

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**SÍNTESE DE TIOSSEMICARBAZONAS SUBSTITUÍDAS E
DERIVADOS DE 4-TIAZOLIDINONAS E AVALIAÇÃO *in vitro*
CONTRA *Toxoplasma gondii***

Rômulo Pinto Tenório

Recife – 2005

Rômulo Pinto Tenório

**SÍNTESE DE TIOSSEMICARBAZONAS SUBSTITUÍDAS E
DERIVADOS DE 4-TIAZOLIDINONAS E AVALIAÇÃO *in vitro*
CONTRA *Toxoplasma gondii***

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

Área de concentração: Química de Produtos Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José da Silva Góes

Co-Orientador: Prof. Dr. José Gildo de Lima

Recife – 2005

Tenório, Rômulo Pinto

Síntese de tiossemicarbazonas substituídas e derivados de 4-tiazolidinonas e avaliação *in vitro* contra *Toxoplasma gondii* / Rômulo Pinto Tenório. – Recife : O Autor, 2005.

110 folhas. : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia, 2005.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Química medicinal – Síntese orgânica – Avaliação biológica. 2. Tiossemicarbazonas e 4-Tiazolidinonas – Síntese e avaliação antiprotozoária (*Toxoplasma gondii*). I. Título.

615.31
615.31

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR RÔMULO PINTO
TENÓRIO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 28 DE JANEIRO DE 2005 DIANTE DA
BANCA EXAMINADORA:



Dr. LOTHAR WILHELM BIEBER
Departamento de Química Fundamental - UFPE



Dra. ELBA LÚCIA CAVALCANTI DE AMORIM
Departamento de Farmácia - UFPE



Dr. EDÉSIO JOSÉ TENÓRIO DE MELO
Laboratório de Biologia Celular e Tecidual - UENF

“Tem certos dias em que eu penso em minha gente
E sinto assim todo o meu peito se apertar
Porque parece que acontece de repente
Como um desejo de eu viver sem me notar
Igual a como quando eu passo no subúrbio
Eu muito bem vindo de trem de algum lugar
E aí me dá como uma inveja dessa gente
Que vai em frente sem nem ter com quem contar
São casas simples com cadeiras na calçada
E na fachada escrito em cima que é um lar
Pela varanda flores tristes e baldias
Como a alegria que não tem onde encostar
E aí me dá uma tristeza no meu peito
Feito um despeito de eu não ter como lutar
E eu que não creio peço a Deus por minha gente
É gente humilde, que vontade de chorar.”

(Chico Buarque – Vinícius de Moraes)

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a meus pais, Rômulo Tenório e Maria José da Silva, a meus irmãos, Camilo e Vladimir, a minha esposa Denise Patricia e a minha filha Luísa. Pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, que me deu a oportunidade de realizar o curso de mestrado, sem dúvida, de muita importância em minha formação;

Ao orientador, Professor **Alexandre Góes**, pela concessão do laboratório de pesquisa, bem como, de todo material necessário para a realização deste trabalho, e pela atenção concedida durante toda a trajetória;

Ao co-orientador Professor **José Gildo de Lima**, pelas longas discussões a respeito deste trabalho e ciência em geral, bem como, pela orientação no desenvolvimento dos artigos;

Ao Professor **Edésio José T. de Melo** e a toda sua equipe, pela realização dos ensaios biológicos;

Ao Professor **Antônio Rodolfo de Faria**, pelo exemplo de profissionalismo e pela amizade desenvolvida durante o curso de mestrado. Um agradecimento especial também para Marcelo, Elis, Nádia e Valderes, pelos momentos de alegria;

Ao pessoal do **LASSINT**, em especial a Thiago e Priscila, pela amizade, companheirismo e camaradagem em todos os momentos de trabalho;

Aos **Professores do mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos**, em especial a Professora **Glícia Calazans**, pelo exemplo de profissional e pela convivência sempre amigável;

Às Professoras **Eulália Camelo** e **Magali**, pela amizade e atenção dispensadas durante o curso de mestrado;

À secretária do curso de mestrado em **Biotecnologia de Produtos Bioativos**, **Maria Sueli**, pelo carinho e atenção;

A todos os colegas do departamento de antibióticos, em especial para: **Ivanildo, Joás Lucas, Manuela, Cláudia, Rita, Gerson, Renata, Janaína, Chico, Lourinalda, Danilo e Lauren**;

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos, pela amizade;

A todos os vigilantes, em especial para: **Melo, Alberto, Brito, Jorge e Hemenergildo;**

Ao pessoal da Central Analítica, em especial para **Eliete, Severino, Juliana e Ricardo**, este último pelas longas discussões sobre RMN que sem dúvida enriqueceram o meu conhecimento;

À **CAPES** pelo fornecimento da bolsa de pesquisa;

Aos demais amigos e a **minha Família**, meus sinceros agradecimentos por todo o incentivo.

SUMÁRIO

	Pág.
ABREVIATURAS	
LISTA DE ESQUEMAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Aspectos gerais do <i>T. gondii</i>.	22
2.1.1. Ciclo biológico de <i>T. gondii</i> .	22
2.1.2. Considerações epidemiológicas de <i>T. gondii</i> .	24
2.1.3. Manifestações clínicas e tratamento: considerações gerais.	24
2.2. Tiossemicarbazonas	26
2.2.1. Obtenção direta das tiossemicarbazonas.	28
2.2.2. Considerações a respeito das atividades antiprotozoárias de tiossemicarbazonas.	30
2.3. 4-Tiazolidinonas	31
2.3.1. Considerações a respeito das propriedades antiprotozoárias de 4-tiazolidinonas.	34
2.4. Objetivos	35
2.4.1. Geral.	35
2.4.2. Específicos.	36

3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Parte experimental	38
3.1.1. Cromatografias.	38
3.1.2. Pontos de fusão.	38
3.1.3. Espectrometrias.	38
3.1.4. Solventes destilados e reagentes.	39
3.1.5. Reagentes e solventes.	39
3.1.6. Parasitas utilizados.	40
3.1.7. Equipamentos utilizados.	40
3.2. Procedimentos experimentais	41
3.2.1. Procedimento geral para a obtenção das tiossemicarbazonas.	41
3.2.2. Procedimento geral para a obtenção dos derivados de 4-tiazolidinonas.	47
3.3. Estudo biológico	55
3.3.1. Determinação da atividade in vitro dos compostos sintetizados contra <i>T. gondii</i> .	55
3.3.1.1. Preparação da Cultura de Parasitas.	55
3.3.1.2. Preparação das Células Hospedeiras.	56
3.3.1.3. Interação Parasita-Hospedeiro.	56
3.3.1.4. Microscopia ótica.	57
3.3.1.5. Microscopia eletrônica.	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1. Esquema de síntese e moléculas alvo	59
4.1.1. Moléculas alvo.	59
4.2. Metodologia de síntese aplicada	60
4.2.1. Obtenção dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas substituídos.	60
4.2.2. Mecanismo da reação.	62

4.2.3. Obtenção dos derivados de 4-tiazolidinonas.	63
4.2.4. Mecanismo da reação.	64
4.3. Caracterização das estruturas	66
4.3.1. Espectros de infravermelho (IV) dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas substituídos (3a – 3j).	66
4.3.2. Espectros de infravermelho dos derivados de 4-tiazolidinonas (4a – 4j).	69
4.3.3. Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H) dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas substituídos (3a – 3j).	72
4.3.4. Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H) e carbono (RMN ¹³ C) dos derivados de 4-tiazolidinonas (4a – 4j).	78
4.4. Resultados do estudo biológico	82
4.5. Discussão do estudo biológico	87
5. CONCLUSÃO	92
5.1. Conclusão	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
6.1. Referências bibliográficas	95
7. ANEXOS	111

ABREVIATURAS

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome (síndrome da imunodeficiência adquirida).
RR	Ribonucleotídeo redutase.
HIV	Human immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana).
IUPAC	International union of pure and applied chemistry (união internacional de química pura e aplicada).
Å	Angstron.
RMN	Ressonância magnética nuclear.
IV	Infravermelho.
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido deoxiribonucléico).
°C	Graus Celsius.
Rend.	Rendimento.
CCD	Cromatografia em camada delgada.
UV	Ultravioleta.
v	“nu”. Frequência vibracional.
cm⁻¹	Número de onda.
KBr	Brometo de potássio.
MHz	Megahertz.
CDCl₃	Clorofórmio deuterado.
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado.
δ	Deslocamento químico.
TMS	Tetrametilsilano.
Hz	Hertz.
DMF	Dimetilformamida.

