

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

TIAGO BENTO DE OLIVEIRA

SÍNTESE, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
NOVOS DERIVADOS HIDRAZÍNICOS E TIAZOLIDINÔNICOS TIOFÊNICOS

Recife

2013

TIAGO BENTO DE OLIVEIRA

**SÍNTESE, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE
NOVOS DERIVADOS HIDRAZÍNICOS E TIAZOLIDINÔNICOS TIOFÊNICOS**

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, orientado pelo Prof. Dr.
Ivan da Rocha Pitta e co-orientado
pela Prof(a). Dr (a). Maria do Carmo
Alves de Lima Alves de Lima

Recife

2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Oliveira, Tiago Bento de

Síntese, determinação estrutural e avaliação biológica de novos derivados hidrazínicos e tiazolidinônicos tiofênicos/ Tiago Bento de Oliveira– Recife: O Autor, 2013.

87 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Ivan da Rocha Pitta

Coorientadora: Maria do Carmo Alves de Lima

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2013.**

Inclui bibliografia

- 1. Farmacologia 2. Thiazoles I. Pitta, Ivan da Rocha (orientador)
II. Lima, Maria do Carmo Alves de (coorientadora) III. Título**

615

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 311

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BENTO OLIVEIRA, TIAGO.

Título: SÍNTESE, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS HIDRAZÍNICOS E TIAZOLIDINÔNICOS TIOFÊNICOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários ao grau de Doutor em Inovação Terapêutica, na área de concentração Fármacos, Insumos e Medicamentos para a Saúde.

Aprovada em: 14 de junho de 2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta

Instituição: Departamento de Antibióticos - UFPE

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Ana Cristina Lima Leite

Instituição: Departamento de Farmácia - UFPE

Assinatura: _____

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

Instituição: Departamento de Farmácia - UFPE

Assinatura: _____

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Instituição: PNPD/CAPES - UFPE

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Marina Galdino da Rocha Pitta

Instituição: PNPD/CAPES - UFPE

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais: Teresinha Martins de Oliveira e José Bento de Oliveira (*in memorian*), que sempre foram razão do meu esforço e o conforto nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora e mãe científica, professora Maria do Carmo Alves de Lima (Nena), por toda sua dedicação em anos de amizade e trabalho duro.

Aos meus avós que com sua humildade e simplicidade me ensinaram coisas básicas da vida como o valor da família e a fé em Deus.

Á todos os amigos que sempre torceram pelo sucesso deste trabalho.

Enfim, este trabalho é dedicado à Deus que é o meu tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, meu orientador, pela colaboração e confiança na realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, pela disposição e ajuda durante o desenvolvimento da tese.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, pela sua paciência, sua presença, estímulo e dedicação para com os projetos e pessoas do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos.

À Profa. Dra. Suely Lins Galdino (*in memorian*), que vem hasteando a bandeira do desenvolvimento científico regional com muito ímpeto e dedicação e ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) da Universidade Federal de Pernambuco.

À Profa. Dra. Maíra Galdino Pitta do Laboratório de Pesquisa em Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT da Universidade Federal de Pernambuco, por todo apoio científico e orientação na realização dos testes biológicos.

Ao Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo do Laboratório de Pesquisa em Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas - LINAT da Universidade Federal de Pernambuco, pela colaboração na realização dos testes de citotoxicidade *in vitro*.

À Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba, pela realização da avaliação da atividade antifúngica.

Agradeço também aos meus amigos do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos e da UFPE.

À toda minha família e amigos que estiveram sempre orando e intercedendo a Deus por mim em todos os momentos de minha vida!

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

“Ele é a Cabeça do corpo, isto é, da Igreja. Ele é o Princípio, o Primogênito dentre os mortos; de sorte que em tudo ele tem a primazia, porque Deus quis habitar nele com toda a sua plenitude e por ele reconciliar consigo todos os seres, os que estão na terra e no céu, realizando a paz pelo sangue da sua cruz.”

CI 1,18-20

RESUMO

O heterociclo tiofênico e as tiossemicarbazonas são moléculas que apresentam diversas atividades biológicas. Os derivados tiofênicos se destacam nas atividades antifúngica e antitumoral. As tiossemicarbazonas são importantes devido às suas propriedades biológicas, tais como antichagásica, antitumoral, antibacteriana e antiprotozoária. Diante disso, desenvolvemos novos compostos 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila e novas tiossemicarbazonas. Os compostos foram obtidos através de uma rota sintética constituída por duas etapas. Na avaliação da atividade antifúngica, que teve como controle positivo o fluconazol, dezoito compostos tiveram suas CIM (Concentração Inibitória Mínima) determinadas frente a 2 cepas de *Cryptococcus neoformans* e 2 cepas de *Candida krusei*. 2-[(quinolin-8-il-metilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-64) apresentou melhor atividade, com valores de CIM que variaram entre 64 a 128 µg/mL para as duas cepas de *Cryptococcus neoformans*. Na avaliação da atividade antitumoral, três compostos tiveram suas citotoxicidades avaliadas através do ensaio do MTT frente às linhagens tumorais humanas T47D, NG97, CCRF-CEM e HL60 e a PBMC em concentração micromolar (µM). Os compostos apresentam a capacidade de inibir a proliferação celular de linhagens cancerígenas em diferentes concentrações. Os valores de IC₅₀ para a linhagem HL60 (Leucemia Promielocítica) não puderam ser determinadas sendo, portanto a linhagem celular tumoral mais sensível aos compostos, que podem ser utilizados de maneira eficiente em concentrações nanomolares (10⁻⁹M). Com relação aos ensaios *in vivo* os derivados LPSF/SB-44 e LPSF/SB-200 apresentaram um resultado significativo frente ao sarcoma 180, sendo que o primeiro composto apresentou o maior percentual de inibição 55,89% para a dose de 50mg/Kg. O derivado LPSF/SB-200 apresentou uma menor atividade, pois seu percentual de inibição foi de 44,5 % para a mesma dose. O metotrexato foi o controle positivo apresentando uma inibição média de 91,4 %. Ao final, alguns compostos sintetizados demonstraram potencial para as atividades biológicas testadas.

Palavras-chave: 2-aminotiofenos, reação de Gewald, atividade antifúngica, atividade antitumoral.

ABSTRACT

The thiophenic and heterocyclic thiosemicarbazones are molecules that exhibit diverse biological activities. Derivatives thiophenic stand antifungal and antitumor activities. The thiosemicarbazones are important because of their biological properties, such as antichagasic, antitumor, antibacterial and antiprotozoal. Therefore, we have developed novel compounds 2-[(arylidene) amino]-cycloalkyl [b] thiophene-3-carbonitrile and new thiossemicarbozones. The compounds were obtained by a synthetic route consists of two steps. In the evaluation of the antifungal activity, which had as positive control fluconazole, eighteen compounds had their MIC (Minimum Inhibitory Concentration) determined against two strains of *Cryptococcus neoformans* and two strains of *Candida krusei*. 2-[(quinolin-8-yl-methylidene) amino] - 4,5,6,7 - tetrahydro-benzo [b] thiophene-3-carbonitrile (LPSF/SB-64) showed highest activity with MIC values ranging from 64 to 128 mg/mL for two strains of *Cryptococcus neoformans*. In the evaluation of antitumor activity, three compounds their cytotoxicities were assessed by the MTT assay on human tumor cell lines front T47D, NG97, and HL60 CCRF-CEM and PBMC in micromolar concentration (mM). Compounds have the ability to inhibit proliferation cancer cell lines in different concentrations. IC₅₀ values for strain HL60 (promyelocytic leukemia) can't be determined and therefore the tumor cell line is more sensitive to compounds which can be efficiently used at nanomolar concentrations (10⁻⁹M). With respect to in vivo tests and LPSF/SB-200 LPSF/SB-44 derivatives showed a significant result against Sarcoma 180, and the first compound showed the highest percentage inhibition of 55.89% for the 50mg dose/kg LPSF/SB-200. The derivative showed a lower activity because its inhibition percentage was 44.5% for the same dose. Methotrexate was the positive control having a mean inhibition of 91.4%. The end, some synthesized compounds showed potential for the biological activities tested.

Keywords: 2-aminothiophene, reaction Gewald, antifungal, antitumor activity.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Esquema da Síntese de Paal	24
Esquema 2 - Esquema de uma síntese de Fiesselmann	24
Esquema 3 - Esquema de uma síntese de Hinsberg	25
Esquema 4 - Síntese de Gewald	25
Esquema 5 - Reações de acilação em tiofenos	26
Esquema 6 - Oxidação do enxofre do anel tiofênico	26
Esquema 7 - Desprotonação e substituição eletrofílica de tiofenos	27
Esquema 8 - Tiofenos obtidos por meio de irradiação	27
Esquema 9 - Reações de cicloadição envolvendo o anel tiofeno	28
Esquema 10 - Método de obtenção direta (adaptado de TENÓRIO et al., 2005)	33
Esquema 11 - Obtenção da tiossemicarbazida e liberação do ácido tioglicólico	34
Esquema 12 - Reação do ditiocarbamato com hidrazina	34
Esquema 13 - Isotiocianatos na presença de hidrazinas geram tiossemicarbazidas	35
Esquema 14 - Tiossemicarbazidas a partir de dissulfeto de carbono	35
Esquema 15 - Diagrama de síntese dos derivados 2-[(arilideno)-amino]-4,5-cicloalquil-tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB)	39
Esquema 16 - Diagrama de síntese dos derivados hidrazínicos e tiazolidinônicos tiofênicos (LPSF/GBT)	41
Esquema 17 - Mecanismo da reação de Gewald	45
Esquema 18 - Mecanismo de condensação do 2-amino-cicloalquil-[b]tiofenos-3-carbonitrila aos aldeídos aromáticos	46
Esquema 19 - Mecanismo de formação do LPSF/GBT-01	47
Esquema 20 - Mecanismo de formação do LPSF/GBT-02	48
Esquema 21 - Mecanismo de formação do LPSF/GBT-5 e LPSF/GBT-6	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tiofeno	23
Figura 2 - Tiofenos como metabólitos secundários da <i>Tagetes pátula</i> L.	23
Figura 3 - Fármacos que possuem o anel tiofeno	29
Figura 4 - Derivados tiofênicos anti-inflamatórios	30
Figura 5 - Derivados tiofênicos com atividade antibacteriana	30
Figura 6 - Estrutura química dos derivados tiofênicos	31
Figura 7 - Derivados tiofênicos complexados com metais	31
Figura 8 - Estrutura química do raltitrexed e benzotiofênico	32
Figura 9 - Estrutura das tiossemicarbazonas	32
Figura 10 - Estrutura das tiossemicarbazonas sintetizadas	36
Figura 11 - Tiossemicarbazonas anti-cruzaína	36
Figura 12 - Tiossemicarbazonas anti-T. cruzi	37
Figura 13 - Espectroscopia de RMN ^1H do composto LPSF/SB-68	50
Figura 14 - Espectro de RMN ^{13}C do composto LPSF/SB-68	51
Figura 15 - Espectroscopia de IV do composto LPSF/SB-68	52
Figura 16 - Viabilidade celular da linhagem NG97 frente aos compostos LPSF/SB-44, LPSF/SB-200, LPSF/SB-58 e amsacrina (m-AMSA) (utilizado como controle positivo).	76
Figura 17 - Viabilidade celular da linhagem T47D frente aos compostos LPSF/SB-44, LPSF/SB-68 e LPSF/SB-200.	76
Figura 18 - Viabilidade celular da linhagem CCRF-CEM frente aos	77

compostos LPSF/SB44, LPSF/SB68 e LPSF/SB200.

Figura 19 - Inibição do crescimento da massa tumoral em camundongos tratados com LPSF/SB-44 e LPSF/SB-200 por via intra-peritoneal. durante 8 dias. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a equação: $TWI = (C - T) \times 100/C$ e foram significativas para $p \leq 0,05$

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Todas as linhagens utilizadas nos ensaios obtidas do banco de células do Rio de Janeiro	70
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas frente a cepas de <i>C.neoformans</i> e <i>C.krusei</i> pela técnica de microdiluição	74
Tabela 3 - Valores de IC50 dos compostos LPSF/SB-44, LPSF/SB-68 e LPSF/SB-200 frente às linhagens testadas	75

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ASD: Ágar Sabouraud Dextrose

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CSD: Caldo Sabouraud Dextrose

H-292: Linhagem de Câncer de pulmão de humano

HEP: Linhagem de Carcinoma de laringe de humano

HSV-1: Herpes simplex virus 1

HT29: Carcinoma de cólon – humano

IV: Infravermelho

JNK: Jun N-terminal kinase

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolio

NCI: National Cancer Institute

Rf: Fator de retenção

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

TBAB: Brometo de tetrabutilamônio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 GERAL	21
2.2 ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 QUÍMICA MEDICINAL E PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	22
3.1.1 Síntese de Paal	24
3.1.2 Síntese de Fiesselmann	24
3.1.3 Síntese de Hinsberg	25
3.1.4 Síntese de Gewald	25
3.1.5 Reatividade do anel tiofeno	26
3.1.6 Fármacos que contém o anel tiofeno	28
3.1.7 Atividades biológicas de derivados tiofênicos	29
3.1.8 Tiossemicarbazonas	32
3.1.8.1 Obtenção direta	33
3.1.8.2 Obtenção indireta	34
3.1.8.3 Atividade biológica para as tiossemicarbazonas	35
4 PARTE EXPERIMENTAL	38
4.1 MATERIAL	38
4.1.1 Equipamentos	38
4.1.2 Reagentes e solventes	38
4.1.3 Metodologia	39
4.1.3.1 Síntese dos derivados 2-[(arilideno)-amino]-4,5-cicloalquil-tiofeno-3- carbonitrila (LPSF/SB)	39
4.1.3.2 Procedimento Geral de Síntese dos derivados 2-amino-Tiofeno (LPSF/SB-1, LPSF/SB-50 E LPSF/SB-2)	40
4.1.3.3 Procedimento Geral de Síntese dos derivados 2-[(arilideno)-amino]-4,5-cicloalquil-tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB)	40
4.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS HIDRAZÍNICOS E TIAZOLIDINÔNICOS TIOFÊNICOS (LPSF/SBT)	41
4.2.1 Síntese do Ácido cianoacético-(4-cloro-benzilideno)-hidrazida (LPSF/SBT-1)	42

4.2.2 Síntese do Ácido acético-2-ciano-2-[(fenilamino)-tioxometil]-hidrazida (LPSF/SBT-2)	42
4.2.3 Síntese do 2-Amino-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]tiofen-3-ácidocaboxílico-(4-cloro-benzilideno)-hidrazida(LPSF/SBT-3) e do Benzo [b]tiofeno-3-ácido carboxílico-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-2 [(fenilamino)tioxometil]hidrazida (LPSF/SBT-4)	42
4.2.4 Síntese do N-[4-(4-cloro-fenil)-2-oxo-tiazolidin-3-il]-2-ciano-acetamida (LPSF/SBT-5) e do 2-Amino-4,5,6,7-tetra-hidro-benzo[b] tiofeno-3-ácido carboxílico[2-(4-cloro-fenil)-4-oxo-tiazolidin-3-il]-amida (LPSF/SBT-6)	43
4.2.5 Síntese do 2-(2-(4-nitrobenzilidenoamino)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo [b]tiofeno -3- carbonil)-N-fenilhidrazinacarbotoamida (LPSF/SBT-7)	43
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.3.1 Mecanismo da síntese de Gewald	44
4.3.2 Reação de Condensação –2ª etapa	46
4.3.3 Mecanismo do ataque nucleofílico da Cianoacetohidrazida à carbonila	47
4.3.4 Mecanismo do ataque nucleofílico da Cianoacetohidrazida à Tiocarbonila	47
4.3.5 Mecanismo de formação da 4-tiazolidinona	48
4.3.6 Mecanismo do ataque nucleofílico à carbonila catalisado por base	49
4.3.7 Dados físico-químicos e análise espectroscópica	49
4.4 SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS	52
4.4.1 2-amino-5,6-dihidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/ SB-1)	52
4.4.2 2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-50)	53
4.4.3 2-amino-5,6,7,8-tetrahydro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-2)	53
4.4.4 2-[(4-Nitro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4H-ciclohepta[b]	53

tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-43)	
4.4.5. (1H-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4H-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina (LPSF/SB-44)	54
4.4.6 2-[(4-Benziloxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-45)	55
4.4.7 2-[(4-Bromo-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-46)	55
4.4.8 2-[(Tiofen-3-il-metilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno- 3- carbonitrila (LPSF/SB-62)	56
4.4.9 2-[(Tiofen-2-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-63)	56
4.4.10 2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-64)	57
4.4.11 2-[(4-Fluoro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno- 3-carbonitrila (LPSF/SB-65)	57
4.4.12 2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-68)	58
4.4.13 2-[(4-Etoxi-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-70)	59
4.4.14 2-[(4-Etil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-71)	59
4.4.15 2-[(4-Isopropil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-72)	60
4.4.16 2-[(4-Metil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-73)	61
4.4.17 2-[(4-Tiofen-3-il-metilideno)-amino]-5,6-dihidro-4H-ciclopenta[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-80)	61
4.4.18 2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6-dihidro-4H-ciclopenta[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-81)	62
4.4.19 2-[(3,4-Bis-benziloxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-110)	62
4.4.20 2-[(4-Pirrolidin-1-il-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]	63

tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-117)	
4.4.21 2-[(4-Morfolin-4-il-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]	63
tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-118)	
4.4.22 (5-Bromo-1H-Indol-3-ilmetileno)-(5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]	64
tiofen-2-il)-amina (LPSF/SB-200)	
4.4.23 Ácido cianoacético (4-cloro-benzilideno)-hidrazida (LPSF/SBT-1)	64
4.4.24 Ácido acético – 2 – ciano – 2 - [(fenilamino) - tioxometil] - hidrazida (LPSF/SBT-2)	65
4.4.25 2–Amino-4,5,6,7–tetrahidro–benzo[b]tiofen–3–ácidocaboxílico (4-cloro-benzilideno)-hidrazida(LPSF/SBT-3)	- 65
4.4.26.1-(2-Amino-4,5,6,7-tetrahidro–benzo[b]tiofen-3–ácidocarboxílico) –4-fenil-tiossemicarbazona (LPSF/SBT-4)	66
4.4.27 2-(2-(4-nitrobenzilidenoamino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno-3- carbonil) -N-phenilhidrazinacarbotioamida (LPSF/SBT-7)	66
4.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	67
4.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	67
4.5.2 Compostos testados	68
4.5.3 Microrganismos	69
4.5.4 Meios de Cultura	68
4.5.5 Inóculo	69
4.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL PELO MÉTODO DO MTT	69
4.6.1 Materiais e Métodos	69
4.6.2 Cultivos das Células	69
4.6.3 Ensaio de citotoxicidade em células neoplásicas	70
4.6.4 Ensaio de seletividade em Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano	71
4.7 ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VIVO</i>	71
4.7.1 Tumor Sólido	72
4.7.2 Animais	72
4.7.3 Determinação a atividade antitumoral	72
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	73

5.2 ATIVIDADE ANTITUMORAL	75
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

Os compostos heterociclos representam um grande número de estruturas diversas que apresentam importante papel nos sistemas biológicos. O anel tiofênico, uma estrutura insaturada de cinco membros contendo o átomo de enxofre, é um composto fracamente aromático que sofre principalmente reações de substituição no carbono 2 do anel (SARKER e NAHAR, 2009).

A estrutura do anel tiofênico, em particular, tornou-se atrativa para a química medicinal a partir do momento em que várias atividades biológicas foram atribuídas a este núcleo. A literatura relata diversas propriedades entre as quais se destacam as atividades antifúngica (CHAN et al., 1975; RYU et al., 2005) e antitumoral (DALLEMAGNE et al., 2003).

Pesquisas no sentido de descobrir novos fármacos antifúngicos são impulsionadas pela crescente resistência encontrada aos medicamentos já disponíveis na terapêutica. Dados clínicos e laboratoriais têm demonstrado que *Candida krusei* apresentaria resistência ao fluconazol e *Cryptococcus neoformans* à caspofungina (ROGERS, 2006).

Mudanças na afinidade do citocromo P450 estão ligadas a resistência intrínseca da *C. krusei* ao fluconazol, onde o citocromo parece ser um alvo celular insensível a droga (OROZCO et al., 1998; LUPETTI et al., 2002). Já a resistência relacionada com a anfotericina B observada em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* relaciona-se com uma mutação na biossíntese do ergosterol, que geraria um defeito na enzima esterol delta⁸⁻⁷ isomerase (KELLY et al., 1994).

Oliveira et al. (2010) testaram através da determinação das Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) por meio do método de microdiluição em caldo, oito derivados 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila frente a quatro espécies de *Candida* (42 isolados - *C. albicans* - 20 isolados; *C. krusei* - 5 isolados; *C. parapsilosis* - 12 isolados e *C. tropicalis* - 5 isolados) e duas amostras de *Cryptococcus neoformans*. Os valores de CFM foram obtidos utilizando concentrações decrescentes de cada uma das drogas isoladamente (3.200 – 6,25 µg/mL). Esses valores foram comparados com os valores obtidos com as drogas referência fluconazol e anfotericina B, para o mesmo ensaio.

Os derivados apresentaram de maneira geral, uma atividade moderada ou fraca contra a maioria dos isolados de *Candida* e *Cryptococcus* testados, sendo que os isolados de *C. neoformans* mostraram-se mais sensíveis (menores valores de CFM). Os derivados contendo o anel ciclohexila foram mais eficientes para atividade antifúngica que os ciclopentila e cicloheptila, sendo que todos os 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila com atividade se mostram mais fungicidas que fungistáticos, diferentemente da maior parte das drogas comercialmente disponíveis.

Outro grupo de moléculas de considerável interesse científico são as tiossemicarbazonas, devido às suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antichagásica (DONNICI et al. 2009), antitumoral (QUACH et al., 2012), antibacteriana (KASUGA et al., 2003), antiprotozoária (BHARTI et al., 2002; 2004) entre outras.

Em muitas circunstâncias, a ação farmacológica das tiossemicarbazonas é incrementada através da coordenação com íons metálicos (MENDES et al., 2007; SILVA et al., 2009). Fato que favorece significativa atividade tripanocida *in vitro*.

