaptophenylthio)propylidene-2-enehydrazinyl]-5-ethylthiazolidin-4-one (3g). 62% yield, mp 140–1 °C (from ethanol); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 0.92–0.98 (m, 3H, CH_3); 1.05–1.16 (m, 2H, CH_2 - CH_3); 2.07 (s, 4H, CH_3 and SH); 3.92 (s, 2H, CH_2 -S); 4.21–4.29 (m, 1H, CH), 7.41–7.61 (m, 4H, Ar); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 19.2 (CH_3), 24.4 (CH_3), 42.9 (CH_2), 46.3 (S- CH_2); 129.2 (Ar); 129.9 (Ar); 132.1 (Ar); 132.7 (Ar); 133.9 (Ar); 149.3 (CH=N); 176.1 (C=O). IR (KBr, cm^{-1}) ν = 3090 (NH); 1720 (C=O), 1630 and 1598 (C=N).

5.1.2.8. 2-[(*p*-Chlorophenylthio)ethylidenehydrazinyl]thiazolidin-4-one (3h). 42% yield, mp 148–9 °C (from ethanol); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 3.62 (t, 2H, J = 12 Hz, CH_2 -S); 4.02 (s, 2H, CH_2), 7.31 (m, 2H, Ar); 7.61–7.61 (m, 2H of Ar, 1H of CH=N); 11.9 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 43.2 (CH_2), 44.9 (CH_2 -Het); 128.9 (Ar); 130.2 (Ar); 136.4 (Ar); 136.9 (Ar); 144.3 (CH=N); 162.3 (C=N); 178.0 (C=O). IR (KBr, cm^{-1}) ν = 3170 (NH); 1710 (C=O), 1640 and 1608 (C=N).

5.1.2.9. 2-[(*p*-Bromophenylthio)ethylidenehydrazinyl]-5-ethylthiazolidin-4-one (3i). 49% yield, mp 165 °C (from ethanol); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 0.94–1.09 (m, 3H, CH_3); 1.85–1.92 (m, 2H, CH_2 - CH_3); 3.52 (t, 2H, J = 12 Hz, CH_2 -S); 4.12 (m, 1H, CH_2), 7.39 (m, 2H, Ar); 7.71–7.91 (m, 2H of Ar, 1H of CH=N); 11.3 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 10.9 (CH_3), 24.4 (CH_2), 45.1 (CH_2), 132.1 (Ar); 132.9 (Ar); 139.4 (Ar); 139.9 (Ar); 144.3 (CH=N); 174.0 (C=O). IR (KBr, cm^{-1}) ν = 3170 (NH); 1710 (C=O), 1640 and 1608 (C=N).

5.1.2.10. 2-[(Phenylthio)propylidene-1-enehydrazinyl]-5-methylthiazolidin-4-one (3j). 47% yield, mp 140–1 °C (from ethanol); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 1.45–1.56 (m, 3H, CH_3); 3.42 (d, 2H, J = 10 Hz, CH_2 -S); 4.22 (m, 1H, CH), 7.35–7.49 (m, 4H, Ar); 7.91 (t, 1H, J = 10 Hz, CH=N); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 14.9 (CH_3), 43.2 (CH_2), 44.2 (CH_2), 132.9 (Ar); 134.2 (Ar); 134.8 (Ar); 136.9 (Ar); 146.2 (CH=N); 168.5 (C=N); 174.0 (C=O). IR (KBr, cm^{-1}) ν = 3100 (NH); 1710 (C=O), 1630 and 1600 (C=N).

5.1.2.11. N^1 -[(3-Phenyl)propenylidenehydrazinyl]thiazolidin-4-one (5a). 60% yield, mp 238–9 °C (dec) (from ethanol); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 3.87 (s, 2H, CH_2 -S), 7.03–7.19 (m, 2H, CH), 7.31–7.45 (m, 3H, Ar); 7.56–7.73 (d, J = 9 Hz, 2H, CH), 8.16 (d, J = 9 Hz, 1H, CH=N). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 33.1 (CH_2 -S), 125.3 (CH), 127.3 (CH), 128.9 (Ar), 129.1 (Ar), 135.7 (Ar); 141.2 (Ar); 149.05 (Ar), 158.6 (CH=N), 164.6 (C=N); 174.3 (C=O). IR (KBr, cm^{-1}) ν = 3197 (NH); 1760 (C=O), 1680 and 1607 (C=N).

5.1.3. Conversion of aryl-4-oxothiazolylhydrazones in aryl-4-thioxothiazolylhydrazones (6a and 6b)

The aryl-4-oxothiazolylhydrazone **3f** (1.0 mmol) was suspended in dry toluene (20 mL) containing five drops of DMF and added to a solution of Lawesson' reagent (2.0 mmol) in toluene.

The mixture was heated under reflux (110 °C) under dry nitrogen during 24 h (controlled by TLC). After this time, the solvent was evaporated, washed with cold water and filtered off. Due to the close R_f values of unreactant **3f** and product **6a**, the crude mixture was subjected to a first column (to remove impurities) and a further purification using a second silica column (EtOAc/DCM, 9:1 as an eluent) to yield pure **6a** in the form of yellow crystals. Similar procedure was done to compound **6b**.

5.1.3.1. 2-[(*p*-Methylphenylthio)ethylidenehydrazinyl]-5-methylthiazolidine-4-thione (6a). 38% yield, mp 125 °C (from DCM); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 1.67–1.73 (m, 3H, CH_3), 3.21 (s, 3H, CH_3), 3.71 (d, 2H, J = 8 Hz, CH_2 -S), 3.94 (m, 1H, CH-S), 7.01 (d, 2H, Ar); 7.20 (d, 2H, Ar); 7.91 (t, J = 8 Hz, 1H, CH=N), 10.09 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 19.3 (CH_3), 24.3 (CH_3), 39.5 (CH-S), 47.7 (CH_2 -S), 122.7, 126.3, 128.0, 132.6, 135.7; 141.2; 149.0, 157.6 (CH=N), 169.9 (CH=N); 191.1 (C=S). IR (KBr, cm^{-1}) ν = 3201 (NH); 1602 and 1598 (C=N), 1209 (C=S).

5.1.3.2. 2-[(*p*-Methylphenyl)thiopropylidenehydrazinyl]-5-methylthiazolidine-4-thione (6b). 34% yield, mp 137 °C (from DCM); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 1.47–1.73 (m, 6H, CH_3), 3.48–3.61 (m, 4H, 2 CH_2), 3.94 (m, 1H, CH_2 -S), 7.35 (m, 4H, Ar); 8.31 (t, J = 11 Hz, 1H, CH=N), 9.49 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 16.3 (CH_3), 18.3 (CH_2), 24.8 (CH_3), 45.31 (CH_2 -S), 126.3, 127.3, 128.0, 130.2, 136.0; 145.2; 151.0, 159.2 (CH=N), 170.9 (CH=N); 186.5 (C=S). IR (KBr, cm^{-1}) ν = 3191 (NH); 1672 and 1608 (C=N), 1206 (C=S).

5.2. Pharmacology

5.2.1. Cruzain inhibition assays

Cruzain activity was measured as previously described,^{15b} by monitoring the cleavage of the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-aminomethylcoumarin (Z-FR-AMC). Assays were performed in a final volume of 200 μL , in sodium acetate 0.1 M pH 5.5, in the presence of 5 mM dithiothreitol and 0.01% Triton X-100, except for evaluation of detergent-sensitivity, when inhibition was compared in 0% and 0.01% Triton. Final concentrations were 0.4 nM for the enzyme and 2.5 μM for the substrate (K_m = 2 μM). All assays were performed in duplicates and followed for 5 min, and activity was calculated based on initial rates. All compounds were initially tested at 100 μM , after a 10 min pre-incubation with cruzain. Compounds which inhibited over 50% of cruzain activity at this concentration were further evaluated for time-dependence and detergent-sensitivity, and their dose-response curves were determined. For evaluation of time-dependence, percentages of enzyme inhibition by a compound with or without pre-incubation with enzyme for 10 min were compared. During the pre-incubation step cruzain and compound concentrations were 10-fold higher than in the final assay. Since compounds were observed to be time-dependent, consistently with a covalent mode of inhibition, all subsequent assays were performed with a 10 min pre-incubation. Dose-response curves were determined based on ten compounds concentrations, varying from 100 μM to 1.5 nM in fourfold dilutions and at 200 μM . Data was analyzed with Prism 4 (GraphPad). To evaluate if compounds were aggregators,²⁹ cruzain inhibition was compared for a given compound concentration in the absence of or in the presence of 0.01% Triton X-100. Compound concentrations varied depending on their potency against cruzain, and concentrations around their IC_{50} s were tested. Detergent-sensitivity was not observed.

5.2.2. Cytotoxicity screens

The cytotoxicity was determined using BALB/c mice splenocytes (5×10^6 cells well^{-1}) cultured in 96-well plates in Dulbecco's Mod-

ified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Chemical Co., USA) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS; Cultilab, Brazil) and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of gentamycin (Novafarma, Brazil). Each compound was evaluated in four concentrations (1, 5, 10 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), in triplicate. Cultures were incubated in the presence of ^3H -thymidine (1 $\mu\text{Ci well}^{-1}$) for 24 h at 37 °C and 5% CO_2 . After this period, the content of the plate was harvested to determine ^3H -thymidine incorporation using a beta-radiation counter (β -matrix 9600, Packard). The cytotoxicity of the compounds was determined by comparing the percentage of ^3H -thymidine incorporation (as an indicator of cell viability) of drug-treated wells in relation to untreated wells. Non-cytotoxic concentrations were defined as those causing a reduction of ^3H -thymidine incorporation below 10% in relation to untreated cells (control).

5.2.3. *T. cruzi* cell culture assay

Epimastigotes of *T. cruzi* (Y strain) were cultivated at 26 °C in Liver Infusion Tryptose medium supplemented with 10% fetal calf serum, 1% hemin, 1% R9 medium and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamycin. Parasites (10^6 cells mL^{-1}) were cultured in a fresh medium in the absence or in the presence of the compounds being tested (from stock solution in DMSO). Cell growth was determined after 15 h, 7 and 11 days of culture by counting viable forms in a hemacytometer. The compounds were prepared from a stock solution in DMSO. To determine IC_{50} , cultures of Y strain epimastigotes in the presence of different concentrations of the compounds were evaluated after 11 days as described above. IC_{50} calculation was carried out using non-linear regression on Prism 4.0 GraphPad software. Y strain *T. cruzi* trypomastigotes were obtained from culture supernatants of the LCC-MK2 cell line at 37 °C and placed in 96-well plates (4×10^5 well^{-1}) in DMEM medium supplemented with 10% FCS and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamycin. Tests were conducted in triplicate. Viable parasites were counted in a hemacytometer 24 h after addition of compounds by way of trypan blue exclusion. The percentage of inhibition was calculated in relation to untreated cultures. The same procedure was performed for Benznidazole (Bdz, reference drug) and vehicle alone, with DMSO blank.

5.2.4. Toxicological tests in mice

The selected compounds were re-suspended in 100 μL [30% DMSO/70% H_2O , v/v] and female Swiss mice weighting 40–45 g ($n = 6$ animals) were treated with a single dose of respective compounds (100 mg kg^{-1} weight). The treated animals were monitored for signs of general toxicity, including behavior and feeding, for 72 h after the last treatment. The number of dead animals was checked and compared with the untreated animals, which received 100 μL of solution (30% DMSO/70% H_2O , v/v). The experimental protocols with animals were approved and supervised by the Ethics Committee at the HEMOPE Hospital (Recife, PE, Brazil).

Acknowledgements

This research received support from Pernambuco State Foundation for Science and Technology (FACEPE, Grant #APO-0123-4.03/08) and Brazilian National Council of Research (CNPq, Grant #472880/2009-8). M.V.O.C. holds a CAPES scholarship, while J.H.M. acknowledges the Sandler Family Foundation. We also thank the Federal University of Pernambuco Department of Fundamental Chemistry for recording the spectra and elemental analyses and HEMOPE Hospital for supplying mice for the toxicological test.

Supplementary data

CCDC 793133 (3g) contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained charge free from

The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif. Supplementary data (X-ray diffraction data for 3g compound, HRMS and elemental analysis data of all new compounds) associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.bmc.2010.09.056.

References and notes

- Coura, J. C. *Mem. Inst. Oswald Cruz* **2007**, *112*, 113–122.
- Cerecetto, H.; Gonzalez, M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1185–1211.
- Hunter, W. N. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 11749–11753.
- (a) Steverding, D.; Caffrey, C. R.; Sajid, M. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1025–1032; (b) Caffrey, C. R.; Steverding, D. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, *167*, 12–19.
- (a) Ariyanayagam, M. R.; Oza, S. L.; Mehler, A.; Fairlamb, A. H. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 27612–27619; (b) Eberle, C.; Burkhardt, J. A.; Stump, B.; Kaiser, M.; Brun, R.; Krauth-Siegel, R. L.; Diederich, F. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 2034–2044.
- (a) Neres, J.; Bryce, R. A.; Douglas, K. T. *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 110–117; (b) Carvalho, I.; Andrade, P.; Campo, V. L.; Guedes, P. M. M.; Sesti-Costa, R.; Silva, J. S.; Schenkan, S.; Dedola, S.; Hille, L.; Rejzek, M.; Nepogodiev, S. A.; Field, R. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2412–2427.
- (a) Santos, C. C.; Sant'Anna, C.; Terres, A.; Cunha-e-Silva, N. L.; Scharfstein, J.; Lima, A. P. C.; De, A. *J. Cell. Sci.* **2005**, *118*, 901–915; (b) Duschak, V. G.; Couto, A. S. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 3174–3202.
- (a) Scharfstein, J.; Schmitz, V.; Morandi, V.; Capella, M. M.; Lima, A. P.; Morrot, A.; Juliano, L.; Müller-Esterl, W. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1289–1300; (b) Aparicio, I. M.; Scharfstein, J.; Lima, A. P. C. *A. Infect. Immun.* **2004**, *72*, 5892–5902; (c) Acosta, D. M.; Arnaiz, M. R.; Esteve, M. I.; Barboza, M.; Stivale, D.; Orlando, U. D.; Torres, S.; Laucella, S. A.; Couto, A. S.; Duschak, V. G. *Int. Immunol.* **2008**, *20*, 461–470.
- (a) Engel, J. C.; Doyle, P. S.; Hsieh, I.; McKerrow, J. H. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 725–734; (b) Doyle, P. S.; Zhou, Y. M.; Engel, J. C.; McKerrow, J. H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3932–3939.
- Moreira, D. R. M.; Leite, A. C. L.; Santos, R. R.; Soares, M. B. P. *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 212–231.
- Du, X.; Hansell, E.; Engel, J. C.; Caffrey, C. R.; Cohen, F. E.; McKerrow, J. H. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 733–742.
- Du, X.; Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; Caffrey, C. R.; Holler, T. P.; McKerrow, J. H.; Cohen, F. E. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2695–2707.
- Greenbaum, D. C.; Mackey, Z.; Hansell, E.; Doyle, P.; Gut, J.; Caffrey, C. R.; Lehrman, J.; Rosenthal, P. J.; McKerrow, J. H.; Chibale, K. J. *Med. Chem.* **2004**, *47*, 3212–3219.
- (a) Fujii, N.; Mallari, J. P.; Hansell, E.; Mackey, Z.; Doyle, P.; Zhou, Y. M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; McKerrow, J. H.; Guy, R. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 121–123; (b) Siles, R.; Chen, S.; Zhou, M.; Pinney, K. G.; Trawick, M. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4405–4409.
- (a) Ferreira, R. S.; Bryant, C.; Ang, K. K. H.; McKerrow, J. H.; Shoichet, B. K.; Renslo, A. R. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5005–5008; (b) Jadhav, A.; Ferreira, R. S.; Klumpp, C.; Mott, B. T.; Austin, C. P.; Ingles, J.; Thomas, C. J.; Maloney, D. J.; Shoichet, B. K.; Simeonov, A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 37–51.
- (a) Rodrigues, C. R.; Flaherty, T. F.; McKerrow, J. H.; Springer, C.; Cohen, F. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1537–1541; (b) Porcal, W.; Hernández, P.; Boiani, L.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J. J.; Olea-Azar, C.; González, M.; Cerecetto, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6995–7004; (c) Zanatta, N.; Amaral, S. S.; Santos, J. M.; de Mello, D. L.; Fernandes, L. D. S.; Bonacorso, H. G.; Martins, M. A. P.; Andricopulo, A. D.; Borchardt, D. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10236–10243; (d) Trossini, G. H.; Malvezzi, A.; do Amaral, A. T.; Rangel-Yagui, C. O.; Izidoro, M. A.; Cezari, M. H.; Juliano, L.; Chin, C. M.; Menezes, C. M.; Ferreira, E. J. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2010**, *25*, 62–67.
- (a) Brak, K.; Doyle, P. S.; McKerrow, J. H.; Ellman, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6404; (b) Brak, K.; Kerr, I. D.; Barrett, K. T.; Fuchi, N.; Debnath, M.; Ang, K.; Engel, J. C.; McKerrow, J. H.; Doyle, P. S.; Brinen, L. S.; Ellman, J. A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1763–1773; (c) Mott, B. T.; Ferreira, R. S.; Simeonov, A.; Jadhav, A.; Ang, K. K. H.; Leister, W.; Shen, M.; Silveira, J. T.; Doyle, P. S.; Arkin, M. R.; McKerrow, J. H.; Ingles, J.; Austin, C. P.; Thomas, C. J.; Shoichet, B. K.; Maloney, D. J. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 52–60.
- (a) Remeiro, N. C.; Aguirre, G.; Hernández, P.; González, M.; Cerecetto, H.; Aldana, I.; Pérez-Silanes, S.; Monge, A.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 641–652; (b) Santos-Filho, J. M.; Leite, A. C. L.; Oliveira, B. G.; Moreira, D. R. M.; Lima, M. S.; Soares, M. B. P.; Leite, L. F. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6682–6691; (c) Vera-Divaio, M. A. F.; Freitas, A. C.; Castro, H. C.; Albuquerque, S.; Cabral, L. M.; Rodrigues, C. R.; Albuquerque, M. G.; Martins, R. C. A.; Henriques, M. G. O.; Dias, L. R. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 295–302; (d) Merlino, A.; Benitez, D.; Chavez, S.; Cunha, J.; Hernández, P.; Tinoco, L. W.; Campillo, N. E.; Páez, J. A.; Cerecetto, H.; González, M. *Med. Chem. Commun.* **2010**, *1*, 216–228.
- Bryant, C.; Kerr, I. D.; Debnath, M.; Ang, K. K. H.; Ratnam, J.; Ferreira, R. S.; Jaishankar, P.; Zhao, D.-M.; Arkin, M. R.; McKerrow, J. H.; Brinen, L. S.; Renslo, A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6218–6221.
- Borchardt, D. M.; Mascarello, A.; Chiaradia, L. D.; Nunes, R. J.; Oliva, G.; Yunes, R. A.; Andricopulo, A. D. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 142–150.
- Leite, A. C. L.; Lima, R. S.; Moreira, D. R. M.; Cardoso, M. V. O.; Brito, A. C. G.; Santos, L. M. F.; Hernandez, M. Z.; Kiperstok, A. C.; Lima, R. S.; Soares, M. B. P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3749–3757.

22. Leite, A. C. L.; Moreira, D. R. M.; Cardoso, M. V. O.; Hernandez, M. Z.; Pereira, V. R. A.; Silva, R. O.; Kiperstok, A. C.; Lima, M. S.; Soares, M. B. P. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1339–1345.
23. Donnici, C. L.; Araújo, M. H.; Oliveira, H. S.; Moreira, D. R. M.; Pereira, V. R. A.; Souza, M. de A.; Castro, M. C. A. B. de; Leite, A. C. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5038–5043.
24. (a) Lima, L. M.; Barreiro, E. J. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23–49; (b) Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; Bolzani, V.; Da, S.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 103–112; (c) Hernandez, M. Z.; Cavalcanti, S. M. T.; Moreira, D. R. M.; Azevedo, W. F., Jr.; Leite, A. C. L. *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 303–314.
25. Pessoa, C.; Ferreira, P. M. P.; Lotufo, L. V. C.; Moraes, M. O. de; Cavalcanti, S. T. C.; Coelho, L. C. D.; Hernandez, M. Z.; Leite, A. C. L.; De Simone, C. A.; Costa, V. M. A.; Souza, V. M. O. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 523–528.
26. (a) Leite, A. C. L.; Moreira, D. R. M.; Coelho, L. C. D.; Menezes, F. D. de; Brondani, D. J. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 1538–1541; (b) Alves, A. J.; Leite, A. C. L.; Santana, D. P.; Beltrao, M. T.; Coelho, M. R.; Gayral, P. *Farmaco* **1993**, *48*, 1167–1171.
27. (a) Vicini, P.; Geronikaki, A.; Anastasia, K.; Incertia, M.; Zani, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3859–3863; (b) Vicini, P.; Geronikaki, A.; Incerti, M.; Zani, F.; Dearden, J.; Hewitt, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3714–3724; (c) Lopez-Torres, E.; Dilworth, J. R. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3012–3023.
28. Ozturk, T.; Ertas, E.; Mert, O. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5210–5278.
29. Seidler, J.; McGovern, S. L.; Doman, T. N.; Shoichet, B. K. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4477–4486.
30. Feng, B. Y.; Shoichet, B. K. *Nat. Protocols* **2006**, *1*, 550–553.
31. Rocha, G. B.; Freire, R. O.; Simas, A. M.; Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1101–1111.
32. Spartan '08 Tutorial and User's Guide: Wavefunction: Irvine, CA, 2008. <http://www.wavefun.com/products/spartan.html>.
33. Choe, Y.; Brinen, L. S.; Price, M. S.; Engel, J. C.; Lange, M.; Grisostomi, C.; Weston, S. G.; Pallai, P. V.; Cheng, H.; Hardy, L. W.; Hartsough, D. S.; McMakin, M.; Tilton, R. F.; Baldino, C. M.; Craik, C. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2141–2156.
34. GOLD version 4.0 software, Cambridge Crystallographic Data Centre. <http://www.ccdc.cam.ac.uk>.
35. W.L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific: San Carlos, CA, USA, 2002. <http://www.pymol.org>.

Experimental and theoretical data provide structural insights into bioactive thiazolidin-4-ones

Marcos Veríssimo de O. Cardoso^a, Diogo Rodrigo Magalhães Moreira^a, Ana Cristina Lima Leite^{a*}, Marcelo Zaldini Hernandez^a, Frederico J. S. Pontes^b, Carlos A. de Simone^c.

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, Universidade Federal de Pernambuco, 50.740-540, Recife, PE, Brazil.

^b Departamento de Química Fundamental, CCEN, Universidade Federal de Pernambuco, 50.740-540, Recife, PE, Brazil.

^c Departamento de Física e Informática, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil.

Author address: Ana Cristina L. Leite, Federal University of Pernambuco, Department of Pharmaceutical Science, Recife, PE, Brazil. E-mail: acllb2003@yahoo.com.br

41 **Abstract:** Although viewed as promising drug candidates, few efforts have been
42 addressed towards the structural chemistry of 2-hydrazone-thiazolidin-4-ones. Therefore,
43 2-[(3-phenylsulfanylpropylidene)-hydrazone]thiazolidin-4-one (**ATZ3**) was synthesized
44 and its crystal and molecular structure was studied by NMR and X-ray single crystal
45 diffraction. The ^1H NMR spectral data indicated that the hydrazone group assumes the
46 *E*-configuration, which was further confirmed by bi-dimensional NMR and
47 crystallographic data. In spite of most bond lengths and angles were in agreement with
48 their expected values, the crystalline packing provided important information with regard
49 to the double bond position involving the C-4 carbon. Quantum chemical calculations at
50 Semiempirical, Density Functional Theory (**DFT**) and *Ab Initio* levels provided a good
51 agreement between calculated and the structural results provided by the X-ray analysis.
52 Dimerization energies for the system were also estimated. Statistical and Hierarchic
53 Cluster Analysis (**HCA**) revealed interesting aspects of the calculations and pointed the
54 B3LYP as the most accurate for determination of structure among the considered
55 methods, in spite of some good results achieved by semiempirical schemes.

56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76

Keywords: thiazolidin-2-ones, hydrazones, thiazole, X-ray, quantum chemical, NMR.

1. Introduction

Highly functionalized thiazole, thiazolidin-4-one and thiazolidine-2,4-diones derivatives have been explored as potential drug candidates, ^[1, 2] and some of them have entered in clinical trials. ^[3] Following this promising line of research, our group has been deeply involved in the medicinal chemistry of thiazolidin-4-one derivatives as potential antiparasitic drug candidates. ^[4-6] Our biological studies has proven thiazolidin-4-ones are inhibitors of parasitic cysteine proteases. ^[6] To advance our medicinal chemistry program, *in silico* studies through molecular docking has also been performed to highlight the binding mode of these inhibitors into the protease's active site. ^[4, 5] A precise structural and molecular knowledge for this chemical class is highly desirable, to improve the accuracy of our molecular docking and subsequently the quality of our drug design program.

Although there is a plethora of crystallographic structures available for thiazolidine-2,4-diones and 1,3-thiazoles, similar information for thiazolidin-4-one bearing a hydrazone moiety is much less abundant. ^[7, 8] Likewise, 2-hydrazonothiazolidin-4-ones can result to diastereoisomers and tautomers (**Figure 1**) but chemical aspects regarding these features have been few discussed. ^[9] The structural chemistry and molecular modelling towards this chemical class is thereby chemically relevant.

To ensure these issues, studies of spectroscopy, X-ray diffractometry, and computational chemistry were gathered here for a highly representative bioactive thiazolidin-4-one, named ATZ3 (**Figure 2**). More specifically, we have semi-empirical and quantum chemistry calculations at different level of theory that were performed for this compound, along the comparison of the intermolecular interactions collected from the X-ray crystallography and the gas-phase isolated molecule. At the first time, one- and two-dimensional NMR data were acquired and studied. Relevant molecular insights are provided in the light of these findings, which could be useful for anyone working on the thiazole chemistry.

2. Experimental

2.1 Physical measurements

All chemicals and solvents were purchased locally from Aldrich or Fluka. Melting point was determined on Thomas Hoover and is uncorrected. Elemental analysis was performed on a Carlo Erba E-1110. NMR were recorded on a Varian UNITYplus-400 NMR (at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C) using TMS as an internal standard. The mass spectrum was measured on a LC-IT-TOF (**Shimadzu**). Chemical shifts are reported in ppm and multiplicities are given as s (**singlet**), d (**doublet**), t (**triplet**), q (quartet), m (**multiplet**), dd (**double doublet**) integration, and coupling constants (**J**) in hertz.

2.2. Synthesis

2-[(3-Phenylsulfanyl-(*E*)-propylidene)-hydrazono]thiazolidin-4-one (**ATZ3**): Yield (53%, from ethanol), white crystals, m.p.: 125 °C; m.p._{lit} 125°C ^[8]; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 2.59 (dd, 2H, *J*= 12.2, 7.0 Hz, CH₂), 3.18 (t, 2H, *J*= 7.1 Hz, 2H, CH₂),

123 3.83 (s, 2H, CH₂), 7.20 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, Ar), 7.27-7.42 (m, 4H, Ar), 7.72 (t, 1H, *J* = 5.1
124 Hz, CH=N), 11.78 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 174.71 (C5),
125 164.41 (C3), 159.47 (C4), 136.15 (C7), 129.55 (C12, C8), 128.94 (C11, C9), 126.34
126 (C10), 33.37 (C6), 32.21 (C1), 29.44 (C2). HRMS, Calcd (Found) for C₁₂H₁₃N₃OS₂:
127 280.0534 (280.0568).

128

129 **Crystal Structure Determination**

130

131 X-ray diffraction data collections were performed on an Enraf-Nonius Kappa-CCD
132 diffractometer (**95 mm CCD camera on κ-goniostat**) using graphite monochromated
133 MoKα radiation (0.71073 Å), at room temperature. Data collections were carried out using
134 the COLLECT software [9] up to 50° in 2θ. Final unit cell parameters were based on 2938
135 reflections. Integration and scaling of the reflections, correction for Lorentz and
136 polarization effects were performed with the HKL DENZO-SCALEPACK system of
137 programs. [10] The structure of compound was solved by direct methods with SHELXS-
138 97. [11] The models were refined by full-matrix least squares on F² using SHELXL-97. [12]
139 The program ORTEP-3 [13] was used for graphic representation and the program WINGX
140 [14] to prepare materials for publication. The H atom bound to N3 was located in a
141 difference Fourier map and refined freely with isotropic displacement parameter. All other
142 H atoms were located by geometric considerations placed (**C–H = 0.93–0.98 Å**) and
143 refined as riding with U_{iso}(H) = 1.5U_{eq}(C-methyl) or 1.2U_{eq}(other). An Ortep-3 diagram of
144 the molecule is shown in **Figure 2**, while in **Table 1** shown the main crystallographic
145 parameters.

146

147 **Quantum Chemistry Calculations and Statistical and Chemometrics Evaluation of**

148 **the Results**

149

150 In order to assure the accuracy and reliability from the proposed X-ray structures,
151 a quantum chemical investigation at Semiempirical, *Ab initio* and Density Functional
152 Theory (**DFT**) levels was made about the structures and energies on the monomeric and
153 dimeric structures proposed in this work. Concerning the semiempirical methods a broad
154 of the parameterizations was used ranging from the most traditional based in NDDO
155 approximation, like AM1, MNDO e PM3, until the more recent and accurate
156 implementations as RM1 [17], MNDO/d [18], PM6 [19] and PM6-DH2 [20]. All these methods
157 are encoded in the MOPAC 2009 program [21]. PM6-DH2 is an extension of the PM6
158 method with inclusion of dispersion and hydrogen bonding correction terms to given good
159 binding energies. For this reason this method was only employed in the complexation
160 study, where the intermolecular hydrogen bonds has an outstanding role in the molecular
161 complex packing. Hartree-Fock (**HF**), Second Order Møller-Plesset (**MP2**) and DFT (**via**
162 **B3LYP functional**) calculations were carried out in the Gaussian 03 program [22] using
163 6-31G** basis sets for C, H, N and O atoms and 6-31+G* for S atom. *Ab Initio* and DFT
164 estimative of dimerization energy were improved by inclusion of zero point energy (**ZPE**)
165 and Counterpoise correction for basis set superposition errors (**BSSE**).

166 Semiempirical calculations of geometry optimization and energy had their
167 precision improved by the inclusion of GNORM=0.01 and PRECISE keywords. Gaussian
168 03 default criteria were kept throughout this work.

169 Optimized geometries obtained by quantum chemical methods had their
170 performance evaluated through statistical and chemometrics methods. Beyond the most
171 habitual statistical indexes as: average error (**AE**), average unsigned error (**AUE**) and
172 standard deviation (**SD**), a Hierarchic Cluster Analysis (**HCA**) was carried out in the
173 calculated geometric parameters generated by the quantum chemical methods. HCA is
174 a chemometric technique of recognition of patterns, where the similarities between
175 clusters are estimated by a distance measurement. A common approach of this method
176 is initially to treat each data as a cluster and join each closer cluster together. This
177 process is repeated until remaining only one cluster. The information obtained in this
178 process is shown in a two-dimensional plot called dendogram ^[23].