DMSO	Dimetilsulfóxido.
CHCl₃	Clorofórmio.
PBS	Phosphate buffer solution (solução tampão de fosfato).
FCS	Fetal calf serum (soro fetal bovino).
CaCl₂	Cloreto de cálcio.
mL	Mililitro.
Pf	Ponto de fusão.
ppm	Partes por milhão
<i>J</i>	Constante de acoplamento.
arom	Aromático.
<i>m</i>	Posição <i>meta</i> .
<i>o</i>	Posição <i>orto</i> .
<i>p</i>	Posição <i>para</i> .
C_q	Carbono quaternário.
eq.	Equivalentes.
mM	Milimolar.
M	Molar.
EtOH	Etanol.
M. M.	Massa molecular.
R_f	Razão de frente.
R %	Rendimento.
Hex	Hexano.
AcOEt	Acetato de etila.
K	Kelvin (medida de temperatura).
HU	Hidroxiuréia.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Ciclo biológico do <i>T. gondii</i> .	23
Esquema 2.	Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas.	27
Esquema 3	Análise retrossintética de tiossemicarbazonas.	28
Esquema 4.	Reação de formação de tiossemicarbazonas.	28
Esquema 5.	Obtenção de tiossemicarbazonas derivadas de isatinas pelo método convencional (a) e em solução neutra (b).	29
Esquema 6.	Estratégias de preparação de 4-tiazolidinonas a partir de tiossemicarbazonas.	32
Esquema 7.	4-Tiazolidinonas preparadas pela reação de tiossemicarbazonas e ácido carboxílicos α -halogenados e ésteres α -halogenados.	33
Esquema 8.	Diminuição da reatividade de tiossemicarbazonas N-4 fenil substituídas frente a ésteres de etila α -halogenados.	33
Esquema 9.	Rota sintética empregada na preparação das tiossemicarbazonas (3) e derivados de 4-tiazolidinonas (4).	59
Esquema 10.	Obtenção dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas substituídos.	61
Esquema 11.	Mecanismo de formação dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas (3a – 3j).	62
Esquema 12.	Obtenção dos derivados de 4-tiazolidinonas.	63
Esquema 13.	Mecanismo de formação de 4-tiazolidinonas (4) a partir de tiossemicarbazonas (3) e anidrido maléico.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Hidroxiuréia (a), tiossemicarbazona (b) e 4-tiazolidinona (c).	20
Figura 2.	Fotomicrografia eletrônica de <i>T. gondii</i> .	22
Figura 3.	Pirimetamina (a), sulfadiazina (b) e azitromicina (c).	25
Figura 4.	Estrutura das tiossemicarbazonas.	26
Figura 5.	Comprimentos das ligações de tiossemicarbazonas em Angstrom (Å).	26
Figura 6.	Tiossemicarbazonas com potencial atividade antiprotozoária.	31
Figura 7.	Estrutura e numeração de 4-tiazolidinona.	31
Figura 8.	Similaridade estrutural de tiossemicarbazonas e derivados de 4-tiazolidinonas.	35
Figura 9.	Planejamento das tiossemicarbazonas (b) e dos derivados de 4-tiazolidinonas (c), a partir da hidroxiuréia eleita como protótipo. (d) Ciclização.	36
Figura 10.	Fórmulas dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas substituídos (3a – 3j).	59
Figura 11.	Fórmula dos derivados de 4-tiazolidinonas substituídos (4a – 4j).	60
Figura 12.	Espectro IV do p-nitro-benzaldeído tiossemicarbazona 3b mostrando as principais bandas.	67
Figura 13.	Espectros de IV das substâncias: m-nitro-benzaldeído-4-metil-tiossemicarbazona (3d) e do o-nitro-benzaldeído-4-fenil-tiossemicarbazona (3i), respectivamente.	68
Figura 14.	Espectro de IV do ácido [2-(p-nitro-benzilideno-hidrazono)-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4b) mostrando as principais bandas.	70
Figura 15.	Espectro de IV do ácido [2-(o-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-metil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4c).	71
Figura 16.	Espectro de IV do ácido [2-(m-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-fenil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4j).	71
Figura 17.	Espectros de RMN ¹ H da substância 3b em DMSO-d ₆ , mostrando a coalescência do sinal pelo experimento de variação da temperatura.	73

Figura 18.	Modelo de ressonância de duas estruturas para tioamidas.	74
Figura 19.	Espectro de RMN ^1H da substância 3g em CDCl_3 .	75
Figura 20	Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 3g , mostrando os acoplamentos entre os hidrogênios de metila, metileno e N-H terminal.	75
Figura 21.	Espectros de RMN ^1H da substância 3b , mostrando apenas um isômero configuracional em DMSO-d_6 pelo experimento de variação do tempo. (a) Espectro obtido logo após a preparação da amostra.	76
Figura 22.	Espectro de RMN ^1H da substância 3i em DMSO-d_6 .	77
Figura 23.	Espectro de RMN ^1H da substância 4a em DMSO-d_6 .	80
Figura 24.	Espectro de RMN ^{13}C da substância 4b em DMSO-d_6 .	81
Figura 25.	Espectro de RMN ^{13}C , sequência de pulsos DEPT 135, da substância 4b .	81
Figura 26	Células hospedeiras infectadas tratadas com as substâncias sintetizadas e com a hidroxiuréia após 24 horas de incubação.	84
Figura 27.	Número relativo de parasitas intracelulares em células Vero infectadas após o tratamento com as substâncias 3a – 3j e com a hidroxiuréia após 24 horas de incubação.	84
Figura 28.	Número relativo de parasitas intracelulares em células Vero infectadas após o tratamento como as substâncias 4a – 4j e com a hidroxiuréia após 24 horas de tratamento.	85
Figura 29.	Microscopia ótica de células Vero infectadas com <i>T. gondii</i> por 24 h (a) e após incubação com as substâncias 4i (b) e 4a (c e d).	85
Figura 30.	Microscopia eletrônica mostrando alterações na morfologia de <i>T. gondii</i> após o tratamento com a substância 4b .	86
Figura 31.	Relação estrutura-atividade das tiossemicarbazonas contra células infectadas com <i>T. gondii</i> .	87
Figura 32.	Relação estrutura-atividade dos derivados de 4-tiazolidinonas contra células infectadas com <i>T. gondii</i> .	88
Figura 33.	Comparação do potencial em reduzir o número de células infectadas com <i>T. gondii</i> das tiossemicarbazonas e dos derivados de 4-tiazolidinonas.	88
Figura 34.	Relação estrutura-atividade das tiossemicarbazonas versus o número	89

médio de parasitas intracelulares.

Figura 35 Relação estrutura-atividade dos derivados de 4-tiazolidinonas versus o número médio de parasitas intracelulares. **90**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Rendimentos e propriedades físico-químicas das tiossemicarbazonas (3a – 3j).	61
Tabela 2.	Rendimentos e propriedades físico-químicas dos derivados de 4-tiazolidinonas (4a – 4j).	63
Tabela 3.	Principais bandas de absorção do espectro de IV para os compostos 3a – 3j .	66
Tabela 4.	Principais bandas de absorção do espectro de IV para os compostos 4a – 4j .	69
Tabela 5.	Principais deslocamentos químicos de RMN ¹ H (300 MHz, ppm, DMSO-d ₆) das substâncias 3a – 3j .	72
Tabela 6.	Principais deslocamentos químicos de RMN ¹ H (300 MHz, ppm, DMSO-d ₆) das substâncias 4a – 4j .	78
Tabela 7.	Principais deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (75,4 MHz, ppm, DMSO-d ₆) das substâncias 4a – 4j .	79
Tabela 8.	Atividade biológica in vitro contra <i>T. gondii</i> das substâncias sintetizadas.	82

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasita unicelular responsável pela toxoplasmose, doença de alta gravidade em pacientes imunodeprimidos devido ao seu caráter oportunista. Os fármacos empregados no tratamento levam a severos efeitos adversos. Neste cenário, faz-se urgente a descoberta de novas substâncias com potencial atividade anti-*T. gondii*. A enzima ribonucleotídeo redutase, vem sendo relacionada como possível alvo quimioterapêutico. As tiossemicarbazonas, por sua vez, apresentam comprovada eficácia na inibição desta enzima. Neste sentido, sintetizamos uma série de tiossemicarbazonas e derivados de 4-tiazolidinonas e avaliamos seu potencial contra *T. gondii*. As tiossemicarbazonas (**3a – 3j**) foram preparadas a partir de nitro-benzaldeídos e tiossemicarbazidas substituídas, em etanol sob refluxo e purificadas por lavagem com solvente apropriado. Na segunda etapa, as tiossemicarbazonas foram ciclizadas utilizando o anidrido maléico para formar as 4-tiazolidinonas (**4a – 4j**). Todas as estruturas foram confirmadas por RMN ^1H , ^{13}C e IV. Quanto à atividade biológica, células Vero foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* por 24 h, e após esse período, incubadas com as substâncias sintetizadas por mais 24 horas. Todas as substâncias reduziram drasticamente a percentagem de células Vero infectadas após o tempo de incubação, bem como o número de parasitas intracelulares, causando graves alterações morfológicas no parasita intracelular sem afetar a célula hospedeira, conforme observado por microscopia ótica e eletrônica. Dentre estas, as substâncias **3a**, **3b**, **4h** e **4i** mostraram os melhores resultados.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a unicellular protozoa responsible for toxoplasmosis, a disease known for its great importance to immunodepressed patients due to its opportunistic character. The current chemotherapy against human toxoplasmosis involves undesirable side effects. In this sense, it makes urgent the discovery of new compounds with potential activity against *T. gondii*. The enzyme ribonucleotide reductase has been related as a possible chemotherapeutic target. The thiosemicarbazones, on the other hand, are known inhibitors of this enzyme. In this way, we synthesized a series of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and we evaluated their potential against *T. gondii*. The thiosemicarbazones (**3a** – **3j**) were prepared from substitutes nitro-benzaldehydes and thiosemicarbazides, in ethanol under reflux and purified by washing with appropriated solvent. In the second step, the thiosemicarbazones were cyclized utilizing the maleic anhydride to prepare the 4-thiazolidinones (**4a** – **4j**). The structures of all compounds were established on the basis of their NMR spectroscopic data and IR. In respect to biological activity, Vero cells were infected with tachyzoites of *T. gondii* for 24 h, and after this time, incubated with the synthesized compounds for more 24 hours. All the compounds caused a drastic decrease in the percentage of Vero cells infected after the time of incubation, as like as the number of intracellular parasites, causing serious morphologic alterations in the intracellular parasite without affecting the host cell, according to the observations by optic and electronic microscopy. Among these compounds, **3a**, **3b**, **4h** and **4i** showed the best results.

1. *INTRODUÇÃO*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório, causador da toxoplasmose. Ele pertence ao filo Apicomplexa e encontra-se globalmente distribuído principalmente nas áreas de clima tropical (MOHAMED et al., 2003; DEGERLI et al., 2003). Atualmente, estima-se que 500 milhões de pessoas em todo mundo estejam infectadas com *T. gondii* (MOHAMED et al., 2003).