Considerando isto, o presente trabalho procurou desenvolver novos derivados 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila e novas tiossemicarbazonas, com a finalidade de avaliar a atividade antifúngica frente a cepas de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*, e atividade antitumoral *in vitro* frente a linhagens tumorais de câncer de carcinoma de mama (T47D), Glioblastoma Multiforme (NG97), Leucemia Linfoblástica Aguda (CCRF-CEM) e Leucemia Promielocítica (HL60).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver sinteticamente e avaliar as atividades biológicas de novas moléculas das séries 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB), hidrazínicos e tiazolidinônicos tiofênicos (LPSF/SBT) potencialmente bioativos.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar novas moléculas das séries 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB), hidrazínicos e tiazolidinônicos tiofênicos (LPSF/SBT), determinado suas características físico-químicas e as elucidando por meio das técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos derivados tiofênicos LPSF/SB através de ensaios de sensibilidade, frente a diferentes isolados clínicos de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* de forma a determinar as concentrações mínimas inibitórias;
- Verificar a citotoxicidade *in vitro* de derivados tiofênicos LPSF/SB em linhagens de células tumorais carcinoma de mama (T47D), Glioblastoma Multiforme (NG97), Leucemia Linfoblástica Aguda (CCRF-CEM) e Leucemia Promielocítica (HL60), através de um *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral das amostras.
- Avaliar a atividade antitumoral dos derivados tiofênicos LPSF/SB, selecionados através de um *screening* inicial, frente ao tumor sólido Sarcoma 180.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 QUÍMICA MEDICINAL E PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

Uma das principais ferramentas para introdução na clínica médica de novos agentes terapêuticos, potencialmente ativos e menos tóxicos, é o planejamento racional de fármacos. Para isso utilizamos diferentes ferramentas, que nos possibilita o conhecimento dos mecanismos que regem as reações químicas, a interação com catalisadores e métodos específicos de purificação e identificação de moléculas (BARREIRO e FRAGA, 2008).

Segundo Thomas (2003), as rotas usadas na síntese de fármacos podem ser classificadas como vias sintéticas parciais ou plenas, onde as parciais são resultantes da combinação da síntese orgânica e de outros métodos, como por exemplo, computacionais; e as vias plenas utilizam apenas métodos de síntese orgânica.

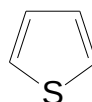
Dois fármacos estruturalmente semelhantes, diferenciando-se apenas por um átomo ou posição que este ocupa na molécula, podem apresentar diferenças quanto às suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, quanto à atividade biológica, tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo (WERMUTH, 2003; TAVARES, 2004).

As propriedades físico-químicas de compostos bioativos, reflexo de sua estrutura química, podem ser descritas quantitativamente se forem expressas por meio de parâmetros físico-químicos ou descritores estruturais adequados. Assim, com base neste conceito, foi possível desenvolver nova área do conhecimento, que se preocupa com o estudo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica. Estas relações são expressas por modelos matemáticos, que correlacionam descritores estruturais de séries de compostos análogos com a atividade biológica por eles desempenhada (WERMUTH, 2003; THOMAS, 2003; TAVARES, 2004).

Na química medicinal, os heterociclos são alvo de estudos antigos, sendo o anel Tiofeno um dos mais ativos frente as mais diversas atividades biológicas. Este anel é um heterociclo pentagonal que contém como heteroátomo o enxofre e duas

duplas ligações duplas (nas posições 2 e 4), formando um sistema aromático (Figura 1) (STEFANI, 2009).

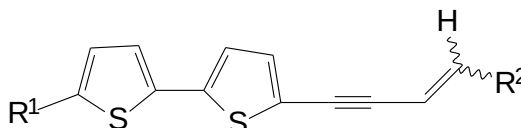
Figura 1: Tiofeno



Caracteriza-se por ser um líquido incolor, solúvel em água, com aroma que se assemelha ao do benzeno. Foi descoberto por Meyer, em 1882, e sua ocorrência se dá em vários organismos, como fungos e plantas superiores. (STEFANI, 2009; KATRITZKY and POZHARSKII, 2000).

São várias as fontes naturais de tiofenos, dentre as quais se encontram: óleo cru, petróleo, gases condensados e carvão. Sem falar em plantas como a *Tagetes pátula l.* (Asteraceae), onde vários derivados tiofenos (1-3) já foram identificados como metabólitos secundários (Figura 2) (MARGL et al., 2002).

Figura 2: Tiofenos como metabólitos secundários da *Tagetes pátula L.*



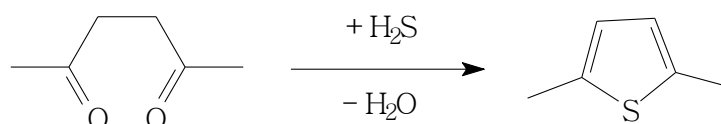
- 1: $R^1 = R^2 = H$
- 2: $R^1 = CH_3, R^2 = H$
- 3: $R^1 = H, R^2 = CH_3$

Várias são as reações de formação do anel tiofeno, dentre elas se encontram a Síntese de Paal, a síntese de Fielsselman, síntese de Hinsberg, e finalmente a tão conhecida síntese de Gewald, que envolve a condensação de uma cetona ou aldeído com um composto metileno ativo (α -cianoéster, etc) na presença de enxofre elementar e de uma base, originando 2-amino-tiofeno polissubstituídos (STEFANI, 2009; SRIDHAR et al., 2007).

3.1.1 Síntese de Paal

O método mais simples é a “sulfurização” de compostos 1,4-dicarbonílicos, sendo feita com P_4S_{10} ou H_2S e seguida por uma ciclização desidratativa idêntica à síntese de Paal-Knorr de furanos (Esquema 1). Com relação ao mecanismo, o H_2S age como nucleófilo atacando uma das carbonilas do composto dicarbonílico, sendo a próxima etapa caracterizada pela saída de uma molécula de água e posterior ciclização do anel com saída de outra molécula de água (STEFANI, 2009).

Esquema 1: Esquema da síntese de Paal

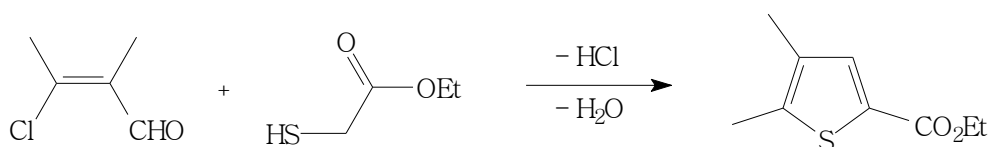


Este método, no caso, é uma síntese eficiente e altamente versátil de furanos, pirróis e tiofenos. Além do que ela também pode ser realizada via micro-ondas, partindo de β -ceto-ésteres pode-se obter 1,4-dicetonas que sofrerão uma posterior ciclização e formarão o anel tiofênico por meio de uma condensação de Paal-Knorr (MINETTO, RAVEGLIA, SEGA, and TADDEI. et al., 2005).

3.1.2 Síntese de Fiesselmann

Compostos 1,3-dicarbonílicos ou aldeídos β -clorovinílicos reagem na presença de piridina com tioglicolatos ou outros tióis, possuindo um grupo metileno reativo e formando tiofeno-2-carboxil ésteres (Esquema 2) (SAINSBURY, 2001).

Esquema 2: Esquema de uma síntese de Fiesselmann

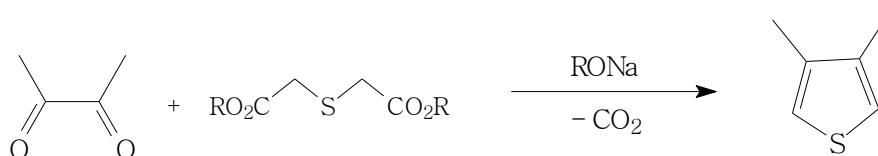


De início ocorre uma substituição nucleofílica pela adição de Michael, via o átomo de enxofre, tendo como resultado a perda de uma molécula de HCl e posteriormente ocorre uma condensação aldólica intramolecular com intuito de obter-se o anel tiofeno (STEFANI, 2009; EICHER e HAUPTMANN, 1995).

3.1.3 Síntese de Hinsberg

Esta síntese ocorre com compostos 1,2-dicarbonílicos que podem ser induzidos a ciclizar com ésteres do ácido tioglicólico tendo com catalisador uma base (esquema 3). É uma síntese que apresenta bons rendimentos, levando a ésteres tiofeno dicarboxílicos por meio de uma dupla condensação aldólica com os dois grupos metilenos do sulfeto (KATRITZKY e POZHARSKII, 2000).

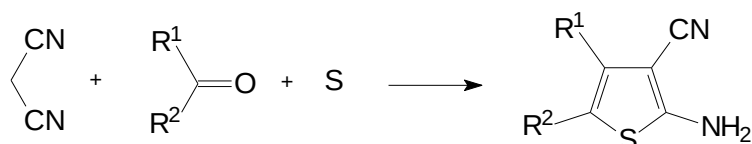
Esquema 3: Esquema da síntese de Hinsberg



3.1.4 Síntese de Gewald

Reação publicada originalmente em 1961 por Gewald, levando o nome do próprio cientista que a estudou inicialmente e representa a primeira parte da rota sintética dos compostos finais (Esquema 4).

Esquema 4: Síntese de Gewald



Esta reação orgânica caracteriza-se por envolver a condensação de uma cetona ou de um aldeído com um composto metileno ativo (nesse caso um α -

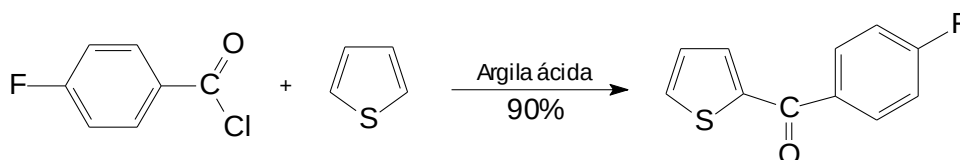
cianoéster) na presença de enxofre elementar e de uma base orgânica. (STEFANI, 2009; PUTEROVA, KRUTOSIKOVA e VEGH, 2010).

3.1.5 Reatividade do anel tiofeno

As reações de substituição nos 2-amino-tiofenos representam uma forma versátil de obtenção de novos compostos biologicamente ativos. Os derivados contendo os 2-amino-tiofenos possuem uma grande variedade de aplicações como corantes, produtos agroquímicos, biológicos e farmacêuticos (BEHBEHANI, 2012).

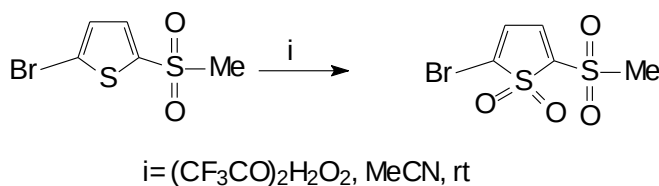
Derivados tiofeno 2-acilados podem ser obtidos por acilação de Friedel-Krafts em reação envolvendo um cloreto acila (cloreto de 4-flúor-benzoíla) na presença de argila ácida como catalisador (Esquema 5). Esta mesma reação poderia ser feita com o AlCl_3 ou outros ácidos de Lewis, ou ainda com a argila ácida, que é um catalisador ecologicamente mais aceitável (CAMPANATI et al., 1998).

Esquema 5: Reações de acilação em tiofenos



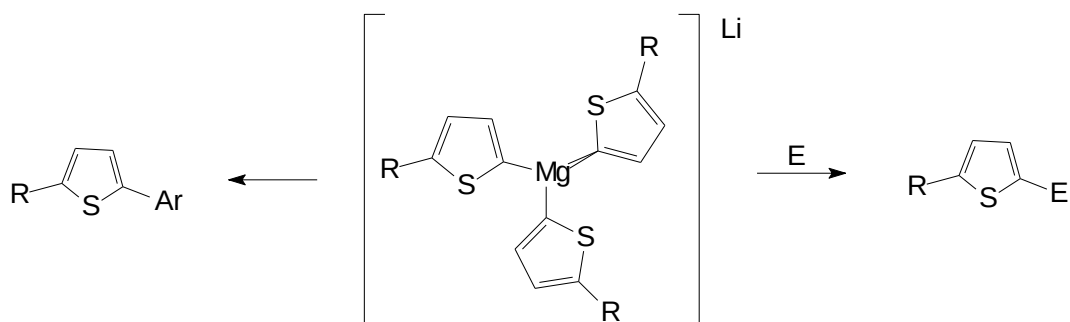
Também são observadas reações sob o átomo de enxofre. Ácido trifluoroperacético em acetonitrila anidra é um reagente efetivo para a oxidação de tiofenos que possuem grupos retiradores de elétrons, levando a tiofeno 1,1-dióxidos (Esquema 6) (NENAJDENKO; GAVRYUSHIN e BALENKOVA, 2001).

Esquema 6: Oxidação do enxofre do anel tiofênico



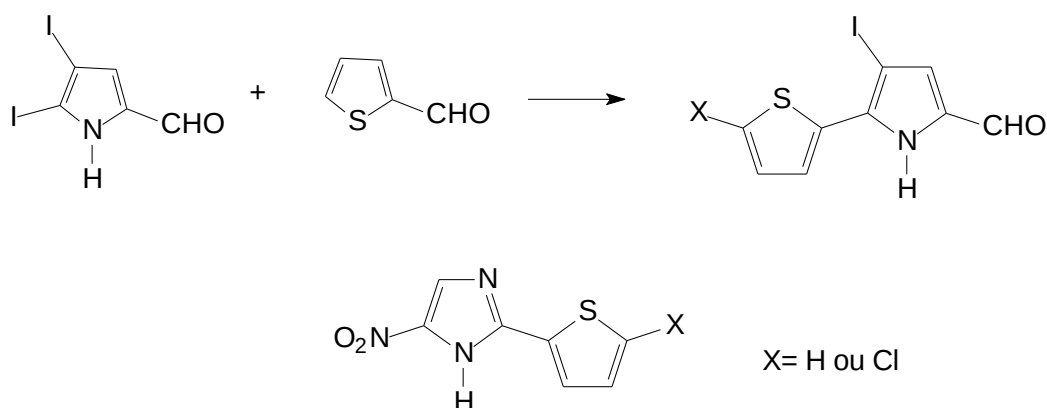
O tiofeno também pode sofrer desprotonação quando reage com o lítio tributilmagnésio, podendo reagir com diversos eletrófilos. Este tipo de reação é conduzido em tetrahidrofurano à temperatura ambiente, de preferência na presença de tetrametiletilenediamino, como é relatado no esquema 7 (BAYH et al., 2005).

Esquema 7: Desprotonação e substituição eletrofílica de tiofenos



A irradiação de 4,5-diiodopirrol-2-carbaldeído com 2-carbaldeído-tiofeno leva à formação de tiofenos substituídos com rendimentos satisfatórios (Esquema 8) (D'AURIA et al., 1998).

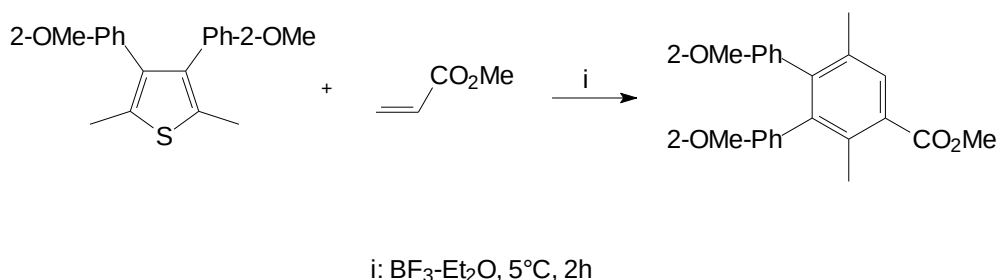
Esquema 8: Tiofenos obtidos por meio da irradiação



Tiofenos podem também sofrer reações de cicloadição gerando derivados do benzeno. No exemplo abaixo temos o 3,4-bis-(2-metóxilifenil)-2,5-dimetil-tiofeno que reage com o acrilato de metila na presença de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ para originar o benzeno

pentassubstituído em 65% de rendimento (Esquema 9) (KUMAR e BALASUBRAHMANYAM, 1997).

Esquema 9: Reações de cicloadição envolvendo o anel tiofeno



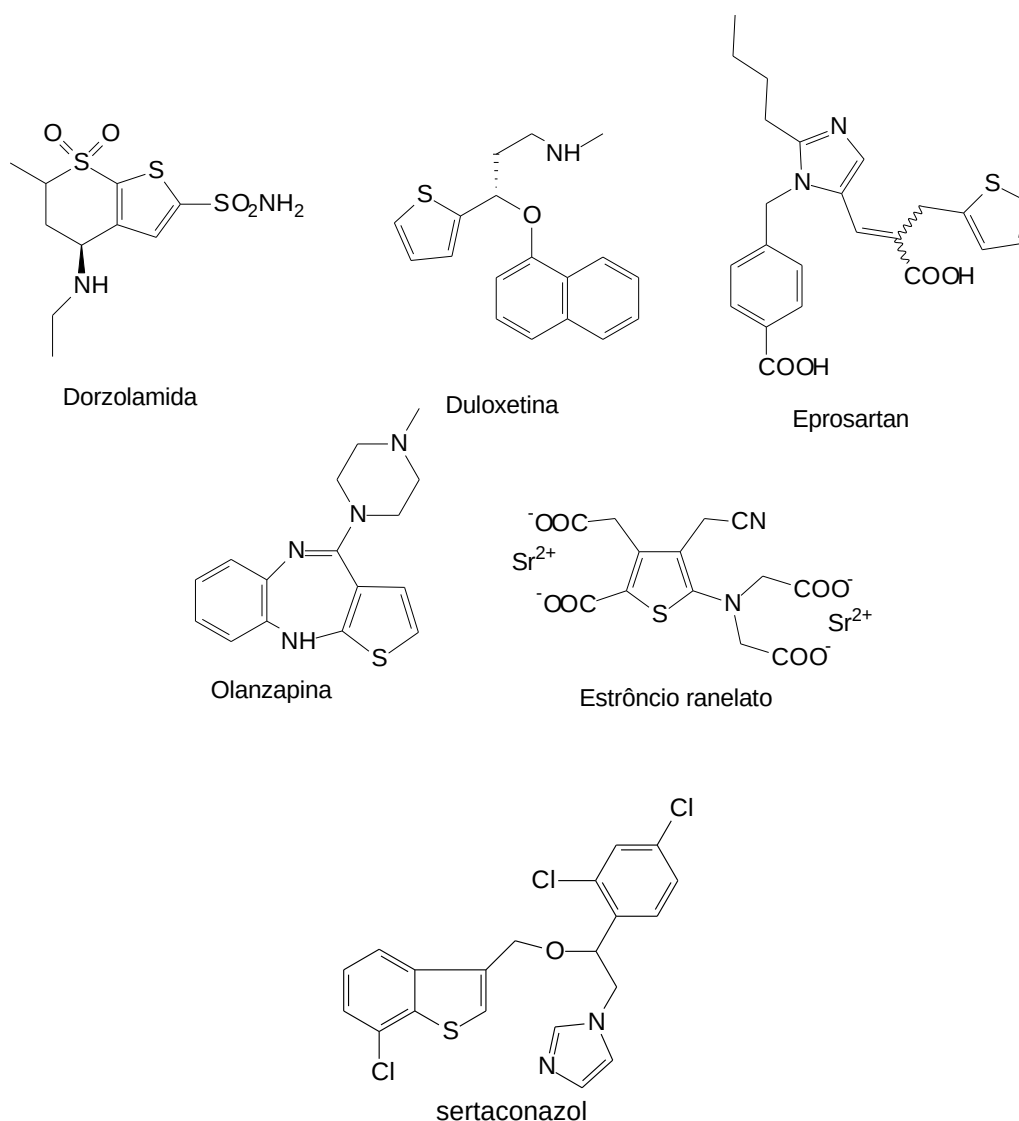
3.1.6 Fármacos que contém o núcleo tiofeno

São muitas as aplicações farmacológicas dos derivados de tiofeno. Diversos derivados desse anel são relatados na literatura por apresentarem promissoras atividades biológicas, dentre as quais: anti-inflamatória, antibacteriana, antitumoral e anti-HIV (MITTAL et al., 2004; WARDAKHAN, SHAMS e MOUSTAFA, 2005; BRAULTA et al., 2005), também a atividade antifúngica (PINTO et al., 2008) e anti-histamínico (STEFANI, 2009).

Várias são os fármacos que possuem o anel tiofênico, como por exemplo Surgam® (ácido tiaprofênico) como anti-inflamatório, biotina (vitamina H) e Ziprexa® (olanzapina) na esquizofrenia (Figura 3) (STEFANI, 2009).

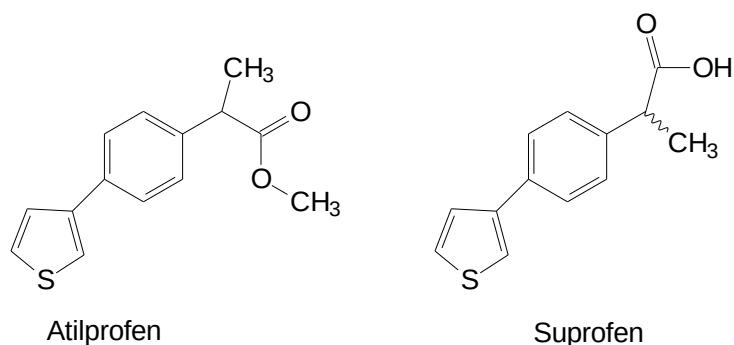
Outros são: dorzolamida e ticlopidina que são inibidores da anidrase carbônica e são utilizados para diminuir a pressão intraocular no glaucoma e a hipertensão ocular. A duloxetina que é um antidepressivo, no eprosartan que é utilizado como anti-hipertensivo. A quetiapina é um antipsicótico de última geração e o estrôncio ranelato utilizado para o tratamento da osteoporose (Figura 3) (BYMASTER et al., 2003).

O sertaconazol é um antifúngico comercial, com aplicações na dermatologia e na ginecologia. Este fármaco possui o sistema benzo[b]tiofênico que é frequentemente presente em compostos biologicamente ativos (Figura 3) (PINTO et al., 2008).