179 The numerical data used in HCA was initially submitted to a preprocessing of
180 autoscaling. This process becomes indispensable, due to the different units from the
181 geometric parameters studied in this analysis (**bond lengths in angstroms; bond and**
182 **torsional angles in degrees**). The autoscaling applied in all data set consisted in to
183 subtract each class of geometric parameter of its average and followed of division by its
184 standard deviation. The average and standard deviation were calculated for each class
185 of parameter and quantum chemical method or experimental data. This preprocessed
186 data formed the matrix of elements, where the columns are occupied by the geometric
187 parameters and the lines are occupied for the results produced for each method.

188 **Results and Discussion**

189
190
191 **ATZ3** was essentially synthesized as reported in ^[8] and detailed in **Scheme 1**, with
192 a moderate yield (**53%**). The structure of the **ATZ3** was initially ascertained by
193 comparison of its previously reported data of melting point and infrared spectra ^[8]. Here
194 is reported, for the first, the high-resolution mass spectra (**HR-MS**), ESI-TOF MS and
195 NMR (**¹H, ¹³C and DEPT**) spectral.

196 The first step of this work was to determine the relative configuration of the
197 exocyclic iminic bond (**Figure 1a**). The ¹H NMR spectra showed a triplet at δ 7.72 for one
198 proton, suggesting the presence of only one isomer. This was further confirmed by HPLC
199 chromatogram. Although Karabatsos(reference) had stated that iminic hydrogen of (**E**-
200 diastereomer usually is downfielded rather than the analogous hydrogen in (**Z**-
201 diastereomer, this kind of assignment using one-dimensional ¹H NMR alone is feasible
202 of mistake, because of the influence of used solvent and the chemical nature of
203 substituents around the imine-attached hydrogen. To gather evidences about the relative
204 configuration of the imine double bond, NOESY ¹H NMR was therefore recorded.

205 Moreover, NH proton has resonated at 11.78 ppm, which is suggestive of a lactam
206 proton (**I**) rather than an imine-like proton (**III**), being this later expected to resonate at
207 much higher field. This chemical field might be influenced by solvent effect, but the X-ray
208 analysis has corroborated with this assignment.

209 The Ortep-3 diagram displays the entire molecular structure conformation obtained from
210 X-ray analysis for the compound **ATZ3** (**Figure 2**). The crystal data details are
211 summarized in the **Table 1**.

212 Bond lengths and bond angles of the structure are essentially in agreement with
213 expected values, in particular, those found among the thiazolidine rings reported to date
214 in the Cambridge Structural Database. ^[16] The atoms of the thiazolidine ring and the

linkage of the atoms N2,N1,C3,C2,C1 and S2 are planar and the largest deviation (0.0864Å) from the least-square plane is exhibited by atom C5. The dihedral angle between this plane and the aromatic ring is 10.6°. The main interatomic bond distances and angles are summed in **Table 2**. The molecular packing involves one strong intermolecular hydrogen contacts between N3-H1.....N2ⁱ where H1.....N2ⁱ = 1.869(2) Å; N3.....N2ⁱ = 2.867(3) Å and N3-H1.....N2ⁱ = 174° [i= -x, -y+1, -z+2], as can see in **Figure 3**.

X-ray diffraction is one of the most widely used and precise method for the determination of the position of atoms in molecules and solids. However, the correct location of hydrogen atoms is nearly always made by geometric considerations or indirect methods. Eventual doubts about a molecular geometry obtained from the X-ray analysis can be suppressed with help of quantum chemical investigations.

The possibility of incorrect attribution from position of a hydrogen atom in the analyzed structure was investigated in this work. A tautomeric form of the proposed thiazolidine was studied using quantum chemical methods, besides the originally proposed structure. However, calculations of structure and stability in this tautomeric form indicated that it is not more stable than the original structure confirming the agreement between theory and X-ray measurements (see **Supporting Information – Table S7 and S8**).

The confidence in the correct prediction of the proposed structure associated with the importance gained of these compounds in the last years as anti-parasitic drug candidates motivated a more extensive exploration of the most appropriated quantum chemical methods to describe this class of compounds.

The next tables (**Table 2**) resumes the statistical analysis made from the comparison between optimized geometries and experimental measurements from X-ray analysis. Geometric parameters involving hydrogen atoms were left out from this analysis. Extensive information about the optimized geometries is enclosed in the supplementary material (**Tables S1 – S6**).

The monomeric structure did not have its geometric structure optimized by the PM6-DH2 method. The absence of hydrogen bonds or dispersion interactions in this system would become the PM6-DH2 results identical to the ones achieved by the PM6 method.

The first stage of analysis from the geometric parameters produced by quantum chemical methods had the AUE as the strongest indicator of the computational performance. Conclusions based in the AUE results shows to be more trustworthy due the impossibility of an error cancelation to mask the analysis. SD indicates how close to the mean value calculated data are. Small value for SD indicates that the data points tend to be close to the mean, whereas high SD indicates that the data spreads over a large range of values.

Concerning the monomeric structure, the AUE measurement assures that HF has the best performance for bond lengths among the considered methods. MP2 gives smaller error than the B3LYP method. Considering the semiempirical methods MNDO has the biggest error for bond lengths, and the inclusion of *d* orbitals in its more recent implementation (**MNDO/d**) was not enabled to correctly predict the structures. PM6 and RM1 methods had a performance comparable to the B3LYP.

260 While the inclusion of electronic correlations seems to be not very important to
261 bond length results, the statistical analysis pointed that for bond and torsional angles
262 points, correlation effects are indispensable for a good reproducing of these parameters.
263 B3LYP had the smallest errors and may be considered the best method to reproduce the
264 experimental geometry considering the whole studied parameters.
265 The expectable superior performance of RM1 in comparison to the AM1 (**the first is an**
266 **accurate re-parameterization from the last method**) was observed. RM1 showed a
267 superior performance than other recent and very accurate semiempirical
268 parameterizations, like the PM6 method. PM3 method gave the best results for torsional
269 angles among the semiempirical methods contrasting with the large deviation provided
270 by PM6 method.

271 X-ray information about the molecular packing of the studied compound indicates
272 formation of a dimeric structure with intermolecular hydrogen bonds involving the atoms
273 N2 (from one monomer) and N3 – H (**from the other monomer**) – according to the
274 ORTEP numeration given in **Figure 2**. Using almost the same quantum chemical
275 methods from the previous investigation, the geometry and complexation energy of this
276 system were investigated.

277 Firstly, it will be compared only the information extracted from the X-ray analysis
278 involving the intermolecular hydrogen bond and the theoretical previsions. The results
279 were resumed in the **Table 3**. Among the bond distances analyzed (**H1.....N2ⁱ and**
280 **N3.....N2ⁱ**) the best result was achieved with the B3LYP method. Almost theoretical
281 approaches, that independent of including some electronic correlation treatment in its
282 formulation, overestimated the bond lengths. Exceptions were the PM3 and RM1
283 methods and MP2 (**only for H1.....N2ⁱ bond**). Semiempirical parameterizations, which
284 have not been parameterized for hydrogen bonds in its original formulation, like MNDO
285 and MNDO/d produce the worst results. More recent developments as PM6 and PM6-
286 DH2 did not show a superior performance than that achieved by PM3 method for this
287 type of bond.

288 Considering the bond angle the closest result was achieved by the RM1 method
289 followed by the B3LYP. With exception of the results came from MNDO and MNDO/d
290 methods all calculations overestimated the bond angle value. In resume, the B3LYP
291 method showed the most acceptable performance for the description of the
292 intermolecular bond in this system, but the MP2 prediction seems to be quite accurate as
293 well. This method shows a non-systematic error in the bond length predictions,
294 contrasting with the other calculated estimations.

295 Statistical analysis from the geometric parameters of the dimers structures reveals
296 the same pattern seemed in the analysis of de monomeric structures. Bond lengths are
297 not sensitive to correlation electronic effects, whereas a treatment of these effects seems
298 very important to correct description of bond and torsional angles. MP2 performs the best
299 results for bond angles. However, the statistics regarding the torsional angles are the
300 main source of the biggest errors in the performance of the methods. HF, MP2 and some
301 semiempirical calculations in gas phase does not predict an almost planarity observed in
302 condensed phase. These methods found minimum structures with the aromatic rings out
303 of the plane made by the others atoms. In brief, it is possible to reach the conclusion, that
304 B3LYP method has the best performance for geometry optimization of this system,
305 considering all aspects studied here.

306 PM6-DH2 had one of the most accurate performances in the class of
307 semiempirical methods. Although the PM6-DH2 predictions never been the most
308 accurate for each considered geometric parameter, its predictions are always close to
309 the best theoretical estimation.

310 Semiempirical performances should be analyzed carefully. Despite the slightly
311 worse accuracy of these methods, in comparison to the *Ab Initio* e B3LYP methods, the
312 CPU time wasted in a semiempirical job is quite small than a more sophisticated
313 calculation. For example, RM1 and AM1 geometry optimizations of dimeric structure
314 consumed about 60 seconds of computational time, while the B3LYP calculations, with
315 the basis sets indicated in the methodology section of this work, consumed more than
316 15000 seconds of computational time to do the same task. A more conclusive analysis
317 about the time wasted in each calculation can be made, if a relative time scale in the
318 calculations is adopted. From the graphs of **Figure 5** is possible to notice the dramatic
319 difference between the computational time of semiempirical and other more sophisticated
320 quantum chemical methods.

321 For the monomeric structure (**Figure 5, right graph**) the HF and B3LYP
322 optimizations consumes about 10000 more time than the semiempirical calculations. A
323 difference becomes larger (**about 65000 times**) for the MP2 method. This tendency
324 remains true for the computational time wasted in the geometry optimization of the
325 dimeric structure (**Figure 5, left graph**).

326 Additionally, *Ab Initio* and DFT calculations need much more memory resources
327 from the computer. In resume, semiempirical methods can be a good exploratory tool for
328 calculations of geometry and energy of this kind of system with a low computational cost
329 and moderate accuracy.

330

331 **Dimerization Energy Estimations**

332

333 A natural extension of this work is the estimation from the dimerization energy of
334 the studied system. Firstly the semiempirical predictions will be analyzed. The results are
335 resumed in the next table.

336 Despite the absence of experimental estimates of the dimerization energy from
337 the system, it is possible to states, that the MNDO and MNDO/d predictions are quite
338 small. The main reason for this poor estimation is a lack of parameters to describe
339 hydrogen bond in these methods. Part of this deficiency was partially corrected in the
340 AM1 and PM3 methods. It is very known that these methods can predict very well the
341 energy interaction from a water dimer, but fails for other systems involving hydrogen
342 bonds ^[24]. More recent developed semiempirical methods (**PM6 and RM1**) uses new
343 functions to describe hydrogen bonds and an increase in the accuracy was achieved, but
344 a correct treatment of weak interactions was made only with the inclusion of empirical
345 corrections for dispersion and hydrogen bonds in the PM6-DH2. The PM6-DH2 method
346 provides energy difference of almost 5 kcal.mol⁻¹ in relation to the PM6 prediction, where
347 the last method is the parametrization used in its formulation, guarantees that this
348 difference comes from the inclusion of corrections for weak interactions in the PM6-DH2
349 method.

350 Ab Initio and B3LYP estimations are showed in the next table. Total energies of
351 dimer and monomers were augmented by the inclusion of Zero-point energy (**ZPE**) and
352 Basis set superposition error (**BSSE**). Dimerization energies were estimated as:

$$353 \Delta E_{\text{DIM}} = \Delta E - \Delta \text{ZPE} - E(\text{BSSE}) \quad (1)$$

354
355 With ΔE given by the difference of energies between dimer and monomers, ΔZPE
356 is the difference between the ZPE of dimer and monomers and $E(\text{BSSE})$ the BSSE
357 correction.
358

359 Inclusion of correlation energy in the estimations increases the predictions of the
360 dimerization energy. BSSE and ZPE contributions at MP2 level seem to be more
361 significant in the final result. Only semiempirical prediction close to the high level
362 calculations comes from the PM6-DH2 method, but with a difference of almost 4 kcal.mol⁻¹
363 of HF estimative.
364

365 Hierarchical Cluster Analysis (HCA) from the geometry optimization results.

366
367 The large amount of geometric parameter to analyze becomes almost impossible
368 the observation of a possible pattern from the calculated data without use of statistical
369 tools. Successful applications of exploratory statistical tools to analyze geometric
370 parameters obtained from quantum chemical calculation [25] encouraged us to apply
371 similar techniques in our work. The HCA analysis used here allowed the easy
372 identification of patterns through graphic known as dendograms.

373 Using the single linkage method for the clustering and an Euclidian metric, HCA
374 analysis were carried out in the geometric parameters produced by the theoretical
375 methods for the monomeric and dimeric structures. Analyses were performed in the
376 complete data set and furthermore in three distinct groups: bond lengths, bond angles
377 and torsional angles. Results are showed in the next picture. All HCA analyses were
378 made using the PAST program [26].

379 The first dendogram shows a general view from the performance of the methods.
380 Experimental measurements are very similar to the *Ab Initio* and B3LYP estimations. The
381 last method showed the greatest similarity from the experimental data. This can be noted
382 by the line joining these two branches. Among the semiempirical methods, the RM1
383 shows to have the best predictive power followed by the PM3 method. RM1 result
384 surpasses the HF and MP2 calculations. The last two methods had similar performance.
385 The MNDO and MNDO/d shows the biggest similarity between the considered methods,
386 but with a large dissimilarity in comparison to experimental values. AM1 performed the
387 worst result considering a general view of the methods.

388 Analyzing the dendograms of bond distances and bond angles, it is possible to
389 realize some patterns. MNDO and MNDO/d predictions are always closer of each other
390 and are almost always the first cluster to be aggregated, indicating a great similarity
391 between the methods. Except for the torsional angles, where is closest to the PM3
392 method, in all remaining parameters the experimental values are closer to the high level
393 calculations (**HF, MP2 and B3LYP, specially the last method**) than the semiempirical
394 calculations evidencing the superiority of these predictions. RM1, PM6 and PM3

395 calculations had their predictions very similar to each other and AM1 had in almost
396 circumstances the most dissimilar prediction.

397 The dendograms referring to torsional angles shows the most different pattern in
398 comparison to the other graphics, except for the building of a cluster by the MNDO and
399 MNOD/d predictions. HF and MP2 predictions, which could not reproduce the total
400 planarity of this system, separated from the experimental values. Semiempirical methods,
401 like PM3 and RM1, features a good geometry optimization for the torsional angles.

402 Proving the consistency from the quantum chemical calculations, the similarity
403 between the methods observed in the monomeric case is repeated in the geometry study
404 of dimers. The main difference between the dendograms is the similarity between the
405 PM6 and PM6-DH2 predictions. Since geometric parameters involving hydrogen atoms
406 were left out of the statistical analysis, in essence these two methods had the same
407 performance in the HCA.

408 Each group of dendograms repeats a very similar pattern, when the all geometric
409 parameters are analyzed together or only the bond angles or bond distances are
410 individually considered. However, the hard task of correct reproducing torsional angles,
411 results in considerable changes in the dendograms dedicated only to torsional angles.
412 For example, MP2 method makes good estimates for bond angles and bond distance for
413 these systems, but fails into predict correct torsional angles. Then, the dendograms for
414 torsional angles clearly indicates that this method is supplanted by semiempirical
415 predictions.

416

417 **Conclusion**

418

419 In summary we disclosed the entire molecular structure of the 2 [(2-
420 phenylthioethylidene)-hydrazono]-thiazolidin-4-one (**ATZ3**) by X-ray analysis allied whit
421 semiempirical and quantum chemical calculations.

422 Quantum chemical investigations confirmed, through energetics and structural
423 evidences, the X-ray structure proposed. Statistical analysis from the errors and standard
424 deviations, as well as the relative energies from the other possible tautomers supports
425 the correctness from the proposed X-ray structure. The theoretical investigations shows
426 the importance of the semiempirical methods, specially the recent PM6-DH2
427 implementation, as an alternative exploratory tool for similar chemical systems, in front of
428 the excessive computational demand of *Ab Initio* and DFT methods performing the same
429 tasks. Among the high level quantum chemistry methods the B3LYP had the best
430 performance, combing reasonable well the inclusion of electronic correlation and
431 reasonable computational demand. B3LYP predict geometries better than the more
432 precise MP2 method.

433 Use of HCA allowed a more easily identification and evaluation of the theoretical
434 methods used in this work and agrees with the statistical measurements of previously
435 calculated errors and standard deviations.

436

437 **Supplementary Materials**

438

439 Crystallographic data for compound **ATZ3** have been deposited with the
440 Cambridge Crystallographic Data Center as Supplementary Publication No. CCDC

441 XXXX. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to CCDC, 12
442 Union Road, Cambridge CH21EZ, UK (fax: +44 1223 336 033 or e-mail:
443 deposit@ccdc.cam.ac.uk). Structural data, statistical estimations and relative energies
444 calculated through quantum chemical methods are enclosed in the supplementary pages.
445

446 Acknowledgment

447
448 This study received support from the Brazilian National Research Council (**CNPq**,
449 **grant number 479982/2008-2**). M.V.O.C. and D.R.M.M. holds a CAPES scholarship of
450 doctoral.

452 References

- 453
454 [1] Bondock, S.; Khalifa, W.; Fadda, A. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 948-954.
455 [2] a) KÜÇÜKGÜZEL, G. *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 353 – 359; b) Saiz, C.;
456 Pizzo, C.; Manta, E.; Wipf, P.; Mahler, S. G. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 901–904; c)
457 Tenorio, R.; Carvalho, C.; Pessanha, C.; de Lima, J.; de Faria, A.; Alves, A.; de Melo, E.
458 J.; Goes, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2575–2578.
459 [3] Veniant, M. M.; Hale, C.; Hungate, R. W.; Gahm, K.; Emery, M. G.; Jona, J.; Joseph,
460 S.; Adams, J.; Hague, A.; Moniz, G.; Zhang, J.; Bartberger, M.; Li, V.; Syed, R.; Jordan,
461 S.; Komorowski, R.; Chen, M. M.; Cupples, R.; Kim, K. H.; Jean Jr., D. J.; Johansson, L.;
462 Henriksson, M. A.; Williams, M.; Vallgarda, J.; Fotsch, C.; Wang, M. *J. Med. Chem.* **2010**,
463 **in press**.
464 [4] Leite, A. C. L.; Lima, R. S.; Moreira, D. R. M.; Cardoso, M. V. O.; Brito, A. C. G.;
465 Santos, L. M. F.; Hernandez, M. Z.; Kiperstok, A. C.; Lima, R. S.; Soares, M. B. P. *Bioorg.*
466 *Med. Chem.* **2006**, *14*, 3749-3757.
467 [5] Leite, A. C. L.; Moreira, D. R. M.; Cardoso, M. V. O.; Hernandez, M. Z.; Pereira, V. R.
468 A.; Silva, R. O.; Kiperstok, A. C.; Lima, M. S.; Soares, M. B. P. *ChemMedChem* **2007**, *2*,
469 1339-1345.
470 [6] Donnici, C. L.; Araújo, M. H.; Oliveira, H. S.; Moreira, D. R. M.; Pereira, V. R. A.;
471 Souza, M. de A.; Castro, M. C. A. B. de; Leite, A. C. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*,
472 5038–5043.
473 [9] KLIKA, K. D. *et al.* Structural revision of products resulting from the reaction of
474 methylhydrazine with acridin-9-yl isothiocyanate due to unexpected acridinyl migration
475 and further reactions. **ARKIVOC**, v. 16, p. 93 - 108, 2006.
476 [10] Enraf-Nonius COLLECT; Nonius BV: Delft, The Netherlands, (**1997-2000**).
477 [11] Otwinowski, Z.; Minor, W. in: Carter, C. W.; Sweet, R. M. (Eds.), *Methods in*
478 *Enzymology*, vol. 276, Academic Press, New York, **1997**, p. 307-326.
479 [12] Sheldrick, G. M.; SHELXS-97. Program for Crystal Structure Resolution. University
480 of Göttingen, Göttingen, Germany, (**1997**).
481 [13] Sheldrick, G. M.; SHELXL-97. Program for Crystal Structure Refinement. University
482 of Göttingen, Göttingen, Germany, (**1997**).
483 [14] Farrugia, L. J.; *J. Appl. Cryst.* **1997**, *30*, 565.
484 [15] Farrugia, L. J.; *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *32*, 837-838.
485 [16] Allen, F. H.; *Acta Cryst.* **2002**, *B58*, 380-388.
486 [17] Rocha GB, Freire RO, Simas AM, Stewart JJP; *J. Comp. Chem.* **2006**, *27*, 1101.

- 487 [18] Thiel W, Voityuk AA; *Theor. Chim. Acta* **1992**, 81, 391.
488 [19] Stewart JJP; *J. Mol. Model.* **2007**, 13, 1173.
489 [20] Korth M, Pitonák M, Rezáč J, Hobza P; *J. Chem. Theory Comp.* **2010**, 6, 344.
490 [21] OPENMOPAC. www.openmopac.net (accessed Apr 23, 2010).
491 [22] Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR,
492 Montgomery JA Jr, Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J,
493 Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada
494 M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O,
495 Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Adamo C, Jaramillo J,
496 Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW,
497 Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich
498 S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman
499 JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko
500 A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY,
501 Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez
502 C, Pople JA (2004) GAUSSIAN 03, Revision B.04. Gaussian Inc, Wallingford, CT.
503 [23] Beebe KR; Pefl RJ; Seasholtz MB; *Chemometrics: a practical guide.* **1998**, John
504 Wiley & Sons.
505 [24] Dannenberg JA; *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1997**, 401, 287.
506 [25] Kiralj R; Ferreira MCF; *Int. J. Quan. Chem.* **2003**, 95, 237.
507 [26] Hammer Ø; Harper DAT; Ryan, PD; *Paleontologia Electronica* **2001**, 4(1), 9.
508

List of Schemes, Figures and Tables

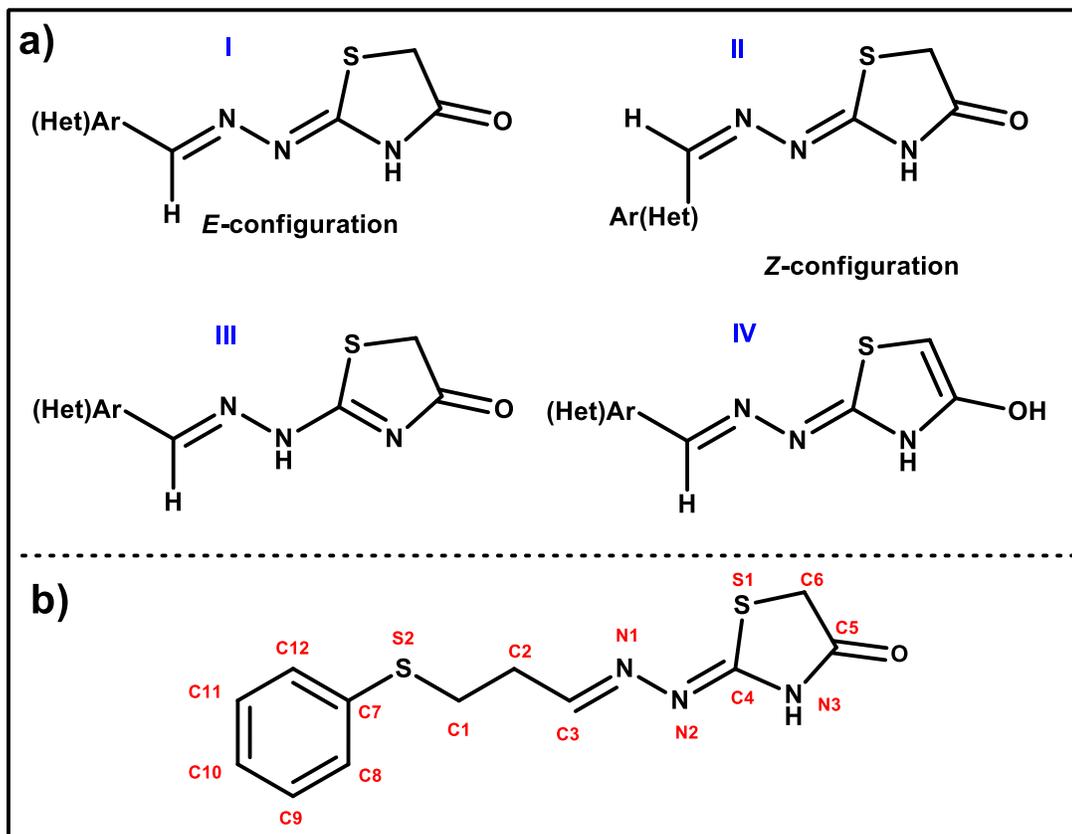
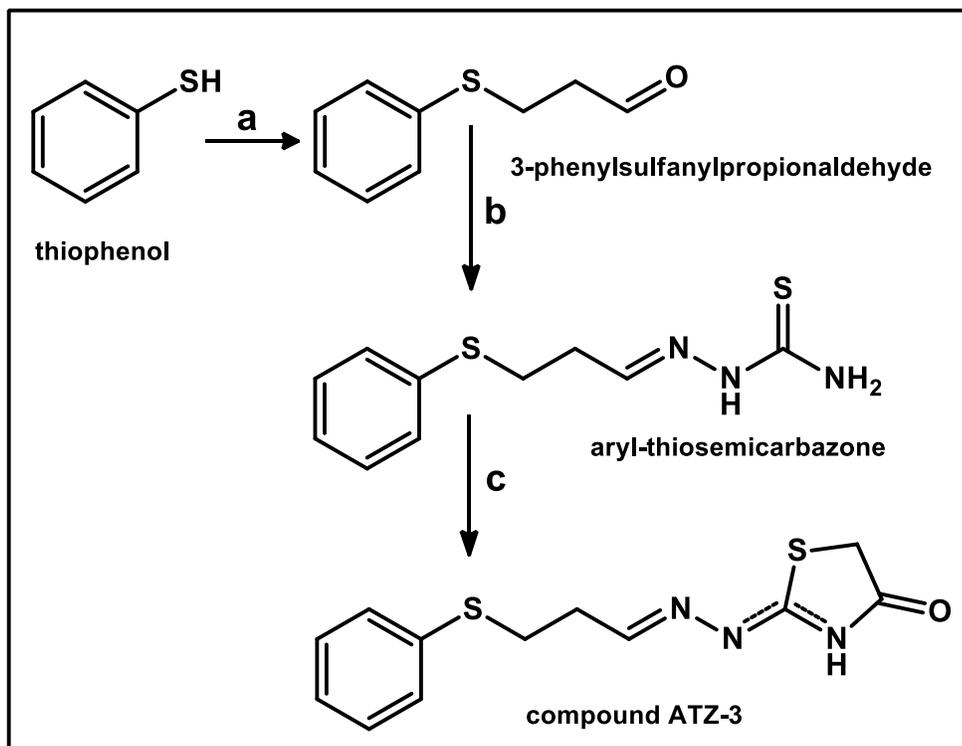


Figure 1: a) Possible isomers and tautomers. b) Numbered structure of the hydrazone-thiazolidin-4-one (ATZ3) under study.



Scheme 1: Synthesis of compound **ATZ3**. Reagents and conditions: (a) i) propionaldehyde diethyl acetal, KOH, fusion at 110°C; 2 h; ii) Water, sulfuric acid, reflux, 1h; (b) thiosemicarbazide, MeOH, AcOH, reflux, 12 h. (c) α -bromocarboxylic acids, AcONa, EtOH, reflux, 8 h.

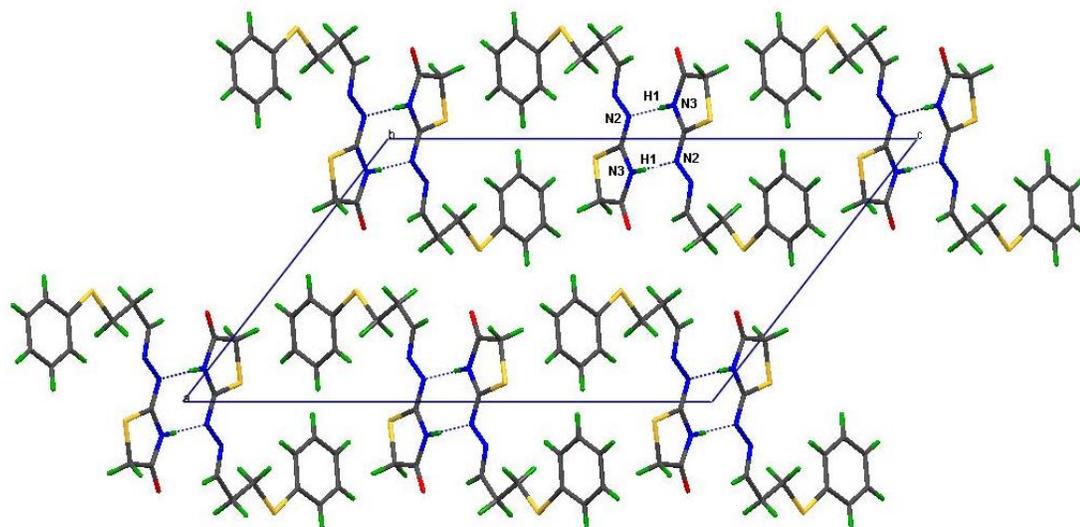


Figure 2: ORTEP-3 diagram of compound **ATZ3**. Displacement ellipsoids are drawn at 50% probability level.

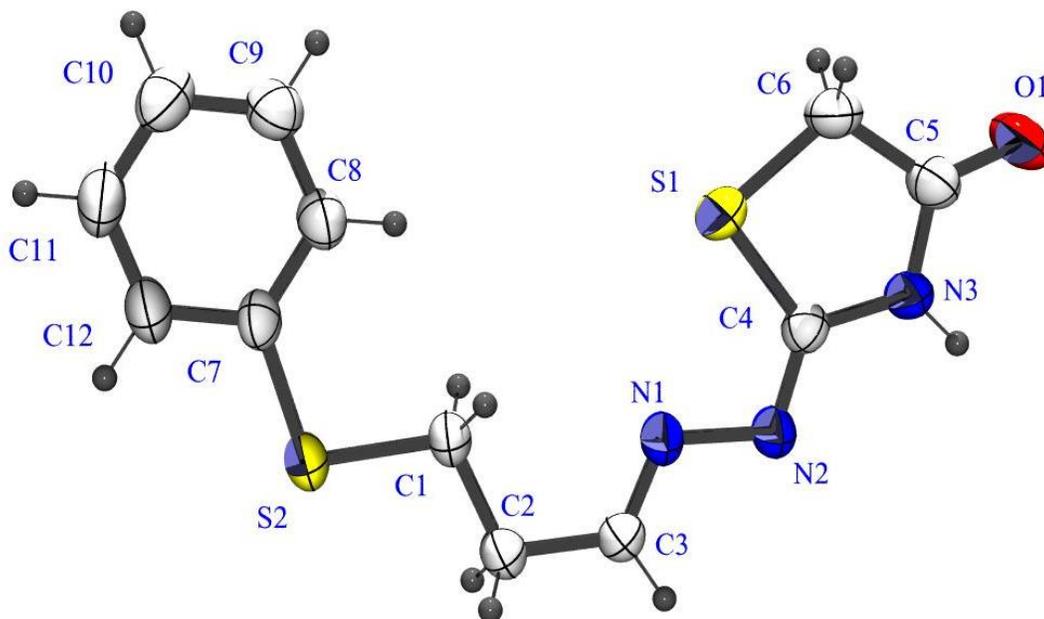


Figure 3: A packing diagram of the **ATZ-3** showing the chain of molecules linked by N3–H1...N2 hydrogen bonds. Hydrogen bonds are shown as dashed lines.