A quimioterapia atualmente empregada no tratamento da toxoplasmose envolve indesejáveis efeitos adversos e não é efetiva em eliminar os parasitas alojados no sistema nervoso central (BHOPALE, 2003; DEGERLI et al., 2003). A ineficiência dos procedimentos terapêuticos em eliminar a forma infectante do *T. gondii*, chamado taquizoíta, é devido ao fato deste protozoário ser um parasita intracelular obrigatório; multiplicando-se e desenvolvendo-se, dentro do citoplasma da célula hospedeira (DEGERLI et al., 2003; MELO et al., 2000).

Os taquizoítas de *T. gondii* infectam as células eucarióticas em diferentes tecidos do organismo, sendo responsáveis por lesões histológicas, principalmente no sistema nervoso central (DUBEY, 1998; YAZAR et al., 2003). Além disso, os parasitas podem desenvolver cistos no cérebro, e quando reativados em pacientes imunodeprimidos, podem levar a encefalite toxoplasmica (DUBEY, 1998).

Com o advento da AIDS (síndrome da imunodeficiência humana adquirida), a incidência mundial de infecções causadas pelo *T. gondii* tem aumentado (CAMPAGNA, 1997). Nos Estados Unidos da América, entre 18% a 25% dos pacientes com AIDS sofrerão de toxoplasmose sintomática durante o curso da sua doença (KASPER; BUZONI-GATEL, 1998).

Estudos recentes utilizando a hidroxiuréia (figura 1a) demonstraram que essa substância é eficaz na eliminação *in vitro* de *T. gondii*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*, interrompendo o ciclo celular na fase G1/S através da inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (RR) (MELO et al., 2000, 2003). Inibidores desta enzima são extremamente efetivos em bloquear a biossíntese de DNA (LI et al., 1998a).

A hidroxiuréia, entretanto, é pouco efetiva uma vez que possui pouca afinidade pela RR e um curto tempo de meia-vida no plasma (GWILT et al., 1998). Por outro lado, as tiossemicarbazonas (figura 1b) representam uma classe de compostos que estão entre os mais eficazes inibidores da RR conhecidos, sendo 1000 vezes mais potentes que a hidroxiuréia *in vitro* (LI et al., 1998b).

As tiossemicarbazonas geralmente reagem como ligantes organometálicos pela ligação através do átomo de enxofre e do nitrogênio azometina, formando quelatos (SHAILENDRA et al., 2003). Tal característica molecular está relacionada com as suas ações farmacológicas (WALCOURT et al., 2004). Vários trabalhos relatam a sua atividade biológica contra protozoários, como *Plasmodium falciparum* (WALCOURT et al., 2004), *T. cruzi* (GREENBAUM et al., 2004), *Trichomonas vaginalis*, e outros parasitas (BHARTI et al., 2002).

Em adição, as tiossemicarbazonas podem também ser visualizadas como análogos estruturais das 4-tiazolidinonas que apresentam um grupo hidrazona condensado na posição 2 (figura 1c). Compostos que possuem o núcleo 4-tiazolidinona, em geral, são de interesse biológico, devido ao seu largo espectro de atividade, tais como, antimicrobiana (BONDE; GAIKWAD, 2004), antiviral (RAO et al., 2004), antiinflamatória (VIGORITA et al., 2003), hipnótica (ERGENÇ et al., 1999) e antiprotozoária (ALVES et al., 1993; Seebacher et al, 2004).

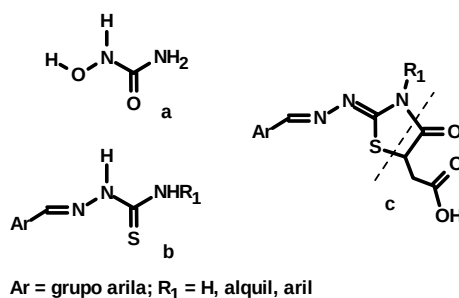


Figura 1. Hidroxiuréia (a), tiossemicarbazona (b) e 4-tiazolidinona (c)

Recentemente, nós demonstramos os efeitos de algumas tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas no desenvolvimento de *T. gondii* (TENÓRIO et al., 2004). Nossos resultados mostraram uma grande especificidade pelos compostos sintetizados contra o parasita, sem afetar a célula hospedeira. No presente estudo, nós ampliamos o número de moléculas, pela variação dos substituintes e mantendo o mesmo esqueleto central, com o objetivo de realizar uma possível relação estrutura-atividade contra *T. gondii*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ASPECTOS GERAIS DO *T. GONDII*

T. gondii é um protozoário unicelular pertencente ao Filo Apicomplexa, assim como os agentes causadores da malária, *Plasmodium* sp, e da coccidiose, *Eimeria* sp; apresentando-se largamente distribuído em todo mundo, principalmente nas áreas de clima tropical, sendo capaz de infectar diversos vertebrados (GAGNE, 2001; BOOTHROYD; GRIGG, 2002; DEGERLI et al., 2003). A figura abaixo, mostra a fotomicrografia eletrônica ultra-estrutural do *T. gondii* (Figura 2).



Figura 2. Fotomicrografia eletrônica de *T. gondii*. Barra equivalente a 1µm. **Fonte:** SOLDATI, 1999

2.1.1. Ciclo Biológico de *T. gondii*

O ciclo biológico deste parasita é heterogenético e heteroxênico, tendo como hospedeiro intermediário o homem e outros animais, e os gatos domésticos e demais Felídeos como hospedeiro definitivo (DUBEY, 1998; NEVES et al., 2000).

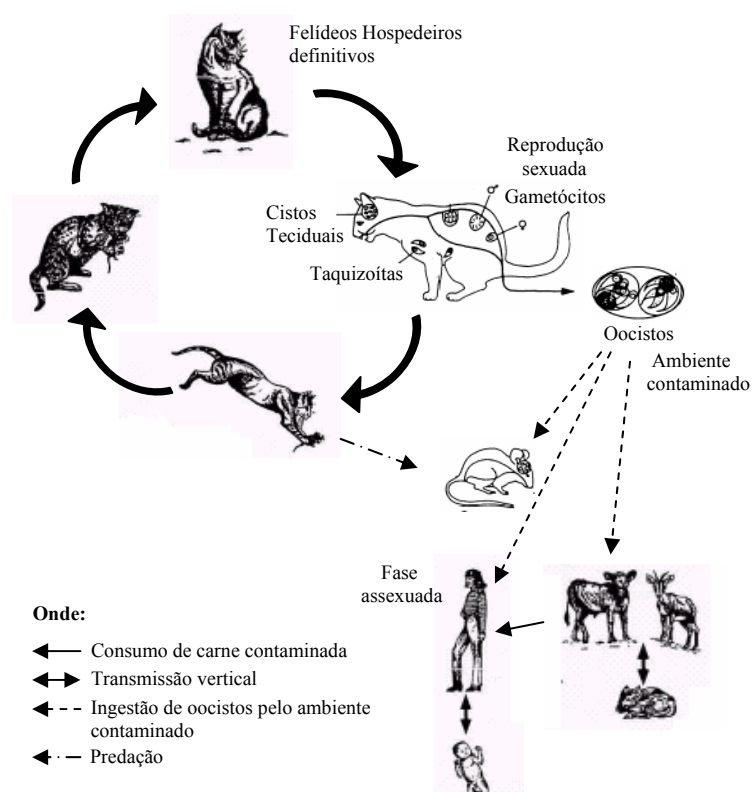
Os Felídeos são os únicos hospedeiros que apresentam as duas fases do ciclo biológico: sexuada e assexuada (GAGNE, 2001). A fase sexuada desenvolve-se nas células do epitélio intestinal e é responsável pela formação dos oocistos que são liberados nas fezes (GAGNE, 2001; DUBEY, 1998). Uma vez no meio ambiente, os oocistos sofrem esporulação liberando, cada um, 4 (quatro) esporozoítos altamente infectantes (GAGNE, 2001; NEVES et al., 2000).

A fase assexuada inicia-se após ingestão das formas infectantes do *T. gondii* - taquizoíta, bradizoíta, oocistos ou esporozoítos (NEVES et al., 2000). Isso pode ocorrer

através de água e leite contaminados, carne crua, oocistos liberados nas fezes de gatos, dentre outros modos (BHOPALE, 2003; LYONS et al., 2002; GARCIA et al., 1999). O homem e outros hospedeiros intermediários desenvolvem apenas esta fase do ciclo.

Após infecção inicial, tem-se rápida multiplicação, caracterizada pela presença de taquizoítas em vários tecidos (NEVES et al., 2000; LYONS et al., 2002). Esta fase de multiplicação celular ocorre dentro de vacúolos, conhecidos como vacúolos parasitóforos, que protegem o parasita de agressores externos. Após divisões sucessivas, ocorre o rompimento da célula parasitada liberando os novos taquizoítas que invadirão novas células (MELO et al., 2000; NEVES et al., 2000).

Passado alguns dias, os taquizoítas evoluem para a forma bradizoíta e formam cistos em diversos locais do organismo. Estes cistos podem ficar retidos por anos e serem reativados caso haja uma queda acentuada no sistema imunológico (LYONS et al., 2002; BHOPALE, 2003). Abaixo, pode-se ver um esquema do ciclo biológico do *T. gondii* (Esquema 1)



Esquema 1. Ciclo biológico do *T. gondii*

2.1.2. Considerações epidemiológicas de *T. gondii*

T. gondii é um protozoário de ampla distribuição geográfica (BHOPALE, 2003). Em algumas regiões do planeta, 50-90% da população apresenta títulos sorológicos contra o parasita, denotando algum tipo de prévia exposição. Alguns países como a França e o Taiti apresentam alta prevalência (60 – 70%) (AVELINO et al., 2003).