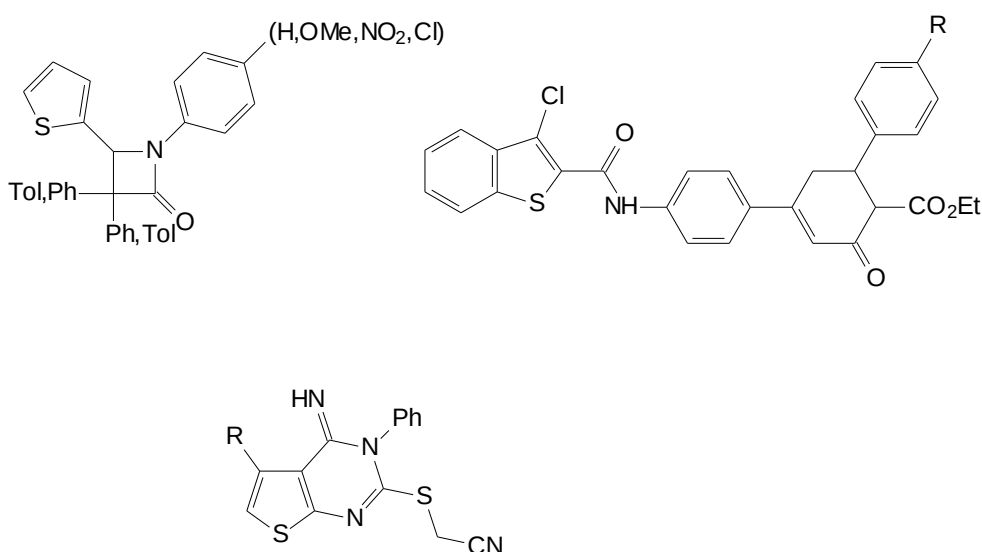
Figura 3: Fármacos que possuem o anel tiofeno

3.1.7 Atividades Biológicas de Derivados Tiofênicos

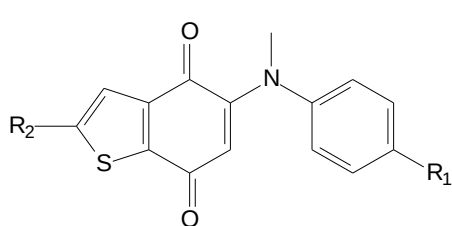
O Atliprofen é um derivado tiofênico que possuem uma atividade anti-inflamatória bem pronunciada como o análogo do suprofen. Estes compostos atuam contra a quimase humana que é uma serina protease que participa de várias doenças que envolvem o processo inflamatório (Figura 4) (RAO et al., 1995; MITTAL et al., 2004).

Figura 4: Derivados tiofênicos anti-inflamatórios

Alguns compostos Tiofênicos também possuem propriedades antibacterianas. Alguns compostos exploram a aparência com antibióticos β -lactâmicos, outros apresentam anéis aromáticos e também a função amida e possuem também o anel pirimidínico (Figura 5) (WARDAKHAN, SHAMS e MOUSTAFA, 2005).

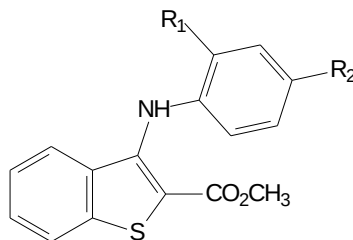
Figura 5: Derivados Tiofênicos com atividade antibacteriana

Segundo Ryu et al. (2005) derivados 5-amilamino-4,7-dioxobenzo[*b*]tiofeno foram sintetizados e testados na atividade antifúngica frente espécies de *Candida* e de *Aspergillus Níger*. Os compostos exibiram uma atividade contra as espécies de *Candida* (Figura 6) (PINTO et al., 2008).

Figura 6: Estrutura química dos derivados tiofênicos

R_1 e R_2 : H, OCH_3 , $COOH$

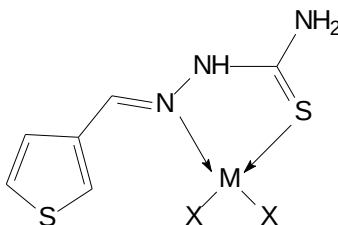
4,7-dioxobenzo[b]tiofenos



R_2 e R_2 : H, OCH_3 , OH

di(hetero)arilamino de benzo[b]tiofenos

Também existem relatos na literatura de derivados tiofênicos complexados com metais como o zinco e o cádmio com potente atividade antifúngica (Figura 7) (ALOMAR et al., 2010).

Figura 7: Derivados tiofênicos complexados com metais

$X = Cl$ ou Br

$M =$ Metal

Outros exemplos de fármacos contendo o núcleo tiofênico são o raltitrexed (Tomudex®), fármaco utilizado no tratamento do câncer de colo retal, e o derivado benzotiofênico, um anti-HIV (Figura 8) (BRAULT et al., 2005).

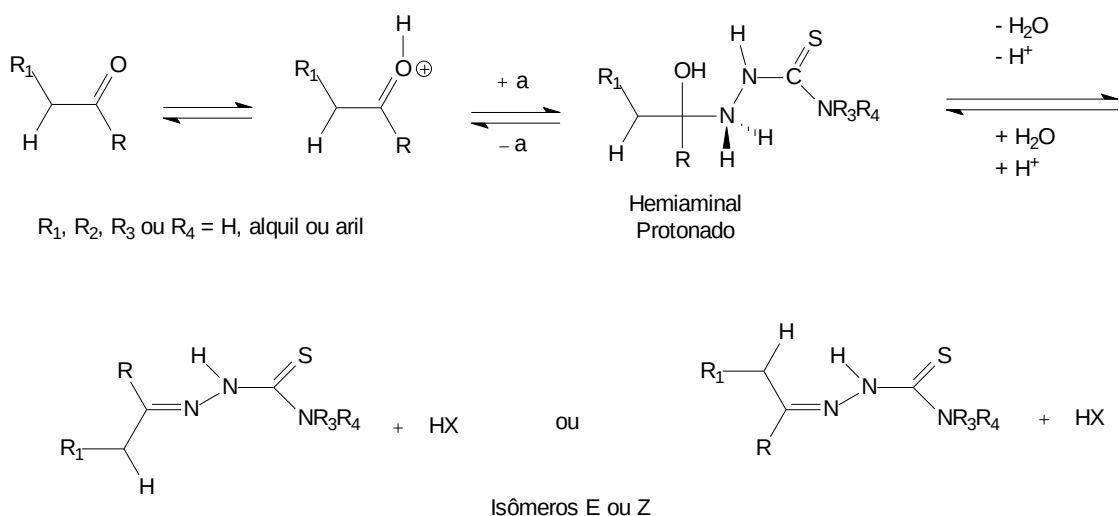
estéricos contribuem para este arranjo estrutural. Contudo, o fator que mais prevalece é que o enxofre que está em posição anti permitir a existência de interação de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio da imina e os hidrogênios da tioamida (CHATTOPADHYAY et al., 1989).

As tiossemicarbazonas podem ser obtidas de duas formas: direta, pela reação quimiosseletiva de aldeídos e/ou cetonas, e indireta, através da preparação prévia das tiossemicarbazidas (TENÓRIO et al., 2005).

3.1.8.1 Obtenção direta

A síntese é descrita pela reação de condensação de um derivado carbonilado, do tipo aldeído ou cetona, com tiossemicarbazidas em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido (SARODNICK et al., 2003; FUJII et al., 2005). Este tipo de reação é conhecido pela quimiosseletividade, praticidade e rapidez e o mais importante é que apresenta rendimentos quantitativos. Inicialmente, ocorre a protonação da carbonila do aldeído ou cetônico, seguida do ataque nucleofílico no átomo de nitrogênio da tiossemicarbazida. Havendo a eliminação de água e formação da tiossemicarbazona (Esquema 10) (TENÓRIO et al., 2005).

Esquema 10: Método de obtenção direta (adaptado de TENÓRIO et al., 2005)

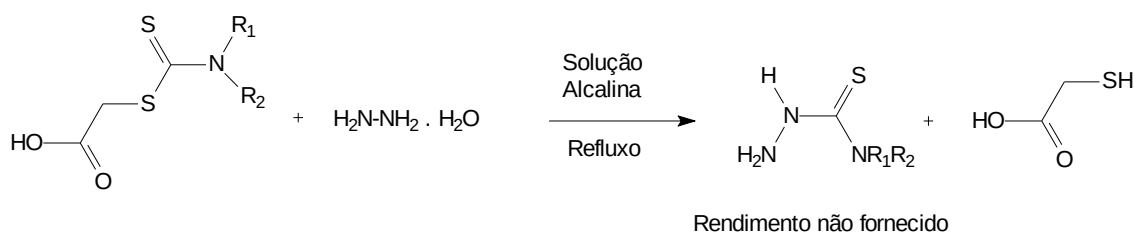


3.1.8.2 Obtenção indireta

A seguir estão descritas algumas reações para obtenção indireta das tiossemicarbazidas a partir de hidratos de hidrazina. Os tipos de reações envolvidas são: Reação com ácido tiocarbamoiltioglicólico, reação com ditiocarbamatos, reação com isotiocianatos e reação com dissulfeto de carbono (TENÓRIO et al., 2005).

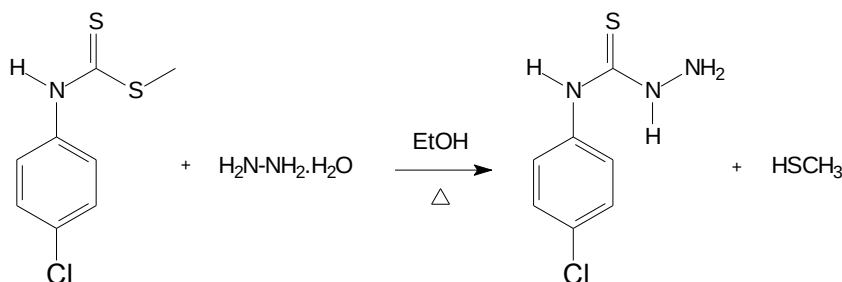
A reação com ácido tiocarbamoiltioglicólico é um método que fornece a obtenção de tiossemicarbazidas substituídas na posição N-4. O meio reacional deve ser alcalino, estar sob refluxo e conter o ácido tiocarbamoiltioglicólico e o hidrato de hidrazina. Desta forma se obtém a tiossemicarbazida e ocorre a liberação do ácido tioglicólico (Esquema 11) (BHARTI et al., 2002).

Esquema 11: Obtenção da tiossemicarbazida e liberação do ácido tioglicólico



Na reação com ditiocarbamatos se utiliza hidrato de hidrazina. Neste caso, a obtenção das tiossemicarbazidas ocorre após adição nucleofílica da hidrazina ao carbono da tiocarbonila, com conseqüente remoção do grupo S-CH₃ que se comporta como grupo de partida (Esquema 12) (ASHTON et al., 1993).

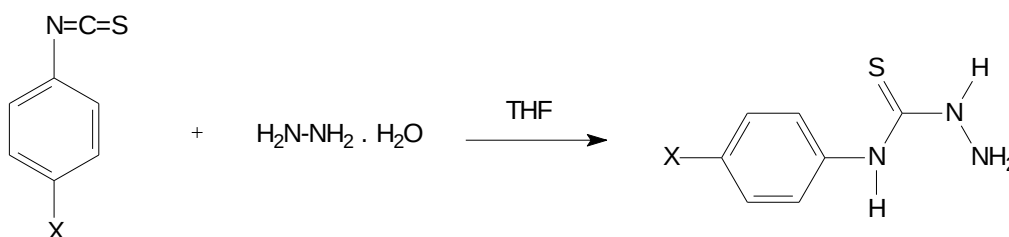
Esquema 12: Reação de ditiocarbamato com hidrazina



Partindo-se de Isotiocianatos na presença de hidrato de hidrazina poderemos conduzir a formação de tiossemicarbazidas, apresentando bons rendimentos que

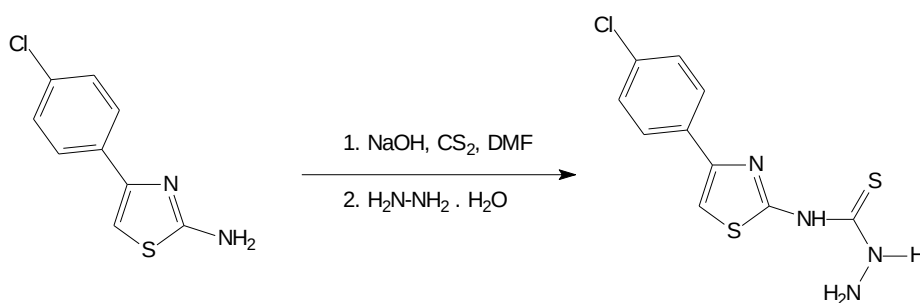
variam entre 70 e 90% (Esquema 13). Contudo, se caso forem utilizadas hidrazonas, no lugar das hidrazinas, tem-se a formação direta das tiossemicarbazonas (DEMILO, REDFERN e BORKOVEC, 1983; SALGIN-GÖKSEN et al., 2007).

Esquema 13: Isotiocianatos na presença de hidrazinas geram tiossemicarbazidas



A reação com dissulfeto de carbono é um método muito útil na preparação de tiossemicarbazidas. Inicialmente, reage-se derivados de amina com dissulfeto de carbono, seguida da adição de hidrato de hidrazina. Uma outra maneira seria a síntese das tiossemicarbazidas a partir das azidas que são tratadas inicialmente com trifenilfosfina e dissulfeto de carbono para fornecer os isotiocianatos correspondentes e, em seguida, faz-se a adição da hidrazina (Esquema 14) (PANDEYA et al., 1999).

Esquema 14: Tiossemicarbazidas a partir de dissulfeto de carbono



3.1.8.3 Atividade biológica para as tiossemicarbazonas

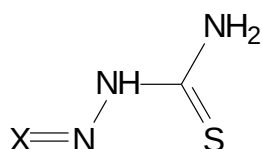
As tiossemicarbazonas são um grande grupo de derivados da tiouréia que apresentam várias atividades biológicas e, portanto, atraem considerável interesse farmacêutico (HU et al., 2010). Eles têm sido avaliados como antivirais (GARCIA et al., 2008), antibacteriano (BECKFORD et al., 2011) e anticâncer (BECKFORD et al.,

2011), e acredita-se que a atividade biológica deve-se função de aldeído ou porção cetona (SAU et al., 2003).

Outro provável alvo biológico é a Cruzaina também denominada cruzipaína, que é a principal cisteína protease do *Trypanosoma cruzi*. Esta protease é expressa em todas as fases do ciclo de vida do parasita. Participa da nutrição ou na remodelação da célula quando no interior do mamífero, (FUJII et al., 2005).

Neste contexto, Du et al. (2002) sintetizaram novos derivados de tiossemicarbazonas que se comportaram como promissores compostos anti-cruzaína (Figura 10).

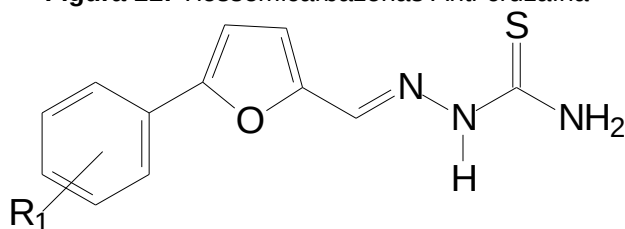
Figura 10: Estrutura das tiossemicarbazonas sintetizadas



X= Vários substituintes

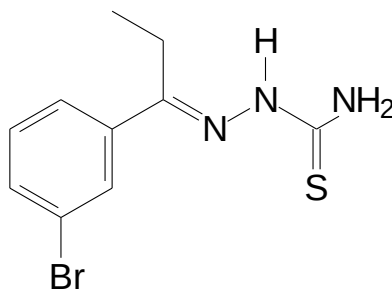
Como resultado, quatro compostos analisados obtiveram os valores de IC₅₀ inferiores a 300 nM (Figura 11). Os derivados substituídos pelos átomos de bromo em *para* e cloro em *meta* tiveram uma ação tripanostática (Du et al., 2002).

Figura 11: Tiossemicarbazonas Anti-cruzaína



R₁ = 3-Cl, 4-Cl, 4-Br e 2-OCH₃

Já o derivado abaixo (Figura 12) exibiu propriedades tripanocidas, sem apresentar toxicidade para a célula hospedeira, ou problemas de solubilidade (Du et al., 2002). Berraldo et al. (2011) demonstraram que nitro-tiossemicarbazonas e seus complexos de cobre (II) e rutênio (II) apresentaram significativa atividade tripanocida.

Figura 12: Tiossemicarbazonas Anti-T.cruze

Diante destes relatos o Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – GPIT/UFPE e o Grupo de Pesquisa em Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF/UFPE propôs a síntese de novos derivados tiofênicos e Tiossemicarbazonas e a avaliação biológica.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL

4.1.1 Equipamentos

Para a elucidação estrutural dos compostos sintetizados utilizamos, na espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), espectrofotômetro FTIR Bruker, modelo IFS66, em pastilhas de KBr de 1 % e 2 %, com bandas de absorção expressas em cm^{-1} . Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN^1H) foram realizados em espectrofotômetro Varian, modelo Unity plus-300 e Varian. Os pontos de fusão (PF) foram determinados em aparelho Quimis, modelo Q.340D.

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366 nm) ou através de vapores de iodo. Na cromatografia em coluna sob pressão, a sílica gel 60 Merck (230-400 Mesh) foi utilizada como adsorvente.

4.1.2 Reagentes e solventes

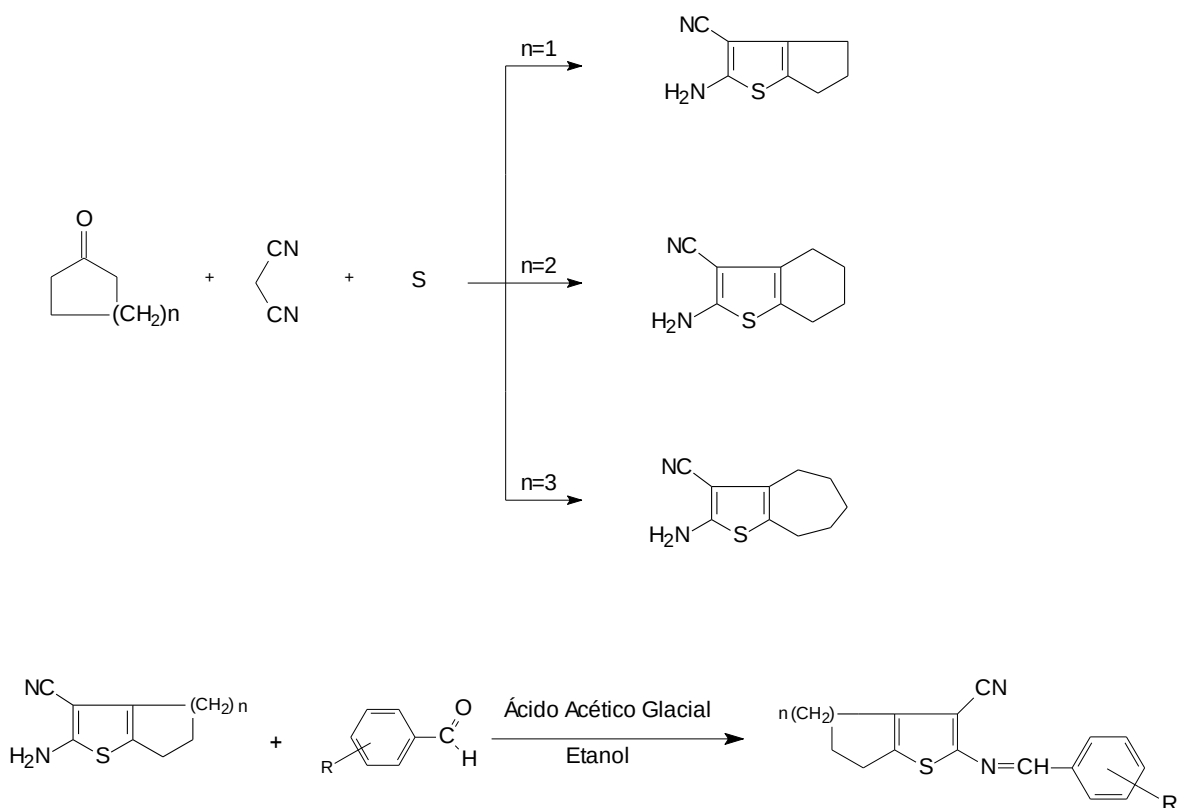
Os seguintes reagentes e solventes foram utilizados para obtenção dos compostos: aldeídos aromáticos substituídos (indolcarboxaldeído, 5-bromo-indolcarboxaldeído, benzaldeído, 4-cloro-benzaldeído, 4-nitro-benzaldeído), enxofre elementar, malononitrila, morfolina, ciclopentanona, ciclohexanona, cicloheptanona, etanol absoluto, ácido acético glacial, cloreto de zinco, ácido tioglicólico, metanol, 2-propanol, tozemicarbazida, fenilisotiocianato, cianoacetohidrazina, acetato de sódio, acetato de etila. Estes reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos ou para suas análises pertencem às marcas Sigma-Aldrich, Acros, Merck, Vetec ou Quimis e foram utilizados sem purificação.

4.1.3 Metodologia

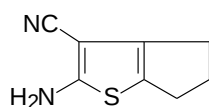
4.1.3.1 Síntese dos derivados 2-[(arilideno)-amino]-4,5-cicloalquil-tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB)

O diagrama de síntese abaixo apresenta o diagrama de síntese dos derivados tiofeno com anéis cíclicos laterais de cinco, seis e sete membros (LPSF/SB) (Esquema 15).