Table 1: Crystal data and structure refinement.

Empirical formula	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O S ₂		
Formula weight	279.37		
Temperature	295 K		
Wavelength	0.71073 Å		
Crystal system	Monoclinic		
Space group	P 2 ₁ /c		
Unit cell dimensions	a = 13.5930(7) Å	b = 5.6310(3) Å	∠ = 128.042(3)°
	c = 21.6040(7) Å		
Volume	1302.32(11) Å ³		
Z	4		
Density (calculated)	1.425 Mg/m ³		
Absorption coefficient	0.406 mm ⁻¹		
F(000)	584		
Crystal size	(0.150 x 0.132 x 0.099) mm ³		
Theta range for data collection	3.0 to 26.6°.		
Index ranges	-17 ≤ h ≤ 15, -7 ≤ k ≤ 6, -26 ≤ l ≤ 26		
Reflections collected	9401		
Independent reflections	2709 [R(int) = 0.064]		
Completeness to theta = 26.6°	98.0 %		
Refinement method	Full-matrix	least-squares on F ²	
Computing:	COLLECT ¹⁰ , Denzo Scalepack ¹¹	HKL and	
	SHELXS-97 ¹² , SHELXL-97 ¹³		
Data / restraints / parameters	2007/ 0 / 163		
Goodness-of-fit on F ²	1.029		
Final R indices [I > 2σ(I)]	R	indices	(all data)
	R ₁ = 0.064, wR ₂ = 0.110		
Largest diff. Peak and hole	0.275 and -0.227 e.Å ⁻³		
Final R indices [I > 2σ(I)]	R	indices	(all data)
	R ₁ = 0.042, wR ₂ = R ₁ = 0.064, wR ₂ = 0.110		

0.099

Table 2: Statistical measurements summary (**AE**, **AUE** and **SD**) from the comparison of the bond lengths (**Å**), bond and torsional angles ($^{\circ}$) between experimental and several theoretical methods for ATZ3.

	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3	PM6	RM1
Bond Lengths									
AE	0.005	0.018	0.016	0.003	0.006	0.023	0.016	0.019	0.014
AUE	0.012	0.020	0.017	0.028	0.040	0.030	0.023	0.022	0.019
SD	0.016	0.013	0.011	0.035	0.044	0.027	0.026	0.021	0.020
Bond Angles									
AE	0.31	0.32	-0.14	0.78	0.73	0.73	0.76	0.34	0.01
AUE	1.63	1.18	1.50	2.08	2.47	2.40	2.60	2.08	2.02
SD	2.20	1.53	2.08	2.78	3.43	3.40	3.90	2.73	2.52
Torsional Angles									
AE	0.1	-0.3	0.1	-7.0	3.5	3.7	0.2	-7.9	-1.2
AUE	7.6	2.3	6.2	8.6	11.1	10.5	2.8	10.8	4.7
SD	23.3	4.2	18.6	34.9	30.4	28.7	3.7	36.0	11.3

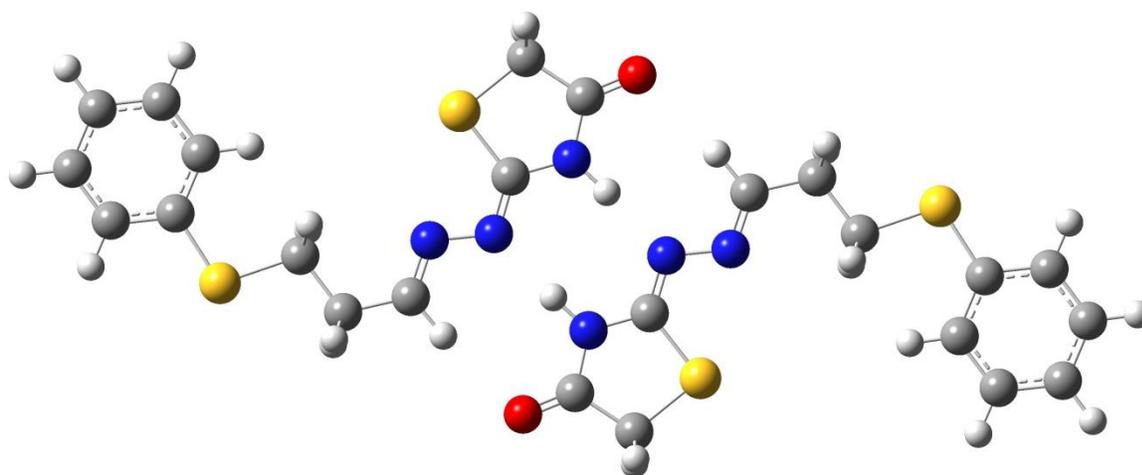


Figure 4: Superior view from the dimeric structure observed during the packing in the condensed phase.

Table 3: Comparison between theoretical and experimental results for the intermolecular hydrogen contact in the molecular packing from the structure. Bond lengths are given in Angstroms (Å) and Bond angles in degree (°) and $i = -x, -y+1, -z+2$.

	H1.....N2 ⁱ	N3.....N2 ⁱ	N3-H1.....N2 ⁱ
Experimental	1.869(2)	2.867(3)	174°
HF	2.088	3.096	176.7
B3LYP	1.876	2.917	176.3
MP2	1.857	2.894	175.8
AM1	2.351	3.347	176.4
MNDO	3.743	4.699	160.4
MNDO/d	3.781	4.730	159.1
PM3	1.829	2.857	178.0
PM6	2.064	3.104	177.0
PM6-DH2	2.021	3.063	175.7
RM1	1.618	2.698	174.2

Table 4: Statistical measurements summary (**AE**, **AUE** and **SD**) from the comparison of the bond lengths (**Å**), bond and torsional angles ($^{\circ}$) between experimental and several theoretical methods for the dimeric structure.

	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3	PM6	PM6-DH2	RM1
	Bond Lengths									
AE	-0.005	0.013	0.015	0.020	0.011	0.023	0.034	0.028	0.028	0.023
AUE	0.013	0.018	0.018	0.039	0.045	0.043	0.039	0.035	0.035	0.029
SD	0.017	0.016	0.015	0.040	0.048	0.041	0.027	0.027	0.027	0.023
	Bond Angles									
AE	0.85	0.60	-0.29	1.39	-0.50	-0.38	-0.19	0.41	0.41	2.52
AUE	1.57	1.33	1.00	3.60	2.74	2.76	4.53	2.61	2.51	5.33
SD	1.81	1.59	1.34	4.52	3.87	4.12	5.17	4.05	4.02	11.86
	Torsional Angles									
AE	-0.3	-0.5	-0.2	-0.5	23.1	18.9	-21.3	-5.7	-2.7	-7.8
AUE	22.5	2.5	17.5	2.5	49.0	49.8	24.1	12.3	7.2	16.7
SD	45.4	3.5	36.1	3.4	66.8	69.4	39.1	16.7	10.8	23.4

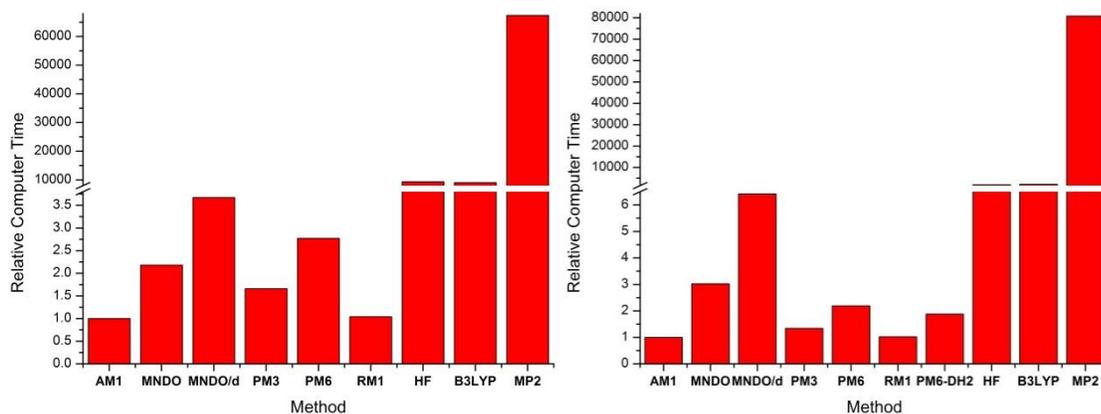


Figure 5: Relative computer time consumed for the different methods used in this work for geometry optimization of the monomeric (**right**) and dimeric (**left**) structures.

Table 5: Semiempirical estimations for the dimerization energy (kcal.mol^{-1}). Energies of monomers and dimers are given in electron volt (eV).

	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3
Monomer	-6087.908	-6238.157	-6074.798	-5546.297
Dimer	-3043.872	-3119.066	-3037.386	-2773.017
Dimerization Energy	-3.76	-0.59	-0.59	-6.05

	PM6	RM1	PM6-DH2
Monomer	-5648.589	-6016.011	-5648.207*
Dimer	-2824.104	-3007.792	-5648.574
Dimerization Energy	-8.79	-9.85	-13.76

Table 6: *Ab Initio* and B3LYP estimations of the dimerization energy (**kcal.mol⁻¹**). Total energies, Zero-point energies (**ZPE**) and basis set superposition errors (**BSSE**) are indicated (**in a.u.**).

	HF	B3LYP	MP2
Monomer/a.u.	-1495.223917	-1500.945073	-1497.705628
ZPE /a.u.	0.255324	0.237141	0.240540
Dimer/a.u.	-2990.469182	-3001.921104	-2995.448676
ZPE/a.u.	0.512679	0.476017	0.482933
BSSE/a.u.	0.005132	0.008014	0.012549
Dimerization Energy	-17.89	-25.54	-32.52

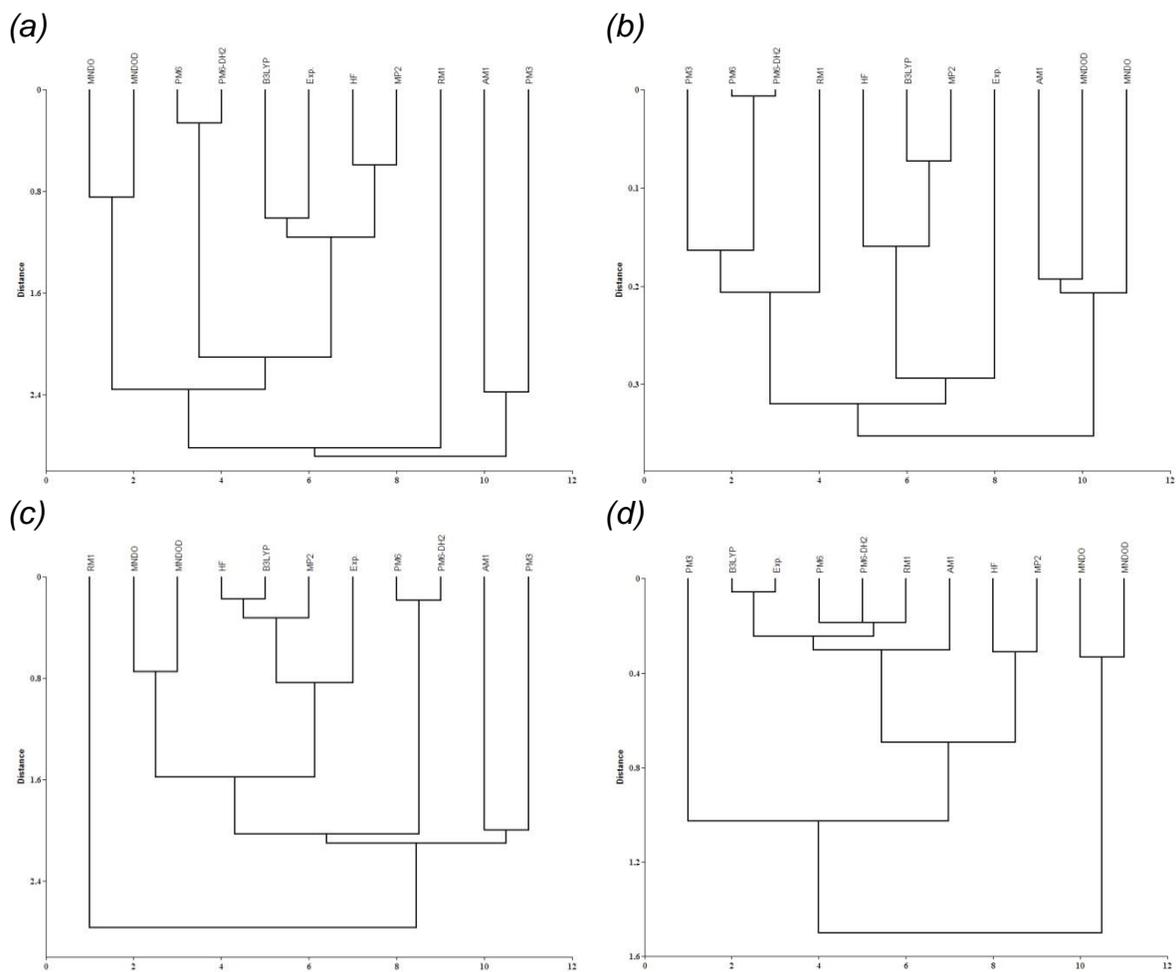


Figure 6: Dendrograms relative to HCA of the monomeric structure: **(a)** all geometric parameters are included in the analysis; **(b)** only bond lengths considered **(c)** only bond angles considered and **(d)** only torsional angles considered.

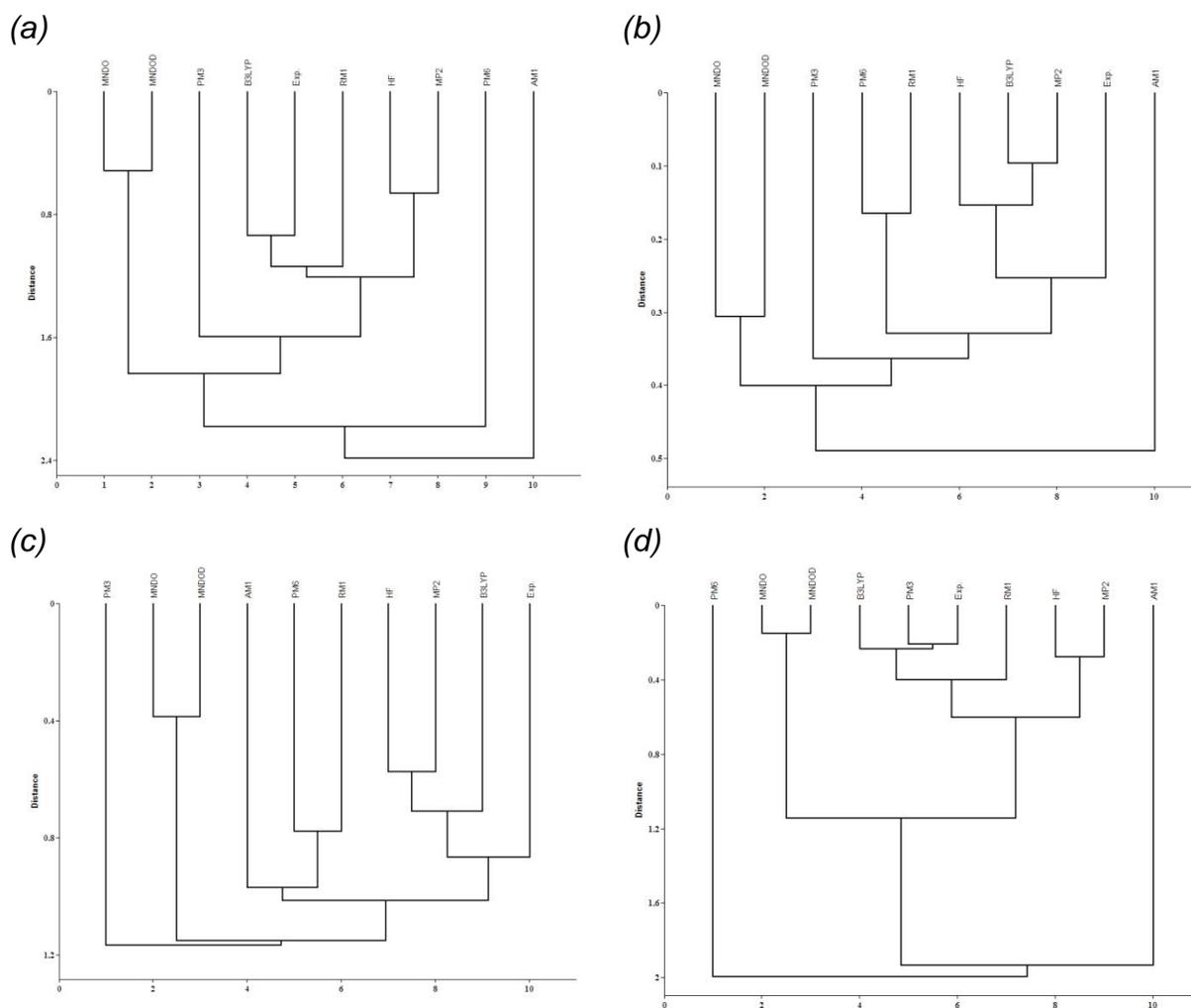
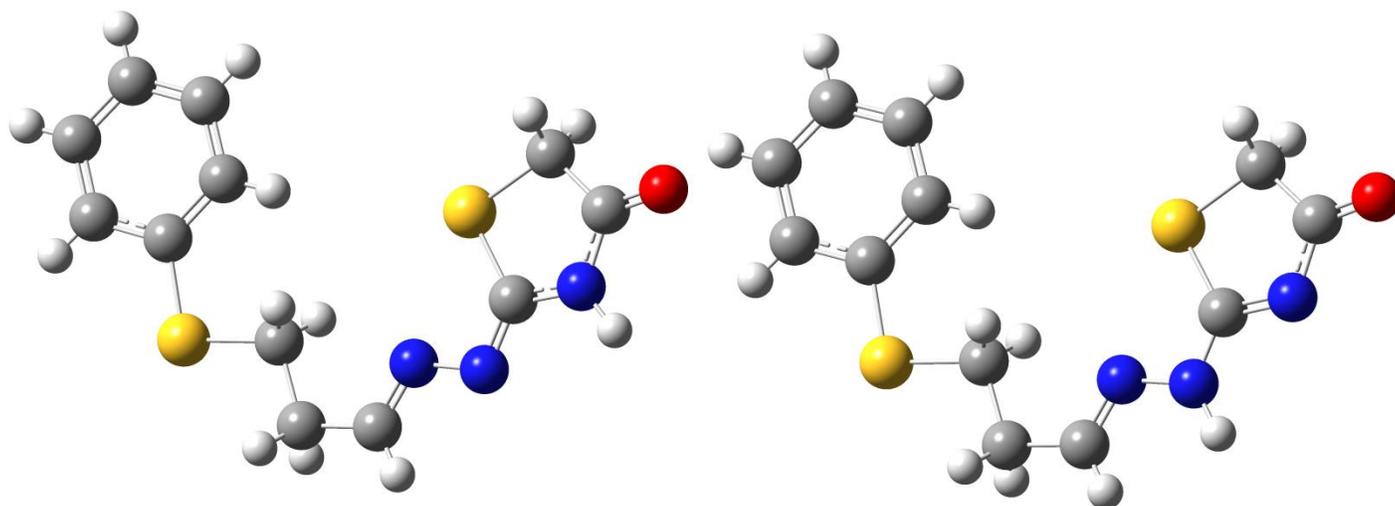


Figure 7: Dendrograms relative to HCA of the dimeric structure: **(a)** all geometric parameters are included in the analysis; **(b)** only bond lengths considered **(c)** only bond angles considered and **(d)** only torsional angles considered.

Supporting Information



Structure 1

Structure 2

Figure S1: Two proposed structures studied in the quantum chemical study. Left, structure derived from X-ray analysis and right, a possible tautomer.

Table S1: Comparison of the bond lengths between the structures of the Structure 1 obtained by *ab initio*, DFT and semiempirical methods and X-ray analysis. All values are given in angstroms, Å. Atomic numbers follow the numeration from the Figure 2.

Bonds	Exp.	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3	PM6	RM1
S1—C4	1.750 (2)	1.769	1.785	1.766	1.760	1.700	1.769	1.784	1.794	1.779
S1—C6	1.814 (2)	1.818	1.839	1.821	1.777	1.744	1.813	1.828	1.816	1.807
S2—C7	1.762 (2)	1.786	1.787	1.781	1.695	1.695	1.762	1.761	1.761	1.743
S2—C1	1.800 (2)	1.827	1.836	1.823	1.771	1.740	1.808	1.829	1.826	1.820
N1—C3	1.255 (3)	1.254	1.279	1.290	1.302	1.306	1.306	1.299	1.303	1.304
N1—N2	1.412 (2)	1.384	1.396	1.407	1.343	1.342	1.343	1.384	1.388	1.397
N2—C4	1.291 (3)	1.255	1.282	1.293	1.318	1.310	1.316	1.305	1.301	1.310
N3—C4	1.360 (3)	1.375	1.382	1.381	1.406	1.408	1.413	1.434	1.408	1.405
N3—C5	1.367 (3)	1.365	1.383	1.382	1.340	1.417	1.419	1.428	1.426	1.408
O1—C5	1.190 (3)	1.189	1.212	1.221	1.236	1.221	1.222	1.216	1.206	1.217
C1—C2	1.519 (3)	1.524	1.530	1.522	1.507	1.538	1.545	1.515	1.522	1.517
C2—C3	1.494 (3)	1.500	1.500	1.495	1.496	1.513	1.515	1.494	1.505	1.502
C5—C6	1.508 (3)	1.517	1.528	1.524	1.511	1.528	1.535	1.513	1.504	1.503
C7—C8	1.386 (3)	1.390	1.401	1.403	1.397	1.413	1.418	1.395	1.395	1.388
C7—C12	1.388 (3)	1.390	1.404	1.402	1.404	1.413	1.417	1.400	1.399	1.390
C8—C9	1.383 (3)	1.385	1.397	1.396	1.395	1.406	1.407	1.391	1.400	1.390
C9—C10	1.363 (3)	1.385	1.394	1.398	1.393	1.406	1.406	1.389	1.398	1.390
C10—C11	1.369 (4)	1.385	1.397	1.397	1.397	1.406	1.406	1.339	1.400	1.390
C11—C12	1.378 (4)	1.385	1.393	1.397	1.390	1.406	1.407	1.388	1.398	1.389

Table S2: Comparison of the bond angles between the structures of the Structure 1 obtained by *Ab initio*, DFT and semiempirical methods and X-ray analysis. All values are given in degrees, °. Atomic numbers follow the numeration from the Figure 2.

Angles	Exp.	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3	PM6	RM1
C4—S1—C6	90.83 (10)	91.73	91.22	91.15	94.07	96.37	94.73	92.47	94.11	93.14
C7—S2—C1	102.73 (10)	100.94	103.31	98.30	105.66	107.16	107.70	105.51	104.67	101.94
C3—N1—N2	115.86 (17)	113.72	113.50	112.45	118.72	115.84	115.84	117.61	115.19	113.50
C4—N2—N1	109.04 (16)	112.64	111.54	109.24	117.53	115.76	116.14	120.03	115.54	113.82
C4—N3—C5	117.24 (18)	119.11	119.22	118.53	115.51	116.19	117.28	113.95	117.59	116.15
C2—C1—S2	109.91 (15)	109.12	108.61	109.42	105.98	110.31	110.86	107.68	106.16	107.07
C3—C2—C1	110.70 (18)	114.24	114.18	113.20	115.27	112.63	112.36	115.51	114.10	114.12
N1—C3—C2	119.41 (19)	122.53	121.97	120.58	122.54	119.46	119.53	121.30	119.85	118.86
N2—C4—N3	122.62 (18)	121.51	121.60	121.29	121.34	117.60	117.44	115.03	122.95	119.52
N2—C4—S1	124.58 (16)	127.83	127.29	127.03	128.17	132.30	132.79	132.98	128.17	129.96
O1—C5—C6	124.2 (2)	124.76	125.26	125.32	125.48	128.87	128.05	127.30	127.78	126.41
N3—C5—C6	111.0 (2)	110.52	109.97	109.58	112.58	110.03	111.48	112.95	111.90	112.45
C5—C6—S1	108.01 (16)	107.98	108.48	109.01	107.35	107.31	106.75	108.10	107.51	107.74
C8—C7—C12	118.3 (2)	119.42	119.26	119.60	119.16	118.87	118.98	119.28	121.32	120.60
C8—C7—S2	125.36 (17)	120.28	123.87	120.37	125.60	120.50	120.90	125.42	122.46	122.02
C12—C7—S2	116.36 (18)	120.28	116.86	120.03	115.24	120.50	120.03	115.30	116.17	117.33
C9—C8—C7	120.3 (2)	120.23	119.98	120.10	120.30	120.54	120.32	120.21	119.09	119.54
C10—C9—C8	120.8 (2)	120.10	120.71	120.17	120.30	120.32	120.27	120.31	120.25	120.16
C9—C10—C11	119.5 (2)	119.91	119.31	119.86	119.67	119.76	119.83	119.72	120.03	120.01
C10—C11— C12	120.6 (2)	120.10	120.45	120.20	120.19	120.13	120.27	120.20	120.21	120.07
N3—C4—S1	112.79 (15)	110.66	111.11	111.74	110.49	110.11	109.76	111.98	108.88	110.52
O1—C5—N3	124.8 (2)	124.73	124.76	125.11	121.94	121.10	120.47	119.74	120.32	121.15
C11—C12—C7	120.5 (2)	120.23	120.29	120.07	120.37	120.55	120.32	120.29	119.10	119.62

Table S3: Comparison of the torsional angles between the structures of the Structure 1 obtained by *Ab initio*, DFT and semiempirical methods and X-ray analysis. All values are given in degrees, °. Atomic numbers follow the numeration from the Figure 2.

Torsions	Exp.	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3	PM6	RM1
C3—N1—N2—C4	-176.73 (19)	180.0	179.1	179.6	178.0	179.5	179.5	179.4	178.9	179.5
C7—S2—C1—C2	177.95 (16)	180.0	169.5	179.0	180.0	176.7	179.2	179.8	155.3	148.8
S2—C1—C2—C3	-175.57 (15)	180.0	178.9	178.8	180.0	175.5	175.8	179.9	178.9	178.2
N2—N1—C3—C2	178.61 (18)	180.0	179.9	179.9	179.7	179.3	179.2	179.9	179.9	180.0
C1—C2—C3—N1	-2.1 (3)	0.0	0.9	1.6	0.3	101.2	102.5	0.1	0.2	0.8
N1—N2—C4—N3	179.94 (19)	180.0	179.9	180.0	179.6	180.0	179.9	178.2	179.8	179.9
N1—N2—C4—S1	1.0 (3)	0.0	0.2	0.0	0.5	0.0	0.0	0.6	0.3	0.2
C5—N3—C4—N2	-179.8 (2)	180.0	179.9	180.0	179.9	179.8	179.9	173.4	179.9	179.9
C5—N3—C4—S1	-0.8 (2)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	7.5	0.0	0.1
C6—S1—C4—N2	-178.9 (2)	180.0	180.0	180.0	179.9	179.9	179.9	177.5	179.9	179.9
C6—S1—C4—N3	2.07 (17)	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	3.6	0.0	0.0
C4—N3—C5—O1	179.5 (2)	180.0	179.9	180.0	180.0	179.7	179.9	173.2	0.0	179.9
C4—N3—C5—C6	-1.4 (3)	0.0	0.1	0.0	0.0	0.3	0.1	8.3	0.0	0.1
O1—C5—C6—S1	-178.1 (2)	180.0	179.9	180.0	180.0	179.8	180.0	176.4	180.0	179.9
N3—C5—C6—S1	2.8 (2)	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	0.0	5.2	0.0	0.1
C4—S1—C6—C5	-2.68 (18)	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.9	0.0	0.0
C1—S2—C7—C8	7.9 (2)	90.7	21.0	73.4	0.1	92.1	82.8	0.4	34.8	43.1
C1—S2—C7—C12	-172.82 (19)	90.7	160.6	107.4	179.9	92.1	100.7	179.6	147.9	139.4
C12—C7—C8—C9	-1.6 (4)	0.7	0.4	1.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.3	0.5
S2—C7—C8—C9	177.61 (18)	179.3	178.8	179.8	0.0	176.1	177.0	180.0	177.5	177.9
C7—C8—C9—C10	0.8 (4)	0.3	0.7	1.1	0.0	0.1	0.3	0.0	0.5	0.6
C8—C9—C10—C11	0.3 (4)	0.1	0.4	0.4	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1
C9—C10—C11—C12	-0.4 (4)	0.1	0.4	0.4	0.0	0.1	0.2	0.0	0.3	0.5
C10—C11—C12—C7	-0.5 (5)	0.3	0.7	0.5	0.0	0.1	0.0	0.0	0.5	0.5
C8—C7—C12—C11	1.5 (4)	0.7	0.4	0.3	0.0	0.2	0.3	0.0	0.1	0.0
S2—C7—C12—C11	-177.8 (2)	179.3	178.4	179.5	180.0	176.1	176.8	180.0	177.2	177.5

Table S4: Comparison of the bond lengths between the structures of the Structure 2 obtained by *ab initio*, DFT and semiempirical methods and X-ray analysis. All values are given in angstroms, Å. Atomic numbers follow the numeration from the Figure 2.