Nos Estados Unidos, apesar da baixa prevalência sorológica (20 – 25%), cerca de 18 a 25% dos pacientes com AIDS sofrerão de toxoplasmose sintomática durante a doença (GAGNE, 2001; KASPER; BUZONI-GATEL, 1998).

Por outro lado, estudos realizados no Brasil em populações urbanas e rurais demonstraram alta soropositividade, geralmente acima de 50% nas amostras analisadas (COUTINHO et al., 1981). Garcia et al. (1999), relatou a soropositividade de 82,9% numa amostragem de 82 pacientes do município de Jaguapitã localizado ao norte do estado do Paraná. Em outros municípios do Paraná, como Guaraci e Londrina, foram registrados títulos elevados, de 71 e 75% respectivamente, ambos na região rural (GARCIA et al., 1999). Segundo Bonametti et al. (1997), tais variações devem-se principalmente a fatores geográficos e hábitos alimentares.

Roberts et al. (1994) estimou em 5,3 bilhões de dólares o custo anual das perdas com cuidados médicos, perda em produtividade e gastos com educação especial para a toxoplasmose congênita nos Estados Unidos no ano de 1993. Mais recentemente, foram calculados em 7,7 bilhões de dólares por ano o custo com toxoplasmose congênita (GAGNE, 2001).

2.1.3. Manifestações clínicas e tratamento: considerações gerais

Em geral, as manifestações clínicas da toxoplasmose estão associadas com o grau imunológico do paciente (BHOPALE, 2003). Adultos e jovens imunocompetentes geralmente apresentam quadro assintomático, com algumas exceções apresentando linfadenopatia e letargia como os sintomas mais freqüentes (GAGNE, 2001). Contudo, recentemente foi

detectado a forma mais grave da doença, caracterizada por abscessos cerebrais, em paciente sem evidência de imunossupressão (SILVA et al., 2001).

Como mencionado anteriormente, as formas mais graves da doença estão associadas com as deficiências imunológicas do indivíduo. Sendo assim, com o surgimento da AIDS houve um aumento na incidência de infecções oportunistas causadas pelo *T. gondii*, especialmente no sistema nervoso central (NEVES et al., 2000; CAMPAGNA, 1997). Na França, a toxoplasmose cerebral representa uma das infecções mais comuns em pacientes infectados com HIV (BOSSI et al., 1998).

Outra forma grave da doença é a toxoplasmose congênita. Ela pode ter complicações fatais para o feto ou manifestações clínicas como, coriorretinite, calcificações do tecido cerebral, hidrocefalia e retardo mental ou psicomotor (DEGERLI et al., 2003, NEVES et al., 2000).

Atualmente, o tratamento de pacientes com toxoplasmose é feito pela combinação sinérgica da pirimetamina e da sulfadiazina. Entretanto, tal associação causa severos efeitos adversos, como depressão da medula óssea em pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles que fazem uso de quimioterápicos (DEGERLI et al., 2003, DRIESSEN et al., 2002).

Por outro lado, a azitromicina, um antibiótico macrolídeo semi-sintético, tem sido cogitado como possível agente potencial no tratamento de pacientes com a infecção, porém estudos vêm mostrando que este fármaco é pouco eficiente na eliminação dos parasitas localizados ao nível de tecido cerebral (DEGERLI et al., 2003) (Figura 3).

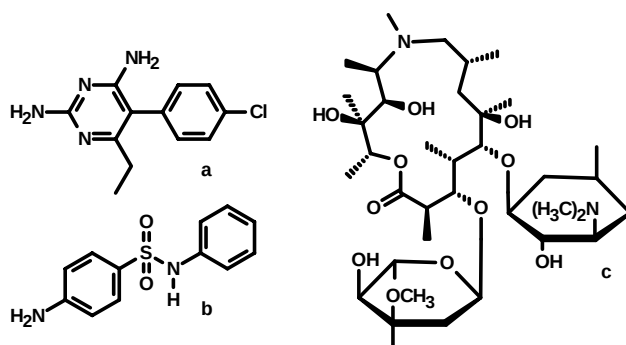


Figura 3. Pirimetamina (a), sulfadiazina (b) e azitromicina (c)

De qualquer forma, embora o uso da combinação da pirimetamina com sulfadiazina continue muito efetiva, a utilização dessas duas substâncias, notadamente em indivíduos infectados com HIV, com frequência resulta em elevada incidência de reações adversas.

Dessa forma, faz-se necessário a busca por substâncias alternativas que minimizem esses efeitos e sejam eficazes na eliminação do *T. gondii*.

2.2. TIOSSEMICARBAZONAS

Tiossemicarbazonas são compostos de considerável interesse científico devido as suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antitumoral (FEUN et al., 2002), antibacteriana (KASUGA et al., 2003), antiviral (TEITZ et al., 1994), antiprotozoária (BHARTI et al., 2002), citotóxica (KARAH, 2002), dentre outras. A estrutura química das tiossemicarbazonas e a numeração dos seus átomos segundo a IUPAC (PÂNICO et al., 1993) é mostrado na Figura 4.

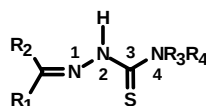


Figura 4. Estrutura das tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas apresentam-se como sistemas extremamente deslocalizados, principalmente quando há grupos aromáticos ligados ao carbono da imina (PALENIK et al., 1974). A figura 5 mostra esquematicamente a influência dos comprimentos de ligação na deslocalização dos elétrons π nas tiossemicarbazonas.

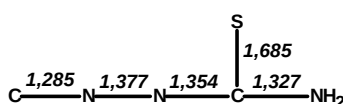
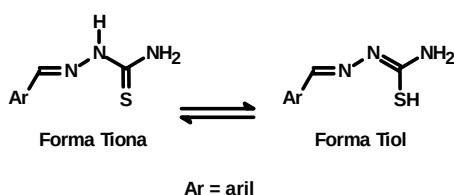


Figura 5. Comprimentos das ligações de tiossemicarbazonas em Angstrom (Å)

Pode-se observar que o fragmento N-C-N apresenta um comprimento de ligação muito próximo ao observado para as duplas ligações (C=C, 1,201 – 1,246 Å), enquanto que na ligação C-S (1,685 Å), ocorre exatamente o inverso, indicando que o átomo de enxofre permite um maior envolvimento das duas ligações C-N na deslocalização dos elétrons π (ALLEN et al, 1983; CASAS et al., 2000). De fato, tiossemicarbazonas que não possuem substituintes na posição N-4 apresentam o esqueleto central quase planar, permitindo desta forma uma melhor sobreposição dos orbitais livres (CASAS et al., 2000).

O caráter parcialmente duplo da ligação C-N pode também ser facilmente evidenciado pela espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), uma vez que os hidrogênios em NH_2 aparecem como dois sinais não equivalentes. Isto acontece devido à rotação restrita da ligação C-NH₂ por conta da dupla ligação parcial, que desta forma, torna os hidrogênios diastereotópicos (TARASCONI et al., 2000; JOUAD et al., 2001). À temperaturas elevadas ($\sim 323\text{ K}$) estes sinais coalescem como mostra o trabalho de Ferrari e colaboradores (FERRARI et al., 1994).

Devido a esta deslocalização, as tiossemicarbazonas podem coexistir na forma tiona ou tiol em equilíbrio tautomérico (Esquema 2).

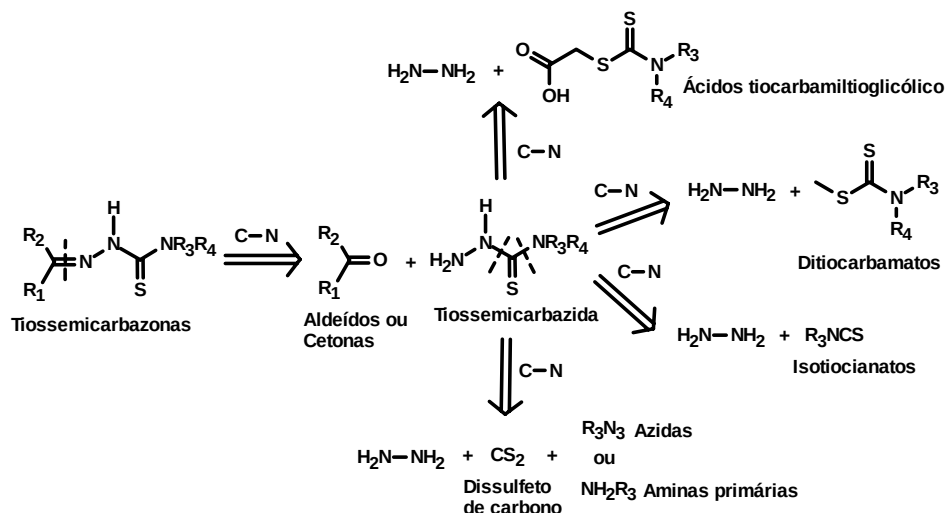


Esquema 2. Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas

De qualquer forma, o espectro de infravermelho (IV) mostra a forma predominante neste tautomerismo, uma vez que o aparecimento de uma banda forte na região de $1028\text{-}1082\text{ cm}^{-1}$ indica a presença da tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$). Contudo, a ausência desta banda e o aparecimento de outra na região de $2500\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ demonstra que a forma tiol é mais predominante (BHARTI et al., 2003; ANTONINI et al., 1977).

Vale ressaltar que, o baixo valor da banda de estiramento de $\text{C}=\text{S}$ é devido ao seu acentuado caráter de ligação simples, e que esta pode variar de acordo com o seu ambiente químico (GALABOV et al., 2003; LAUVERGNAT; HIBERTY, 1997; VASSILEV; DIMITROV, 2003; CREWS et al., 1998).