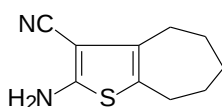
Esquema 15: Diagrama de síntese dos derivados 2-[(arilideno)-amino]-4,5-cicloalquil-tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB)



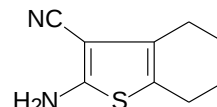
4.1.3.2 Procedimento Geral de Síntese dos derivados 2-amino-tiofeno (LPSF/SB-1, LPSF/SB-50 E LPSF/SB-2)



LPSF/SB-1



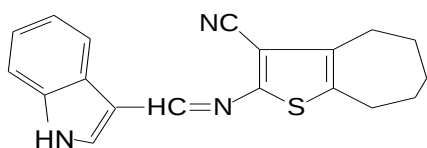
LPSF/SB-2



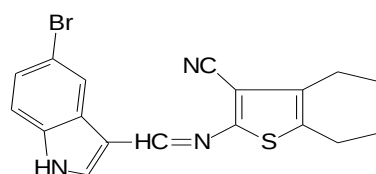
LPSF/SB-50

Em um balão de fundo redondo sob banho de gelo foi preparada uma solução etanólica e adicionados quantidades equimolares (20,1836 mmols) da cetona cíclica (pentanona, hexanona ou heptanona), malononitrila e enxofre elementar, diferentemente da morfolina que foi adicionada na proporção de 0,6 mols em presença de etanol absoluto. A morfolina foi adicionada gota a gota durante 30 minutos e a mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente por cerca de 4 horas. A mistura reacional foi filtrada e lavada com etanol gelado. Em seguida, a água mãe foi levada ao freezer 12 horas. O produto final foi purificado através de cristalizações sucessivas em etanol.

4.1.3.3 Procedimento Geral de Síntese dos derivados 2-[(arilideno)-amino]-4,5-cicloalquil-tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB)



LPSF/SB-44



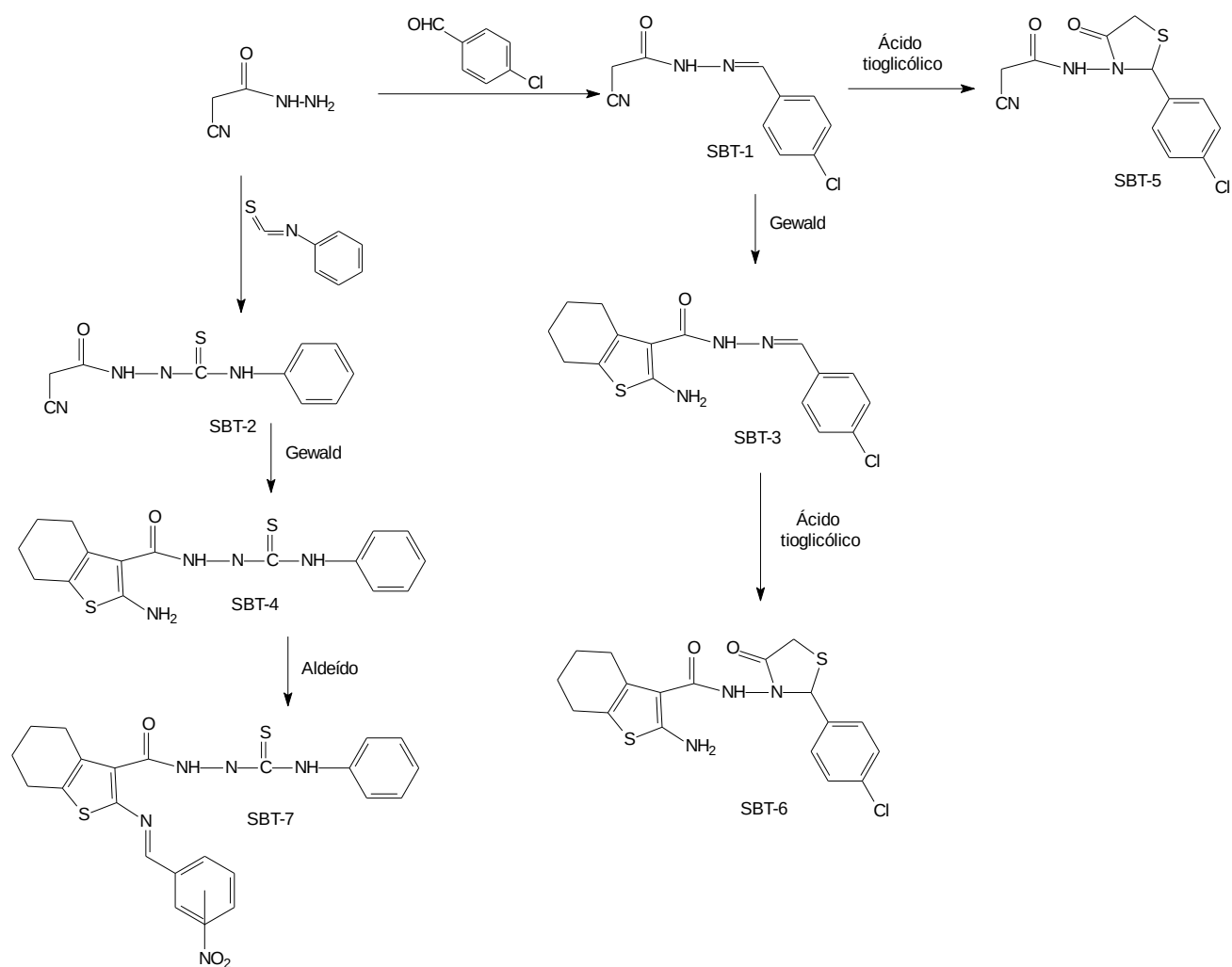
LPSF/SB-200

Quantidades equimolares do 2-amino-tiofeno e do aldeído aromático (indolcarboxaldeído ou 5-bromo-indolcarboxaldeído) foram colocados em um balão de 100 mL, em meio etanólico e 0,46 mL de ácido acético glacial (catalisador). A mistura reacional foi mantida em temperatura ambiente por 4 horas. O produto foi precipitado pela adição de água destilada, filtrado e lavado sucessivamente com água destilada. Os produtos finais foram purificados através de cristalizações sucessivas em etanol. O rendimento do LPSF/SB-44 foi de 95% e do LPSF/SB-200 foi de 99%.

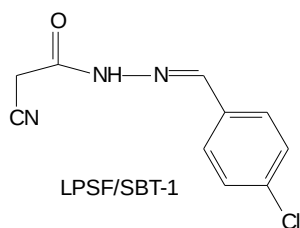
4.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS HIDRAZÍNICOS E TIAZOLIDINÔNICOS TIOFÊNICOS (LPSF/SBT)

O esquema 16 abaixo mostra com detalhes a síntese dos derivados hidrazínicos e tiazolidinônicos tiofênicos (LPSF/SBT).

Esquema 16: Diagrama de síntese dos derivados hidrazínicos e tiazolidinônicos tiofênicos (LPSF/SBT)

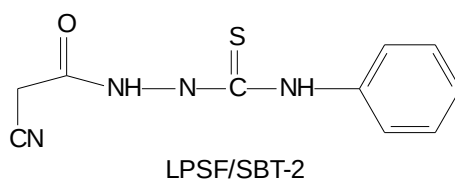


4.2.1 Síntese do Ácido cianoacético-(4-cloro-benzilideno)-hidrazida (LPSF/SBT-1)



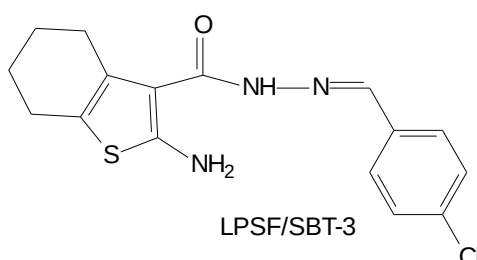
Quantidades equimolares da cianoacetohidrazida (2g – 20,1836 mmols) e do aldeído (20,1836 mmols) de escolha foram postos a reagir tendo solvente o 2-propanol (90 mL). Essa mistura reacional foi aquecida à temperatura de refluxo durante 3 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. Após constatado termino da reação, o produto final foi filtrado e lavado com o etanol.

4.2.2 Síntese do Ácido acético-2-ciano-2-[(fenilamino)-tioxometil]-hidrazida (LPSF/SBT-2)



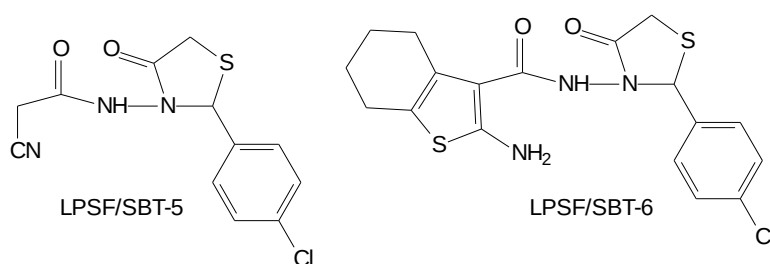
Quantidades equimolares da cianoacetohidrazida (2g – 20,1836 mmols) e do fenilisotiocianato (20,1836 mmols) na presença de 2-propanol (90 mL) foram adicionados em um balão de 250 mL. A mistura reacional foi aquecida à temperatura de refluxo 8 horas. O produto obtido foi filtrado e purificado através de lavagens etanol gelado.

4.2.3 Síntese do 2-Amino-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofen-3-ácidocaboxílico-(4-cloro-benzilideno)-hidrazida (LPSF/SBT-3) e do Benzo [b] tiofeno - 3 - ácido carboxílico – 2 – amino - 4,5,6,7 – tetrahidro - 2 [(fenilamino)tioxometil]hidrazida (LPSF/SBT-4)



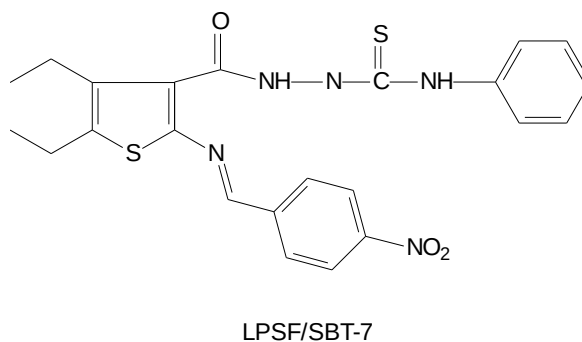
Foram colocados em um balão de 250 mL os derivados LPSF/SBT-1 ou LPSF/SBT-2 (0,1 mol), a cicloexanona (0,1 mol), o enxofre (0,11 mol), a morfolina (catalisador) e o DMF (15 mL). A reação se processou a 0 °C, e foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 6 horas. O produto obtido foi extraído com acetato de etila, e purificado através de cromatografia de SiO₂ sob pressão *n*-hexano/AcOEt 8:2.

4.2.4 Síntese do N-[4-(4-cloro-fenil)-2-oxo-tiazolidin-3-il]-2-ciano-acetamida (LPSF/SBT-5) e do 2-Amino-4,5,6,7-tetra-hidro-benzo[b] tiofeno-3-ácido carboxílico[2-(4-cloro-fenil)-4-oxo-tiazolidin-3-il]-amida (LPSF/SBT-6)



Os derivados LPSF/SBT-1 ou LPSF/SBT-3 (0,1 mol), o ácido tioglicólico (0,12 mol) e o Cloreto de zinco (0,12 mol), usado como catalisador, foram colocados em um balão de 250 mL. O solvente utilizado foi o tolueno. A reação foi mantida em refluxo por 8 horas. Após rotaevaporação o produto obtido lavado com etanol.

4.2.5 Síntese do 2-(2-(4-nitrobenzilidenoamino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo [b] tiofeno - 3 - carbonil) – N - fenilhidrazinacarbotoamida (LPSF/SBT-7)



Foram colocados em um balão de 100 mL o derivado LPSF/SBT-4 (2,71 mol), o acetato de sódio (2,71 mol) e o metanol (80 ml), sendo que os reagentes foram colocados sob agitação em refluxo. Em um outro balão de 100 ml foram adicionados o 4-nitrobenzaldeído (2,71 mol), o ácido acético glacial (0,46 ml) e metanol (20 ml). Após a completa solubilização das duas soluções o conteúdo do 1º balão foi levado ao 2º, sendo a reação acompanhada por placas de cromatografia. Ao final o produto foi filtrado e lavado com etanol gelado.

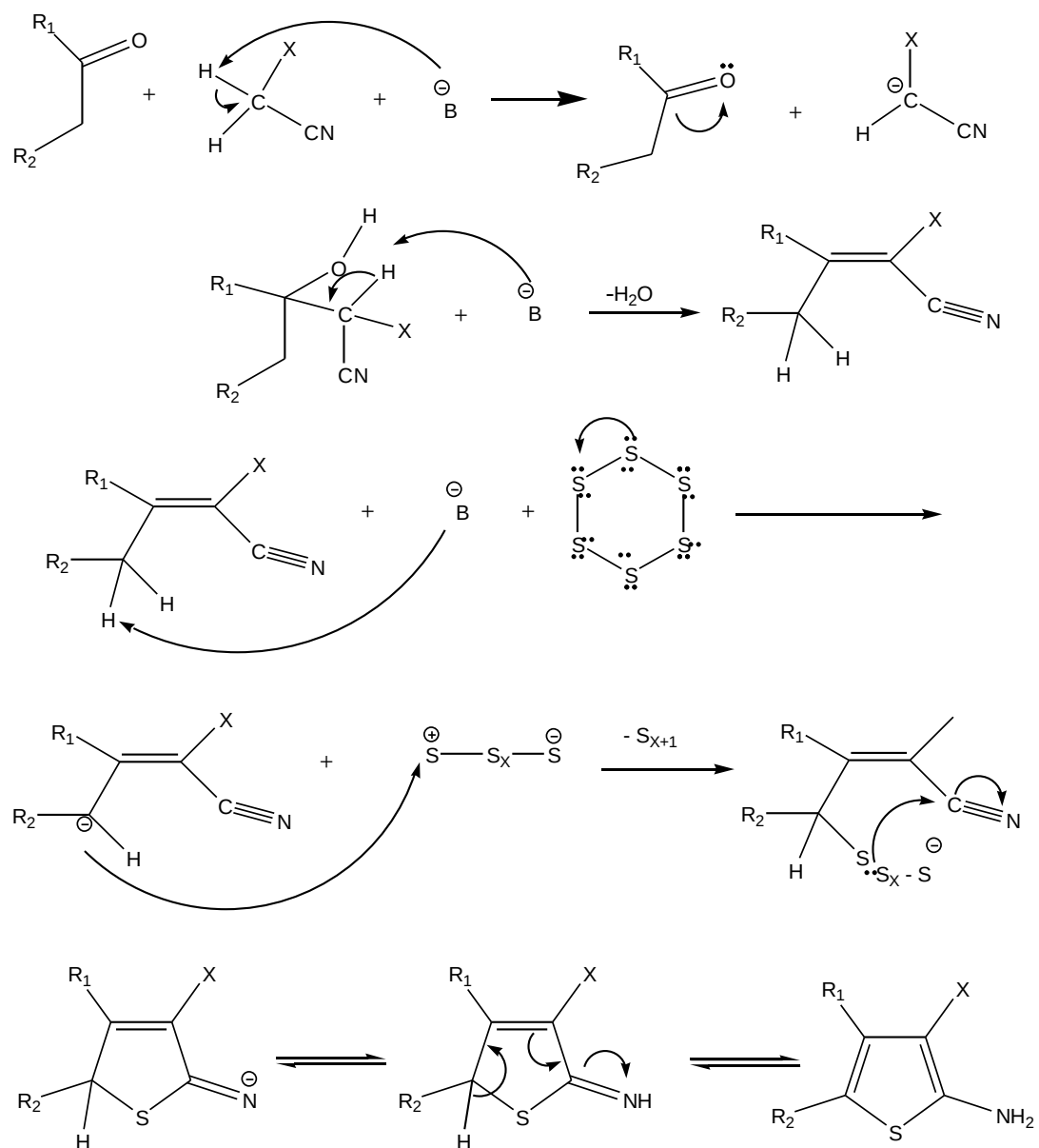
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Mecanismo da Síntese de Gewald

A primeira etapa da síntese correspondeu a uma reação de Gewald que é o método mais simples e utilizado para preparação de derivados 2-amino-tiofenos. Inicialmente a base (morfolina) ataca o carbono metilênico da acetonitrila, retirando um próton do mesmo e tornando este um nucleófilo. O carbânion formado ataca a função carbonila. Ocorre uma deslocalização dos elétrons π para o oxigênio, tornando o oxigênio apto para captar o próton que estava ligado à base.

Em seguida, há formação de água e sua posterior saída gerando uma nitrila α - β -insaturada, chegando-se ao final da primeira etapa. Esta primeira etapa da síntese é, na verdade uma condensação de Knoevenagel entre uma cetona ou um aldeído e o composto metileno ativo que vem a produzir o éster de Cope.

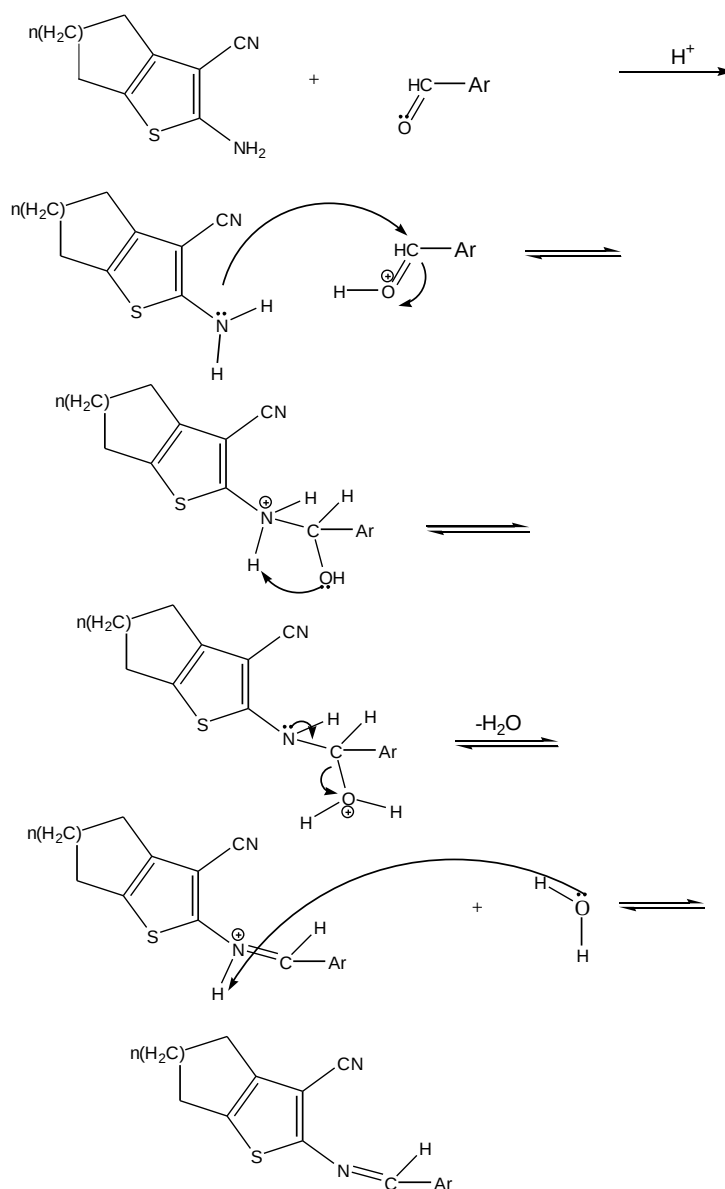
A segunda etapa da síntese em questão ainda não possui o mecanismo totalmente elucidado, mas é caracterizada pela adição do enxofre elementar ao composto intermediário. Após ciclização e tautomerização é formado o tiofeno desejado (STEFANI, 2009; OLIVEIRA, 2010). O mecanismo reacional mais provável se inicia com o ataque da base ao próton mais ácido que estava anteriormente na posição α à carbonila. Com isso, o carbânion formado ataca um dos átomos de enxofre (S_8) e ocorre a ciclização, pois o átomo de enxofre ataca o carbono da nitrila formando o ciclo. Através de sucessivas transferências de prótons e tautomerização são gerados os compostos 2-amino-cicloalqui[b]tiofenos-3-carbonitrila, conforme mecanismo abaixo.

Esquema 17: Mecanismo da Reação de Gewald

4.3.2 Reação de Condensação – 2ª etapa

A etapa da síntese para obtenção do composto final caracteriza-se por uma reação de condensação. Ocorre uma ativação, por meio de um ácido, da função aldeído do composto aromático de escolha. O par de elétrons livres, presente no nitrogênio da função amino do derivado tiofeno, ataca o carbono que está mais positivo. Assim, ocorre a deslocalização dos elétrons com formação e posterior eliminação de água. O nitrogênio que está positivo protona a água e finalmente forma-se o composto final, esquematizado abaixo.