Bonds	Exp.	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3	PM6	RM1
S1—C4	1.750 (2)	1.766	1.785	1.761	1.765	1.704	1.770	1.791	1.802	1.789
S1—C6	1.814 (2)	1.807	1.826	1.807	1.769	1.741	1.809	1.825	1.807	1.799
S2—C7	1.762 (2)	1.786	1.789	1.782	1.696	1.695	1.762	1.762	1.761	1.743
S2—C1	1.800 (2)	1.825	1.839	1.822	1.771	1.740	1.808	1.829	1.815	1.819
N1—C3	1.255 (3)	1.252	1.278	1.290	1.303	1.304	1.304	1.298	1.301	1.303
N1—N2	1.412 (2)	1.356	1.361	1.364	1.342	1.358	1.357	1.399	1.379	1.371
N2—C4	1.291 (3)	1.337	1.354	1.355	1.396	1.410	1.417	1.415	1.380	1.381
N3—C4	1.360 (3)	1.277	1.296	1.301	1.327	1.316	1.321	1.320	1.314	1.322
N3—C5	1.367 (3)	1.381	1.394	1.403	1.422	1.437	1.437	1.451	1.437	1.437
O1—C5	1.190 (3)	1.187	1.211	1.219	1.232	1.218	1.219	1.206	1.119	1.211
C1—C2	1.519 (3)	1.525	1.529	1.522	1.507	1.538	1.545	1.515	1.522	1.517
C2—C3	1.494 (3)	1.501	1.500	1.496	1.495	1.513	1.515	1.493	1.506	1.502
C5—C6	1.508 (3)	1.537	1.554	1.549	1.533	1.543	1.551	1.530	1.538	1.527
C7—C8	1.386 (3)	1.390	1.402	1.403	1.397	1.413	1.417	1.394	1.395	1.388
C7—C12	1.388 (3)	1.390	1.403	1.402	1.404	1.413	1.417	1.400	1.399	1.390
C8—C9	1.383 (3)	1.385	1.396	1.396	1.395	1.406	1.407	1.391	1.400	1.390
C9—C10	1.363 (3)	1.385	1.396	1.398	1.393	1.406	1.406	1.389	1.398	1.390
C10—C11	1.369 (4)	1.385	1.396	1.397	1.397	1.406	1.406	1.392	1.400	1.390
C11—C12	1.378 (4)	1.385	1.394	1.397	1.391	1.406	1.407	1.388	1.398	1.389

Table S5: Comparison of the bond angles between the structures of the Structure 2 obtained by *Ab initio*, DFT and semiempirical methods and X-ray analysis. All values are given in degrees, °. Atomic numbers follow the numeration from the Figure 2.

Angles	Exp.	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3	PM6	RM1
C4—S1—C6	90.83 (10)	88.25	87.66	87.68	91.06	93.13	91.70	90.14	90.37	89.83
C7—S2—C1	102.73 (10)	100.88	102.70	98.18	105.62	107.17	107.61	105.50	105.70	101.82
C3—N1—N2	115.86 (17)	118.04	117.71	117.10	120.66	118.92	119.07	120.72	119.24	117.86
C4—N2—N1	109.04 (16)	120.92	121.01	119.74	118.42	113.65	114.04	115.99	115.32	116.46
C4—N3—C5	117.24 (18)	112.34	111.86	110.57	111.49	111.02	112.19	113.10	113.78	110.78
C2—C1—S2	109.91 (15)	109.11	108.56	109.32	105.92	110.22	110.79	107.60	109.96	107.03
C3—C2—C1	110.70 (18)	114.08	114.09	113.04	115.24	112.57	112.29	115.48	114.47	114.24
N1—C3—C2	119.41 (19)	122.26	121.73	120.15	122.58	119.23	119.32	121.39	119.43	118.36
N2—C4—N3	122.62 (18)	120.98	121.03	120.87	122.76	119.45	119.21	116.78	124.88	120.84
N2—C4—S1	124.58 (16)	119.55	118.83	118.14	120.19	122.68	123.50	126.15	119.04	121.11
O1—C5—C6	124.2 (2)	121.31	121.41	121.77	122.46	126.60	125.75	126.28	124.20	123.40
N3—C5—C6	111.0 (2)	113.44	113.23	113.15	113.42	112.29	113.74	112.40	112.34	114.06
C5—C6—S1	108.01 (16)	106.49	107.11	107.61	107.07	105.98	105.41	107.48	107.46	107.28
C8—C7—C12	118.3 (2)	119.50	119.42	119.68	119.20	118.89	119.01	119.31	121.24	120.64
C8—C7—S2	125.36 (17)	120.24	123.13	120.31	125.64	120.49	120.67	125.44	123.07	121.87
C12—C7—S2	116.36 (18)	120.25	117.41	120.01	115.16	120.49	120.22	115.26	115.65	117.44
C9—C8—C7	120.3 (2)	120.19	119.97	120.05	120.29	120.53	120.30	120.19	119.16	119.53
C10—C9—C8	120.8 (2)	120.09	120.56	120.17	120.29	120.14	120.27	120.31	120.24	120.14
C9—C10—C11	119.5 (2)	119.94	119.48	119.89	119.68	119.77	119.84	119.73	120.00	120.02
C10—C11—C12	120.6 (2)	120.09	120.38	120.20	120.19	120.13	120.26	120.20	120.25	120.07
N3—C4—S1	112.79 (15)	119.48	120.14	121.00	116.96	117.57	116.96	116.87	116.06	118.05
O1—C5—N3	124.8 (2)	125.25	125.36	125.09	124.13	121.11	120.52	121.37	123.47	122.53
C11—C12—C7	120.5 (2)	120.19	120.18	120.02	120.35	120.54	120.31	120.27	119.10	119.60

Table S6: Comparison of the torsional angles between the structures of the Structure 2 obtained by *Ab initio*, DFT and semiempirical methods and X-ray analysis. All values are given in degrees, °. Atomic numbers follow the numeration from the Figure 2.

Torsions	Experimental	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3	PM6	RM1
C3—N1—N2—C4	-176.73 (19)	180.0	179.9	179.7	169.8	178.6	175.3	173.3	176.7	180.0
C7—S2—C1—C2	177.95 (16)	180.0	165.0	178.9	179.9	175.8	177.9	179.6	71.7	147.4
S2—C1—C2—C3	-175.57 (15)	180.0	178.0	178.8	179.8	175.2	175.6	180.0	177.9	178.1
N2—N1—C3—C2	178.61 (18)	180.0	180.0	179.9	177.0	177.2	177.0	177.3	178.7	179.9
C1—C2—C3—N1	-2.1 (3)	0.0	0.3	1.8	0.0	100.9	102.8	2.0	3.4	0.9
N1—N2—C4—N3	179.94 (19)	180.0	179.9	179.9	165.1	148.8	147.1	158.1	175.8	180.0
N1—N2—C4—S1	1.0 (3)	0.0	0.2	0.1	18.5	37.7	39.6	27.3	5.9	0.0
C5—N3—C4—N2	-179.8 (2)	180.0	180.0	180.0	175.4	172.8	172.8	174.2	178.0	180.0
C5—N3—C4—S1	-0.8 (2)	0.0	0.1	0.0	1.1	1.1	0.9	0.9	0.4	0.0
C6—S1—C4—N2	-178.9 (2)	180.0	180.0	180.0	175.7	172.8	172.8	173.9	178.2	180.0
C6—S1—C4—N3	2.07 (17)	0.0	0.1	0.0	0.9	0.9	0.7	0.7	0.4	0.0
C4—N3—C5—O1	179.5 (2)	180.0	180.0	180.0	179.6	179.8	179.5	179.5	180.0	180.0
C4—N3—C5—C6	-1.4 (3)	0.0	0.0	0.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.2	0.0
O1—C5—C6—S1	-178.1 (2)	180.0	180.0	180.0	179.8	179.9	180.0	180.0	179.8	180.0
N3—C5—C6—S1	2.8 (2)	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.0
C4—S1—C6—C5	-2.68 (18)	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.0
C1—S2—C7—C8	7.9 (2)	90.7	34.5	75.0	0.1	92.0	87.0	0.0	25.9	44.5
C1—S2—C7—C12	-172.82 (19)	90.7	147.9	105.8	179.9	92.2	96.5	180.0	156.3	138.1
C12—C7—C8—C9	-1.6 (4)	0.7	0.7	1.0	0.0	0.3	0.4	0.0	0.2	0.5
S2—C7—C8—C9	177.61 (18)	179.3	178.4	179.7	180.0	176.1	176.9	180.0	177.9	177.9
C7—C8—C9—C10	0.8 (4)	0.3	1.1	1.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.3	0.6
C8—C9—C10—C11	0.3 (4)	0.1	0.5	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1
C9—C10—C11—C12	-0.4 (4)	0.1	0.6	0.4	0.0	0.1	0.1	0.0	0.3	0.5
C10—C11—C12—C7	-0.5 (5)	0.3	1.0	0.4	0.0	0.1	0.0	0.0	0.4	0.5
C8—C7—C12—C11	1.5 (4)	0.7	0.4	0.3	0.0	0.3	0.3	0.0	0.1	0.0
S2—C7—C12—C11	-177.8 (2)	179.3	177.4	179.6	180.0	176.1	176.9	180.0	177.7	177.4

Table S7: Statistical measurements summary (AE, AUE and SD) from the comparison of the bond lengths (Å), bond and torsional angles (°) between experimental and several theoretical methods for the structure 2.

	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3	PM6	RM1
Bond Lengths (Å)									
AE	0.004	0.017	0.014	0.008	0.009	0.026	0.021	0.015	0.014
AUE	0.020	0.029	0.026	0.035	0.046	0.036	0.027	0.031	0.026
SD	0.029	0.029	0.029	0.043	0.052	0.038	0.035	0.038	0.033
Bond Angles (°)									
AE	0.32	0.33	-0.08	0.58	0.31	0.33	0.54	0.39	-0.11
AUE	2.76	2.44	2.78	2.30	2.33	2.26	2.22	1.94	2.30
SD	3.88	3.77	4.06	3.31	3.01	2.93	2.99	2.62	3.04
Torsional Angles (°)									
AE	0.1	-0.5	0.1	-0.6	3.1	3.2	-0.4	-4.3	-1.3
AUE	7.6	3.5	6.3	3.5	14.1	13.8	4.0	6.6	4.9
SD	23.4	7.8	19.0	5.5	32.0	31.4	7.5	21.4	11.8

Comparing the performance from the methods in reproducing the two proposed geometries, it may be possible to observe that errors originated from the structure 2 are almost always bigger than those obtained from the structure 1. This evidence reinforces the correctness from the initially proposed structure.

Table S8: Relative energies (in kcal.mol⁻¹) predicted by different quantum chemical methods for the structures 1 and 2.

Method	1	2	Method	1	2
HF	0.0	6.66	MNDO	0.0	16.09
MP2	0.0	6.36	MNDO/d	0.0	15.50
B3LYP	0.0	4.64	PM3	0.0	11.18
AM1	0.0	13.81	PM6	0.0	11.50
RM1	0.0	13.01			

Table S9: Comparison of the bond lengths between the structures of the dimer 1 obtained by *ab initio*, DFT and semiempirical methods and X-ray analysis. All values are given in angstroms, Å.

Bonds	Exp.	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3	PM6	PM6-DH2	RM1
O57-C56	1.191	1.192	1.217	1.225	1.238	1.221	1.222	1.217	1.210	1.210	1.219
C56-N58	1.367	1.361	1.377	1.377	1.397	1.416	1.418	1.426	1.419	1.419	1.408
N58-C54	1.360	1.370	1.373	1.373	1.407	1.408	1.414	1.425	1.407	1.406	1.393
C54-N55	1.291	1.260	1.290	1.298	1.317	1.310	1.316	1.315	1.301	1.302	1.320
N55-N50	1.412	1.386	1.396	1.404	1.342	1.343	1.343	1.392	1.387	1.387	1.398
N50-C52	1.255	1.256	1.281	1.292	1.304	1.306	1.306	1.298	1.305	1.305	1.303
O15-C19	1.191	1.192	1.217	1.225	1.238	1.221	1.222	1.217	1.210	1.210	1.219
C19-N24	1.367	1.361	1.377	1.377	1.397	1.416	1.418	1.426	1.419	1.419	1.408
N24-C26	1.360	1.370	1.373	1.373	1.407	1.408	1.414	1.425	1.407	1.406	1.393
C26-N28	1.291	1.260	1.290	1.298	1.317	1.310	1.316	1.315	1.301	1.302	1.320
N28-N27	1.412	1.386	1.396	1.404	1.342	1.343	1.343	1.392	1.387	1.387	1.398
N27-C20	1.255	1.255	1.281	1.292	1.304	1.306	1.306	1.298	1.305	1.305	1.303
C54-S51	1.750	1.768	1.781	1.764	1.758	1.701	1.769	1.788	1.791	1.791	1.743
C26-S23	1.751	1.768	1.781	1.764	1.758	1.701	1.769	1.788	1.791	1.791	1.743

Table S10: Comparison of the bond angles between the structures of the dimer 1 obtained by *Ab initio*, DFT and semiempirical methods and X-ray analysis. All values are given in degrees, °.

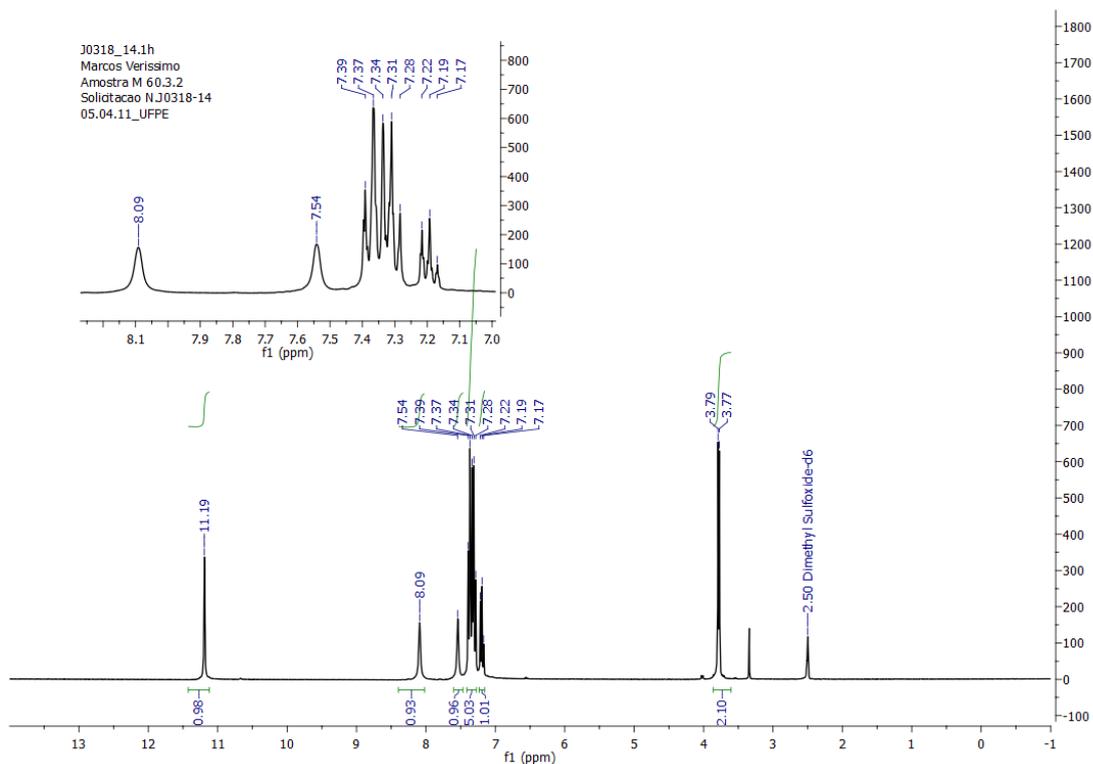
Angles	Exp.	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDO/d	PM3	PM6	PM6-DH2	RM1
C52-N50-N55	115.86	114.49	114.37	113.19	118.04	115.90	115.87	119.16	114.62	114.86	155.27
N50-N55-C54	109.04	112.52	112.03	110.29	118.74	115.70	116.08	117.09	117.25	117.22	112.86
N55-C54-N58	122.62	121.96	122.00	121.43	120.76	117.65	117.50	116.96	121.86	121.85	121.29
C54-N58-C56	117.24	118.47	118.09	117.50	115.57	116.18	117.26	113.68	117.72	117.73	114.69
N58-C56-O57	124.80	124.67	124.70	125.03	121.72	121.12	120.49	119.86	120.17	120.23	121.58
N50-C52-C48	119.41	121.96	121.35	119.81	122.48	119.40	119.47	121.07	119.77	119.50	118.37
C20-N27-N28	115.85	114.49	114.37	113.19	118.04	115.90	115.88	119.16	114.62	114.87	115.28
N27-N28-C26	109.04	112.52	112.03	110.29	118.74	115.71	116.08	117.09	117.25	117.23	112.87
N28-C26-N24	122.62	121.96	122.00	121.43	120.76	117.65	117.50	116.96	121.86	121.86	121.29
C26-N24-C19	117.24	118.47	118.09	117.50	115.57	116.18	117.26	113.68	117.72	117.72	114.69
N24-C19-O15	124.80	124.67	124.70	125.03	121.72	121.12	120.49	119.86	120.17	120.23	121.58
N27-C20-C17	119.41	121.96	121.35	119.81	122.48	119.41	119.48	121.06	119.77	119.50	118.37

Table S11: Comparison of the torsional angles between the structures of the dimer 1 obtained by *Ab initio*, DFT and semiempirical methods and X-ray analysis. All values are given in degrees, °.

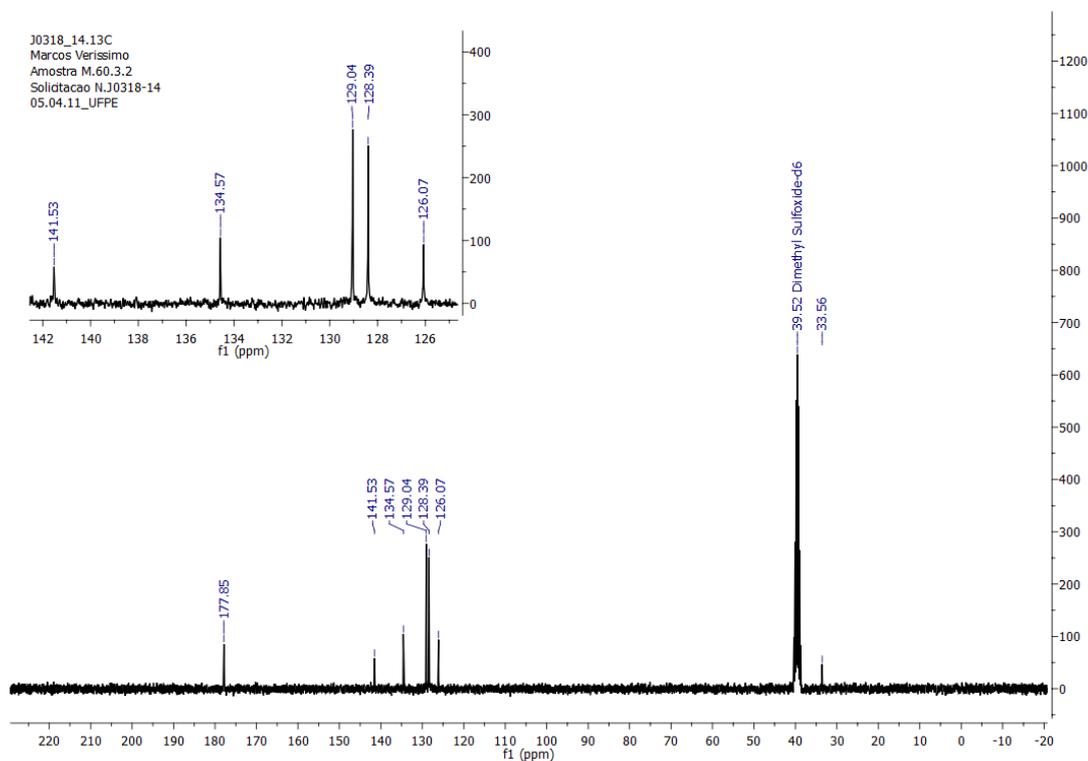
Torsions	Exp.	HF	B3LYP	MP2	AM1	MNDO	MNDOD	PM3	PM6	PM6-DH2	RM1
C43-S45-C47-C48	178.0	180.0	180.0	179.0	179.9	178.3	176.8	93.9	157.8	170.6	149.4
C47-C48-C52-N50	2.1	0.0	0.0	1.7	0.1	104.0	105.3	4.2	0.2	0.3	0.8
C10-S11-C16-C17	178.0	180.0	180.0	179.0	179.9	178.6	176.7	93.8	157.8	170.6	149.4
C16-C17-C20-N27	2.1	0.0	0.0	1.7	0.1	104.3	105.3	4.2	0.2	0.3	0.8
S51-C54-C26-S23	180.0	180.0	180.0	180.0	179.8	179.1	178.5	180.0	180.0	180.0	179.9
C44-C43-S45-C47	177.8	90.7	180.0	107.8	179.9	91.5	76.7	166.9	150.0	156.6	139.5
C13-C10-S11-C16	7.9	90.7	0.0	73.0	0.1	91.4	76.5	14.9	32.6	25.5	43.0
S51-C54-N55-N24	178.0	180.0	179.9	179.9	180.0	161.8	159.6	175.7	180.0	178.4	178.7

APÊNDICE C: espectros

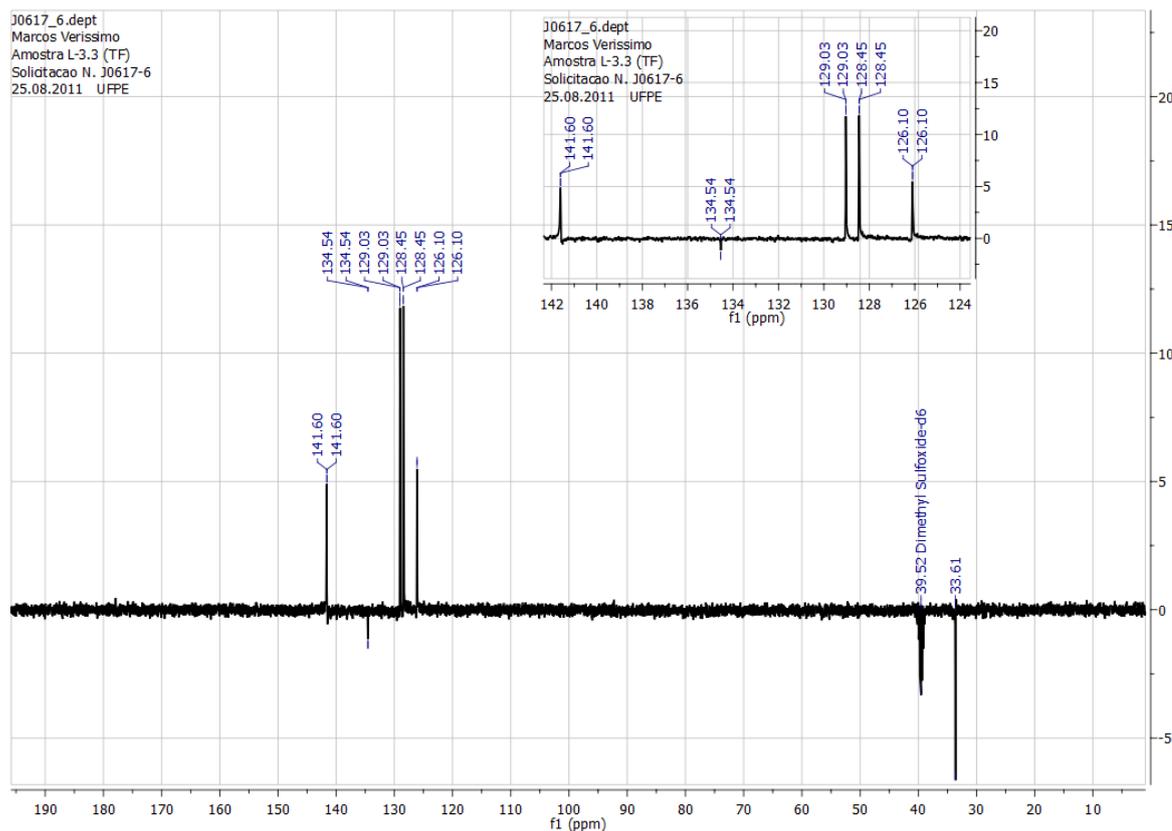
TS-TF



TS-TF: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).



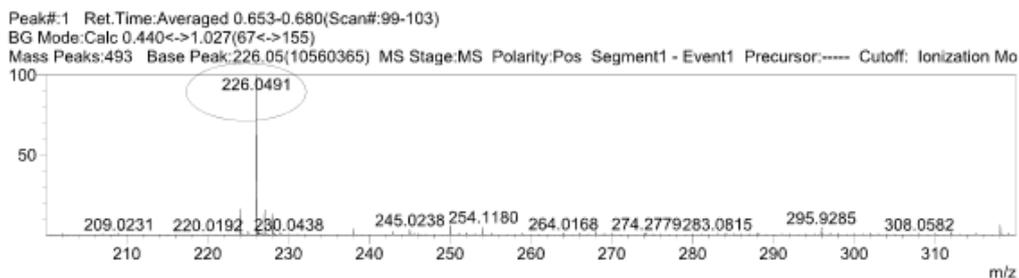
TS-TF: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).



TS-TF: DEPT (75.5Mhz, DMSO-d₆).

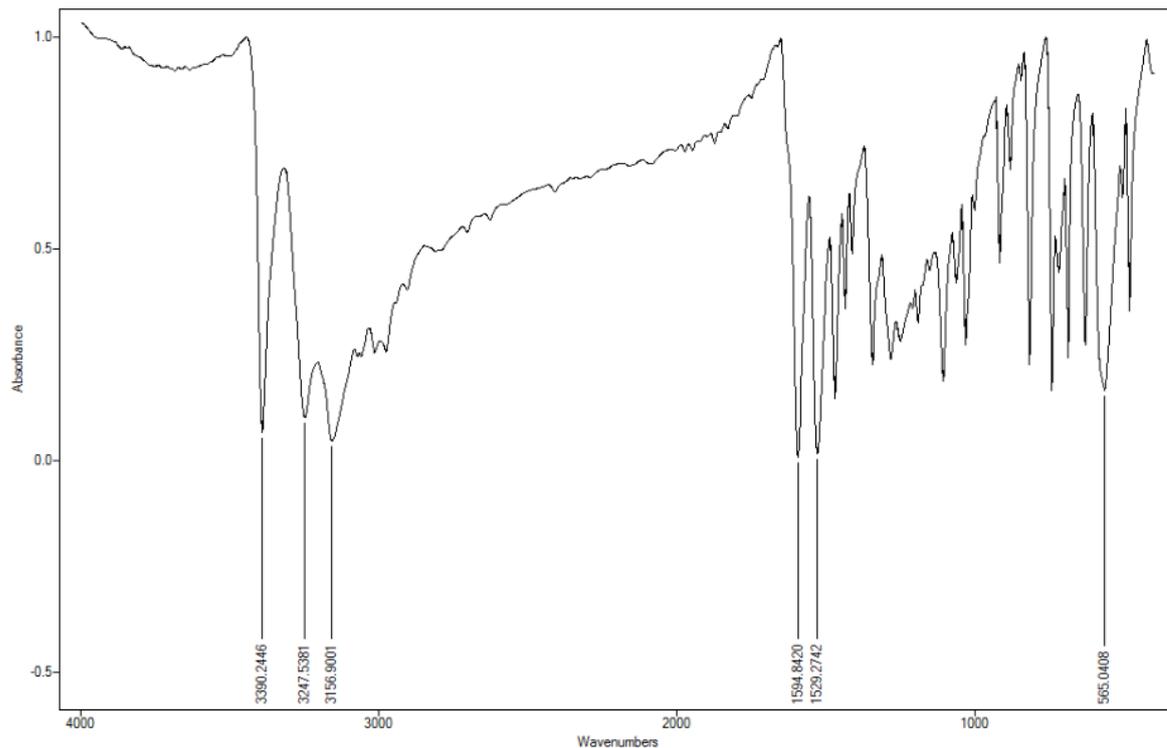
ESPECTRO DE MASSA

MS Spectrum Graph



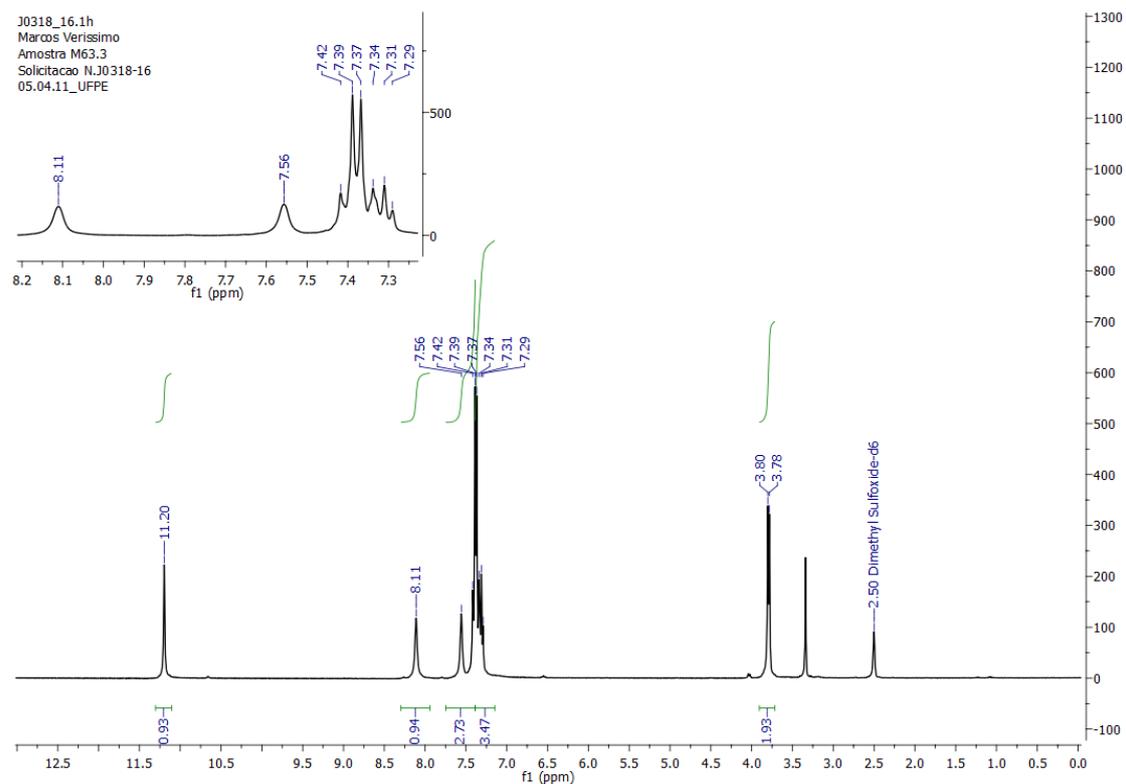
TS-TF: EMAR-ESI.