A preparação de tiossemicarbazonas é extensamente explorada e descrita na literatura (LI et al., 1998a; TARASCONI et al., 2000; HOLLA et al., 2003; SHAIENDRA et al., 2003). Duas estratégias podem ser empregadas na síntese destes compostos: obtenção direta, pela reação quimiosseletiva de aldeídos e/ou cetonas com as tiossemicarbazidas; e obtenção indireta, através da preparação prévia das tiossemicarbazidas; utilizando hidrazina ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$) e diferentes reagentes; seguido da condensação com o derivado carbonilado específico (Esquema 3).

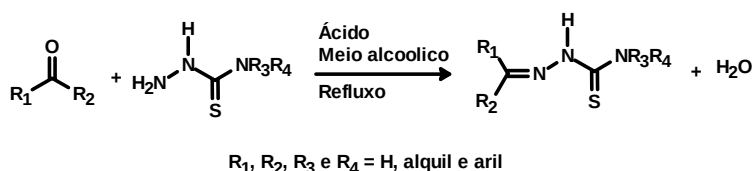


Esquema 3. Análise retrossintética de tiossemicarbazonas

No presente trabalho foi adotado o método direto de preparação das tiossemicarbazonas devido a maior facilidade das reações e disponibilidade dos reagentes.

2.2.1. Obtenção direta das tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazidas podem ser adquiridas comercialmente. A síntese é descrita pela condensação equimolar de um derivado carbonilado, do tipo aldeído ou cetona, com tiossemicarbazidas em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido (HOLLA et al., 2003; SARODNICK et al., 2003). Esta reação é bastante conhecida por sua alta quimiosseletividade, versatilidade e rapidez, apresentando geralmente altos rendimentos (HANG; BERTOZZI, 2001; RODRIGUEZ et al., 1998; BENBROOK et al., 1997) (Esquema 4).



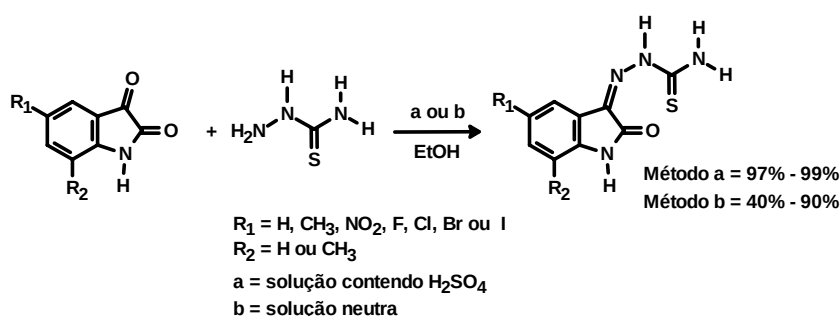
Esquema 4. Reação de formação de tiossemicarbazonas

Vários derivados de tiossemicarbazona foram obtidos utilizando as condições reacionais descritas acima. Karah (2002) trabalhando com derivados de isatina, reagiu estes com a tiossemicarbazida e obteve tiossemicarbazonas em rendimentos elevados, alguns

variando de 97% a 99% (Esquema 5, **a**). Neste trabalho, a síntese foi realizada em solução etanólica, sob refluxo, contendo quantidades catalíticas de ácido sulfúrico concentrado. Em outro estudo, Benbrook et al. (1997) sintetizaram tiossemicarbazonas derivadas de heteroarotinoides, um conhecido sistema molecular derivado de retinóides (WAUGH et al., 1985), utilizando ácido acético como catalisador. Aqui, a condensação da tiossemicarbazida com o aldeído correspondente também forneceu facilmente a molécula alvo em rendimentos satisfatórios de 83%.

Alguns autores, contudo, efetuaram uma pequena modificação neste método e observaram que as tiossemicarbazonas também poderiam ser sintetizadas em solução neutra, indicando que possivelmente o emprego do ácido não seria uma condição indispensável para a formação dessas moléculas (SHAIENDRA et al., 2003; AFRASIABI et al., 2003).

Neste sentido, Chiyanzu et al. (2003) demonstraram que as tiossemicarbazonas derivadas de isatina, que tinham sido anteriormente obtidas por Karah (2002) utilizando o método convencional, também eram facilmente sintetizadas sem o auxílio de catalisadores (Esquema 5, **b**).



Esquema 5. Obtenção de tiossemicarbazonas derivadas de isatinas pelo método convencional (a) e em solução neutra (b)

Tiossemicarbazonas são geralmente obtidas como misturas de isômeros *E* e *Z* no estado sólido (LEMKE et al., 1977). Em solução, há isomerização da configuração *Z* para *E* devido a sua maior estabilidade termodinâmica (OTA et al., 1998). Utilizando técnicas de espectroscopia Raman e RMN ^1H , Temperini et al. (1995) mostraram a predominância do isômero *E* da 2-formil-piridina tiossemicarbazona em DMSO e em meio aquoso.

A isomerização é extremamente influenciada pela presença de ácidos e pela natureza dos grupos substituintes ligados ao carbono azometina ($\text{CH}=\text{N}$), bem como, pelos substituintes ligados ao nitrogênio da tioamida (N-4).

Karabatsos et al. (1964) mostraram, em estudos utilizando RMN ^1H , que os hidrogênios azometina de tiossemicarbazonas na configuração *E* ressonam a frequências menores em relação a tiossemicarbazonas em configuração *Z*, mesmo em diferentes solventes. Resultado semelhante foi obtido por Antonini et al. (1977) alguns anos depois.

De regra geral, as tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos, tendem a formar preferencialmente o isômero *E*, termodinamicamente mais estável, enquanto que as derivadas de cetonas assimétricas, a proporção entre *E* e *Z* depende da estrutura dos substituintes ligados a carbonila (COSTA et al., 2003).

2.2.2. Considerações a respeito das atividades antiprotozoárias de Tiossemicarbazonas

Como mencionado anteriormente, as tiossemicarbazonas pertencem a uma classe de substâncias bastante conhecidas por suas importantes aplicações na pesquisa de novos fármacos por conta do seu largo espectro de ação (SILVA et al., 1998).

Alguns autores atribuem esta propriedade à alta afinidade que as tiossemicarbazonas apresentam pela enzima ribonucleotídeo reductase, enzima responsável pelo passo crucial na síntese do DNA e conseqüentemente da divisão celular (LOUIE, 1999; CORY, 1988). Outros consideram as suas propriedades biológicas à capacidade que estas apresentam de formar complexos com cátions metálicos, formando quelatos (BHARTI et al, 2003). Por outro lado, Greenbaum et al. (2004) sugeriram que o mecanismo de ação das tiossemicarbazonas é ainda complexo e deve ser mediado através da inibição de múltiplos alvos.

Diversos tipos de protozoários foram estudados quanto as suas suscetibilidades às tiossemicarbazonas, como relatam trabalhos recentemente publicados (WALCOURT et al., 2004; SINGH et al., 2004).

Bharti et al. (2002) efetuaram testes antiprotozoários de alguns derivados tiossemicarbazonas e obtiveram bons resultados biológicos frente à *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis*, utilizando metronidazol como fármaco de referência. Atividade antimalárica também foi relatada para algumas tiossemicarbazonas. Klayman et al. (1984)

observaram que as funções tiocarbonila e azometina eram necessárias para esta atividade biológica (Figura 6).

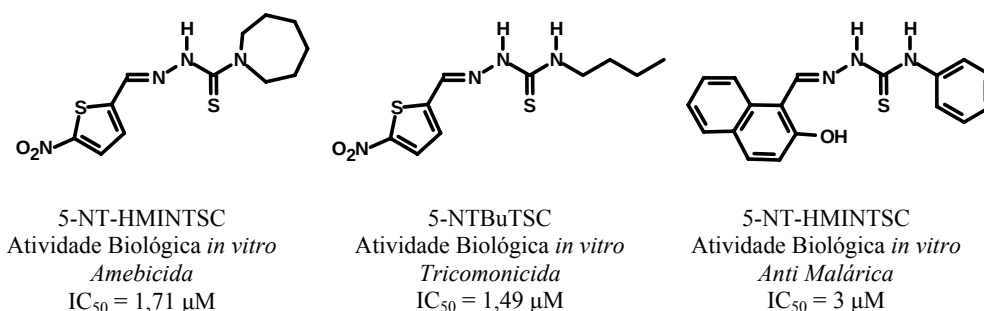


Figura 6. Tiossemicarbazonas com potencial atividade antiprotozoária.

Outros resultados mostram que as propriedades das tiossemicarbazonas de formar complexos com os cátions metálicos são responsáveis pelas atividades antiprotozoárias (BHARTI et al., 2002; WALCOURT et al., 2004). Esta capacidade de formar ligação coordenada é aumentada se houverem grupos doadores de elétrons ligados ao carbono da função azometina (CASAS et al., 2000). Atividades como antitripanossoma (DU et al., 2002; CASERO et al., 1980) e leishmanicida (DODD et al., 1989), foram também relatadas.

2.3. 4-TIAZOLIDINONAS

As 4-tiazolidinonas são derivados carbonilados das tiazolidinas, os quais pertencem a um importante grupo de heterociclos (SINGH et al., 1981). As suas estruturas químicas apresentam-se formadas por um anel de cinco membros, contendo dois heteroátomos, um enxofre (S) e um nitrogênio (N), e um grupo carbonila na posição 4 (figura 7).