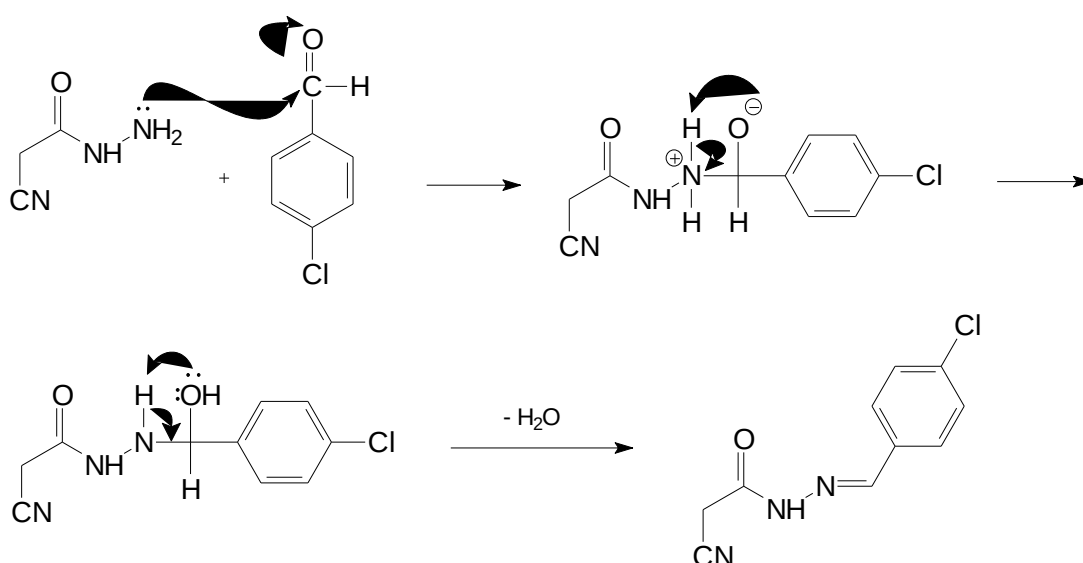
Esquema 18: Mecanismo de condensação do 2-amino-cicloalquil[b]tiofenos-3-carbonitrila aos aldeídos aromáticos



4.3.3 Mecanismo do ataque nucleofílico da Cianoacetohidrazida à carbonila

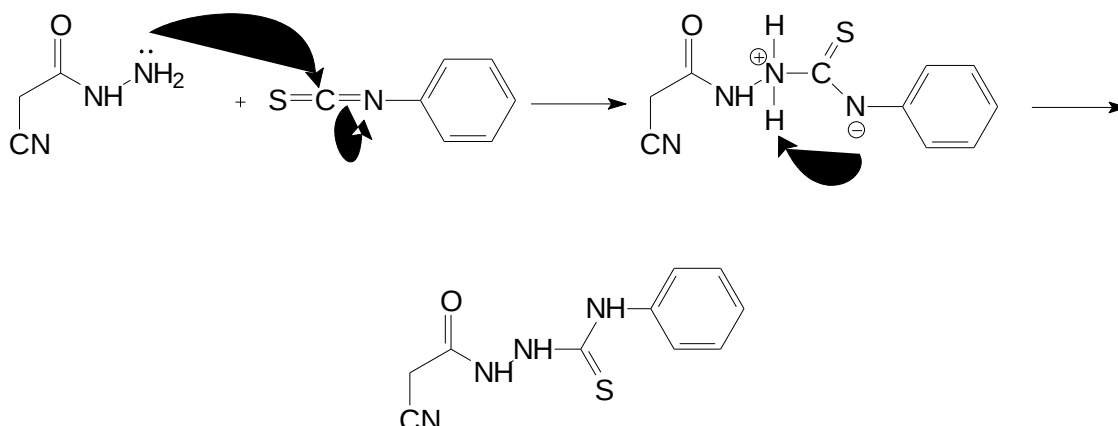
Este mecanismo é descrito na síntese do composto LPSF/SBT-1. Inicialmente ocorre o ataque do nitrogênio livre da hidrazida ao carbono da carbonila do aldeído aromático. Havendo a protonação do átomo de oxigênio, seguida de uma desidratação. Conduzindo ao derivado formação da hidrazida final (Esquema 19).

Esquema 19: Mecanismo de formação do LPSF/SBT-1



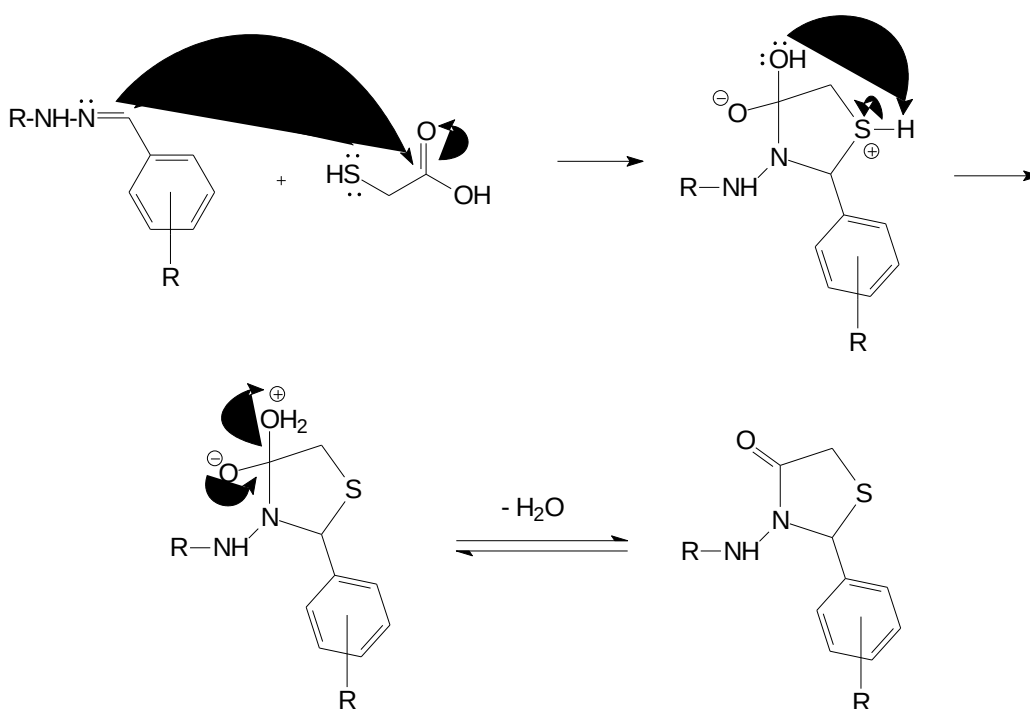
4.3.4 Mecanismo do ataque nucleofílico da Cianoacetohidrazida à tiocarbonila

O mecanismo que se apresenta abaixo representa a formação do composto LPSF/SBT-2. A etapa da síntese para obtenção do composto final caracteriza-se por um ataque simultâneo do nitrogênio ao carbono da tiocarbonila, e deslocização dos elétrons π para o nitrogênio vizinho, conduzindo ao derivado tiossemicarbazônico (Esquema 20).

Esquema 20: Mecanismo de formação do LPSF/SBT-2

4.3.5 Mecanismo de formação da 4-tiazolidinona

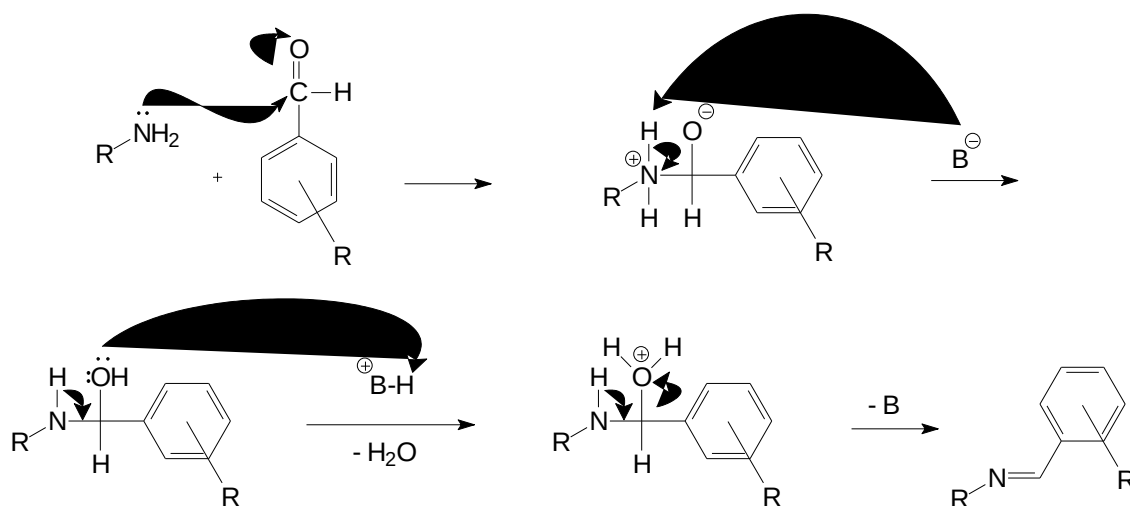
O mecanismo que se apresenta abaixo diz respeito aos compostos LPSF/SBT-5 e LPSF/SBT-6. A reação de ciclização dos derivados hidrazínicos (LPSF/SBT-1 ou LPSF/SBT-3) ocorre a partir do grupamento tiol do ácido tioglicólico ao carbono que faz dupla ligação com o nitrogênio da hidrazina. Seguida de uma desidratação permitindo a formação do anel 4-tiazolidinona (Esquema 21).

Esquema 21: Mecanismo de formação do LPSF/SBT-5 e LPSF/SBT-6

4.3.6 Mecanismo do ataque nucleofílico à carbonila catalisado por base

O mecanismo que se segue diz respeito à reação de formação do LPSF/SBT-7. O nitrogênio primário da hidrazina ataca o carbono da carbonila do aldeído. Em seguida, forma-se um intermediário que apresenta um nitrogênio protonado, que é capturado por uma base. Após isso, ocorre a desidratação e formação de uma dupla ligação entre o nitrogênio e o carbono (Esquema 22).

Esquema 22: Mecanismo de formação do LPSF/SBT-7



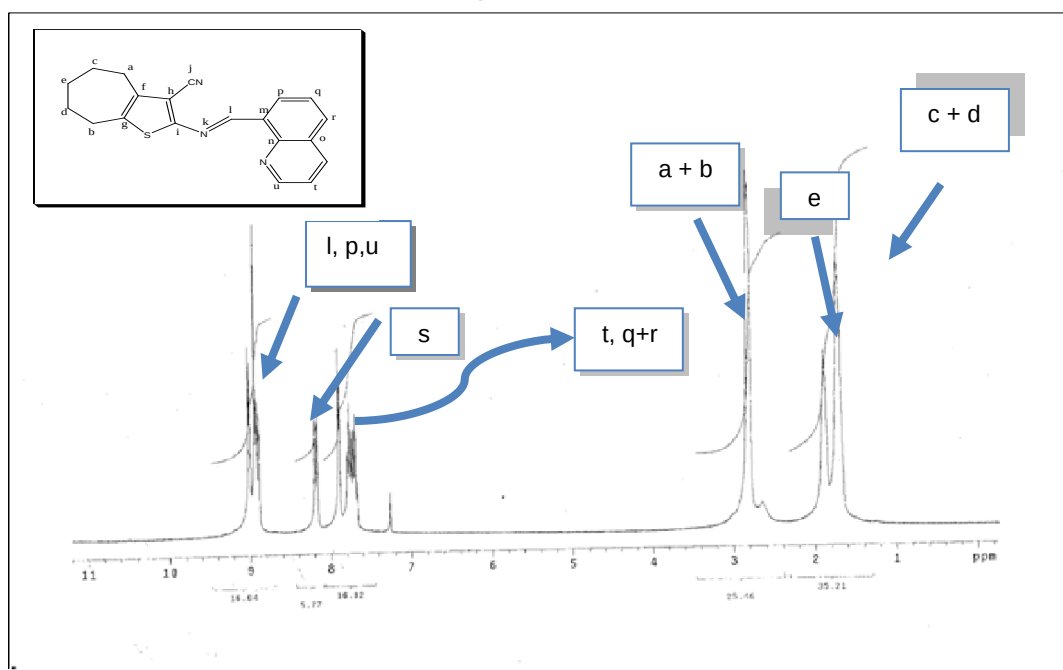
4.3.7 Dados físico-químicos e análise espectroscópica

Nos espectros de RMN ^1H dos compostos sintetizados, podemos observar que os prótons $\text{CH}=\text{N}$ foram observados na região entre 8.02-9.80. Não foram observados os sinais referentes aos prótons 2-amino-tiofenos. Como exemplo temos os dados do derivado 2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-68).

Analisando o espectro de RMN ^1H de LPSF/SB-68, podemos observar que os hidrogênios que obtiveram deslocamentos químicos em campo alto são aqueles pertencentes ao cicloheptila, que se apresentam como 3 multipletos com valores de deslocamento químico aparecendo entre 1,60-2,75 ppm. O hidrogênio ligado ao carbono da imina está entre aqueles que apresentam maior deslocamento químico. O sinal em 8,9 ppm indica a presença de um hidrogênio ligado ao grupamento imina,

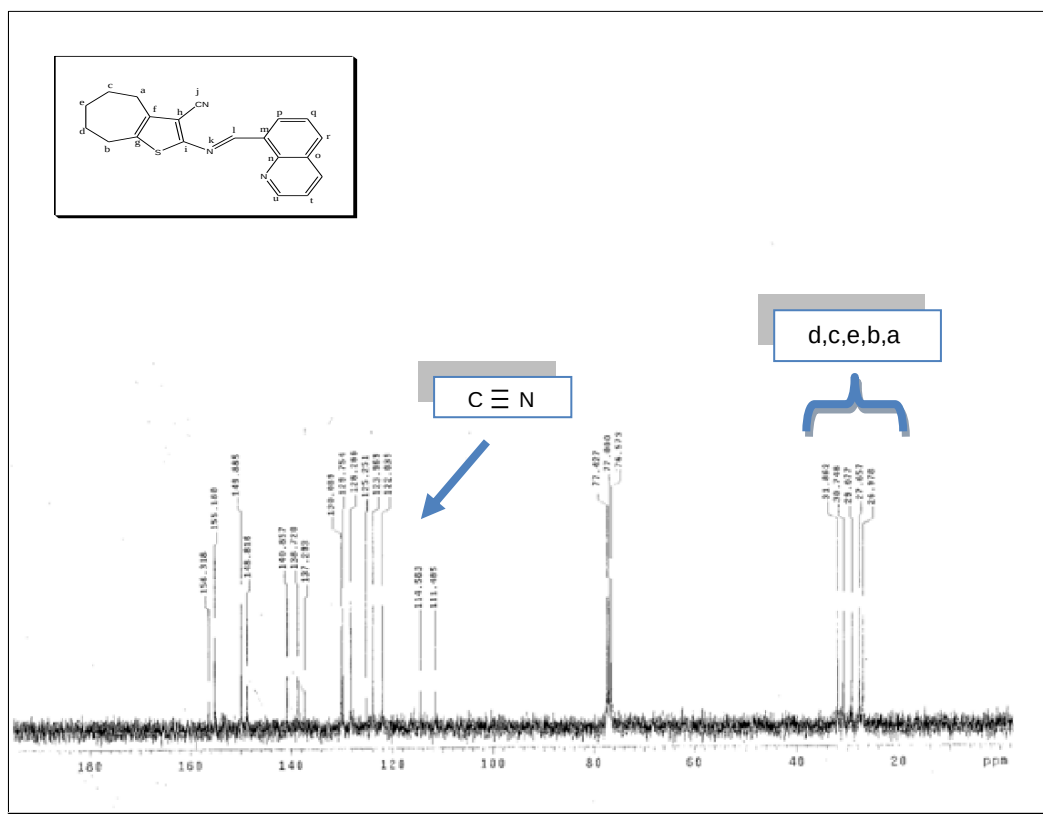
o que é importante na caracterização do sucesso reacional, pois indica a ligação entre o 2-amino-tiofeno substituído e o aldeído aromático (FIGURA 13).

Figura 13: Espectroscopia de RMN ^1H do composto LPSF/SB-68



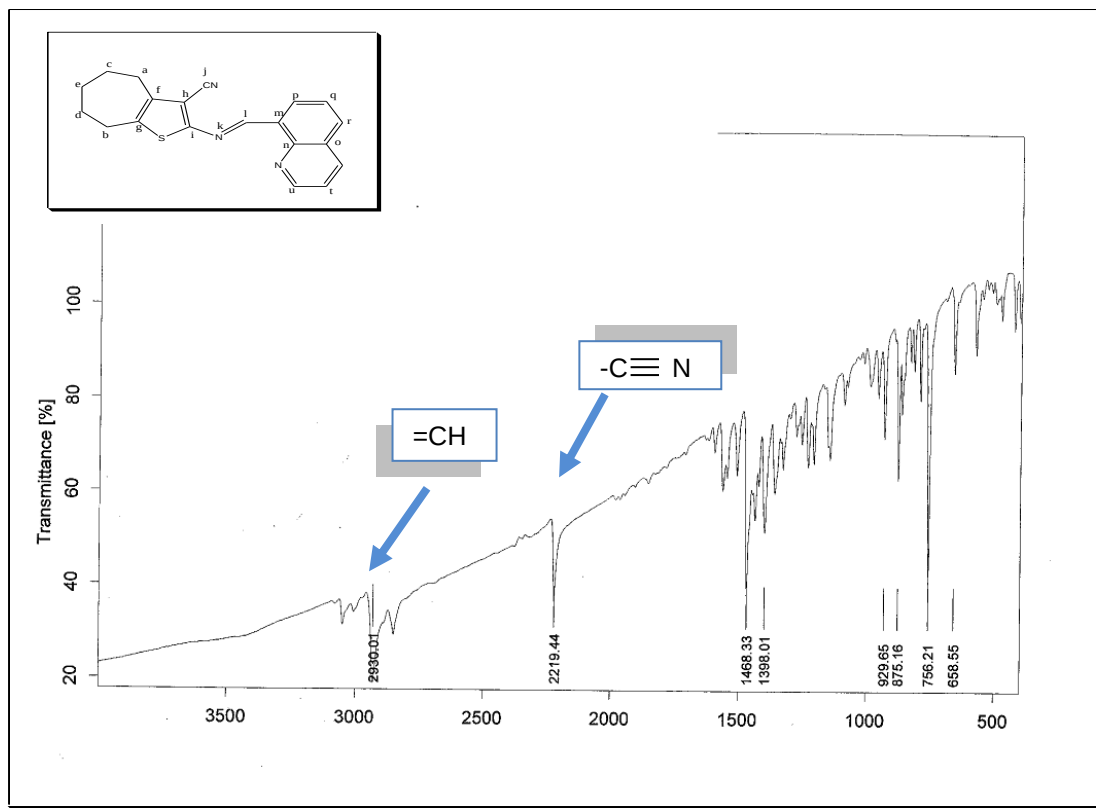
Os espectros de RMN ^{13}C dos compostos sintetizados exibiram sinais de deslocamento químico entre 114.0 e 115.9 ppm, característicos do grupamento $\text{C}=\text{N}$. Em relação ao espectro de RMN ^{13}C (LPSF/SB-68), os carbonos que constituem o ciclo de sete membros apresentam deslocamentos entre 20 e 40 ppm, característicos de carbonos saturados (sp^3). O carbono do radical nitrila é confirmado pela presença de sinal em torno de 115 ppm. Os carbonos aromáticos dos anéis tiofeno e quinolina mostraram deslocamentos químicos em campo baixo, entre 120 e 160 ppm (Figura 14).

Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C do composto LPSF\SB-68



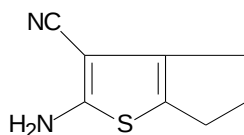
Nos espectros de Infravermelho dos compostos LPSF\SB podemos observar bandas de absorção entre 2960-2911, 2223-2212 e 3010 cm^{-1} características de estiramento CH_2 (da ciclopentila), $\text{C}=\text{N}$ e CH do aromático, respectivamente. No espectro de Infravermelho do composto LPSF/SB-68, o estiramento referente ao CH do aromático ocorreu em 3042 cm^{-1} . A absorção aguda e de intensidade média na frequência entre 2219 cm^{-1} é característica de nitrila. Esta absorção está deslocada para uma frequência mais baixa que 2250 cm^{-1} devido a conjugação da nitrila com o anel aromático tiofeno. A absorção de intensidade fraca próxima a 1690 cm^{-1} é compatível com estiramento da $-\text{C}=\text{N}$ da imina (Figura 15).

Figura 15: Espectroscopia de IV do derivado LPSF/SB-68



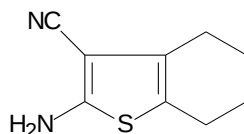
4.4 SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS:

4.4.1 2-amino-5,6-dihidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/ SB-1)



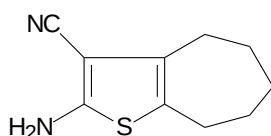
Fórmula Molecular: $C_8H_8N_2S$; Massa Molecular: 164.0408g/mol; Sólido de cor marron claro; Ponto de Fusão: 148-150 °C; Rendimento: 51 %; Razão de Frente/Sistema: 0,45 (*n*-Hex./AcOEt. 7,5/2,5); RMN 1H ($CDCl_3$, 200MHz) δ : 2,29-2,41 (m, 2H, CH_2); 2,63-2,78 (m, 4H, CH_2); 4,62 (s, 2H, NH_2).

4.4.2 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-50)



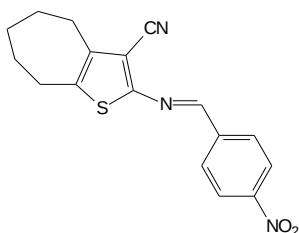
Fórmula Molecular: $C_9H_{10}N_2S$; Massa Molecular: 178,0565g/mol; Sólido de cor amarelo ouro; Ponto de Fusão: 131-133 °C; Rendimento: 62 %; Razão de Frente/Sistema: 0,50 (*n*-Hex./AcOEt 7,5/2,5); RMN 1H ($CDCl_3$, 200MHz) 1,74-1,80 (m, 4H, CH₂); 2,44-2,50 (m, 4H, CH₂); 4,63 (s, 2H, NH₂).

4.4.3 2-amino-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-2)



Fórmula Molecular: $C_{10}H_{12}N_2S$; Massa Molecular: 192,0721g/mol; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 108-110 °C; Rendimento: 58 %; Razão de Frente/Sistema: 0,50 (*n*-Hex./AcOEt 7,5/2,5). RMN 1H ($CDCl_3$, 200MHz) 1,59-1,66 (m, 4H, CH₂); 1,74-1,83 (m, 2H, CH₂); 2,52-2,62 (m, 4H, CH₂); 4,46 (s, 2H, NH₂).