M-60.3.2.dpt: TS-TF

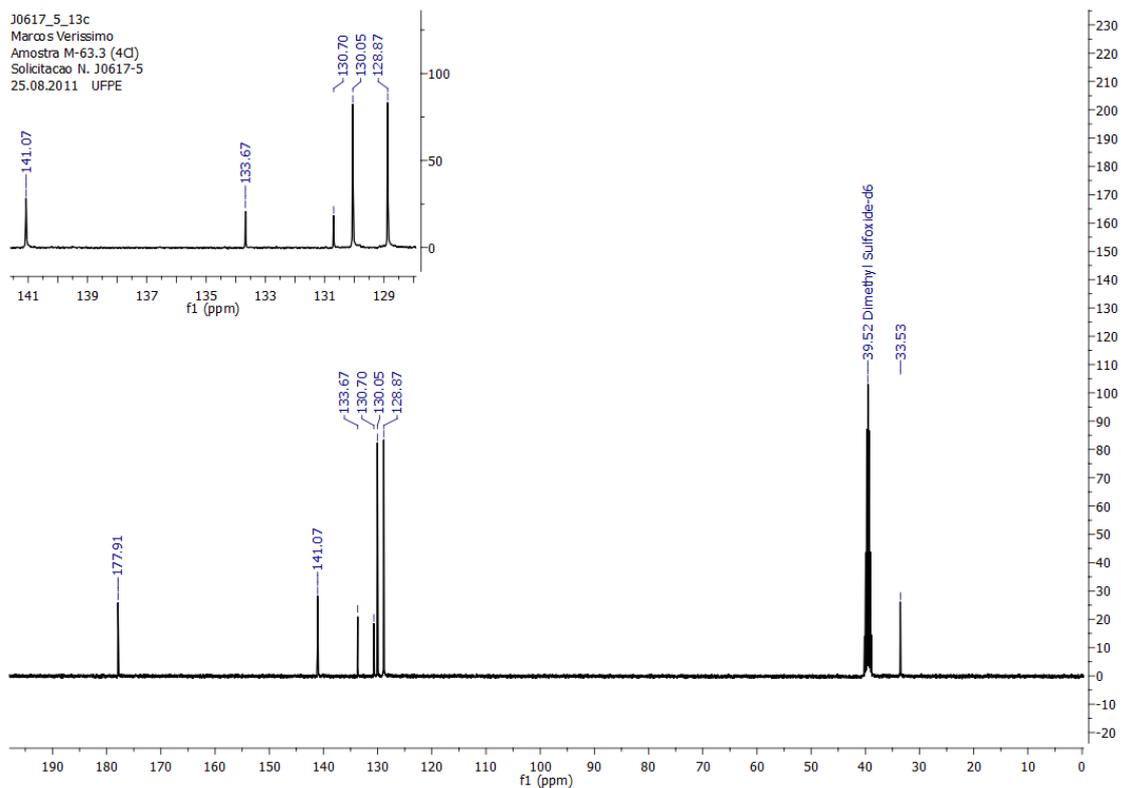


TS-TF: Infra-vermelho.

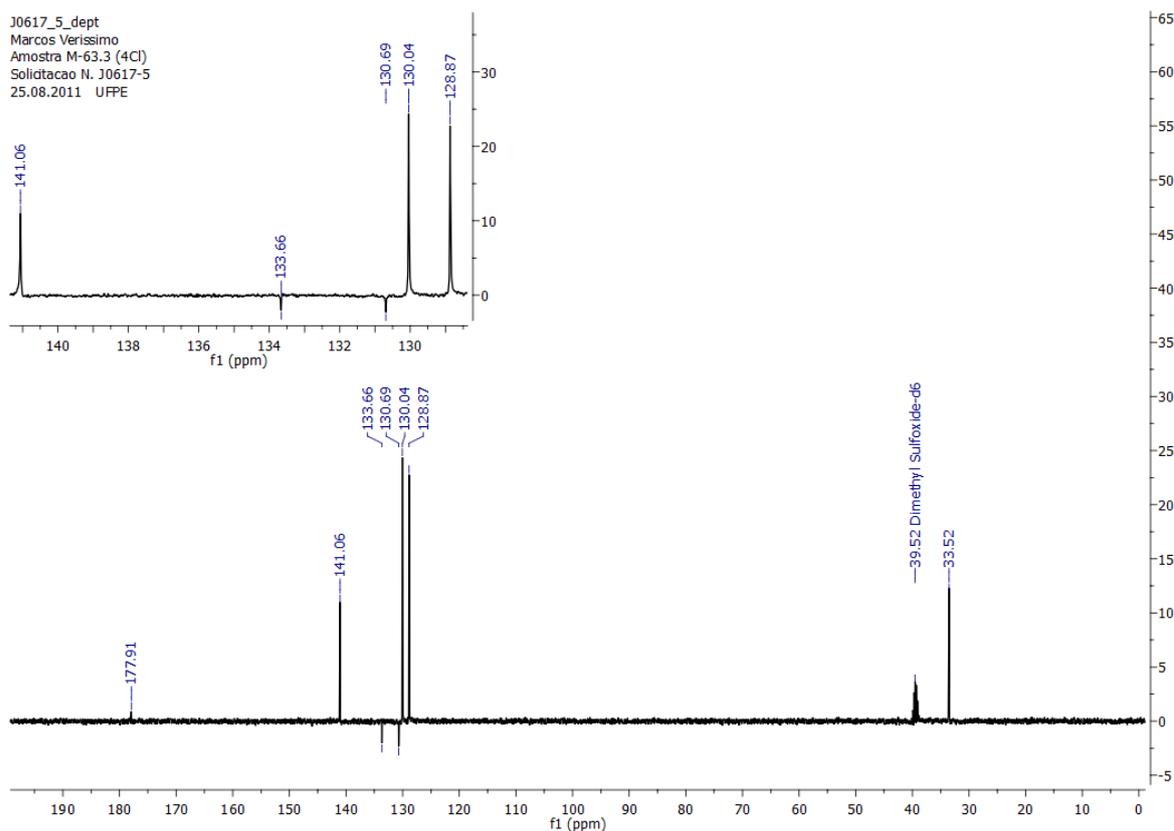
TS-4-CI



TS-4-CI: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).

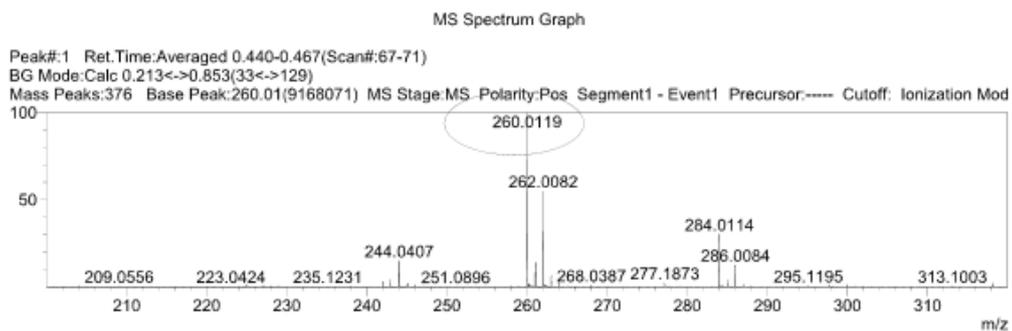


TS-4-CI: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).



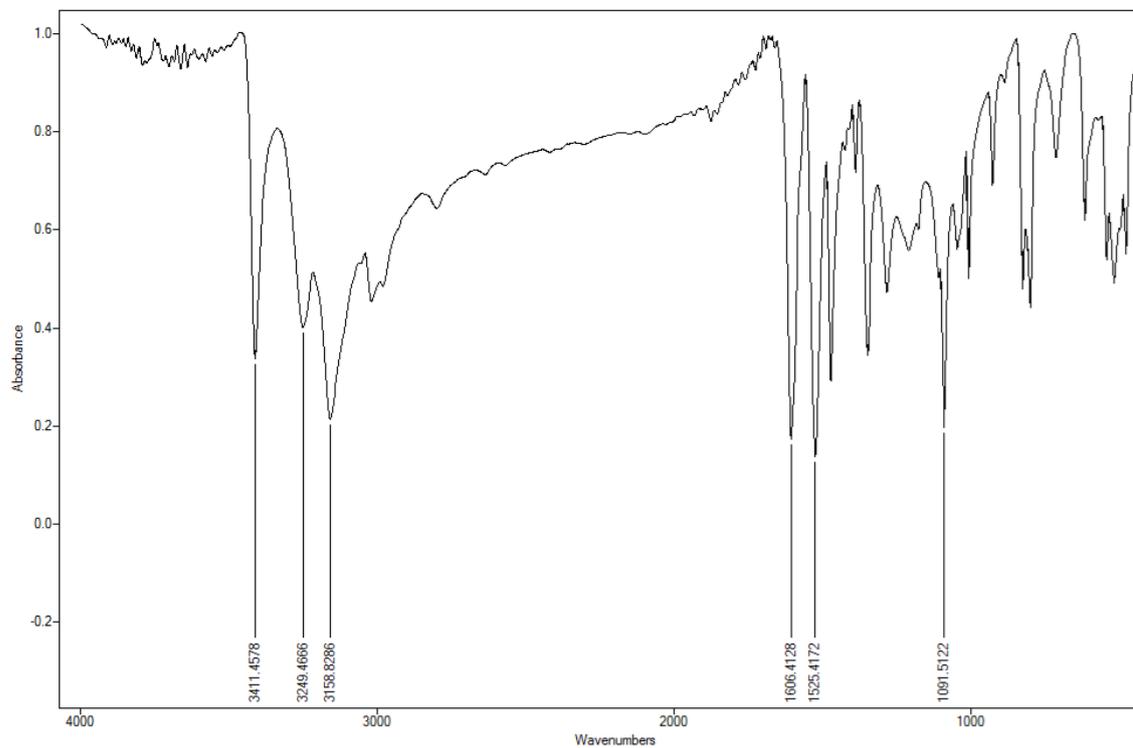
TS-4-Cl: DEPT (75.5Mhz, DMSO- d_6).

ESPECTRO DE MASSA



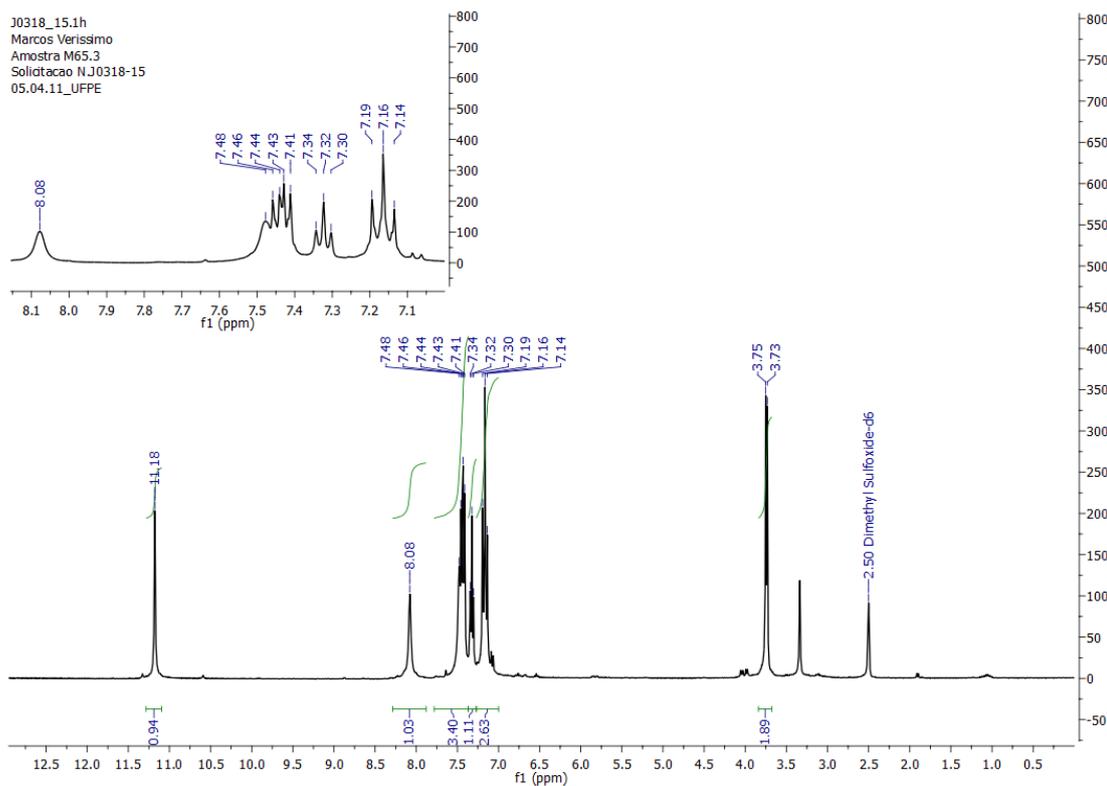
TS-4-Cl: EMAR-ESI.

M-63.3.dpt: TS-4-Cl

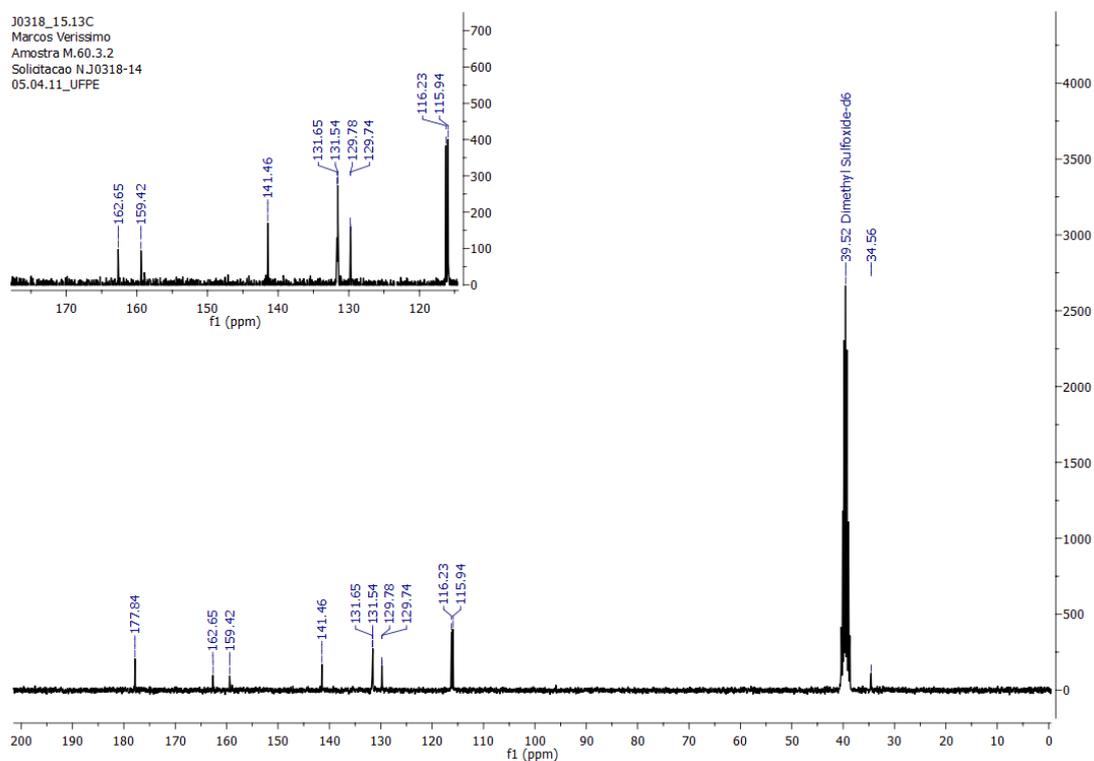


TS-4-Cl: Infra-vermelho.

TS-4-F

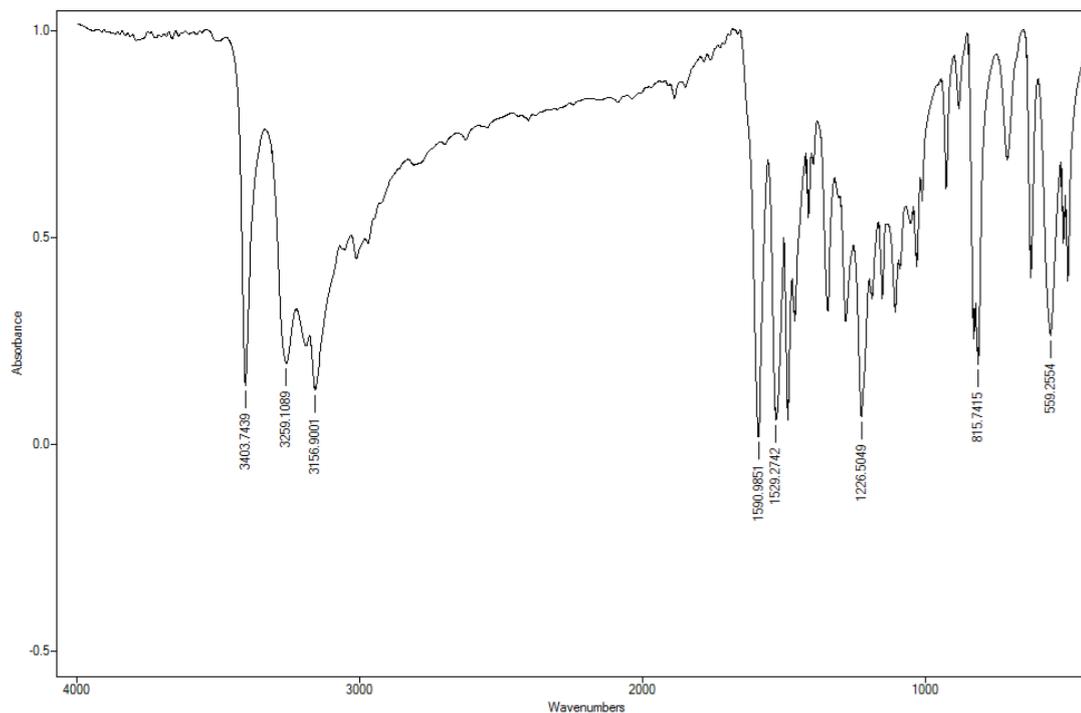


TS-4-F: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).



TS-4-F: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).

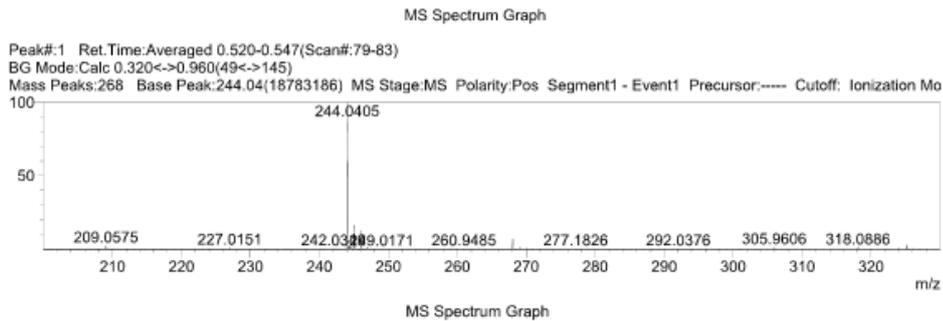
M-65.3.dpt: TS-4-F



TS-4-F: Infra-vermelho.

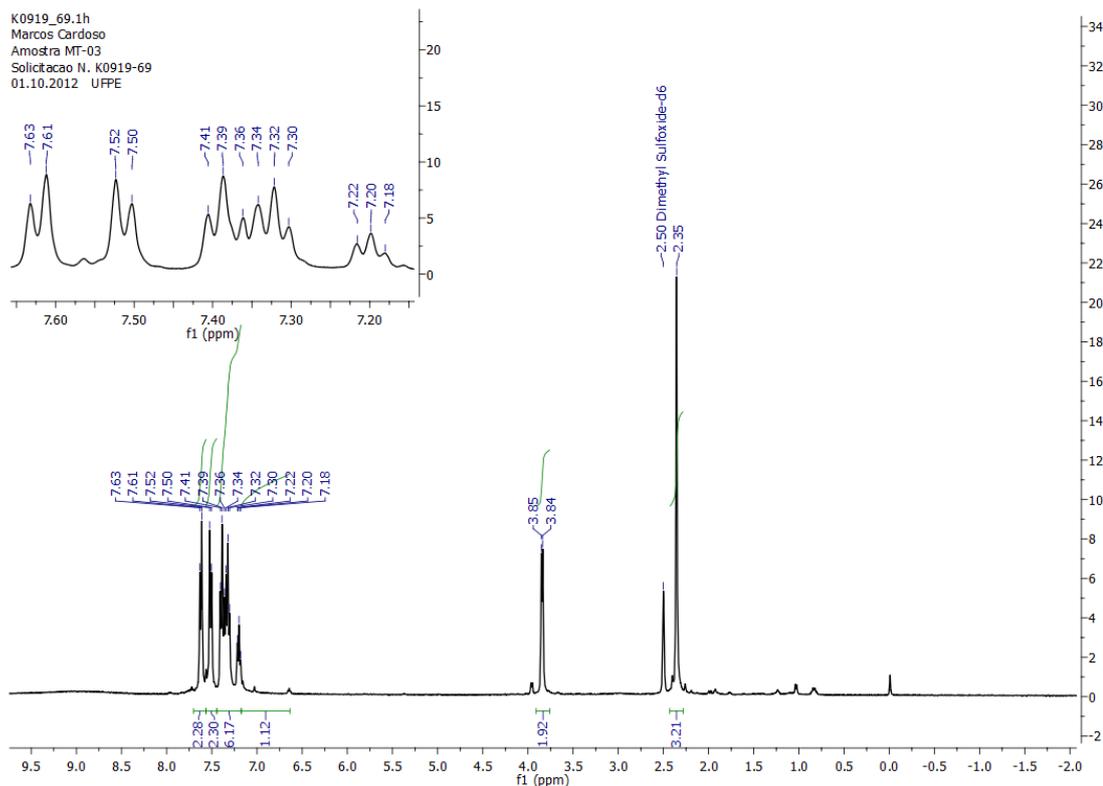
ESPECTRO DE MASSAS

min

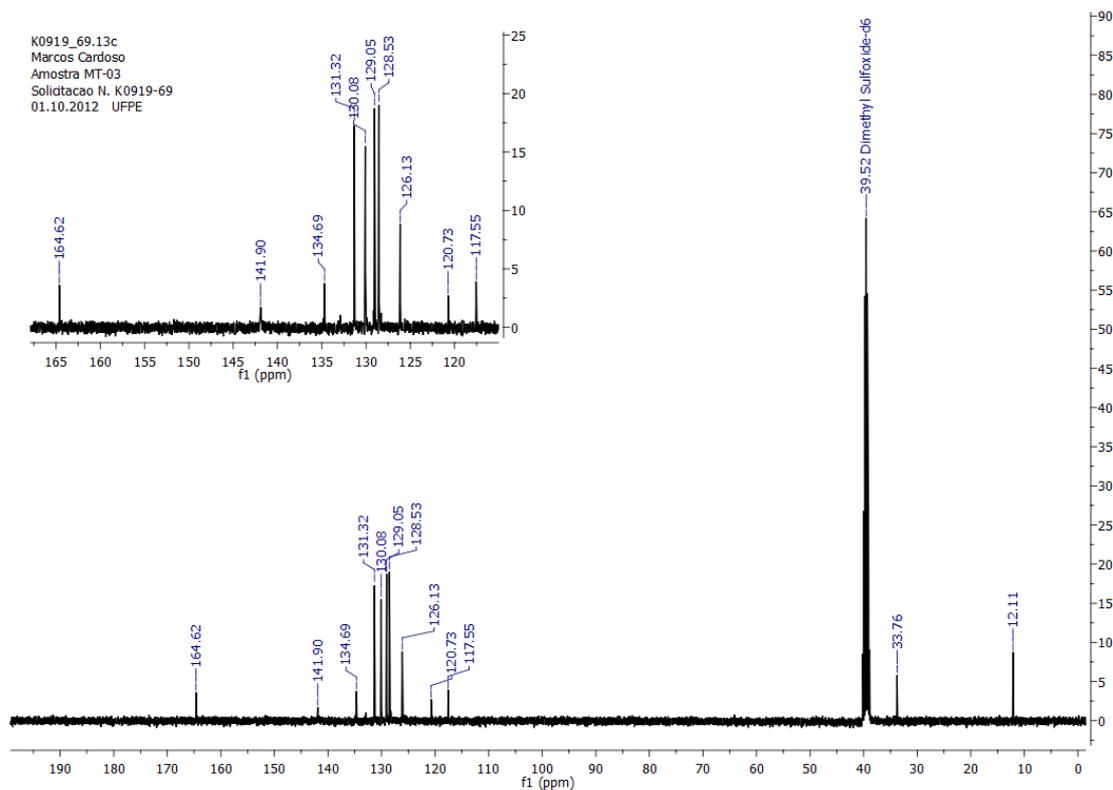


TS-4-F: EMAR-ESI.

TZ-Br-prop

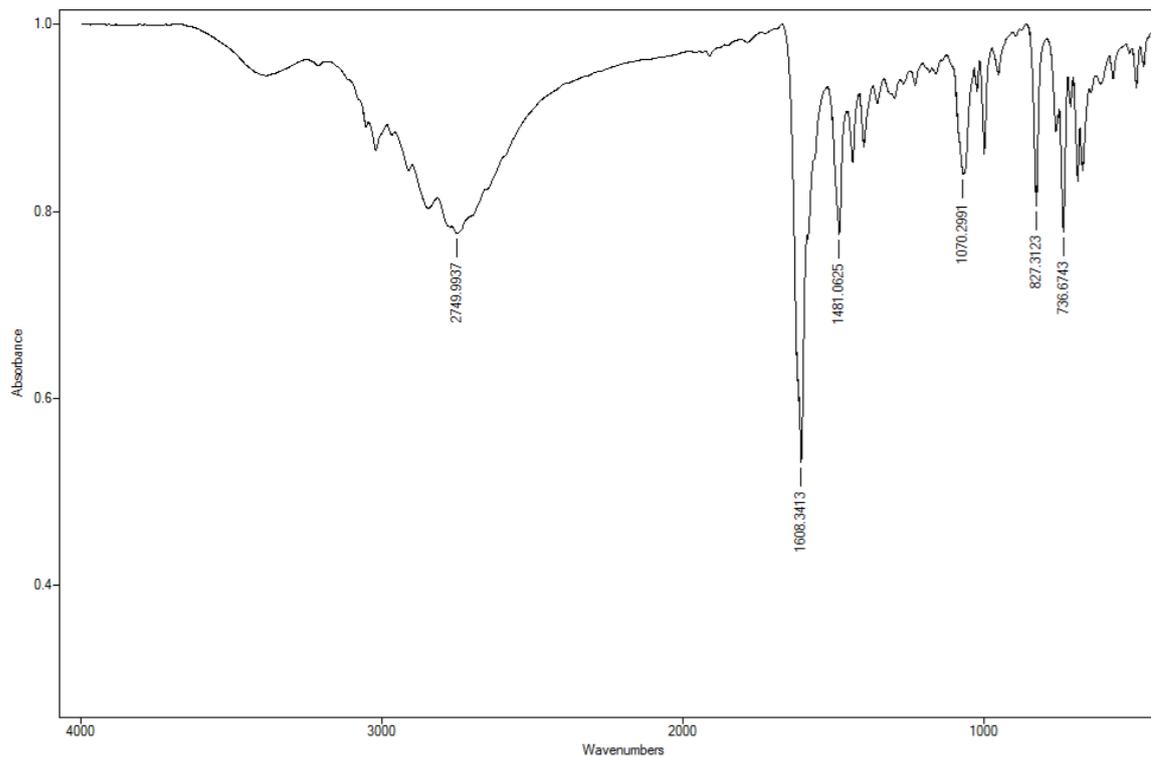


TZ-Br-prop: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).



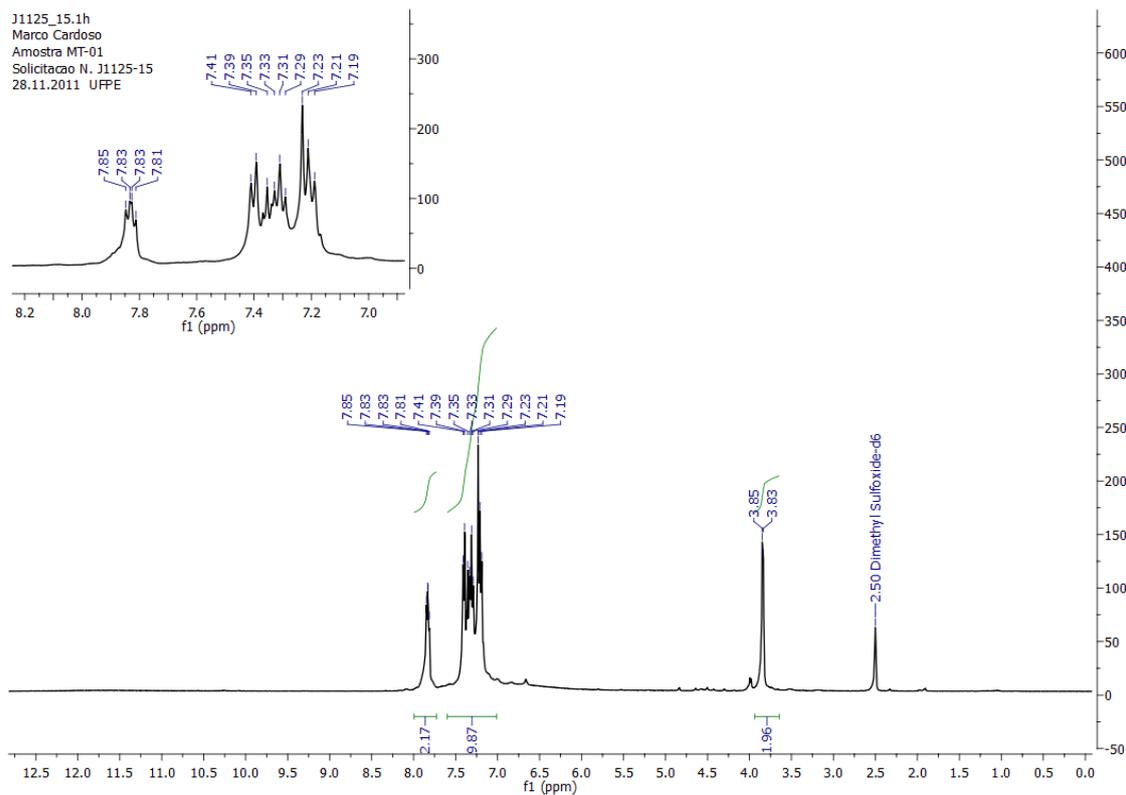
TZ-Br-prop: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).

MT 03.dpt: TZ-Br-Prop.