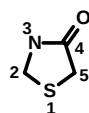
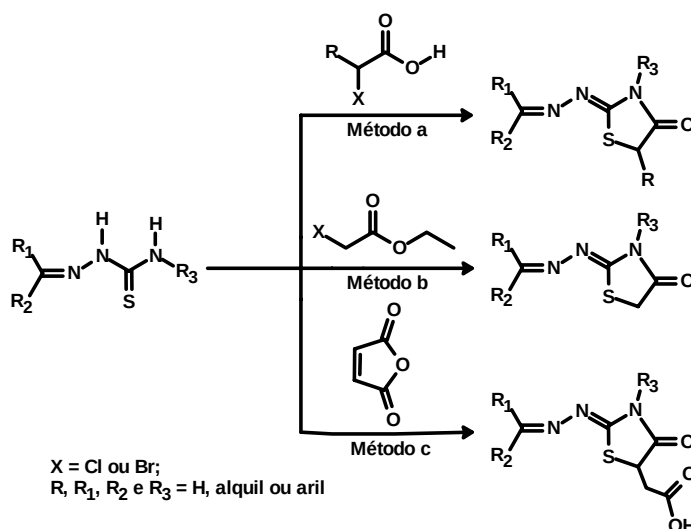


Figura 7. Estrutura e numeração de 4-tiazolidinona

As outras posições do anel, 2 e 5, podem ser substituídas por diversos grupos químicos em geral. As 4-tiazolidinonas obtidas a partir de tiossemicarbazonas apresentam na posição 2 o grupo hidrazona condensado (BROWN, 1961).

Diversas propriedades biológicas são relatadas para esta classe de moléculas, incluindo atividade como, tripanossomicida (SEEBACHER et al., 2004), antimicrobiana (BONDE; GAIKWAD, 2004), hipnótica (ERGENÇ et al., 1999), antifúngica (SIDDIQUI et al., 2003; ÇAPAN et al., 1999), antiinflamatória (ALLEN et al., 2004; SINGH et al., 1985), anti-*Mycobacterium tuberculosis* (BABAOGLU et al., 2003), antiviral (BARRECA et al., 2001), antioxidante (SHIH; KE, 2004), dentre outras.

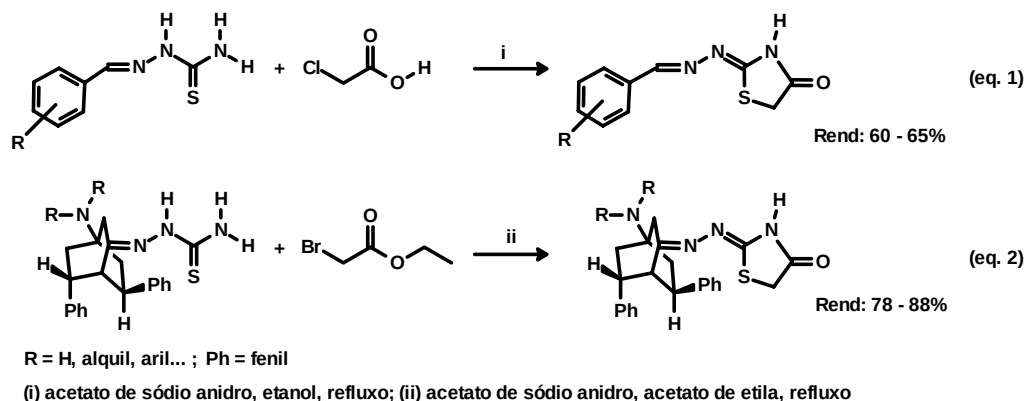
A síntese química de 4-tiazolidinonas pode ser efetuada por vários métodos (BROWN, 1961; SINGH et al., 1981). Contudo, a preparação destas a partir de tiossemicarbazonas pode ser descrita em basicamente três estratégias: método **a**, utilizando ácidos carboxílicos α -halogenados; método **b**, utilizando ésteres de etila α -halogenados e o método **c**, utilizando anidrido maléico e derivados (Esquema 6).



Esquema 6. Estratégias de preparação de 4-tiazolidinonas a partir de tiossemicarbazonas

Os métodos **a** e **b** são muito parecidos, ambos fazem a utilização da base acetato de sódio anidro em solvente apropriado. Porém, como pode ser observado no esquema acima, o método **a** fornece uma estratégia fácil para obter 4-tiazolidinonas substituídas na posição **5** com grupos alquila ou arila (JOLLY; SHARMA, 1990). Em ambos os métodos, a reação inicia-se com o ataque nucleofílico do átomo de enxofre ao carbono halogenado, seguido de aminólise, com conseqüente perda de uma molécula de água ou álcool etílico, formando o heterociclo.

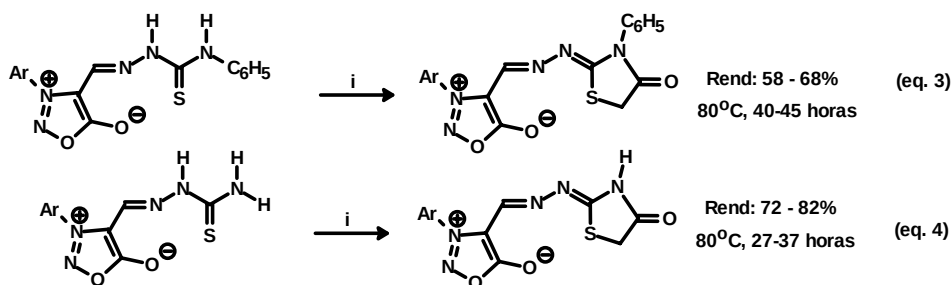
No esquema a seguir pode ser visualizado o emprego destes dois métodos na preparação de 4-tiazolidinonas a partir de tiossemicarbazonas (SINGH, et al., 1985; EL-GENDY et al., 1990; SEEBACHER et al., 2004) (Esquema 7).



Esquema 7. 4-tiazolidinonas preparadas pela reação de tiossemicarbazonas e ácido carboxílicos α -halogenados e ésteres α -halogenados

Um detalhe importante ao se fazer a escolha pelo método **b** é que quanto mais volumoso for o grupo substituintes na posição N-4 da tiossemicarbazona, mais difícil será a ciclização para formar a 4-tiazolidinona. Küçüküz et al. (2002) por exemplo, não conseguiram obter 4-tiazolidinonas por este método quando utilizaram tiossemicarbazonas substituídas com fenil e *p*-metoxi-fenil. Curiosamente foi obtido ao invés o heterociclo 1,3,4-oxadiazol como único produto.

Entretanto, estudos desenvolvidos por Shih et al. (2004) mostraram que é possível obter 4-tiazolidinonas a partir de tiossemicarbazonas fenil substituídas pelo método **b** (Esquema 8, equação 3). Segundo os autores houve apenas uma diminuição na velocidade da reação quando comparada ao emprego de tiossemicarbazonas não substituídas, sugerindo uma queda da reatividade com o aumento do grupo substituinte (Esquema 8, equação 4).



Esquema 8. Diminuição da reatividade de tiossemicarbazonas N-4 fenil substituídas frente a ésteres de etila α -halogenados. (i) Cloroacetato de etila, etanol, ácido acético, acetato de sódio anidro, refluxo.

Em relação ao método **c** existem poucos relatos recentes de aplicação na síntese de 4-tiazolidinonas. Apesar disto, é o método de escolha quando se deseja obter esses heterociclos substituídos na posição **5** com o grupo ácido (MCLEAN; WILSON, 1939; BROWN, 1961).

É importante notar que a função tioamida ($R_1R_2N-C=S$), presente nas tiossemicarbazonas, é a porção responsável por esta reação, como relataram Balasubramaniyan et al. (1990). Na realidade, o anidrido maléico e seus derivados são muito reativos frente a 1,3-dinucleófilos devido a sua característica receptadora de elétrons. Tal tipo de reação é também conhecido como adição tia-Michael (AUGUSTIN; KOHLER, 1976).

Levando-se em consideração o que foi mencionado acima, diversos trabalhos utilizam tioamidas na síntese de 4-tiazolidinonas (BLANCHET; ZHU, 2004; LAURENT et al., 2004; RUDNICHENKO et al., 2004; SIDDIQUI et al., 2003; CHANDE; SURYANARAYAN, 2002; BERSENEVA et al., 1998). Contudo, a aplicação de tiossemicarbazonas nessas reações ainda não foi relatada.

2.3.1 Considerações a respeito das atividades antiprotozoárias de 4-Tiazolidinonas

Anteriormente, foi citado que as 4-tiazolidinonas apresentam um largo espectro de atividades biológicas. Porém, quando se trata de ação antiprotozoária, fica evidente que tal estudo biológico necessita de maiores informações.

Na realidade, apenas dois artigos foram encontrados sobre os efeitos biológicos de 4-tiazolidinonas em protozoários. Em um deles estudos preliminares foram feitos utilizando *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis* e no outro, atividades contra *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* foram realizadas (ALVES et al., 1993, SEEBACHER et al., 2004). Contudo, em ambos os trabalhos, as 4-tiazolidinonas testadas não mostraram atividade significativa.

Entretanto, em estudos desenvolvidos previamente em nosso laboratório com derivados de 4-tiazolidinonas, obtidas a partir de benzaldeídos tiossemicarbazonas substituídas, observamos que estas substâncias apresentavam uma alta seletividade *in vitro* frente ao protozoário *T. gondii* sem afetar a célula hospedeira. Os resultados obtidos sugerem

uma ação inibitória sobre a enzima ribonucleotídeo redutase (RR), enzima responsável pelo passo limitante da síntese do DNA (TENÓRIO et al., 2004).

Pode-se observar pelas estruturas abaixo que as 4-tiazolidinonas sintetizadas mantêm uma similaridade estrutural com as tiossemicarbazonas utilizadas como materiais de partida. Em ambas pode-se ver a presença do grupamento C=N-N-C(S)-N (Figura 8).