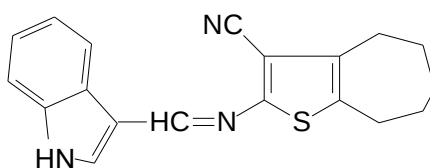
4.4.4 2-[(4-Nitro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-43)



Fórmula Molecular: $C_{17}H_{15}N_3O_2S$; Massa Molecular: 325.0884g/mol; Ponto de Fusão: 126°C; Rendimento: 90%; RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ : 1.66-1.75 (m, 4H, CH₂), 1.85-1.89 (m, 2H, CH₂), 2.79-2.82 (m, 4H, CH₂), 8.06 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-

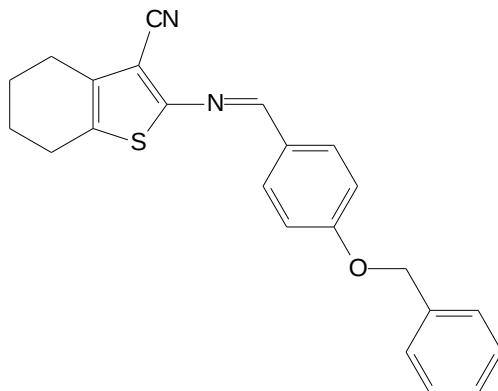
H), 8.28 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 8.43 (s, 1H, CH=N). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ : 155.8, 155.0, 149.3, 140.9, 140.4, 138.6, 129.6, 123.9, 114.5, 111.4, 31.8, 30.7, 29.0, 27.6, 26.9. IV (KBr, cm^{-1}): CH (2929), CN (2220). MS m/z (ES^+): 326.0718 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

4.4.5 (1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina (LPSF/SB-44)



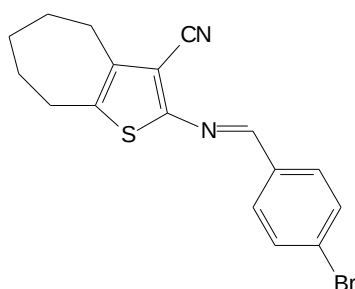
Fórmula Molecular: $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{S}$; Massa Molecular: 319,11g/mol; Sólido de cor Amarelo; Ponto de Fusão: 110-111 °C; Rendimento: 97 %; Razão de Frente Sistema: 0,54 (*n*-Hex./AcOEt 9,5:0,5). RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) 1.65–1.72 (m, 4H, CH_2), 1.84–1.88 (m, 2H, CH_2), 2.75–2.82 (m, 4H, CH_2), 7.29–7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.67 (d, 1H, $J = 3$ Hz, Ar-H), 8.60 (s, 1H, CH=N). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300MHz) δ : 160.5, 153.4, 139.3, 136.9, 133.5, 132.1, 124.8, 124.2, 123.0, 122.7, 116.0, 115.7, 111.3, 106.7, 32.0, 30.5, 29.1, 27.9, 27.2. IR (KBr, cm^{-1}): CH (2911), CN (2220), MS m/z (ES^+)= 320.1003.

4.4.6 2-[(4-Benziloxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-45)



Fórmula Molecular: $C_{23}H_{20}N_2OS$; Massa Molecular: 372.1296g/mol; Ponto de Fusão: 140-142°C; Rendimento: 92%; RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ : 1.73-1.89 (m, 4H, CH_2), 2.62-2.69 (m, 4H, CH_2), 5.12 (s, 2H, OCH_2), 7.03 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.34-7.46 (m, 5H, Ar-H), 7.87 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 8.32 (s, 1H, $CH=N$). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75MHz) δ : 162.1, 160.4, 158.2, 136.0, 134.7, 131.5, 131.3, 128.6, 128.1, 128.1, 127.4, 115.1, 114.6, 105.8, 70.0, 25.0, 24.2, 23.0, 21.9. IV (KBr, cm^{-1}): CH (2938), CN (2218). MS m/z (ES^+): 373.1119 $[M + H]^+$.

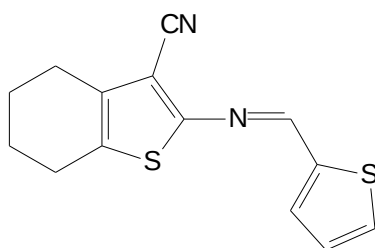
4.4.7 2-[(4-Bromo-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-46)



Fórmula Molecular: $C_{17}H_{15}BrN_2S$; Massa Molecular: 358.0139g/mol; Ponto de Fusão: 144°C; Rendimento: 87%; RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ : 1.64-1.74 (m, 4H, CH_2), 1.84-1.88 (m, 2H, CH_2), 2.76-2.81 (m, 4H, CH_2), 7.58 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.78 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 8.34 (s, 1H, $CH=N$). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75MHz) δ : 157.1,

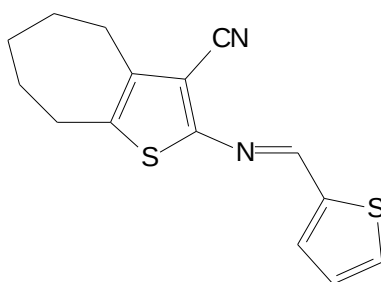
140.3, 136.7, 133.9, 132.1, 130.5, 126.8, 114.9, 109.7, 31.9, 30.6, 29.1, 27.7, 27.0. IV (KBr, cm^{-1}): CH (2916), CN (2223). MS m/z (ES^+): 360.0940 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

4.4.8 2-[(Tiofen-3-il-metilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-62)



Fórmula Molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2$; Massa Molecular: 272.0441g/mol; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 123-125°C; Rendimento: 88%; Razão de Frente/Sistema: 0,5 (n-Hex./AcOEt. 7:3). RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) δ : 1.82-1.91 (m, 4H, CH_2), 2.63-2.69 (m, 4H, CH_2), 6.58 (dd, 1H, $J = 1.5, 3.3$ Hz, Ar-H), 7.11 (d, 1H, $J = 3.3$ Hz, Ar-H), 7.65 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, Ar-H), 8.23 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 159.7, 151.3, 146.9, 146.3, 135.3, 132.3, 117.8, 114.3, 112.9, 106.1, 25.1, 24.2, 22.9, 21.9. IV (KBr, cm^{-1}): CH (2936), CN (2213). MS m/z (ES^+): 273.0399 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

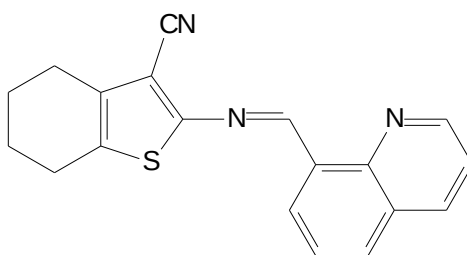
4.4.9 2-[(Tiofen-2-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-63)



Fórmula Molecular: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{S}_2$; Massa Molecular: 286.0598g/mol; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 115-117°C; Rendimento: 76%; Razão de Frente/Sistema: 0,4 (n-Hex./AcOEt. 9:1). RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ : 1.62-1.72 (m, 4H, CH_2), 1.82-1.86 (m, 2H, CH_2), 2.74-2.79 (m, 4H, CH_2), 6.57 (dd, 1H, $J = 1.5, 3.6$ Hz, Ar-H), 7.10 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, Ar-H), 7.64 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, Ar-H), 8.23 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$).

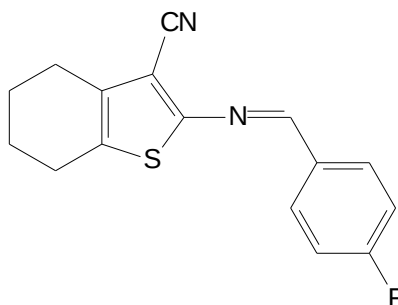
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 157.7, 151.2, 146.8, 146.1, 140.3, 136.0, 117.7, 114.9, 112.8, 108.4, 31.9, 30.4, 29.1, 27.7, 27.0. IV (KBr, cm^{-1}): CH (2929), CN (2215). MS m/z (ES^+): 309.0227 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

4.4.10 2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-64)



Fórmula Molecular: $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{S}$; Massa Molecular: 317.0986; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 175-177 $^{\circ}\text{C}$; Rendimento: 53%; Razão de Frente/Sistema: 0,66 (n-Hex./AcOEt. 8:2). RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) δ : 1.82-1.88 (m, 4H, CH_2), 2.65-2.74 (m, 4H, CH_2), 7.91 (d, 2H, $J = 6$ Hz, Ar-H), 8.90 (t, 2H, $J = 11.2$ Hz, Ar-H), 8.95 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 9.02 (d, 2H, $J = 6$ Hz, Ar-H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 158.4, 155.5, 150.0, 149.0, 137.1, 135.8, 134.8, 130.2, 129.7, 128.2, 125.2, 123.9, 122.1, 114.0, 109.2, 25.3, 24.2, 22.9, 21.8. IV (KBr, cm^{-1}): CH (2937), CN (2217). MS m/z (ES^+): 318.1099 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

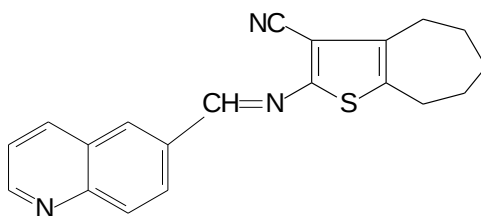
4.4.11 2-[(4-Fluoro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-65)



Fórmula Molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{S}$; Massa Molecular: 284.0783; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 93-95 $^{\circ}\text{C}$; Rendimento: 65%; Razão de Frente/Sistema:

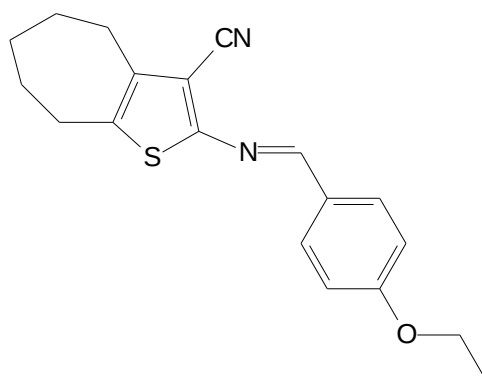
0,47 (n-Hex./AcOEt. 9:1). RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ : 1.84-1.90 (m, 4H, CH_2), 2.63-2.70 (m, 4H, CH_2), 7.12 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.91 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 8.36 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 166.8, 163.5, 159.4, 157.3, 135.1, 132.5, 131.5, 131.4, 116.2, 115.9, 114.4, 107.0, 25.1, 24.2, 23.0, 21.9. IV (KBr, cm^{-1}): CH (2940), CN (2222). MS m/z (ES^+): 285.0903 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

4.4.12 2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-68)



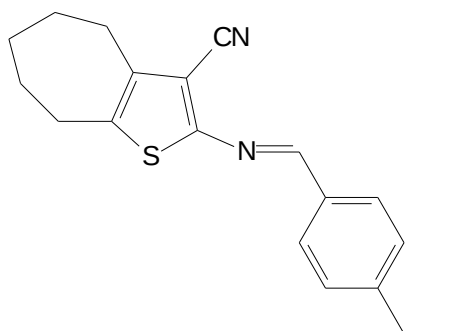
Fórmula Molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{S}$; Massa Molecular: 331.1143; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 204-206 $^{\circ}\text{C}$; Rendimento: 79 %; Razão de Frente/Sistema: 0,6 (n-Hex./AcOEt 8:2). RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) δ : 1.69-1.72 (m, 4H, CH_2), 1.88 (m, 2H, CH_2), 2.79-2.82 (m, 4H, CH_2), 7.66-7.79 (m, 2H, Ar-H), 7.84 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 8.17 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, Ar-H), 8.90 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 8.93 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 9.00 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, Ar-H). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 156.3, 155.1, 149.8, 148.8, 140.8, 138.7, 137.2, 130.0, 129.7, 128.2, 125.2, 123.9, 122.0, 114.5, 111.4, 31.8, 30.7, 29.0, 27.6, 26.9. IV (KBr, cm^{-1}): CH (2930), CN (2219). MS m/z (ES^+): 332.1270 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

4.4.13 2-[(4-Etoxi-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-70)



Fórmula Molecular: $C_{19}H_{20}N_2OS$; Massa Molecular: 324.1296g/mol; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 113-115°C; Rendimento: 86%; Razão de Frente/Sistema: 0,5 (n-Hex./AcOEt. 9:1). RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ : 1.43 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH_3), 1.66-1.72 (m, 4H, CH_2) 1.82-1.86 (m, 2H, CH_2), 2.76 (m, 4H, CH_2), 4.05 (q, J = 7,2Hz, 2H, CH_2), 6.93 (d, J = 8,7 Hz, 2H, CH), 7.84 (d, J = 8,7 Hz, 2H, CH_2), 8.30 (s, 1H, $CH=N$). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ : 162.42, 158.60, 158.26, 139.72, 135.05, 131.22, 127.80, 115.23, 114.72, 108.10, 63.69, 31.93, 30.48, 29.06, 27.78, 27.08, 14.63. IV (KBr, cm^{-1}): 2931 (CH), 2216 (CN). MS m/z (ES $^+$): 325.1419 $[M + H]^+$.

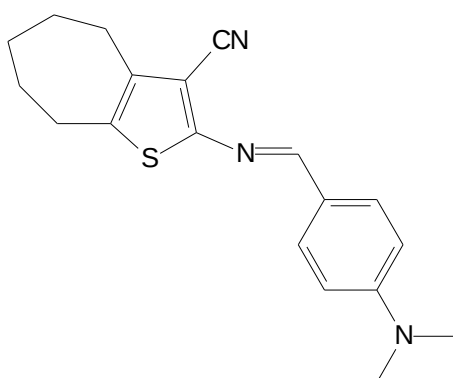
4.4.14. 2-[(4-Etil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-71)



Fórmula Molecular: $C_{19}H_{20}N_2S$; Massa Molecular: 308.1347g/mol; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 94-95°C; Rendimento: 84%; Razão de Frente/Sistema: 0,55 (tolueno). RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ : 1.26 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH_3), 1.64-1.74 (m, 4H, CH_2), 1.84-1.88 (m, 2H, CH_2), 2.73 (q, 2H, J = 7.5 Hz, CH_2), 2.75-2.81

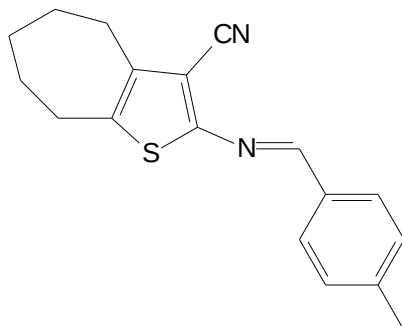
(m, 4H, CH₂), 7.28 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.84 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 8.39 (s, 1H, CH=N). RMN 13C (CDCl₃, 75MHz) δ: 158.8, 158.1, 149.3, 139.9, 135.7, 132.7, 129.5, 128.4, 115.0, 108.7, 31.9, 30.5, 29.1 29.0, 27.8, 27.1, 15.2. IV (KBr, cm⁻¹): CH (2928), CN (2216). MS m/z (ES⁺): 309.1455 [M + H]⁺.

4.4.15 2-[(4-Isopropil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-72)



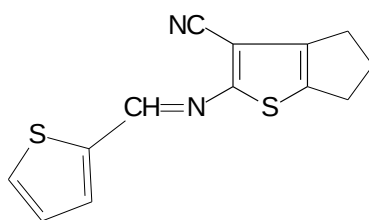
Fórmula Molecular: C₂₀H₂₂N₂S; Massa Molecular: 322.1503g/mol; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 93-95 °C; Rendimento: 70%; Razão de Frente/ Sistema: 0,6 (clorofórmio). RMN 1H (CDCl₃, 300MHz) δ: 1.72 (d, 6H, J = 6.9 Hz, CH₃), 1.63-1.73 (m, 4H, CH₂), 1.83-1.91 (m, 2H, CH₂), 2.75-2.81 (m, 4H, CH₂), 2.96 (d, 1H, J = 6.9 Hz, CH), 7.31 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.84 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 8.38 (s, 1H, CH=N). RMN 13C (CDCl₃, 75MHz) δ: 158.7, 158.1, 153.8, 139.9, 135.6, 132.8, 129.4, 126.9, 115.0, 108.7, 34.2, 31.9, 30.5, 29.0, 27.7, 27.0, 23.6. IV (KBr, cm⁻¹): CH (2927), CN (2216). MS m/z (ES⁺): 323.1641 [M + H]⁺.

4.4.16 2-[(4-Metil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-73)



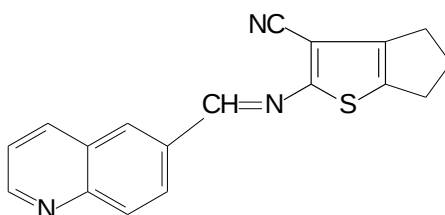
Fórmula Molecular: $C_{18}H_{18}N_2S$; Massa Molecular: 294.1190g/mol; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 88-90°C; Rendimento: 92%; Razão de Frente/Sistema: 0,52 (tolueno). RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ : 1.69 (m, 4H, CH_2), 1.86 (m, 2H, CH_2), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.78 (m, 4H, CH_2), 7.25 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, Ar-H), 7.81 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, Ar-H), 8.38 (s, 1H, $CH=N$). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75MHz) δ : 158.8, 158.1, 143.0, 139.9, 135.7, 132.5, 129.5, 129.3, 115.0, 108.7, 31.9, 30.5, 29.1, 27.7, 27.1, 21.7. IV (KBr, cm^{-1}): CH (2912), CN (2222). MS m/z (ES^+): 295.1067 $[M + H]^+$.

4.4.17 2-[(4-Tiofen-3-il-metilideno)-amino]-5,6-dihidro-4H-ciclopenta[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-80)



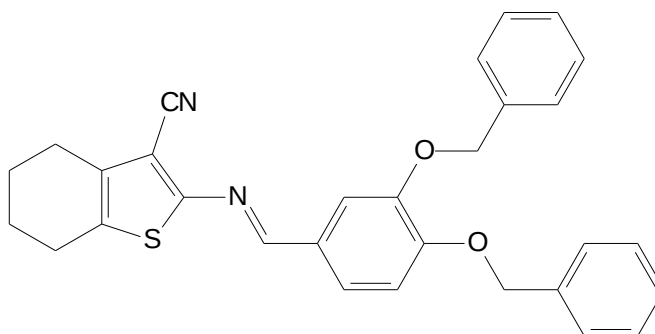
Fórmula Molecular: $C_{13}H_{10}N_2S_2$; Massa Molecular: 258.0285g/mol; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 174-175 °C; Rendimento: 81 %; Razão de Frente/Sistema: 0,55 (*n*-Hex./AcOEt. 7:3). RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ : 2.36-2.45 (m, 2H, CH_2), 2.80-2.92 (m, 4H, CH_2), 6.81 (dd, 1H, $J = 1.5, 3.6$ Hz, Ar-H), 7.11 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, Ar-H), 7.64 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, Ar-H), 8.25 (s, 1H, $CH=N$). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ : 164.9, 151.2, 146.9, 145.2, 144.8, 137.4, 118.0, 114.7, 112.9, 101.6, 30.1, 28.1, 27.2. MS m/z (ES^+): 281.0148 $[M+Na]^+$.

4.4.18 2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6-dihidro-4*H*-ciclopenta[*b*] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-81)



Fórmula Molecular: $C_{18}H_{13}N_3S$; Massa Molecular: 302.0767g/mol; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 200-202 °C; Rendimento: 67 %; Razão de Frente Sistema: 0,65 (benzeno/AcOEt 7:3). RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 2.48 (q, 2H, J = 7.6 Hz, CH_2), 2.91 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH_2), 2.99 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH_2), 7.79 (t, 1H, J = 7.6 Hz, Ar-H), 7.87 (t, 1H, J = 7.6 Hz, Ar-H), 8.08 (d, 1H, J = 4.8 Hz, Ar-H), 8.40 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 8.95 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 8.02 (s, 1H, $CH=N$), 9.03 (d, 1H, J = 4.8 Hz, Ar-H). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ : 163.5, 154.3, 150.0, 149.0, 145.3, 140.1, 137.1, 130.2, 129.7, 128.3, 125.2, 123.9, 122.1, 114.3, 104.7, 30.2, 28.0, 27.3. IV (KBr) cm^{-1} : CH (2924), CN (2220). MS m/z (ES^+): 303.0830 $[M + H]^+$.

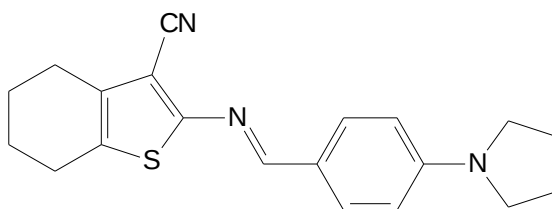
4.4.19 2-[(3,4-Bis-benziloxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-110)



Fórmula Molecular: $C_{30}H_{26}N_2O_2S$; Massa Molecular: 478,1715g/mol; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 80-81°C; Rendimento: 78%; Razão de Frente/ Sistema: 0,5 (n-hexano/AcOEt 7:3). RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ : 1.85-1.86 (m, 4H, CH_2), 2.65-2.67 (m, 4H, CH_2), 5.21 (s, 4H, CH_2), 6.92 (d, J = 8,4Hz, 1H, Ar-H), 7.26-7.55

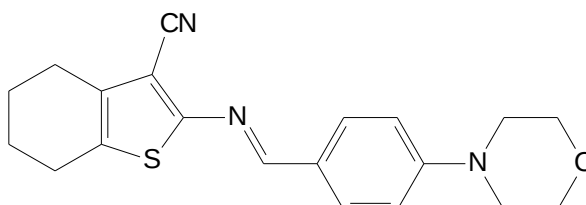
(m, 10H, Ar-H), 7.70 (d, $J = 2.1$ Hz 1H, Ar-H), 8.25 (s, 1H, Ar-H), 9.80 (s, 1H, CH=N). RMN 13C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 160.3, 158.2, 152.6, 149.0, 136.4, 134.8, 131.5, 128.5, 128.5, 127.8, 127.5, 127.2, 127.0, 125.3, 114.6, 113.3, 112.6, 105.9, 70.9, 70.7, 25.1, 24.2, 23.0, 21.9. IV (KBr) cm⁻¹: CH (2925), CN (2220).

4.4.20 2-[(4-Pirrolidin-1-il-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-117)



Fórmula Molecular: C₂₀H₂₁N₃S; Massa Molecular: 335.1456g/mol; Sólido de cor laranja; Ponto de Fusão: 211°C; Rendimento: 18%; Razão de Frente/ Sistema: 0,62 (n-hexano/AcOEt 7:3). RMN 1H (CDCl₃, 400MHz) δ : 1.85 (m, 4H, CH₂), 2.07 (m, 4H, CH₂), 2.66 (m, 4H, CH₂), 3.43 (m, 4H, CH₂), 6.62 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 7.94 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 8.30 (s, 1H, CH=N). RMN 13C (CDCl₃, 100MHz) δ : 198.3, 190.2, 158.3, 151.6, 134.5, 133.1, 115.0, 112.3, 111.2, 102.8, 48.0, 47.6, 25.4, 25.3, 24.9, 24.3, 23.1, 22.0. IR (KBr, cm⁻¹): CH (2928), CN (2212). MS m/z (ES⁺): 336.1291 [M + H]⁺.