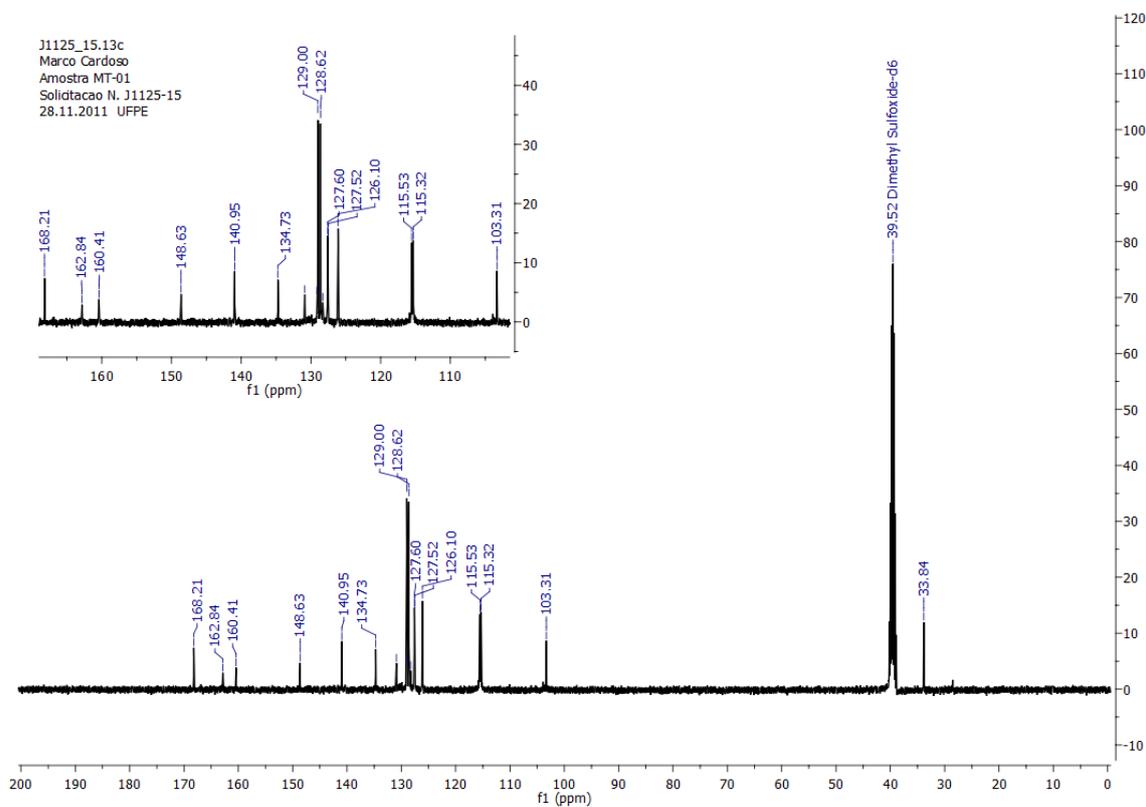


TZ-Br-prop: Infra-vermelho.

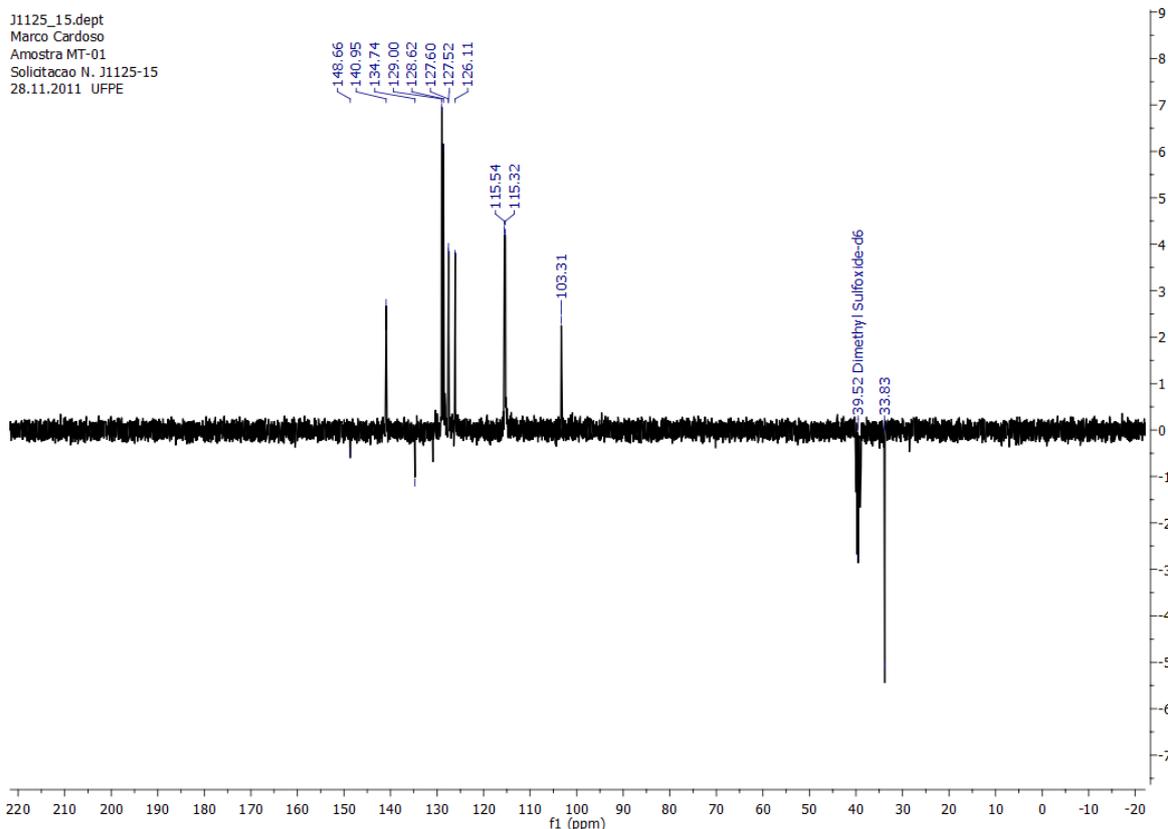
TZ-4-F



TZ-4-F: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).



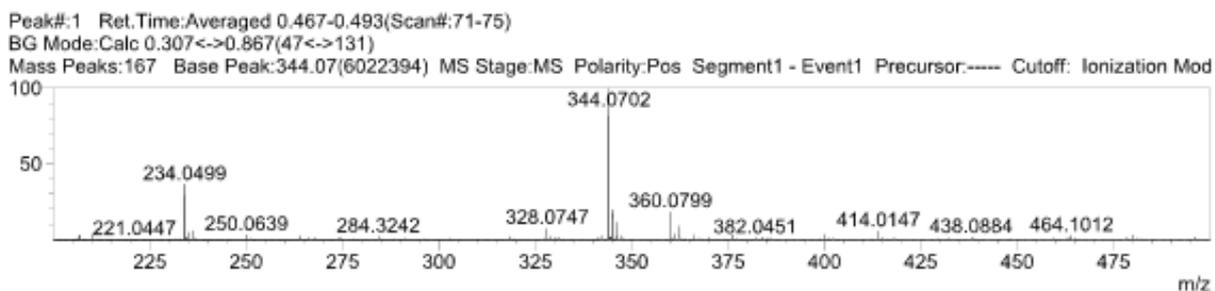
TZ-4-F: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).



TZ-4-F: DEPT (75.5Mhz, DMSO-*d*₆).

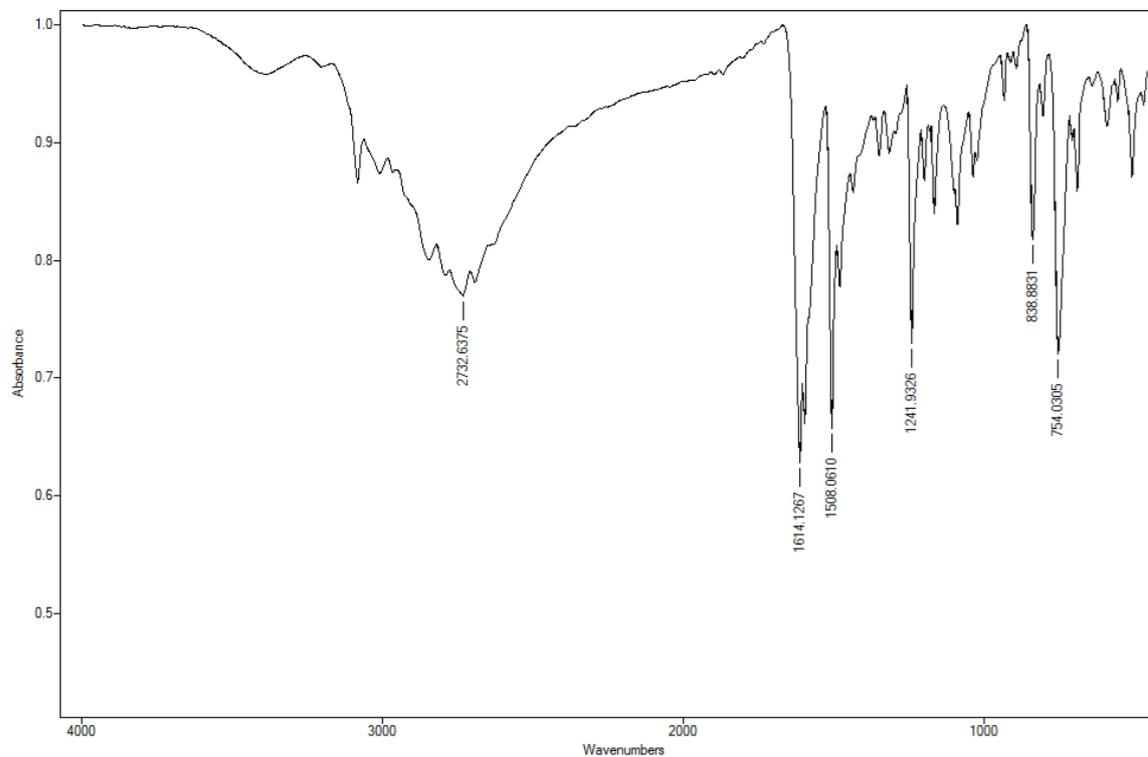
ESPECTRO DE MASSAS (MODO POSITIVO)

MS Spectrum Graph



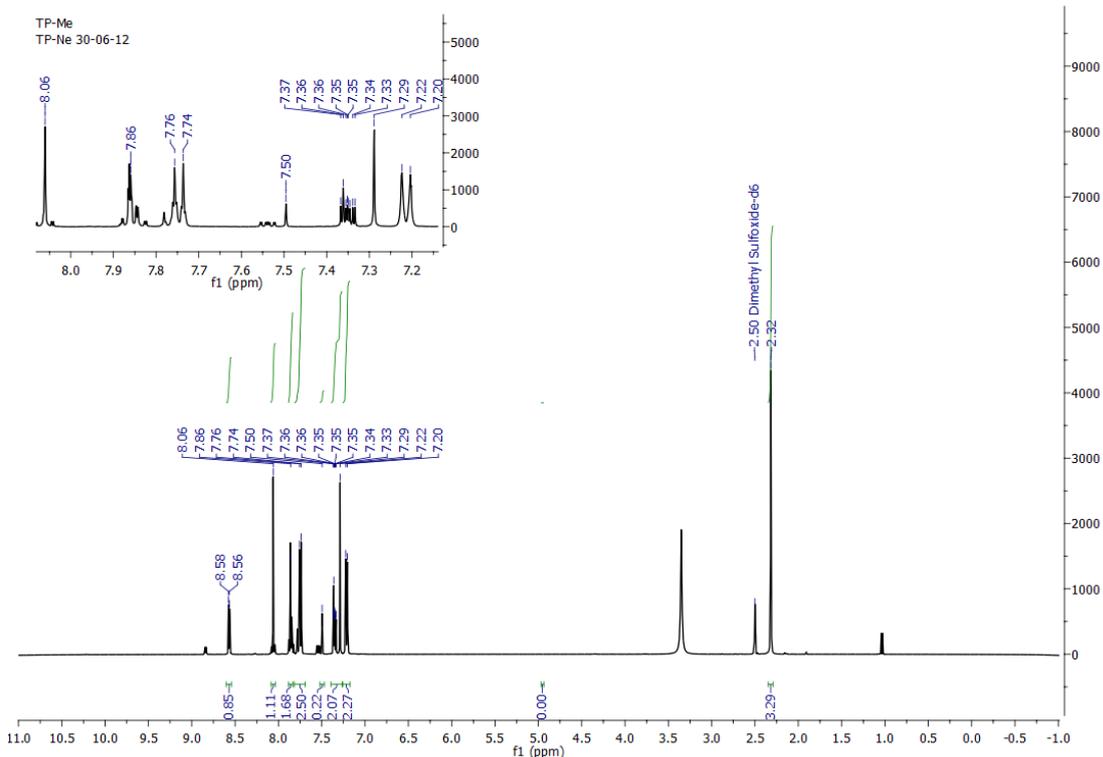
TZ-4-F: EMAR-ESI.

MT 01.dpt: TZ-4-F

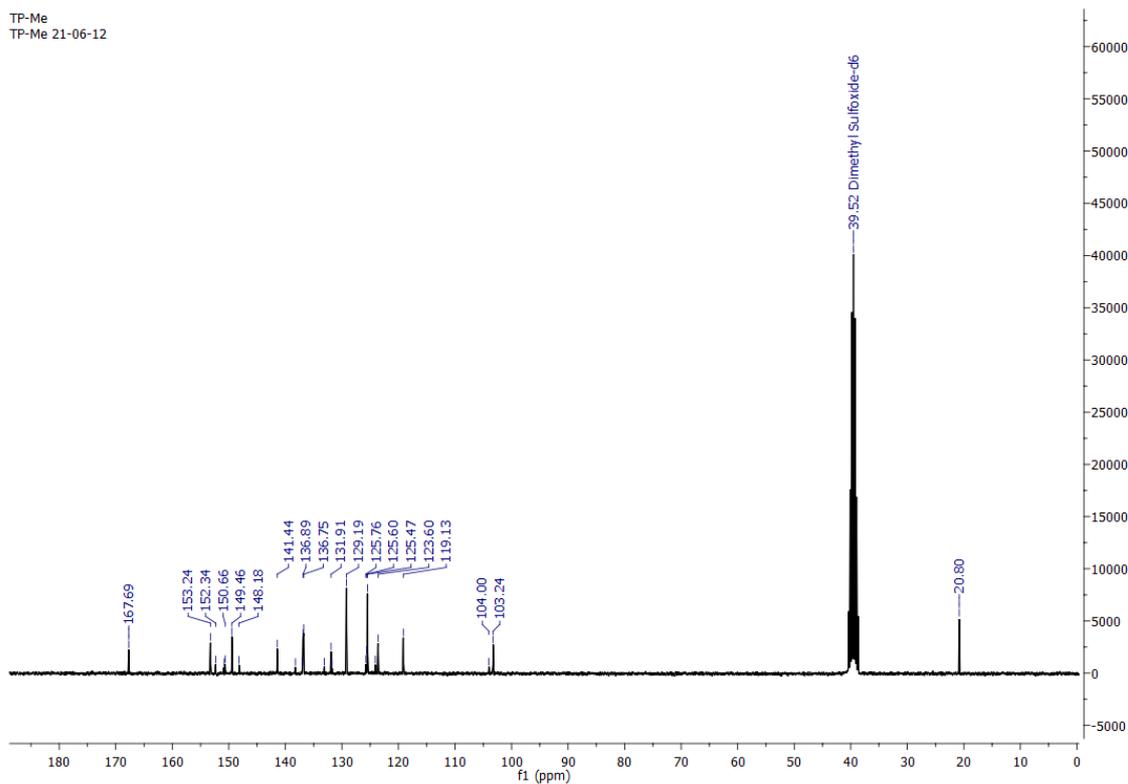


TZ-4-F: Infra-vermelho.

TP-4-Me

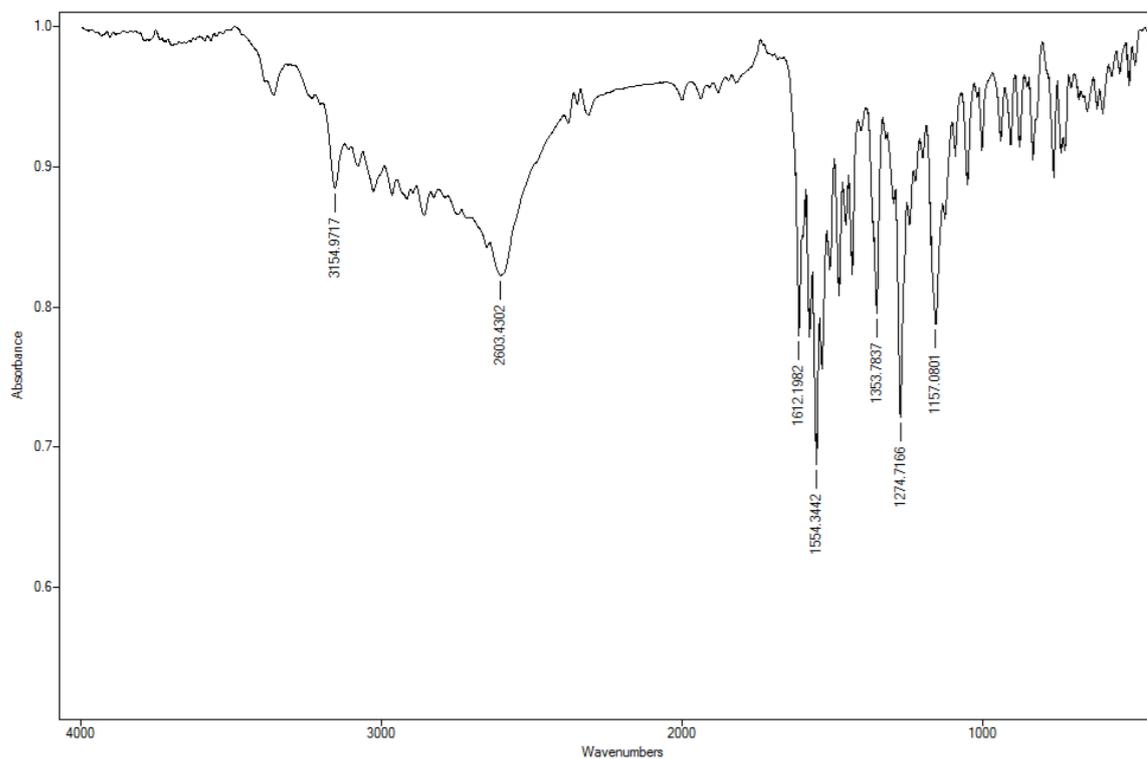


TP-4-Me: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).



TP-4-Me: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).

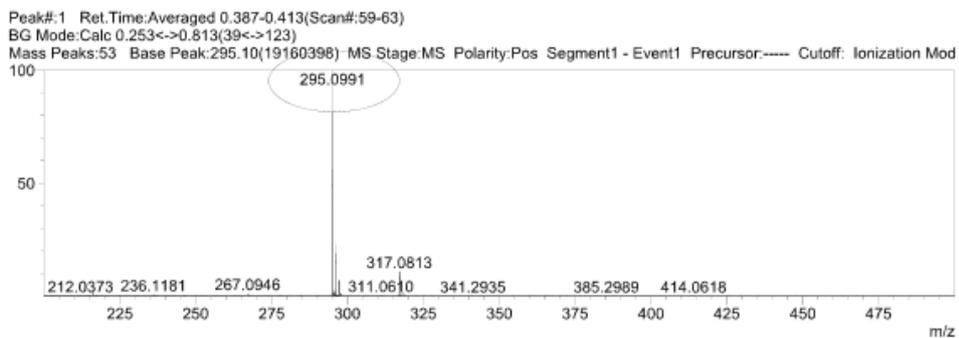
TP-05.dpt: TP-4-Me



TP-4-Me: Infra-vermelho.

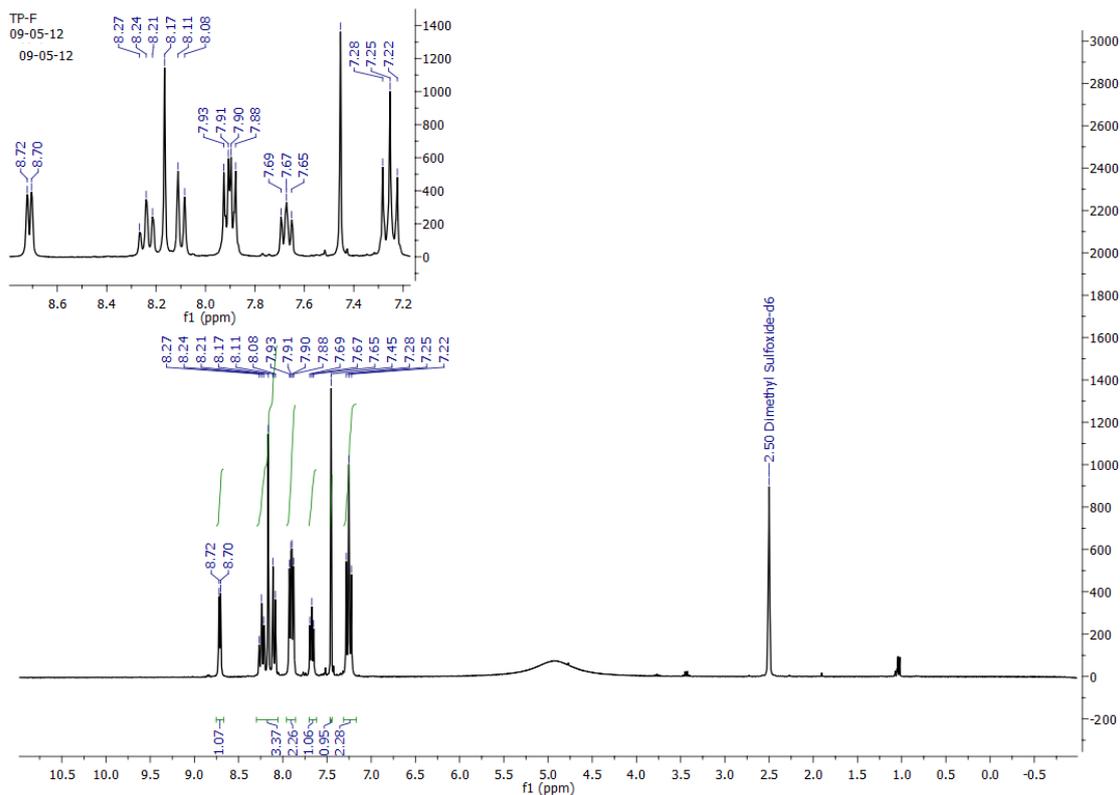
ESPECTRO DE MASSAS (MODO POSITIVO)

MS Spectrum Graph

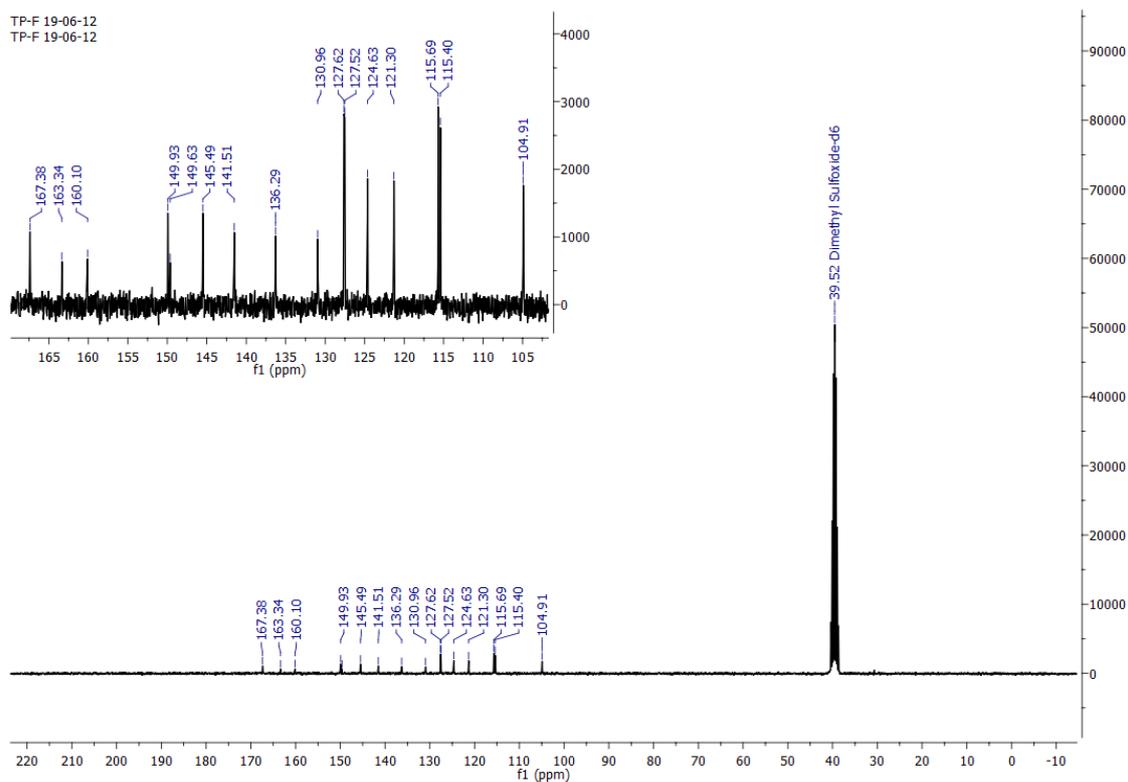


TP-4-Me: EMAR-ESI.

TP-4-F

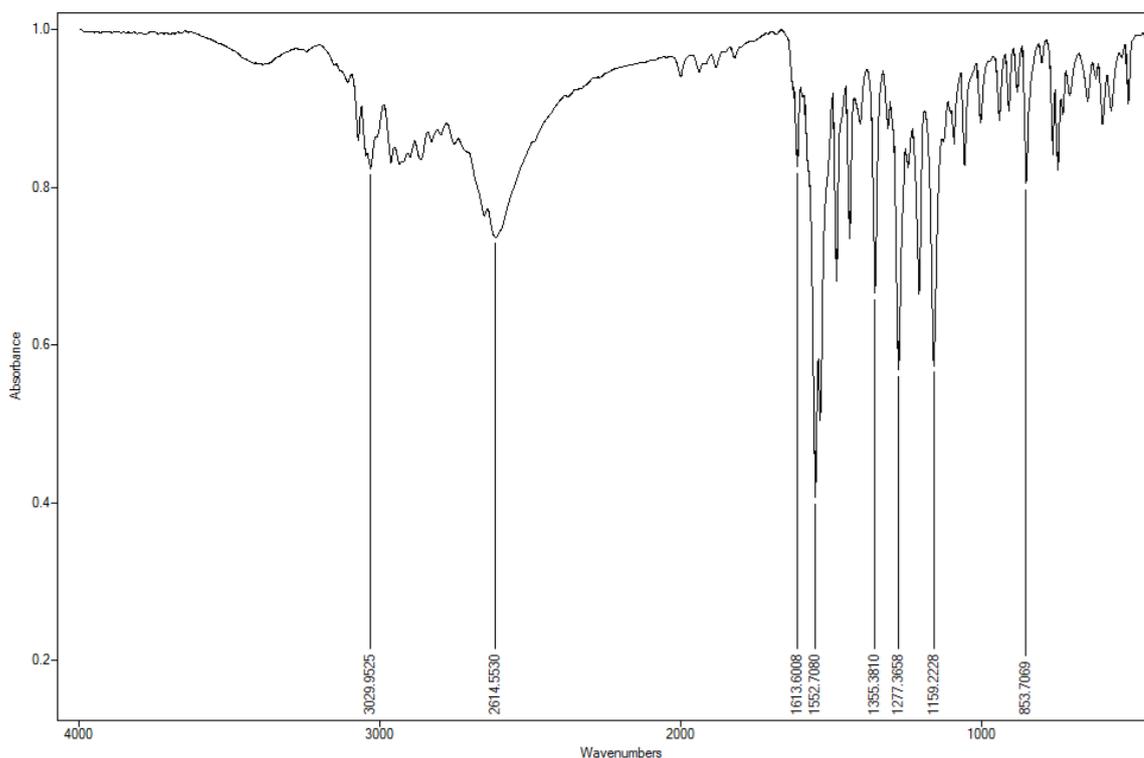


TP-4-F: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).



TP-4-F: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).

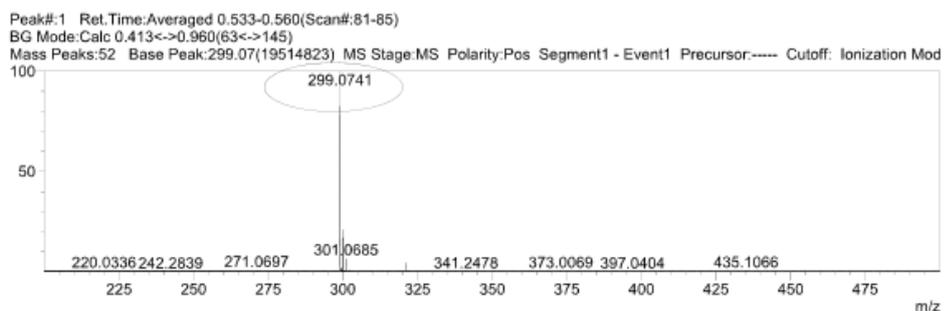
TP-07.dpt: TP-4-F



TP-4-F: Infra-vermelho.