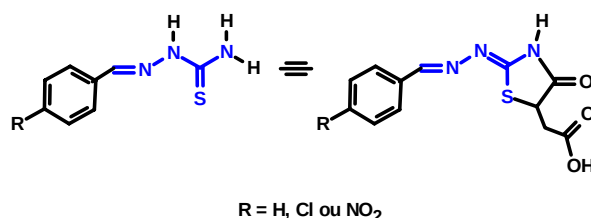


Figura 8. Similaridade estrutural de tiossemicarbazonas e derivados de 4-tiazolidinonas

Em verdade, a ação biológica das tiossemicarbazonas está relacionada com suas propriedades quelantes, como foi mencionado anteriormente. Nesse sentido, os átomos de nitrogênio da função azometina (CH=N) e o átomo de enxofre possuem uma importância significativa. Pela figura acima, fica claro que as 4-tiazolidinonas obtidas mantiveram a mesma relação. Portanto, como as tiossemicarbazonas apresentam acentuada ação inibitória sobre a RR, pode-se sugerir que tais características mantiveram-se no heterociclo.

2.4. Objetivos

2.4.1. Geral

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa à obtenção de novos candidatos a fármacos inibidores da enzima ribonucleotídeo redutase (RR), objetivamos a síntese de tiossemicarbazonas e derivados de 4-tiazolidinonas, baseando-se em trabalhos realizados anteriormente por nossa equipe, e a aplicação destas no estudo de suas atividades biológicas contra *T. gondii*.

As tiossemicarbazonas propostas, tiveram suas estruturas planejadas por analogia a hidroxiuréia (inibidora da RR) eleita como protótipo. Sendo assim, foi substituído o átomo de

oxigênio pelo de enxofre, bem como, o grupo amino foi substituído por uma subunidade arilhidrazona, tendo como substituinte o grupo nitro, considerado como parasitóforo. A hidroxila foi substituída por um átomo de hidrogênio e grupos lipofílicos, tais como, metil, etil e fenil. Ao fim, as tiossemicarbazonas foram ciclizadas para formar os derivados de 4-tiazolidinonas.

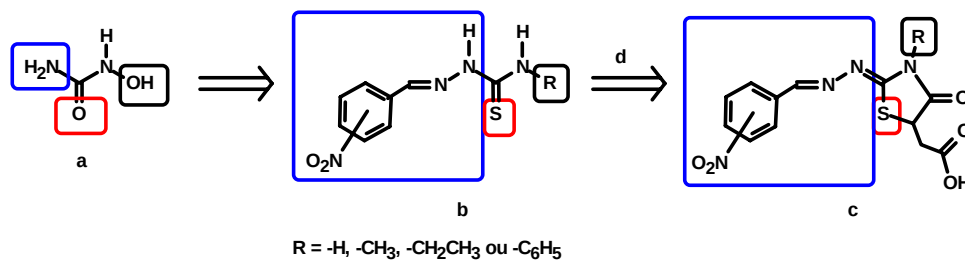


Figura 9. Planejamento das tiossemicarbazonas (b) e dos derivados de 4-tiazolidinonas (c), a partir da hidroxiuréia (a) eleita como protótipo. (d) Ciclização.

2.4.2. Específicos

- Síntese e purificação das tiossemicarbazonas e derivados de 4-tiazolidinonas;
- Caracterização físico-química de todos os compostos sintetizados;
- Determinação das estruturas de todas as moléculas em estudo através da obtenção dos espectros de RMN de 1H , de ^{13}C e IV;
- Avaliação da sensibilidade *in vitro* do protozoário *Toxoplasma gondii* às moléculas sintetizadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Parte Experimental

3.1.1. Cromatografias

A cromatografia em coluna foi efetuada, sob pressão, utilizando-se Gel de Sílica Merck (230-400 Mesh), segundo os métodos descritos por Still et al. (1978). A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada sobre placas comerciais de Gel de Sílica Merck 60 F₂₃₄ de 0,24 mm de espessura. A CCD foi monitorada através de revelação pela iluminação no ultravioleta (UV) (254 nm) ou pela fixação com vapores de iodo. As reações foram monitoradas por CCD pelo desaparecimento dos reagentes de partida.

3.1.2. Pontos de Fusão

Os pontos de fusão foram medidos através dos aparelhos modelo Q.340.23-QUIMIS e modelo MQAPF-301-MICROQUÍMICA com banho de silicone, em tubos capilares.

3.1.3. Espectrometrias

A estrutura química das substâncias obtidas foi determinada pela espectrometria no infravermelho (IV) e pela ressonância magnética nuclear (RMN).

Os espectros no infravermelho (ν , cm^{-1}), foram registrados em um aparelho BRUKER modelo IFS 66, em discos de KBr.

Os espectros de RMN foram obtidos em um aparelho UNITYplus – 300 MHz – VARIAN, a partir de soluções dos compostos em CDCl_3 ou DMSO-d_6 . Os deslocamentos químicos (δ) indicados, expressos em ppm, foram medidos em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como referência interna. As constantes de acoplamento estão indicadas em Hz. As multiplicidades dos sinais são medidas da seguinte forma: s – singlete, d – dubleto, dd

– duplo dubleto, t – tripleto, q – quadrupletto, dq – duplo quadrupletto, qn – quintupletto, m – multipletto.

3.1.4. Solventes Destilados e Reagentes

Os solventes anidros foram destilados sob atmosfera de argônio. O tolueno foi seco sobre sódio metálico e benzofenona como indicador. Todos os outros solventes foram utilizados após destilação. Os reagentes foram obtidos comercialmente (SIGMA, DIFCO, MERCK e ALDRICH).

3.1.5. Reagentes e Solventes

Tiossemicarbazidas substituídas	Nitro-benzaldeídos
Etanol	Ácido acético glacial
Hexano	Acetato de etila
Metanol	Água destilada
Anidrido maléico	Tolueno
Dimetil formamida (DMF)	Benzeno
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d ₆)
Placas de sílica	Clorofórmio (CHCl ₃)
Clorofórmio deuterado (CDCl ₃)	Diclorometano
Sílica gel flash	Sódio metálico
Sulfato de sódio anidro	Solução Ringer
Solução tampão de fosfato (PBS)	Soro fetal bovino (FCS)
Fixador de Bouin	Giemsa
Glutaraldeído	Paraformaldeído

Cloreto de cálcio (CaCl_2)	Sucrose
Cacodilato de sódio	Tetróxido de ósmio
Ferrocianeto de potássio	Acetona
Epon	Acetato de uranila
Citrato de chumbo	Meio 199

3.1.6. *Parasitas Utilizados*

Foram utilizados taquizoítas de *T. gondii* da linhagem virulenta RH.

3.1.7. *Equipamentos Utilizados*

Aparelho de ponto de fusão	Bomba de ar comprimido
Bomba de vácuo	Capelas exaustoras
Espectrômetro de IV (DQF – UFPE)	Espectrômetro de RMN (DQF – UFPE)
Estufa	Freezer
Lâmpada de Ultravioleta	Placas de aquecimento
Evaporador rotatório	Vidraria básica
Ultracentrifuga	Frascos plásticos Falcon
Placas de tecido Limbro	Microscópio Óptico AXIOPLAN
Balança analítica	Balança semi-analítica
Microscópio eletrônico Zeiss 900	

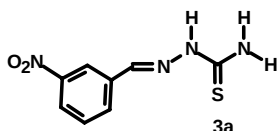
3.2. Procedimentos Experimentais

3.2.1. Procedimento Geral para obtenção das Tiossemicarbazonas

A uma solução aquosa (20 mL) da tiossemicarbazida requerida (0,0109 mol.) foi adicionado uma solução etanólica (10 mL) dos nitro-benzaldeídos substituídos (0,0114 mol; 1,05 eq.), seguida da adição de 0,5 mL de ácido acético glacial. A mistura reacional foi refluxada por um período de 1 hora com contínua agitação. A reação foi monitorada por CCD até o final. Após resfriamento, o precipitado foi filtrado em funil sinterizado e purificado após lavagem com água seguida por hexano.

3.2.1.1. Dados para: *m*-nitro-benzaldeído-3-tiossemicarbazona (3a):

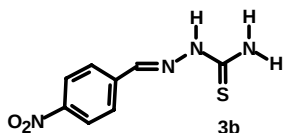
O composto **3a** foi obtido na forma de um sólido amorfo de cor branca.



- Rendimento de 94%;
- Pf: 226 – 229 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 3397 – 3243 (NH₂), 3156 (NH_{hidrazínico}), 1525 (C=N), 1106 (C=S);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 11,6 (1H, s, NH), 8,65 (1H, t, *J* = 1,8 Hz, CH arom *orto* a função azometina e ao grupo nitro), 8,3 e 8,25 (2H, 2 s largo, 1H cada, NH₂), 8,17 – 8,22 (2H, m, 1 CH arom *orto* a função azometina e 1 CH arom *para* a função azometina), 8,14 (1H, s, CH=N), 7,68 (1H, t, *J* = 8,1 Hz, CH arom *meta* a função azometina).

3.2.1.2. Dados para: *p*-nitro-benzaldeído-3-tiossemicarbazona (3b):

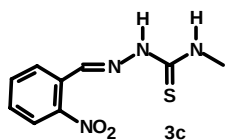
O composto **3b** foi obtido na forma de um sólido amorfo de cor amarela.



- Rendimento de 56%;
- Pf: 213 – 215 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 3492 – 3366 (NH₂), 3143 (NH_{hidrazínico}), 1527 (C=N), 1099 (C=S);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 11,72 (1H, s, NH), 8,42 e 8,27 (2H, 2 s largo, 1H cada, NH₂), 8,11 (1H, s, CH=N), 8,06 – 8,09 (2H, d, J = 9 Hz, CH arom *orto* a função azometina) 8,2 – 8,23 (2H, d, J = 9 Hz, CH arom *meta* a função azometina).

3.2.1.3. Dados para: *o*-nitro-benzaldeído-4-metil-3-tiossemicarbazona (3c):

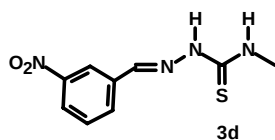
O composto **3c** foi obtido na forma de um sólido amorfo de cor amarela.