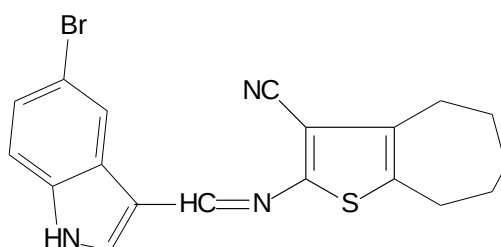
4.4.21 2-[(4-Morfolin-4-il-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b] tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-118)



Fórmula Molecular: C₂₀H₂₁N₃OS; Massa Molecular: 351.1405g/mol; Sólido de cor amarelo; Ponto de Fusão: 159-160°C; Rendimento: 74%; Razão de Frente/Sistema: 0,65 (n-hexano/AcOEt 8:2). RMN 1H (CDCl₃, 400MHz) δ : 1.80-1.88 (m, 4H, CH₂),

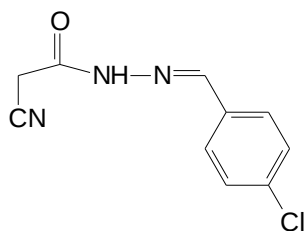
2.61-2.67 (m, 4H, CH₂), 3.30 (t, 4H, J = 4.8 Hz, NCH₂), 3.84 (t, 4H, J = 4.8 Hz, OCH₂), 6.88 (d, 2H, J = 9 Hz, Ar-H), 7.80 (d, 2H, J = 9 Hz, Ar-H), 8.26 (s, 1H, CH=N). RMN ¹³C (CDCl₃, 100MHz) δ: 161.1, 158.3, 153.7, 134.5, 131.1, 130.8, 125.6, 114.9, 113.9, 105.0, 66.4, 47.4, 25.0, 24.2, 23.0, 21.9. IR (KBr, cm⁻¹): CH (2945), CN (2213). MS m/z (ES⁺): 352.121 [M + H]⁺.

4.4.22 (5-Bromo-1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5,6,7,8-tetrahidro-4*H*-ciclohepta[b] tiofen-2-il)-amina (LPSF/SB-200)



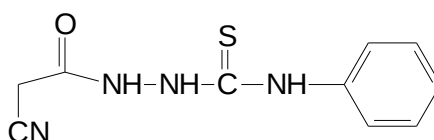
Fórmula Molecular: C₁₉H₁₆BrN₃S; Massa Molecular: 397,02g/mol; Sólido de cor Amarelo; Ponto de Fusão: 104-105 °C; Rendimento: 92,31%; Razão de Frente/Sistema: 0,50 (CHCl₃/MeOH 1:9). RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) δ: 1.58–1.70 (m, 4H, CH₂), 1.75–1.85 (m, 2H, CH₂), 2.65–2.75 (m, 4H, CH₂), 7.29–7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.67 (d, 1H, J = 3 Hz, Ar-H), 8.19 (s, 1H, CH=N), 12,2 (s, 1H, N-H (indol)). RMN ¹³C (CDCl₃, 300MHz) δ: 27.49, 28.15, 30.41, 31.96, 106.38, 114.52, 115.17, 115.94, 125.16, 126.69, 127.01, 128.24, 134.05, 136.86, 139.08, 150.22, 155.50, 161.11. IR (KBr, cm⁻¹): 3223 (=CH-), 2208 (-CN).

4.4.23 Ácido cianoacético (4-cloro-benzilideno)-hidrazida (LPSF/SBT-1)



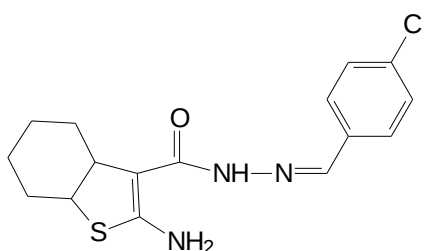
Fórmula Molecular: $C_{10}H_8ClN_3O$; Massa Molecular: 221,04 g/mol; Sólido amorfo bege claro; Ponto de Fusão: 204-205° C; Rendimento: 70%; Razão de Frente Sistema: 0,50 (*n*-Hex./AcOEt. 1:1). RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 4.21 (s, 2H, CH_2), 7.50 (d, 2H, $J = 8$ Hz, Ar-H), 7.73 (d, 2H, $J = 8$ Hz, Ar-H), 7.99 (s, 1H, =CH-), 11.83 (s, 1H, N-H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 24.28, 115.98, 128.63, 128.98, 132.71, 134.54, 134.75, 143.04, 158.97, 164.88. IR (KBr, cm^{-1}): 2261.18 (CN), 1673.47 (C=O), 1486.02 (C=N).

4.4.24 Ácido acético – 2 – ciano – 2 - [(fenilamino) - tioxometil] - hidrazida (LPSF/SBT-2)



Fórmula Molecular: $C_{10}H_{10}N_4OS$; Massa Molecular: 234.27g/mol; Sólido amorfo branco gelo; Ponto de Fusão: 180° C; Rendimento: 46%; Razão de Frente Sistema: 0,60 (AcOEt. 100%). RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 3.71 (s, 2H, CH_2), 7.19 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz, Ar-H), 7.38-7.33 (m, 3H, Ar-H), 9.70 (s, 1H, N-H), 9.78 (s, 1H, N-H), 10.31 (s, 1H, N-H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 24.37, 115.66, 126.06, 126.06, 128.14, 128.14, 138.88, 162.38, 180.88. IR (KBr, cm^{-1}): 2263.67 (-CN), 1668.58 (C=O), 1509.42 (C=S).

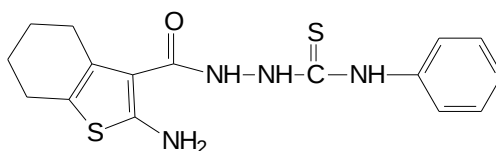
4.4.25 2 – Amino - 4, 5, 6, 7 – tetrahydro – benzo [b] tiofen – 3 -ácidocaboxílico-(4-cloro-benzilideno)-hidrazida(LPSF/SBT-3)



Fórmula Molecular: $C_{16}H_{18}ClN_3OS$; Massa Molecular: 335,85 g/mol; Sólido amorfo amarelo; Ponto de Fusão: 198-200°C; Rendimento: 27,6%; Razão de Frente

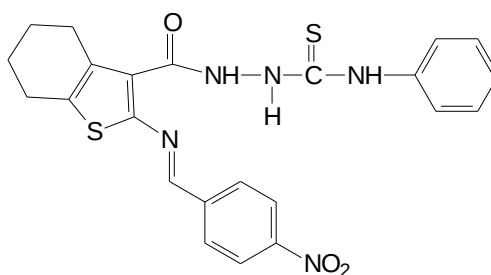
Sistema: 0,40 (*n*-Hex./AcOEt. 1:1). RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 3.59-3.52 (dd, 4H, J = 5.2 Hz, Ciclo alquil), 3.78-3.75 (t, 2H, J = 5.2 Hz, Ciclo alquil), 4.30-4.28 (t, 2H, J = 4.8 Hz), 7,31 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 7.45 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 10.31 (s, 1H, N-H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 38.86, 39.08, 39.29, 39.50, 39.70, 39.91, 40.12, 49.22, 52.28, 65.57, 65.88, 127.77, 128.26, 133.11, 141.06, 197.10. IR (KBr, cm^{-1}): 3096 (NH_2), 1437.87 (C=O), 1286,06 (C-Cl).

4.4.26 1- (2 - Amino - 4,5,6,7- tetraidro – benzo [b]tiofen - 3 - ácidocarboxílico) – 4 - fenil-tiossemicarbazona (LPSF/SBT-4)



Fórmula Molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{OS}_2$; Massa Molecular: 346,46 g/mol; Sólido amorfo branco; Ponto de Fusão: 180°C ; Rendimento: 30%; Razão de Frente Sistema: 0,50 (*n*-Hex./AcOEt. 4:6). RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 3.59-3.52 (dd, 4H, J = 5.2 Hz, Ciclo alquil), 3.78-3.75 (t, 2H, J = 5.2 Hz, Ciclo alquil), 7,20-7,60 (m, 5H, Ar-H), 9.43 (s, 1H, N-H), 9.40 (s, 1H, N-H), 9.50 (s, 1H, N-H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 38.86, 39.08, 39.29, 39.50, 39.70, 39.91, 40.12, 49.22, 52.28, 65.57, 65.88, 127.77, 128.26, 133.11, 197.10, 220.50. IR (KBr, cm^{-1}): 3319.29 (NH_2), 1637.09 (C=O), 1500 (C=S).

4.4.27 2-(2-(4-nitrobenzilidenoamino)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonil) - N-phenilhidrazinacarbotioamida (LPSF/SBT-7)



Fórmula Molecular: $C_{23}H_{20}N_5O_3S_2$; Massa Molecular: 478.56 g/mol; Sólido amorfo amarelo; Ponto de Fusão: 215°C; Rendimento: 78%; Razão de Frente Sistema: 0,45 (*n*-Hex./AcOEt. 1:1). RMN 1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 3.59-3.52 (dd, 4H, J = 5.2 Hz, Ciclo alquil), 3.78-3.75 (t, 2H, J = 5.2 Hz, Ciclo alquil), 6.81 (s, 1H, =C-H), 7.60 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 7.92 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H), 8.15-8.44 (m, 5H, Ar-H), 8.84 (s, 1H, N-H), 9.03 (s, 1H, N-H), 12.81 (s, 1H, N-H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 38.86, 39.08, 39.29, 39.50, 39.70, 39.91, 40.12, 49.22, 52.28, 65.57, 65.88, 127.77, 128.26, 133.11, 197.10, 220.50. IR (KBr, cm^{-1}): 3200 (NH₂), 3150 (NH₂), 1658.04 (C=O), 1516.61 (C=S).

4.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antifúngica dos derivados 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila foram realizados no Laboratório Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

4.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM dos produtos testados foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” e em duplicata. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 μ L do meio líquido CSD duplamente concentrado. Posteriormente, 100 μ L da solução dos produtos (nas concentrações de 10.000, 5.000, 2.500, 1.250, 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 μ g/mL), também duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 μ g/mL até 1 μ g/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontrou a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados 10 μ L do inóculo das espécies nas cavidades, onde cada coluna da placa referiu-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 μ L do mesmo CSD duplamente concentrado, 100 μ L de água destilada estéril e 10

µL do inóculo de cada cepa. As placas foram seladas e incubadas a 35 °C por 24-72 h. A CIM para os produtos testados foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nas cavidades, quando comparado com o crescimento controle. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos dois ensaios (ELOFF, 1998; SOUZA et al., 2007).

4.5.2 Compostos testados

Foram testadas 18 substâncias (LPSF/SB-43, LPSF/SB-44, LPSF/SB-45, LPSF/SB-46, LPSF/SB-62, LPSF/SB-63, LPSF/SB-64, LPSF/SB-65, LPSF/SB-68, LPSF/SB-70, LPSF/SB-71, LPSF/SB-72, LPSF/SB-73, LPSF/SB-80, LPSF/SB-81, LPSF/SB-110, LPSF/SB-117, LPSF/SB-118) nas concentrações de 10.000, 5.000, 2.500, 1.250, 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 µg/mL, as quais foram solubilizadas em DMSO, numa proporção até 10 %.

4.5.3 Microrganismos

Os microrganismos, utilizados no ensaio para a avaliação de atividade antifúngica, corresponderam a 2 cepas de *Candida krusei* (LM 13 e LM 08) e 2 cepas de *Cryptococcus neoformans* (LM 0310 e ICB 59). As mesmas foram fornecidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. As cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud Dextrose (ASD) inclinado, sob refrigeração (4 °C) e a temperatura ambiente (28-30 °C).

4.5.4 Meios de Cultura

O meio de cultura utilizado nos ensaios foi o meio líquido caldo Sabouraud Dextrose (CSD), adquiridos da Difco® e preparados de acordo com as instruções do fabricante. Os meios foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121 °C, por 15 minutos.

4.5.5 Inóculo

Na preparação do inóculo dos fungos, primeiramente os isolados foram cultivados em meio ASD inclinado a 35 °C por 24-72 horas (*overnight*). Inicialmente foram preparadas suspensões dos microrganismos em tubos contendo 5 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,85 % p/v). Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) (ELOFF, 1998; SOUZA et al., 2007).

4.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL PELO MÉTODO DO MTT

O estudo da citotoxicidade pelo método do MTT dos derivados 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila foi realizado no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (UFPE), Universidade Federal de Pernambuco.

4.6.1. Materiais e Métodos

4.6.2. Cultivos das Células

As células listadas na Tabela 06 foram cultivadas em meio RPMI 1640, pH 6,9 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB, p/v) (Cultilab), HEPES, 25 mM (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e bicarbonato de sódio 24 mM em estufa de atmosfera úmida a 37 °C, com 5% de CO₂ (v/v). A adesão da célula da garrafa de cultivo, nas culturas de células aderentes, foi realizada com Tripsina-EDTA 0,05 % (v/v), onde inicialmente o meio antigo era descartado, a garrafa era lavada com PBS gelado e posteriormente a solução de Tripsina-EDTA era adicionada. Após, em média, dois minutos de ação da enzima a mesma era inativada com adição de meio completo contendo 10% de SFB. As

células eram, então, transferidas para tubos tipo Falcon de 15 mL, centrifugadas e então ressuspensas em volume definido.

A contagem das células foi realizada em microscópio invertido utilizando câmara de Neubauer através da fórmula $A+B+C+D/4 \times 10^3$, onde cada letra representa o número de células por campo da câmara analisado. Todos os experimentos foram realizados com confluência (porcentagem de células que ocupam a área da garrafa do cultivo) entre 60 e 80 %. Quando a confluência desejada não era atingida o meio de cultivo era trocado a cada 48h.

Tabela 1: Todas as linhagens utilizadas nos ensaios obtidas do banco de células do Rio de Janeiro

Linhagem	Patologia
T47D	Carcinoma de mama
NG97	Glioblastoma Multiforme
CCRF-CEM	Leucemia Linfoblástica Aguda
HL60	Leucemia Promielocítica

4.6.3 Ensaio de citotoxicidade em células neoplásicas

O teste de citotoxicidade foi realizado *in vitro* nas células neoplásicas listadas na Tabela 7, com diferentes concentrações dos compostos testados. A citotoxicidade celular foi quantificada pelo método MTT.

Descrita por Mosman, em 1983, a análise de citotoxicidade pelo método do MTT, vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato que tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-*H*-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 céls./100 mL e, posteriormente, as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em estufa úmida e 5 % de CO₂. Após esse período, os compostos foram acrescidos em diferentes concentrações (1, 10, 25, 50 e 100 µM) e as placas, novamente incubadas por 72 horas. Em seguida, adicionou-se 20 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas foram incubadas por 3h. Passado esse tempo, foram adicionados 130 µL de SDS 20 % para dissolução do precipitado. A absorbância foi lida após 24h em espectrofotômetro de placa a 570 nm. No estudo, as amostras foram testadas em triplicata e a amsacrina foi utilizada como controle positivo.

4.6.4. Ensaio de seletividade em Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do sangue de doadores sadios por centrifugação com FicollPaque™ Plus (GE Healthcare Bio-Sciences). As PBMCs isoladas foram cultivadas (10^6 células/1000 µL) em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado. Após estabelecimento da cultura as células foram cultivadas por 48h com os compostos testados nas concentrações de 1 a 100 µM e submetidas ao método de MTT como descrito no item acima. Tanto no teste de citotoxicidade quanto no de seletividade o composto Amsacrina foi utilizado como controle positivo.

4.7 ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

A avaliação da atividade antitumoral foi realizada no Laboratório de Cancerologia Experimental, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos.

4.7.1. Tumor Sólido

A avaliação da atividade antitumoral foi realizada com o tumor sólido Sarcoma 180, proveniente do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Esse tumor foi descoberto em 1941 e inicialmente denominado de tumor de Crocker. Apresenta como característica um crescimento rápido, chegando a atingir em sete dias dimensões de 18x14x10 mm, o que facilita a sua utilização na busca de drogas antitumorais potencialmente ativas.

4.7.2. Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos com aproximadamente 60 dias de nascido, albinos swiss (*Mus musculus*) pesando entre 23 e 25 gramas, proveniente do Biotério do Instituto Ageu Magalhães. Os camundongos foram marcados, pesados e separados em grupos de seis animais para cada dose administrada.

4.7.3. Determinação a atividade antitumoral

A avaliação da atividade antitumoral foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Stock et al. (1965). O tumor sólido, Sarcoma 180, encontrava-se com 12 dias de implantados na região axilar direita dos animais doadores. Esses foram sacrificados através de deslocamento cervical, sendo o tumor retirado cirurgicamente e colocado em uma placa de Petri, contendo solução antibiótica de geramicina 0,5 % em soro fisiológico.

Os tumores extraídos dos animais doadores foram seccionados em fragmentos de aproximadamente 2 a 3 mm de diâmetro e colocados em uma placa de Petri contendo uma solução antibiótica. Os animais receptores foram anestesiados com éter etílico e após a assepsia no local do implante, receberam o fragmento tumoral através de um trocáter (STOCK et al., 1965; FUNAYAMA e KOMIYAMA, 1993).

A quimioterapia experimental foi iniciada 48 horas após o implante dos tumores, onde os animais já se encontravam divididos em grupos com 6 animais, um grupo destinado ao controle que foi administrado apenas solução tween/salina, e os demais para o tratamento com as substâncias teste. As doses administradas foram 12,5; 25; 50 e 100 mg/Kg. Para os derivados LPSF/SB-44 e LPSF/SB-200. A duração do tratamento foi de 8 dias com doses diárias administradas por via intra-peritoneal.

Ao término do tratamento os animais foram sacrificados e os tumores dissecados e pesados. O cálculo da inibição do crescimento da massa tumoral foi realizado de acordo com a equação descrita por Machon e colaboradores (1981), a seguir:

$$TWI = (C - T) \times 100/C$$

Onde TWI = inibição tumoral em %, C = média de peso dos tumores do grupo controle, T = média do peso dos tumores do grupo teste.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O percentual de morte celular foi determinado de maneira relativa ao controle negativo e os dados foram analisados a partir da média de 3 experimentos independentes utilizando o software estatístico GraphPadPrism versão 5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os compostos LPSF/SB-44, LPSF/SB-64, LPSF/SB-72 e LPSF/SB-80 mostraram atividade antifúngica significativa contra as cepas de *C. neoformans* testadas. Os valores de CIM para estas moléculas variaram de excelentes (100 a 500 µg/mL) a moderados (600 a 1500 µg/mL), dentro dos limites estabelecidos (excelente atividade: de 100 a 500 µg/mL, Inibição moderada: de 600 a 1500 µg/mL, inativo ou fraca atividade: acima de 1000 ou 1500 µg/mL) (MITSCHER et al., 1972; HOLETZ et al., 2007; HOUGHTON et al., 2007) (TABELA 2).

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas frente a cepas de *C.neoformans* e *C.krusei* pela técnica de microdiluição

Compostos LPSF/SB	Concentração Inibitória mínima – CIM (µg/mL)			
	<i>C. neoformans</i> LM 0310	<i>C. neoformans</i> ICB 59	<i>C. krusei</i> LM 13	<i>C. krusei</i> LM 08
43	----	2500	5000	512
44	128	256	2500	1024
45	----	----	----	----
46	----	2500	1250	5000
62	2500	2500	2500	----
63	2500	10000	5000	----
64	128	64	----	512
65	128	5000	----	512
68	2500	64	----	2500
70	5000	128	2500	2500
71	2500	2500	2500	2500
72	128	128	2500	5000
73	----	128	----	----
80	128	128	2500	5000
81	128	2500	5000	1250
110	----	----	----	----
117	2500	256	10000	----
118	2500	256	5000	----
5-Fluorocitosina	10	10	NT	NT
Miconazol	NT	NT	50	50

NT: Não-testado

Com relação ao estudo da atividade antifúngica sobre *Candida krusei*, apenas os compostos LPSF/SB-64 e LPSF/SB-65 apresentaram atividade moderada com valores de Concentração Inibitória Mínima igual a 512 µg/mL.

O composto que mais se destacou com ação antifúngica contra *C. neoformans* foi o LPSF/SB-64, que apresentou CIM igual a 128 µg/mL (para a cepa *C. neoformans* LM 0310) e 64 µg/mL (para cepa *C. neoformans* ICB 59). A presença do grupamento quinolina ligado ao 2-amino parece ser relevante ao desenvolvimento da atividade em questão. Boateng et al. (2011) sintetizaram compostos tetracíclicos benztieno[3,2-b]quinolina e também testaram sua potência

in vitro contra *C. neoformans*. Os resultados, assim como para o LPSF/SB-64, foram valores de CIM moderados.

No que diz respeito a uma avaliação da relação estrutura química-atividade biológica, o tamanho do anel ciclopentila e ciclohexila acoplado às posições 4 e 5 do anel de tiofeno parece exercer pouca influência na atividade antifúngica, uma vez que não foi observado diferenças significativas das atividades entre os compostos pertencentes a estas séries. Entretanto, os compostos LPSF/SB com melhor perfil de atividade foram derivados benzo[b]tiofênicos.

5.2. ATIVIDADE ANTITUMORAL

A tabela 8 apresenta os valores de IC₅₀ dos compostos SB44, SB68 e SB200 frente às linhagens tumorais: T47D, NG97, CCRF-CEM e HL60 e a linhagem celular humana PBMCs em concentração micromolar (μM). As figura 16, 17 e 18 representam a viabilidade celular das linhagens NG97, T47D e CCRF-CEM frente às concentrações dos compostos avaliadas (Tabela 3).

Tabela 3: Valores de IC₅₀ dos compostos LPSF/SB-44, LPSF/SB-68 e LPSF/SB-200 frente às linhagens testadas.