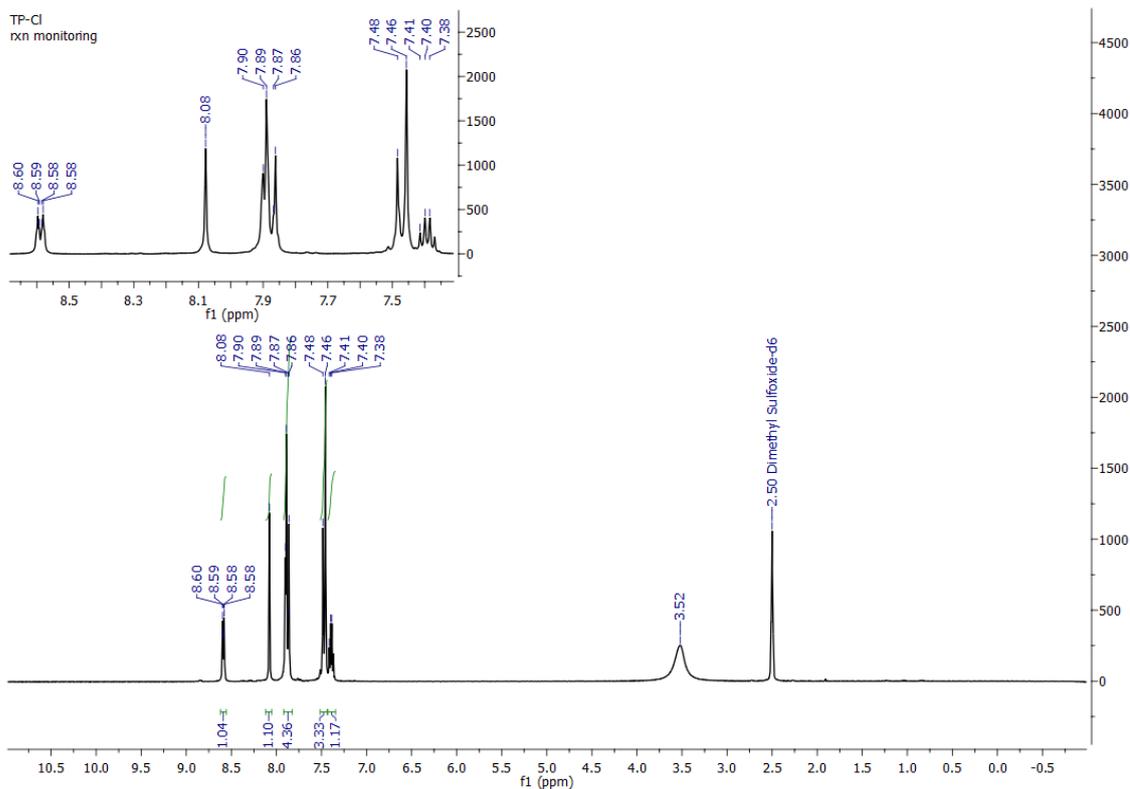
ESPECTRO DE MASSAS (MODO POSITIVO)

MS Spectrum Graph

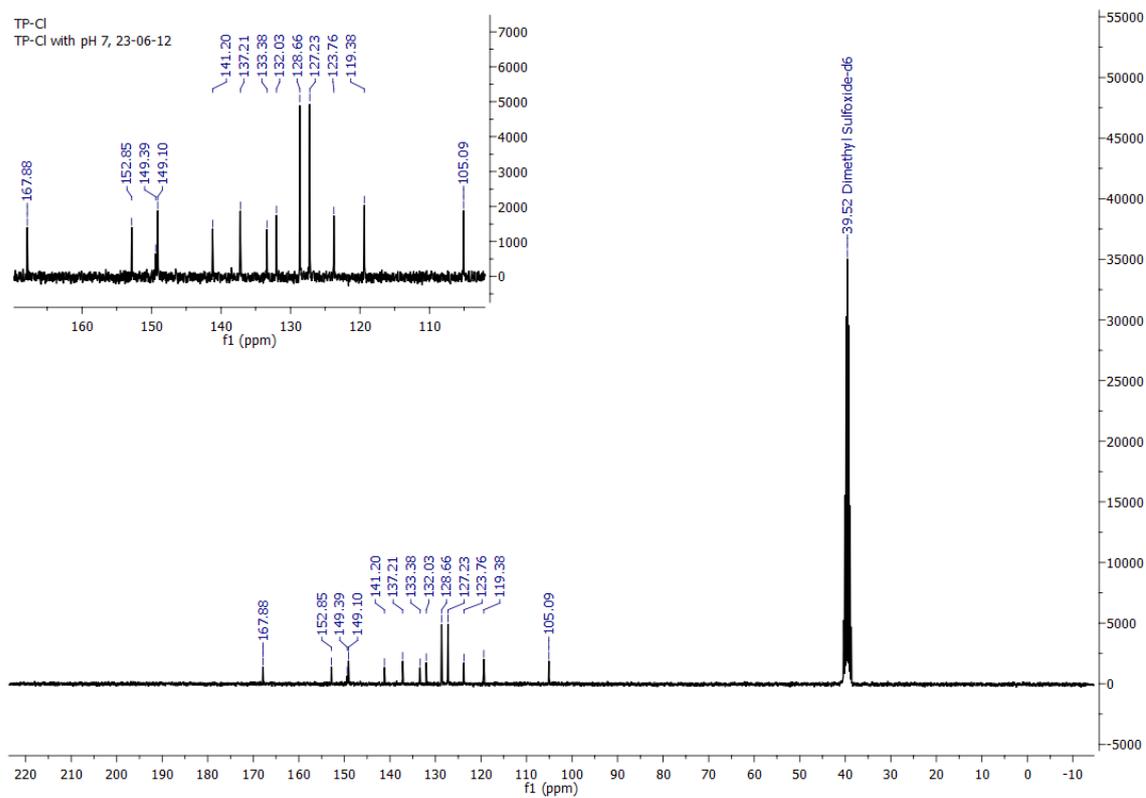


TP-4-F: EMAR-ESI.

TP-4-CI

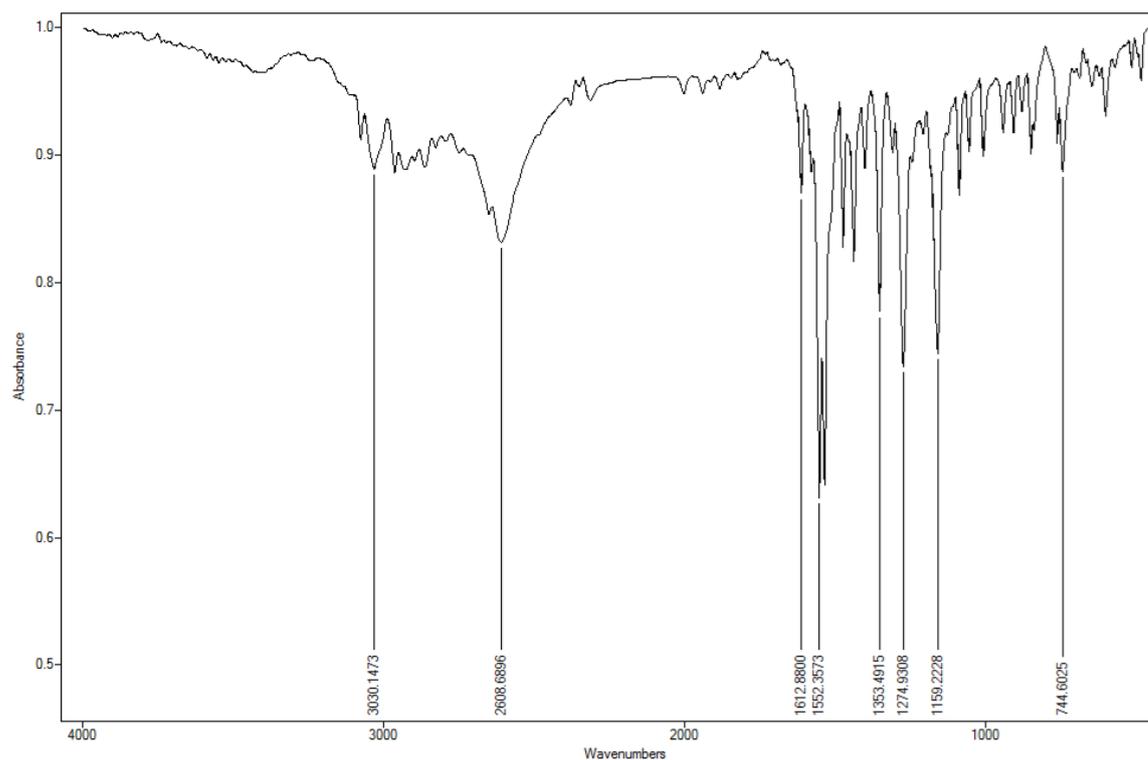


TP-4-CI: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).



TP-4-CI: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).

TP-03.dpt: TP-4-Cl

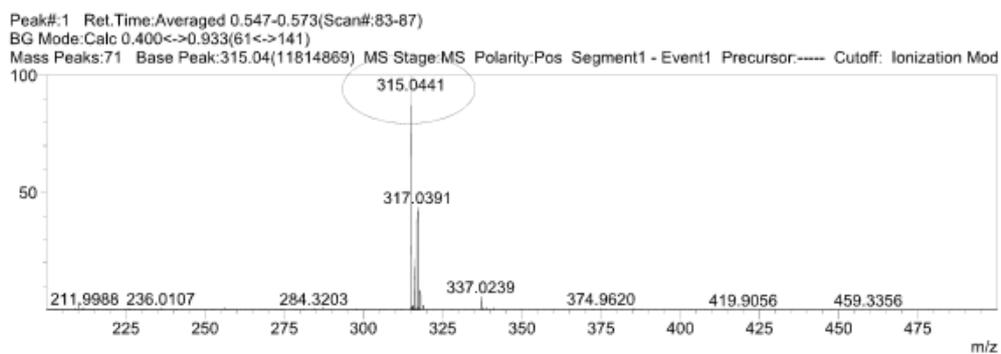


TP-4-Cl: Infra-vermelho.

min

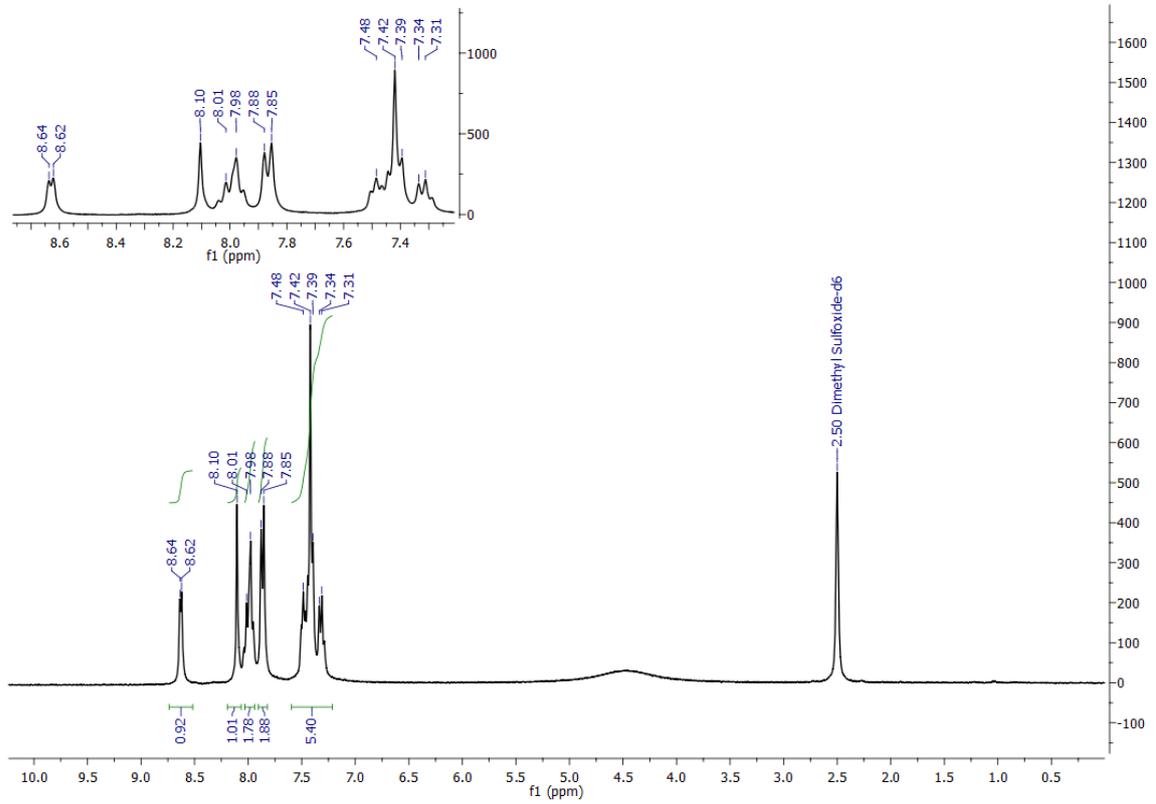
ESPECTRO DE MASSAS (MODO POSITIVO)

MS Spectrum Graph

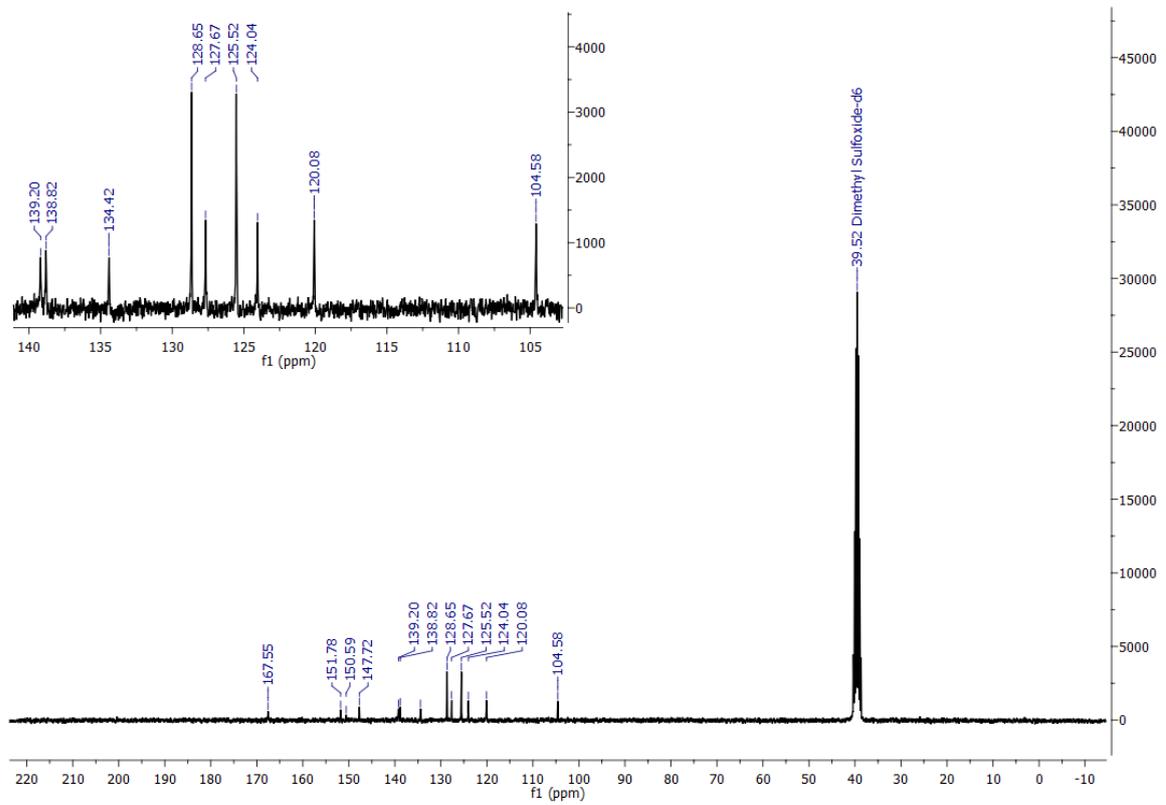


TP-4-Cl: EMAR-ESI.

TP-AF



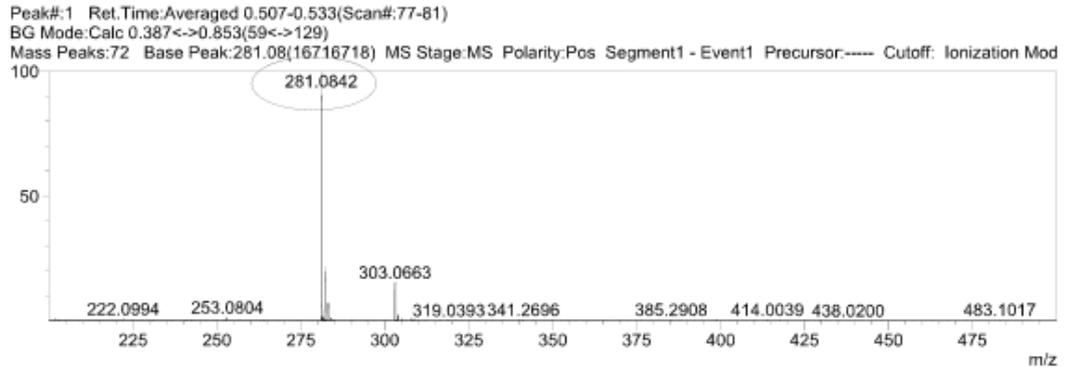
TP-AF: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).



TP-AF: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).

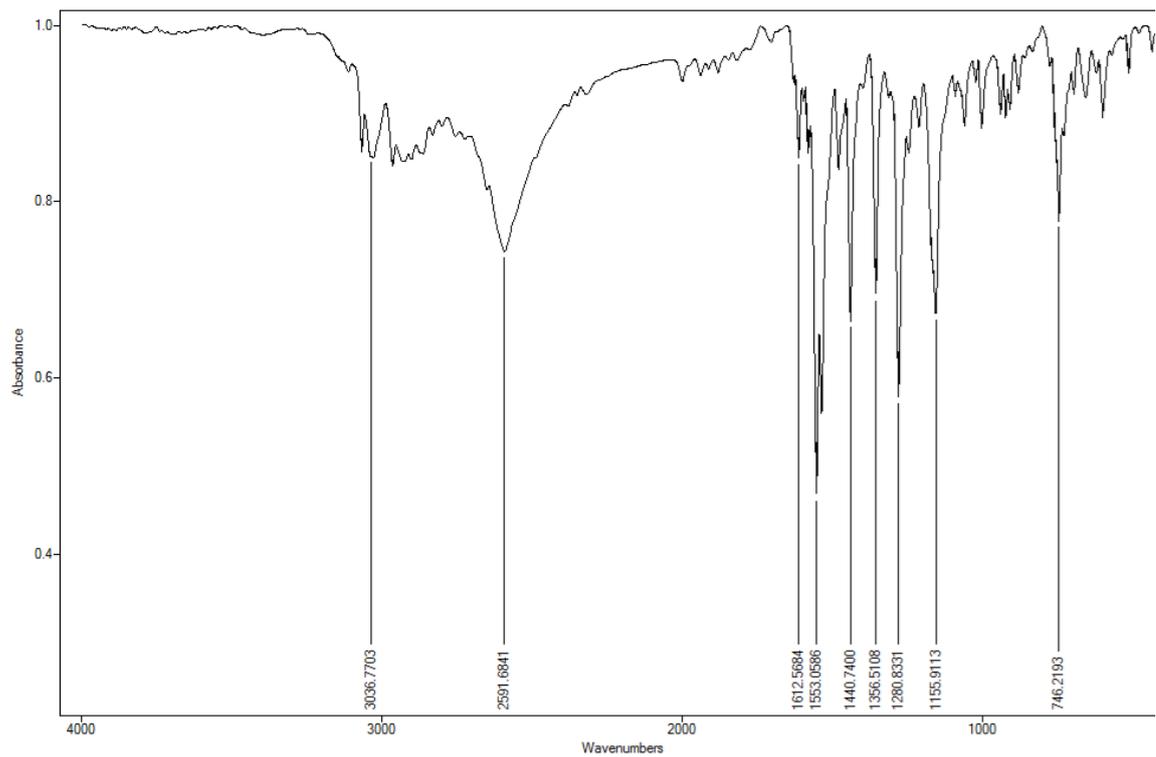
ESPECTRO DE MASSAS (MODO POSITIVO)

MS Spectrum Graph



TP-AF: EMAR-ESI.

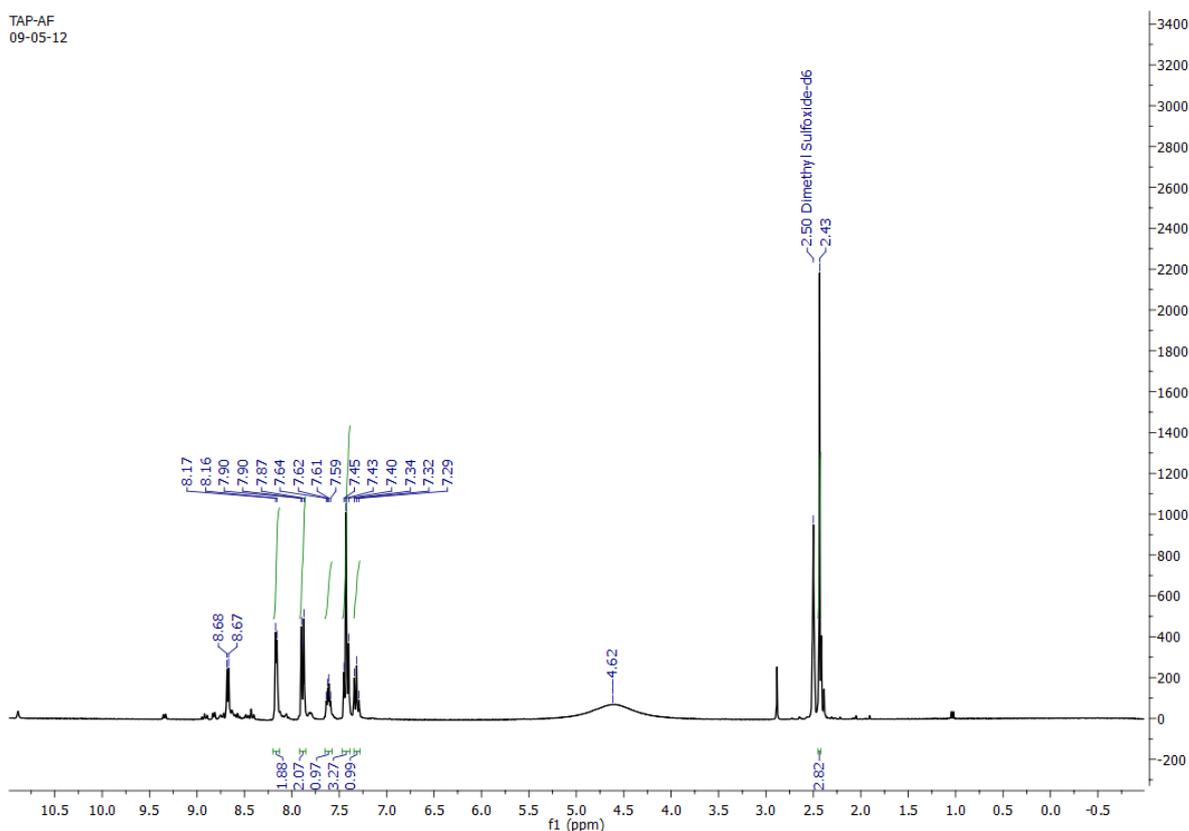
R-TP-1.dpt: TP-AF



TP-AF: Infra-vermelho.

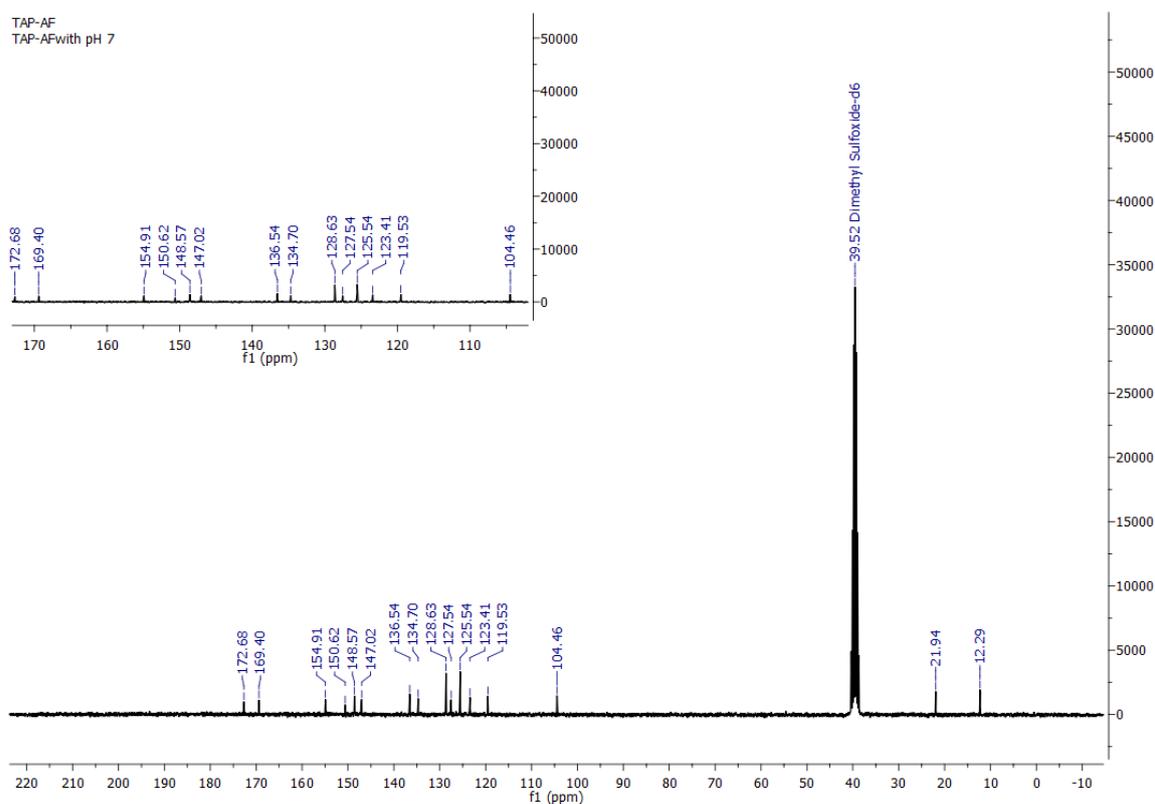
TAP-AF

TAP-AF
09-05-12



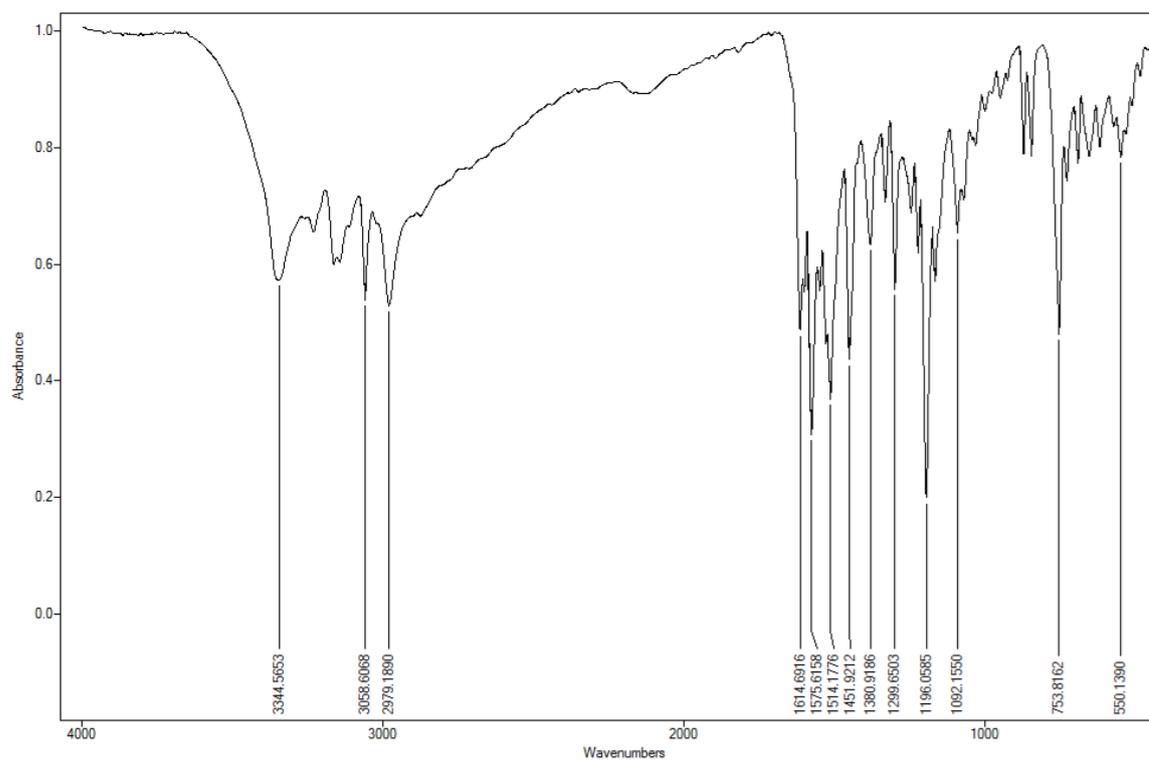
TAP-AF: : RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).

TAP-AF
TAP-AFwith pH 7



TAP-AF: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).

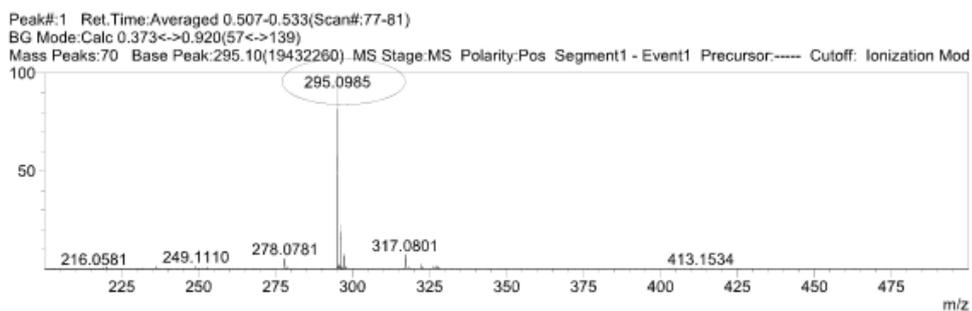
TAP-13.dpt: TAP-AF



TAP-AF: Infra-vermelho.

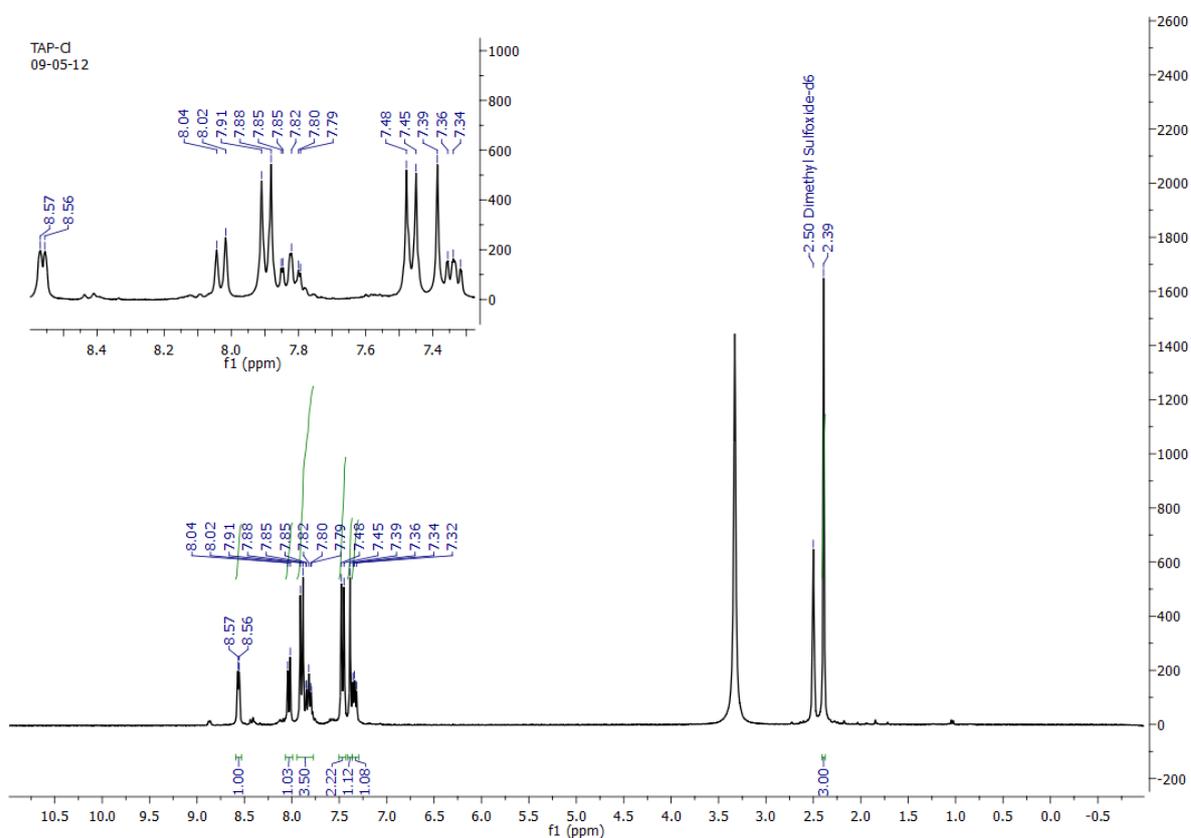
ESPECTRO DE MASSAS (MODO POSITIVO)

MS Spectrum Graph



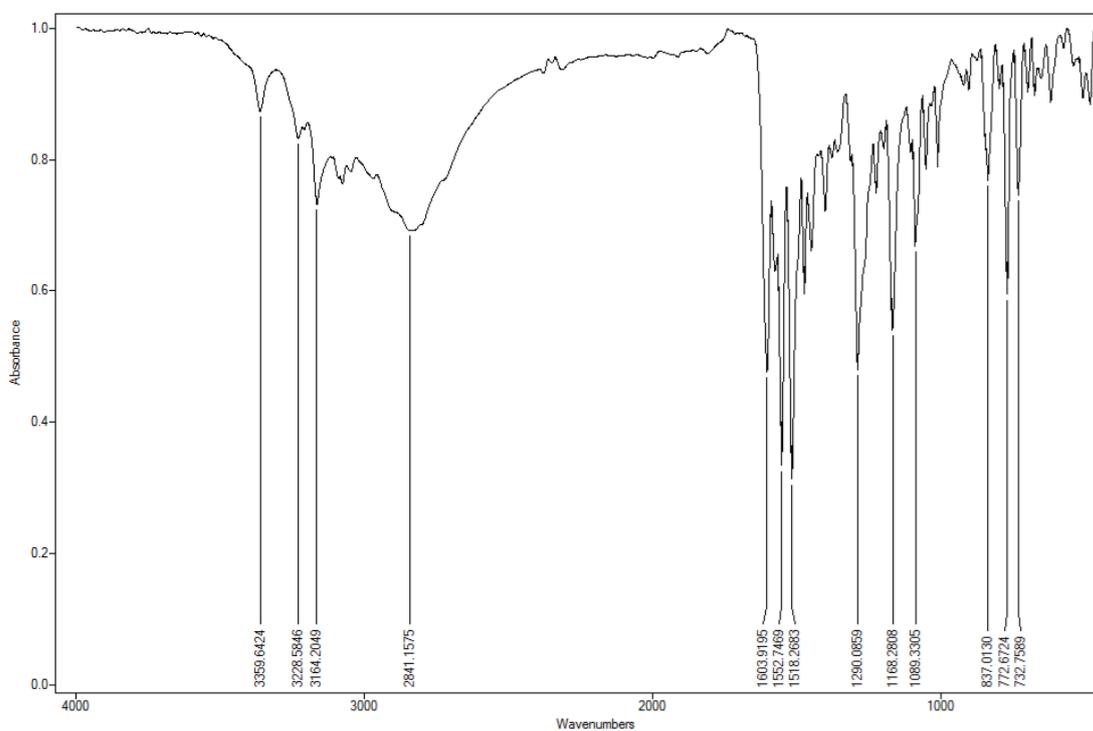
TAP-AF: EMAR-ESI.

TAP-4-Cl



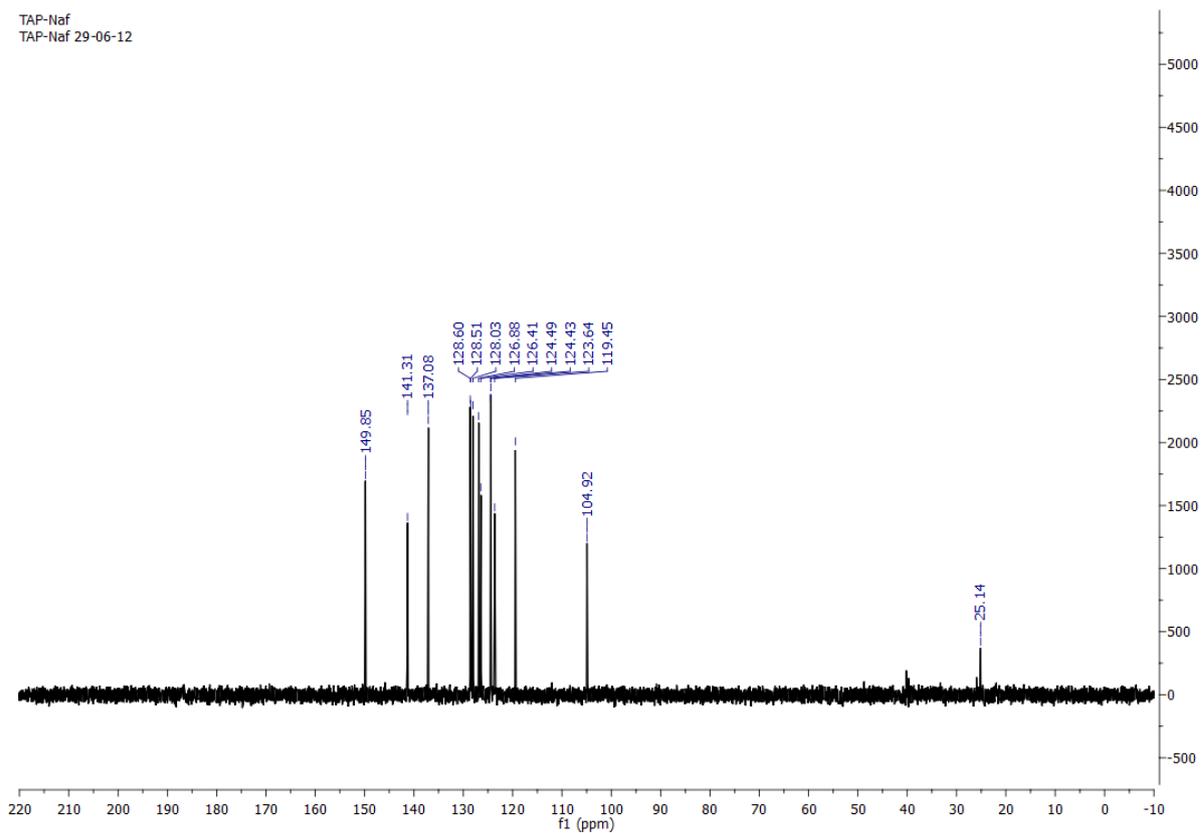
TAP-4-Cl: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).

TAP-03.dpt: TAP-4-Cl



TAP-4-Cl: Infra-vermelho

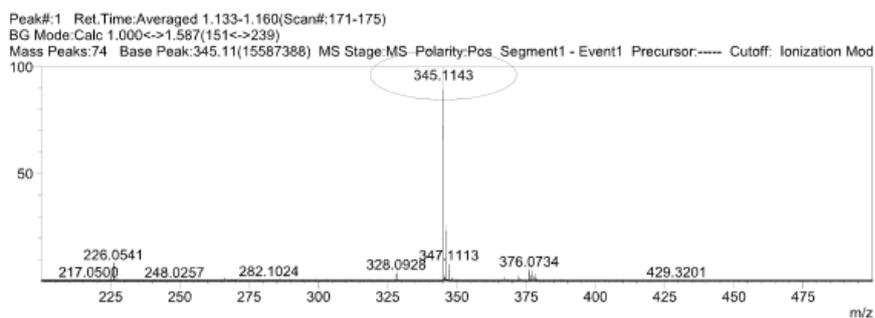
TAP-Naf
TAP-Naf 29-06-12



TAP-2-Naf. : DEPT (75.5Mhz, DMSO-d₆).

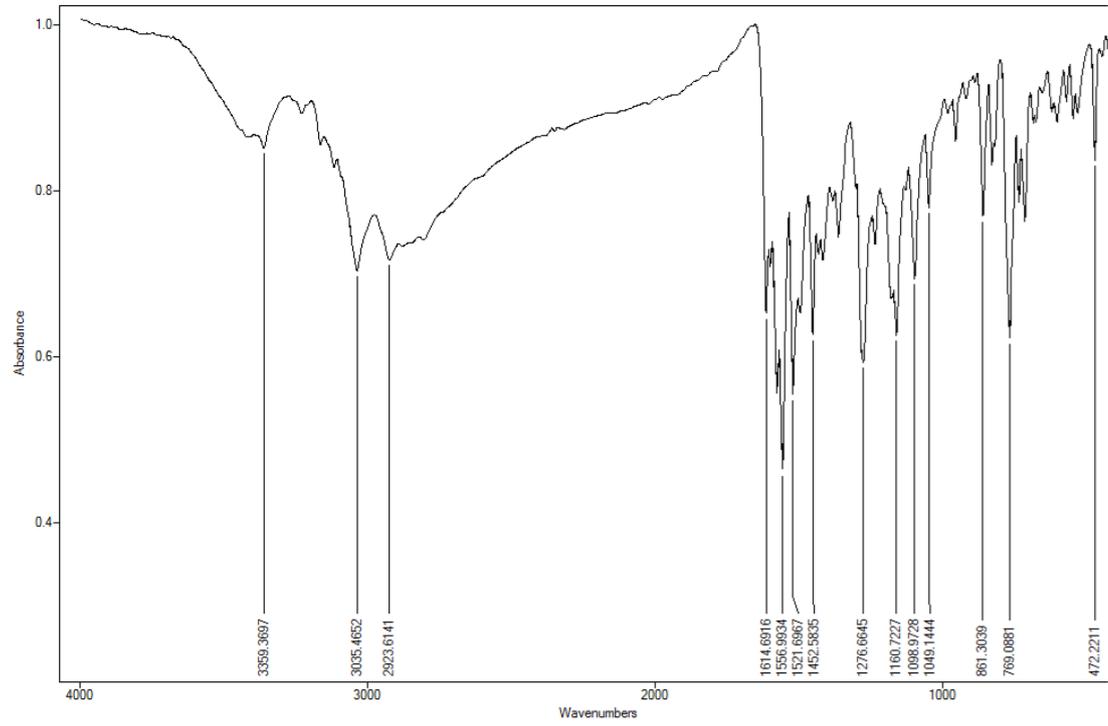
ESPECTRO DE MASSAS (MODO POSITIVO)

MS Spectrum Graph



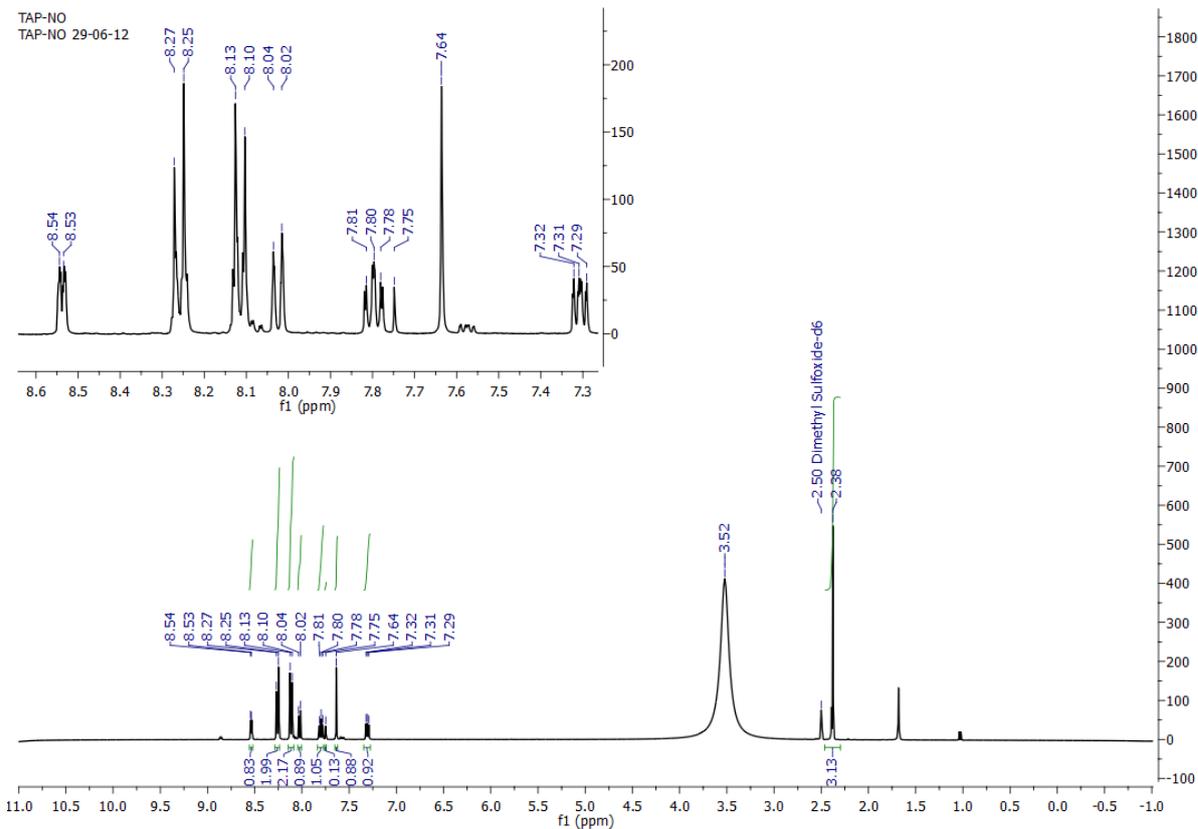
TAP-2-Naf.: EMAR-ESI.

TAP-09.dpt: TAP-2-Naf.

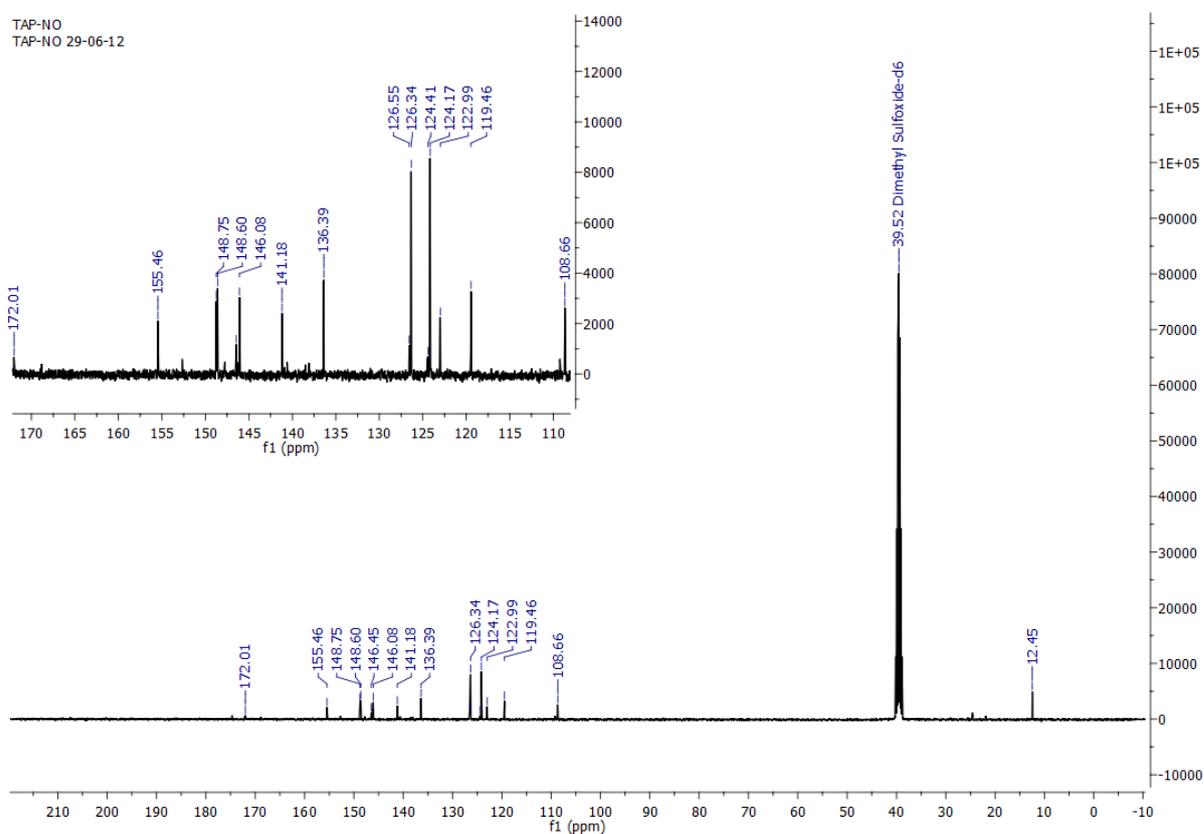


TAP-2-Naf.: Infra-vermelho.

TAP-4-NO₂

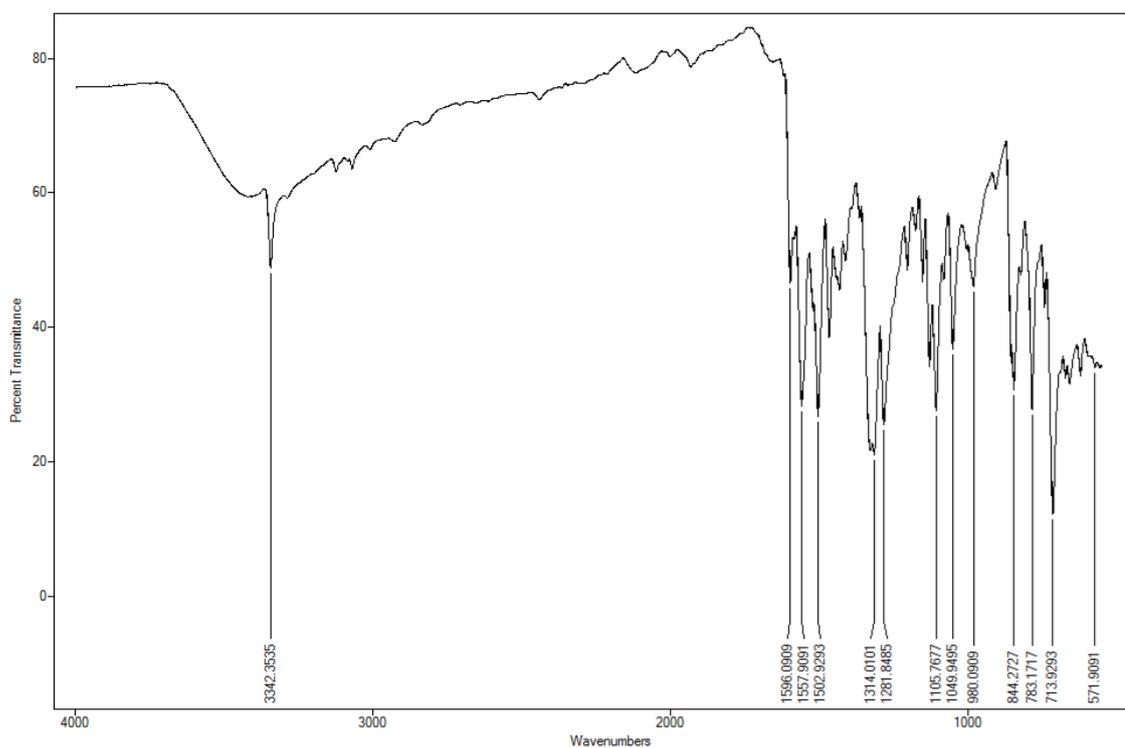


TAP-4-NO₂: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).



TAP-4-NO₂: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).

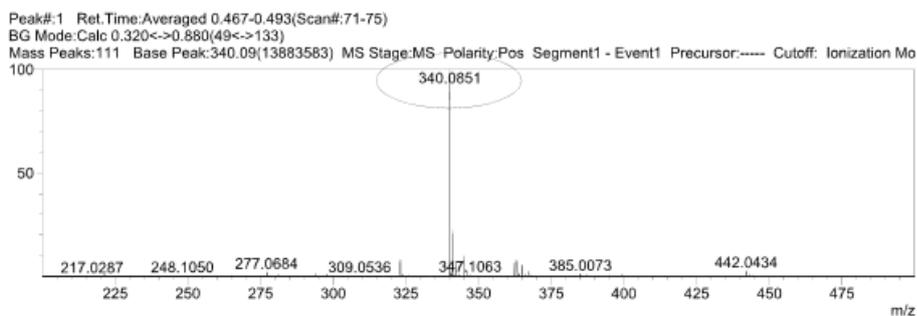
TAP-NO-1.sp: D:/Skydrive/Analysis/FTIR/TAP/TAP-NO-1.sp



TAP-4-NO₂: Infra-vermelho.

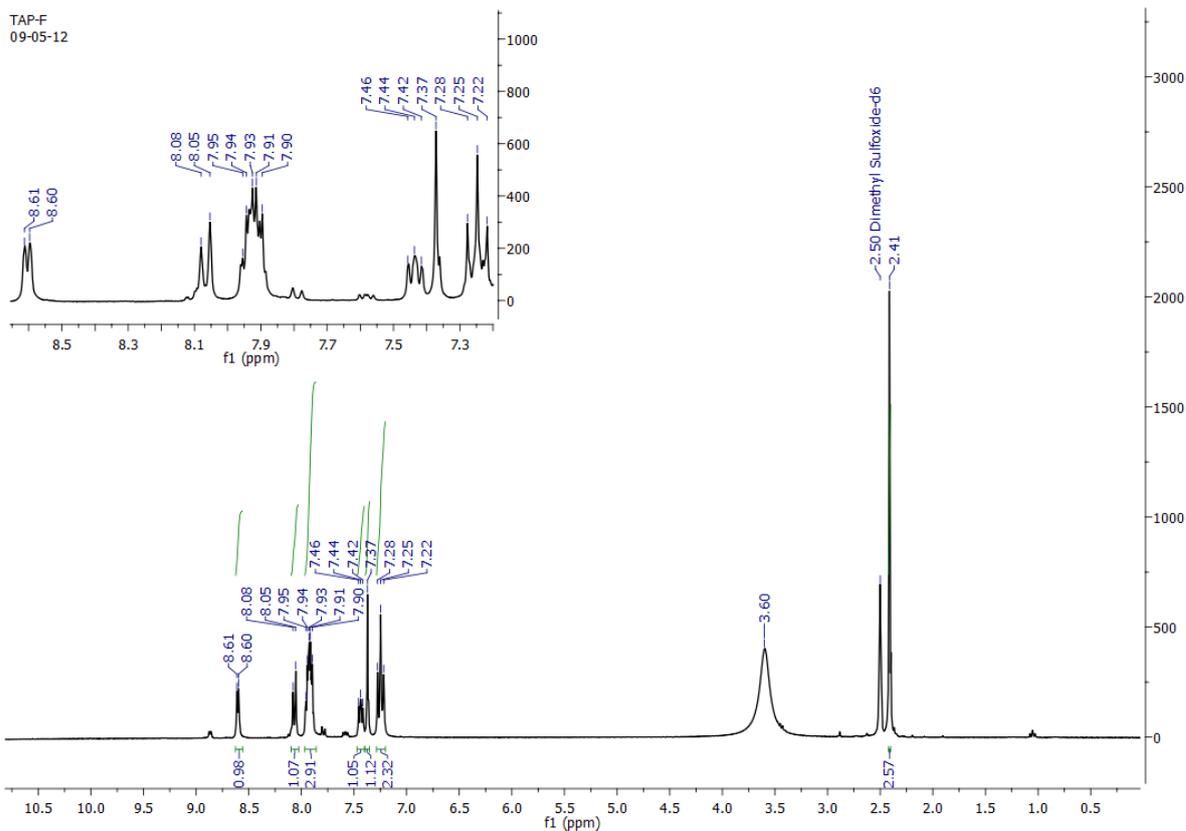
ESPECTRO DE MASSAS (MODO POSITIVO)

MS Spectrum Graph

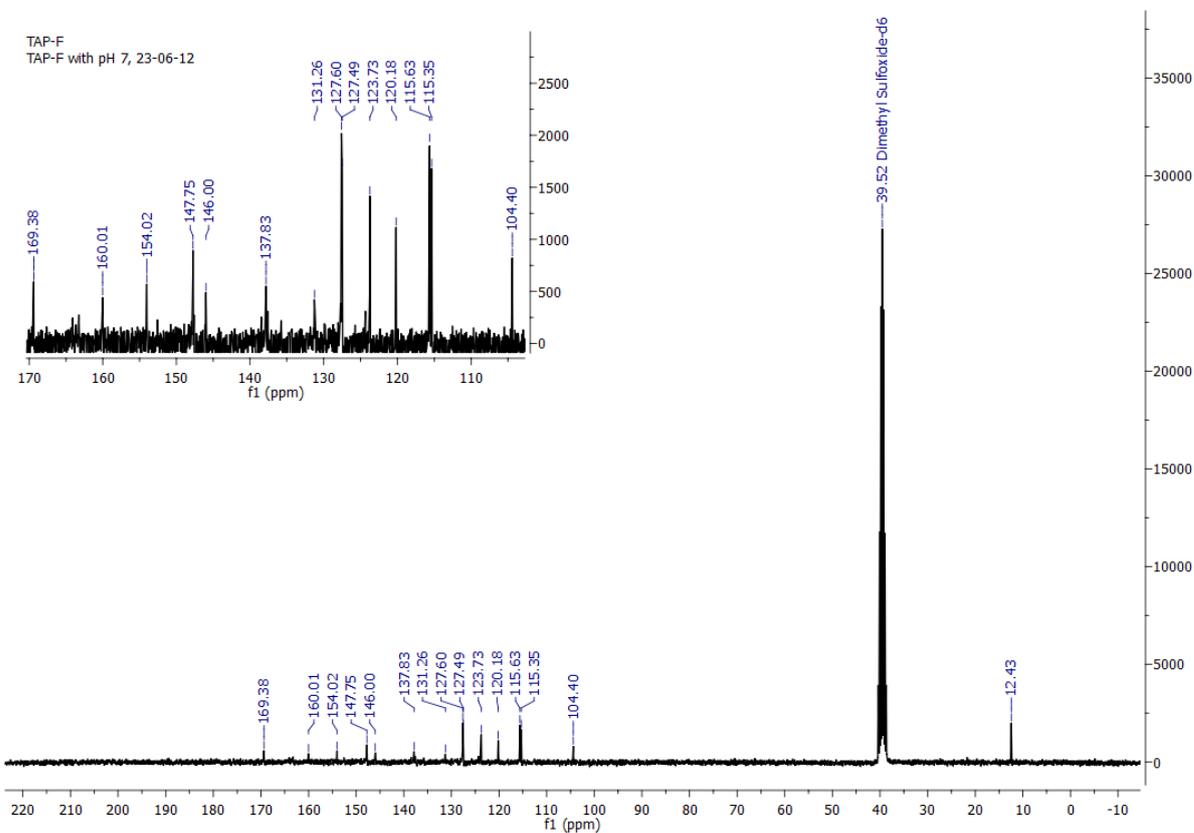


TAP-4-NO₂: EMAR-ESI.

TAP-4-F

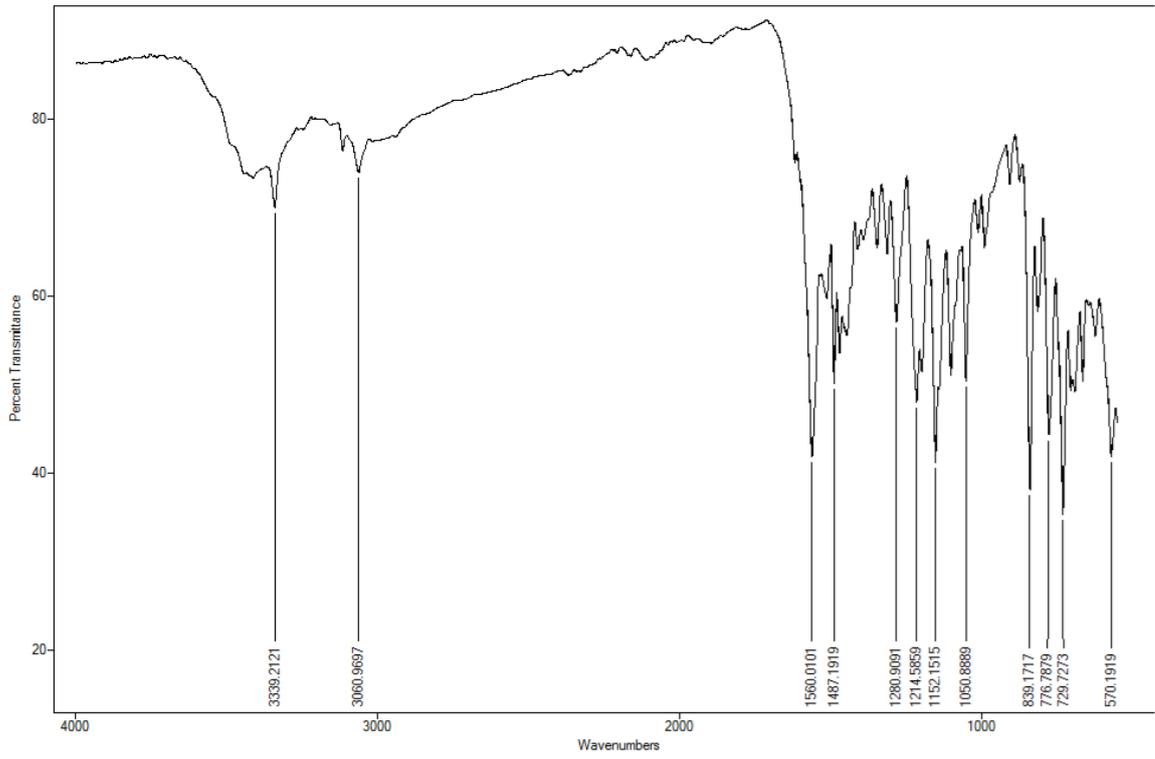


TAP-4-F: RMN ¹H (300Mhz, DMSO-d₆).



TAP-4-F: RMN ¹³C (75.5 Mhz, DMSO-d₆).

TAP-4-F-1.sp: D:\Skydrive\Analysis\FIR\TAP\TAP-4-F-1.sp



TAP-4-F: Infra-vermelho.