	IC ₅₀ (μM)				
	NG97	T47D	HL60	CCRF	PBMC
LPSF/SB-44	24,18	18,9	<1	12,45	37,7
LPSF/SB-68	>75	1	3,4	5,2	>75
LPSF/SB-200	20,44	13,2	<1	7,4	36

* Até 25 μM a seletividade permaneceu em torno de 98% para todos os compostos

Figura 16: Viabilidade celular da linhagem NG97 frente aos compostos LPSF/SB-44, LPSF/SB-200, LPSF/SB-58 e amsacrina (m-AMSA) (utilizado como controle positivo).

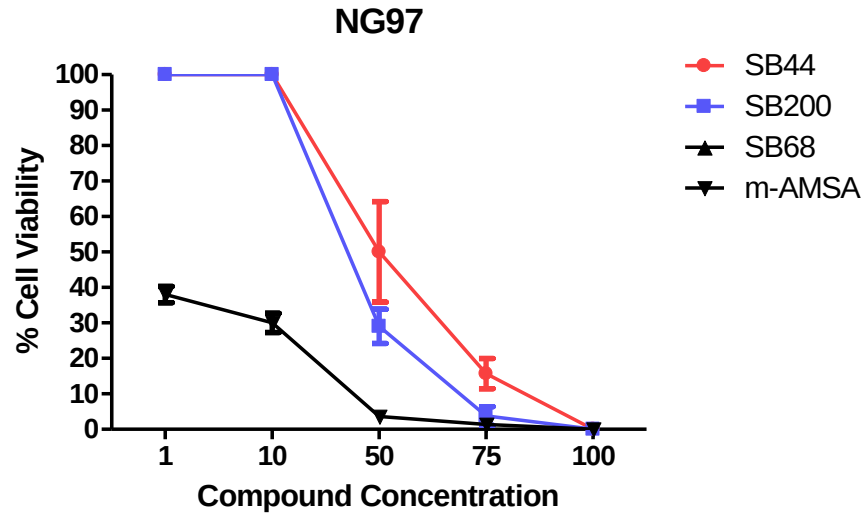


Figura 17: Viabilidade celular da linhagem T47D frente aos compostos LPSF/SB-44, LPSF/SB-68 e LPSF/SB-200

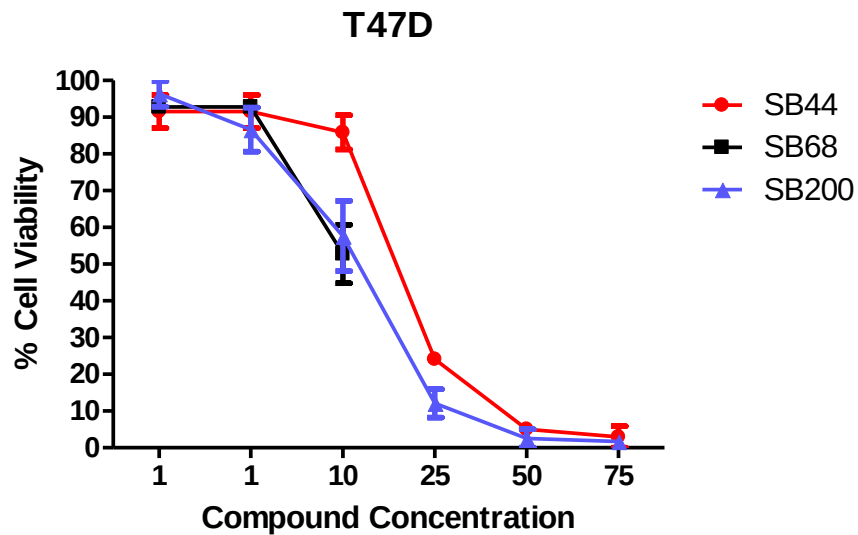
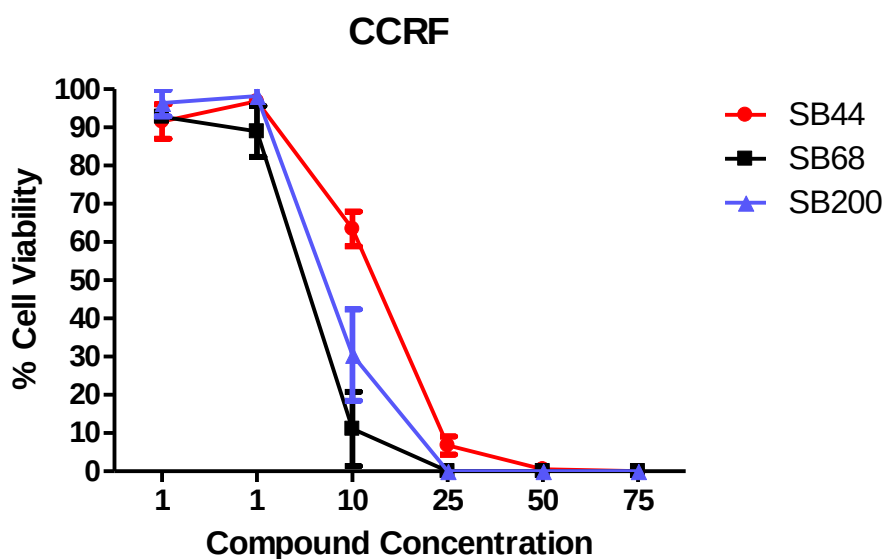


Figura 18: Viabilidade celular da linhagem CCRF-CEM frente aos compostos LPSF/SB44, LPSF/SB68 e LPSF/SB200.

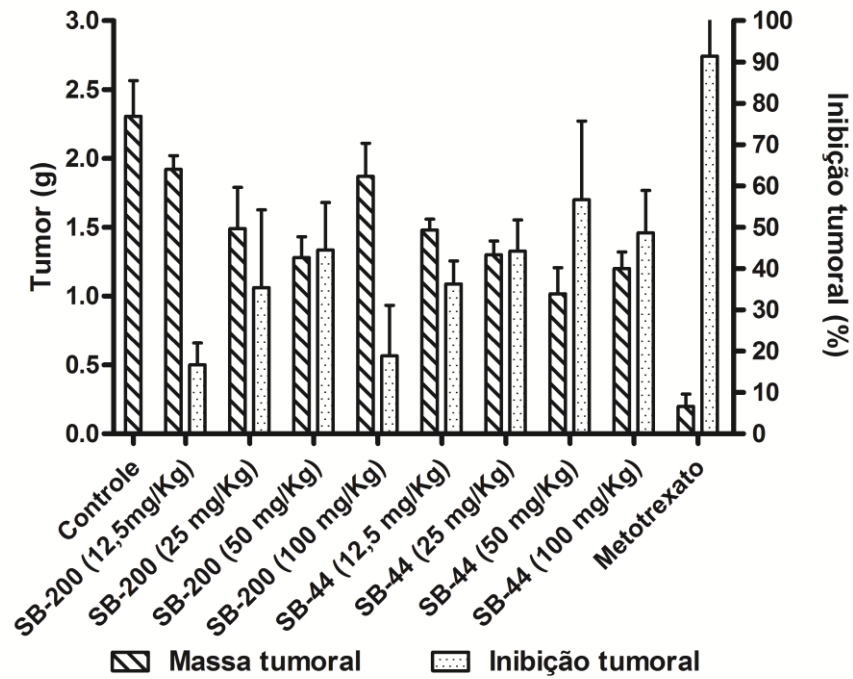


Como pode ser constatado a partir dos dados apresentados, os compostos apresentam a capacidade de inibir a proliferação celular de linhagens cancerígenas em diferentes concentrações. Os valores de IC_{50} para a linhagem HL60 (Leucemia Promielocítica) não puderam ser determinadas nesse experimento visto que seus valores são inferiores a menor concentração testada ($1\mu M$), sendo, portanto a linhagem celular tumoral mais sensível aos compostos, que podem ser utilizados de maneira eficiente em concentrações nanomolares ($10^{-9}M$).

Também é importante observar que a maioria dos valores de IC_{50} encontrados para as linhagens tumorais, tiveram valores inferiores aos valores de IC_{50} para a linhagem celular humana, o que comprova a possibilidade de administração dos compostos em seres humanos.

Com relação aos ensaios *in vivo* os derivados LPSF/SB-44 e LPSF/SB-200 apresentaram um resultado significativo frente ao sarcoma 180. Observa-se que o derivado LPSF/SB-44 apresentou o maior percentual de inibição 55,89% para a dose de 50mg/Kg. O derivado LPSF/SB-200 apresentou uma menor atividade, pois seu percentual de inibição foi de 44,5 % para a mesma dose. O metotrexato apresentou uma inibição média de 91,4 %. Estes ensaios se encontram em andamento (Figura 19).

Figura 19: Inibição do crescimento da massa tumoral em camundongos tratados com LPSF/SB-44 e LPSF/SB-200 por via intra-peritoneal. durante 8 dias. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a equação: $TWI = (C - T) \times 100/C$ e foram significativas para $p \leq 0,05$



6 CONCLUSÕES

Foram sintetizados novos derivados tiofênicos (LPSF/SB) divididos em 3 diferentes séries (ciclopentila, ciclohexila e cicloheptila), e novos derivados tiossemicarbazônicos. Os compostos foram obtidos com rendimentos que se apresentam dentro do previsto para rota sintética utilizada.

Quanto à atividade antifúngica *in vitro*, os derivados tiofênicos se mostraram eficientes em inibir o crescimento fúngico para as cepas de *Criptococcus neoformans*, com valores de CIM variando de excelentes a fracos (64 a 2500 µg/mL). Entretanto, demonstraram baixo potencial de inibição para as cepas de *Candida krusei*.

Os derivados testados foram avaliados quanto ao potencial citotóxico frente as linhagem de células tumorais T47D, CCRF-CEM e NG97. Os valores de IC₅₀ encontrados para as linhagens tumorais tiveram valores inferiores aos valores de IC₅₀ para a linhagem celular humana, o que comprova a possibilidade de administração dos compostos em seres humanos. Sendo candidatos para análise de citometria.

Com relação aos ensaios *in vivo* os derivados LPSF/SB-44 e LPSF/SB-200 apresentaram um resultado significativo frente ao sarcoma 180. Observa-se que o derivado LPSF/SB-44 apresentou o maior percentual de inibição 55,89 % para a dose de 50 mg/Kg. O derivado LPSF/SB-200 apresentou uma menor atividade, pois seu percentual de inibição foi de 44,5 % para a mesma.

REFERÊNCIAS

- ALOMAR, K., ET AL. Synthesis, crystal structure, characterization of zinc(II), cadmium(II) complexes with 3-thiophene aldehyde thiosemicarbazone (3TTSCH). Biological activities of 3TTSCH and its complexes. **Journal Inorganic Biochemistry**. v. 114, p.397-404, 2010.
- ASHTON, W. T.; ET AL. Nonpeptide Angiotensin II Antagonists Derived From 1H-Pyrazole-5-carboxylates and 4-Aryl-1H-imidazole-5-carboxylates. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 36, p. 3595-3605, 1993.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos** 2º ed. ArtMed, São Paulo-SP. 2008. P-272-274.
- BARTHI, N., ET AL. Synthesis and In Vitro Antiprotozoal Activity of 5-Nitrothiophene-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 3475-3478, 2002.
- BAYH, O., ET AL. Deprotonation of thiophenes using lithium magnesates. **Tetrahedron**, v. 61, p. 4779-4784, 2005.
- BECKFORD F.A., ET AL. Synthesis and characterization of mixed-ligand diimine-piperonal thiosemicarbazone complexes of ruthenium(II): biophysical investigations and biological evaluation as anticancer and antibacterial agents. **Journal of Molecular Structure**. v. 992, p.39–47, 2011.
- BEHBEHANI, H., ET AL. 2-Aminothiophenes as building blocks in heterocyclic synthesis: Synthesis and antimicrobial evaluation of a new class of pyrido[1,2-a]thieno[3,2-e]pyrimidine, quinoline and pyridin-2-one derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 52, p. 51-65, 2012.
- BERRIDGE, M. V., ET AL. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BHARTI, N., ET AL. Synthesis, characterization and in vitro anti-amoebic activity of new palladium(II) complexes with 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde N(4)-substituted thiosemicarbazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 4679-4684, 2004.

BHARTI, N.; ET AL. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 12, p. 3475-3478, 2002.

BOATENG, C. A.; ET AL. Synthesis and evaluation against opportunistic fungal pathogens. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 458–470, 2011.

BRAULT, L., ET AL. New thiophene analogues of kenpaullone: synthesis and biological evaluation in breast cancer cells. **European journal of medicinal chemistry**. v. 40, p. 757-763, 2005.

BYMASTER, F.P., ET AL. Duloxetine (Cymbalta™), a Dual Inhibitor of Serotonin and Norepinephrine Reuptake. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 4477–4480, 2003.

CAMPANATI, M., ET AL. Environmentally Friendly Catalysts for Acylation Reactions. **In Chemical Industries**. v. 75, p. 307-318, 1998.

CHAN, G.F.Q., TOWERS, G.H.N., MITCHELL, J.C. Ultraviolet-mediated antibiotic activity of thiophene compounds of Tagetes. **Phytochemistry**. v. 14, p. 2295-2296, 1975.

CHATTOPADHYAY, D.; MAZUMDAR, S. K.; BANERJEE, T.; SHELDRIK, W. S. Structure of 1-(3,4-dichlorophenyl)-4-methylthiosemicarbazide. **Acta Crystallogr. Sect. C: Cryst. Struct. Commun**. v. 45, p. 314, 1989.

CHEN. J., ET AL. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. **Toxicol Appl Pharmacol**. v. 15, p. 40-8, 2004.

D'AURIA, M., ET AL. Photochemical Synthesis of 4(5)-Nitro-2-arylimidazoles. **Journal of the Chemical Society, Perkin Trans.** p. 1271, 1998.

DALEMAGNE, P.; ET AL. Synthesis and Biological Evaluation of Five-Membered Heterocycles Fused to Cyclopenta[c]thiophene as New Antitumor Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1161–1167, 2003.

DEMILO, A. B.; REDFERN, R. E.; BORKOVEC, A. B. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones as Inhibitors of Ecdysis in *Oncopeltus fasciatus*: Structure-Activity Relationship Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 31, p. 713-718, 1983.

DONNICI, C. L., ET AL. Ruthenium complexes endowed with potent anti-Trypanosoma cruzi activity: Synthesis, biological characterization and structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 5038-5043, 2009.

DU, X., ET AL. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Journal Medicinal Chem.** v. 45, p. 2695-2707, 2002.

EICHER, T., HAUPTMANN, S. The Chemistry of Heterocycles - Methods and Principles in Medicinal Chemistry Series. **Wiley**. 1995.

ELOFF, J. N. A sensitive and Quick Microplate Method to determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

FEUN, L.; ET AL. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 50, p. 223-229, 2002.

FUJII, N., ET AL. Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. **Bioorg Med Chem Lett.** V. 15, p. 121-123, 2005.

FUNAYAMA, S.; KUMAIYAMA. Antitumor Agents. In: The Search for Bioactive Compounds from Microorganism. Satoshi Omura (edt), **Spriger-Verlag**, New York. v. 5, p. 79-97, 1993.

GARCÍA B.; ET AL. Interaction of the DNA bases and their mononucleotides with pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazonecopper(II) complexes. Structure of the cytosine derivative. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 102, p. 1892–1900, 2008.

HAIDER, N.; ET AL. Synthesis and *In-vitro* Antitumor Activity of 1-[3-(Indol-1-yl)prop-1-yn-1-yl]phthalazines and Related Compounds. **Molecules**, v. 12, p. 1900-1909, 2007.

HOLETZ, F. B.; ET AL. Screening of some plants used in the Brazilian folk for the treatment of infectious diseases. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 7, p. 102701031, 2007.

HOUGHTON, P. J.; ET AL. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 391-400, 2007.

HU, K., ET AL. Synthesis and antitumor activity of liquiritigenin thiosemicarbazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 45, p. 3453–3458, 2010.

KASUGA, N. C., ET AL. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 96, p. 298-310, 2003.

KASUGA, N. C.; ET AL. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol $\Delta 8-7$ isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 122, p. 39–42, 1994.

KUMAR, S. A., BALASUBRAHMANYAM, S. N. Reactivity of some tetra substituted furans and thiophenes towards $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ catalysed Diels-Alder reaction. In: **Tetrahedron Letters**, v. 38, p. 1099-1100, 1997.

LUPETTI, A.; ET AL. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 8, n.2, 2002.

MENDES, I. C.; ET AL. Coordination to copper(II) strongly enhances the in vitro antimicrobial activity of pyridine-derived N(4)-tolyl thiosemicarbazones. **Polyhedron**, v. 26, p. 3263-3270, 2007.

MISTCHER, L. A.; ET AL. Antimicrobial agents from higher plants I: Introduction, Rationale and Methodology. **Llodya**, v. 35, n. 2, p. 157-166, 1972.

MITTAL, S. K., ET AL. Potentiometric performance of 2-aminothiophenol based dipodal ionophore as a silver sensing material. **Sens. Actuators B-Chemical**, v. 121, p. 386-395, 2007.

NAKANO, S.; ET AL. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 96, p. 298-310, 2003.

NENAJDENKO V.G.; GAVRYUSHIN A.E.; BALENKOVA E.S. A facile route to thiophene-1,1-dioxides bearing electron-withdrawing groups. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n° 26, p. 4397-4399(3), 2001.

OLIVEIRA, TIAGO BENTO DE. Síntese, Elucidação Estrutural e Avaliação Biológica de Novos Derivados Tiazolidínicos e Cicloalquil-tiofênicos. **Dissertação de Mestrado**, UFPE, 2010.

OROZCO, A.S. *et al.* Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 42, p. 2645–2649, 1998.

PANDEYA, S. N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DECLERCQ, E. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derived from isatin derivatives and N-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide. *European Journal of Medicinal Chemistry*, V. 9, p. 25-31, 1999.

PINTO, E.; QUEIROZ, M.J.R.P., VALE-SILVA, L.A., João F. OLIVEIRA, J.F., BEGOUIN, A., BEGOUIN, J.M., KIRSCH, G. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[*b*]thiophene moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v.16, p. 8172–8177, 2008.

PUTEROVÁ Z.; KRUTOŠÍKOVÁ, A.; VÉGH, D. Gewald reaction: synthesis, properties and applications of substituted 2-aminothiophenes. *ARKIVOC*, Special Issue Reviews and Accounts (i), p.209-246, 2010.

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. Methemoglobin Formation by Triapine, Di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT), and Other Anticancer Thiosemicarbazones: Identification of Novel Thiosemicarbazones and Therapeutics That Prevent This Effect. *Molecular Pharmacology*, v. 82, p. 105-114, 2012.

RAO, P. D., CHEN, C.H., LIAO, C. C. **Chemical Communications**. p.155–156, 1995.

ROGERS, T.R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27S, p.S7–S11, 2006.

ROMAGNOLI R.; ET AL. Synthesis and biological evaluation of 2- and 3-aminobenzo[*b*]thiophene derivatives as antimetabolic agents and inhibitors of tubulin polymerization. **J Med Chem.**, v.9, p. 2273-2277, 2007.

RYU, C.K., ET AL. Synthesis and antifungal activity of 5-arylamino-4,7-dioxobenzo[*b*]thiophenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p. 2617–2620, 2005.

RYU, C.K., ET AL. Synthesis and antifungal activity of 5-arylamino-4,7-dioxobenzo[*b*]thiophenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p. 2617–2620, 2005.

SAINSBURY, M. Heterocyclic Chemistry. **Royal Society of Chemistry**, 2001.

SAKER, S.D.; NAHAR, L. Compostos heterocíclicos e seus derivados. In: Química para Estudantes de Farmácia: química geral, orgânica e de produtos naturais, Rio de Janeiro: **Ed. Guanabara Koogan**, p.121-129, 2009.

SALGIN-GÖKSENER, U., ET AL. 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: Synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p.5738–5751, 2007.

SAU, D. K., ET AL. Synthesis and spectroscopy of nickel(II) complexes with 5-methyl-3-formylpyrazole N(4)-methyl-N(4)-cyclohexyl thiosemicarbazone (HMPz4MCy): X-ray crystal structure of $[\text{Ni}(\text{HMPz4MCy})_2]\text{Cl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$. **Transition Metal Chemistry**. v. 29, p. 75–80, 2004.

SILVA, J. G., ET AL. Increasing the antibacterial activity of gallium(III) against *Pseudomonas aeruginosa* upon coordination to pyridine-derived thiosemicarbazones. **Polyhedron**, v. 28, p. 2301-2305, 2009.

SKEHAN, P., ET AL. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SOUZA, E. L.; ET AL. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18 n. 5, p. 409–413, 2007.

SRIDHAR, M., ET AL. Microwave accelerated Gewald reaction: synthesis of 2-aminothiophenes. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 3171-3172, 2007.

STEFANI, H.A. Introdução à Química de compostos heterocíclicos, Rio de Janeiro, **Ed. Guanabara Koogan**, p. 66-74, 2009.

STOCK, K., Gay, W. I. Tumor Transplantation. Methods of animal Experimentation. **Academic Press. New York and London**, v. 2, Cap. 3, p. 171-221. 1965.

TAVARES, L. C. QSAR: A abordagem de Hansch, **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TENÓRIO, R. P., ET AL. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância Biológica. **Química Nova**, v. 28, No. 6, 1030-1037, 2005.

THOMAS, G. Química Medicinal: Uma introdução. 1a ed., Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2003.

WARDAKHAN, W. W., ET AL. Studies on 2-aminothiophenes: synthesis, transformations and biological evaluation of functionally substituted thiophenes and their fused derivatives, **Phosph. Sul. Sil.** v. 180, p. 1815-1827, 2005.

WARDAKHAN, W. W., SHAMS, H. Z., MOUSTAFA, H. E. Synthesis of polyfunctionally substituted thiophene, thieno[2,3-b] pyrimidine and thieno[2,3-d] pyrimidine derivatives. **Phosphorous, Sulfur, silicon and Related Elements.** v. 180, p. 1815-1827, 2005.

WERMUTH, C. G., The Practice of Medicinal Chemistry, **Academic Press**, 2^a ed., 2003.