- Rendimento de 75%;
- Pf: 206 – 210 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 3370 (NHCH₃), 3149 (NH_{hidrazínico}), 1513 (C=N), 1104 (C=S);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 11,8 (1H, s, NH), 8,66 (1H, q largo, J = 4,5 Hz, NHCH₃), 8,47 (1H, s, CH=N), 8,42 (1H, dd, J = 8,1 Hz e J = 1,2 Hz, CH arom *orto* ao grupo nitro), 8,03 (1H, dd, J = 8,1 Hz e J = 1,2 Hz, CH arom *orto* a função azometina), 7,74 – 7,79 (1H, m, CH arom *meta* a função azometina), 7,60 – 7,65 (1H, m, CH arom *para* a função azometina), 3,02 (3H, d largo, J = 4,5 Hz, NHCH₃).

3.2.1.4. Dados para: *m*-nitro-benzaldeído-4-metil-3-tiossemicarbazona (3d):

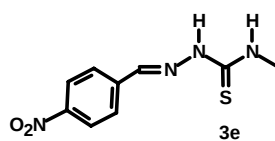
O composto **3d** foi obtido na forma de um sólido amorfo de cor amarela.



- Rendimento de 70%;
- Pf: 233 – 234 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 3360 (NHCH₃), 3155 (NH_{hidrazínico}), 1521 (C=N), 1044 (C=S);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 11,67 (1H, s, NH), 8,73 (1H, q largo, J = 4,2 Hz, NHCH₃), 8,63 (1H, t, J = 1,8 Hz CH arom *orto* a função azometina e ao grupo nitro), 8,19 – 8,24 (2H, m, 1 CH arom *orto* a função azometina e 1 CH arom *para* a função azometina), 8,14 (1H, s, CH=N), 7,7 (1H, t, J = 8,1 Hz, CH arom *meta* a função azometina), 3,03 (3H, d, J = 4,2 Hz, NHCH₃).

3.2.1.5. Dados para: *p*-nitro-benzaldeído-4-metil-3-tiossemicarbazona (3e):

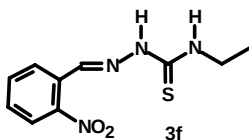
O composto **3e** foi obtido na forma de um sólido amorfo de cor amarela.



- Rendimento de 88%;
- Pf: 233 – 234 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 3375 (NHCH₃), 3142 (NH_{hidrazínico}), 1516 (C=N), 1094 (C=S);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 11,78 (1H, s, NH), 8,75 (1H, q largo, J = 6 Hz, NHCH₃), 8,12 (1H, s, CH=N), 8,06 – 8,09 (2H, d, J = 9 Hz, CH arom *orto* a função azometina), 8,22 – 8,25 (2H, d, J = 9 Hz, CH arom *meta* a função azometina), 3,03 (3H, d largo, J = 6 Hz, NHCH₃).

3.2.1.6. Dados para: *o*-nitro-benzaldeído-4-etil-3-tiossemicarbazona (3f):

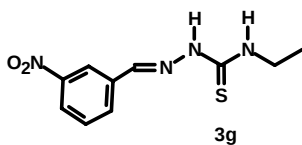
O composto **3f** foi obtido na forma de um sólido amorfo de cor amarela.



- Rendimento de 60%;
- Pf: 208 – 212 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 3351 (NHC₂H₅), 3139 (NH_{hidrazínico}), 1521 (C=N), 1102 (C=S);
- RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz / ppm): 9,27 (1H, s, NH), 8,32 (1H, s, CH=N), 8,05 (1H, dd, J = 8,1 Hz, J = 1,2 Hz, CH arom *orto* ao grupo nitro), 7,97 (1H, dd, CH arom *orto* a função azometina), 7,65 – 7,7 (1H, m, CH arom *meta* a função azometina), 7,53 – 7,59 (1H, m, CH arom *para* a função azometina), 7,36 (1H, br t, J = 5,7 Hz, NHCH₂CH₃), 3,77 (2H, dq, J = 7,2 Hz and J = 5,7 Hz, NHCH₂CH₃), 1,32 (3H, t, J = 7,2 Hz, NHCH₂CH₃).

3.2.1.7. Dados para: *m*-nitro-benzaldeído-4-etil-3-tiossemicarbazona (3g):

O composto **3g** foi obtido na forma de um sólido amorfo de cor amarela.

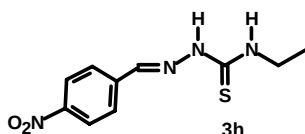


- Rendimento de 60%;
- Pf: 204 – 207 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 3365 (NHC₂H₅), 3139 (NH_{hidrazínico}), 1520 (C=N), 1103 (C=S);
- RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz / ppm): 9,93 (1H, s, NH), 8,52 (1H, t, J = 1,8 Hz, CH arom *orto* a função azometina e ao grupo nitro), 8,22 – 8,26 (1H, m, CH arom *para* a função azometina), 7,91 – 7,94 (2H, m, 1 CH arom *orto* a função azometina e 1H

azometínico), 7,6 (1H, t, $J = 8,1$ Hz, CH arom *meta* a função azometina), 7,45 (1H, t largo, $J = 5,7$ Hz, NHCH_2CH_3), 3,81 (2H, dq, $J = 7,2$ Hz e $J = 5,7$ Hz, NHCH_2CH_3), 1,35 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, NHCH_2CH_3).

3.2.1.8. Dados para: *p*-nitro-benzaldeído-4-etil-3-tiossemicarbazona (3h):

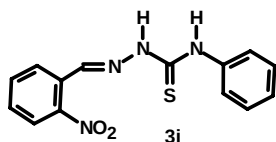
O composto **3h** foi obtido na forma de um sólido amorfo de cor amarela.



- Rendimento de 60%;
- Pf: 234 – 238 °C;
- IV FT (ν cm^{-1} KBr): 3364 (NHC_2H_5), 3143 ($\text{NH}_{\text{hidrazinico}}$), 1511 ($\text{C}=\text{N}$), 1104 ($\text{C}=\text{S}$);
- RMN ^1H (DMSO-d_6 , 300 MHz / ppm): 11,70 (1H, s, NH), 8,78 (1H, t largo, $J = 6,9$ Hz, NHCH_2CH_3), 8,12 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}$), 8,06 – 8,09 (2H, d, $J = 9$ Hz, CH arom *orto* a função azometina) 8,22 – 8,25 (2H, d, $J = 9$ Hz, CH arom *meta* a função azometina), 3,06 (2H, qn, $J = 6,9$ Hz, NHCH_2CH_3), 1,16 (3H, t, $J = 6,9$ Hz, NHCH_2CH_3).

3.2.1.9. Dados para: *o*-nitro-benzaldeído-4-fenil-3-tiossemicarbazona (3i):

O composto **3i** foi obtido na forma de um sólido amorfo de cor amarela.

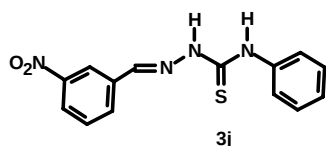


- Rendimento de 97%;
- Pf: 179 – 184 °C;
- IV FT (ν cm^{-1} KBr): 3343 (NHC_6H_5), 3131 ($\text{NH}_{\text{hidrazinico}}$), 1509 ($\text{C}=\text{N}$), 1089 ($\text{C}=\text{S}$);

- RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz / ppm): 12,12 (1H, s, NH), 10,21 (1H, s, NHC_6H_5), 8,55 – 8,58 (2H, m, 1 CH arom *orto* ao grupo nitro e 1H azometina), 8,05 (1H, dd, $J = 8,1$ Hz e $J = 1,2$ Hz, CH arom *orto* a função azometina), 7,74 – 7,79 (1H, m, CH arom *meta* a função azometina), 7,62 – 7,68 (1H, m, CH arom *para* a função azometina), 7,54 – 7,58 (2H, m, CH arom), 7,36 – 7,41 (2H, m, CH arom), 7,20 – 7,25 (1H, m, CH arom).

3.2.1.10. Dados para: *m*-nitro-benzaldeído-4-fenil-3-tiossemicarbazona (3j):

O composto **3j** foi obtido na forma de um sólido amorfo de cor branca.



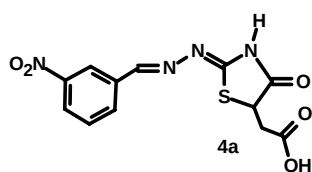
- Rendimento de 98%;
- Pf: 189 – 191 °C;
- IV FT (ν cm^{-1} KBr): 3224 (NHC_6H_5), 1526 ($\text{C}=\text{N}$), 1069 ($\text{C}=\text{S}$);
- RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz / ppm): 9,94 (1H, s, NH), 9,16 (1H, s, NHC_6H_5), 8,55 (1H, t, $J = 1,8$ Hz, CH arom *orto* a função azometina e ao grupo nitro), 8,25 – 8,29 (1H, m, CH arom *para* a função azometina), 7,97 – 7,99 (2H, m, 1 CH arom *orto* a função azometina e 1H azometínico), 7,60 – 7,69 (3H, m, 2 CH arom e 1H azometínico), 7,42 – 7,47 (2H, m, CH arom), 7,3 – 7,32 (1H, m, CH arom).

3.2.2. Procedimento Geral para obtenção dos derivados de 4-Tiazolidinonas

Em um balão acoplado a aparelho Dean Stark contendo a tiossemicarbazona requerida (0,0026 moles.) e anidrido maléico (0,0116 moles; 4,5 eq.) foi adicionado 80 mL de tolueno seco. A mistura reacional foi aquecida, com agitação contínua, até refluxo. Então adicionou-se *N,N*-dimetilformamida (DMF), gota a gota, até atingir solubilidade. A reação foi monitorada por CCD até o fim. Após resfriamento, o excesso de tolueno foi removido sob pressão reduzida e então a mistura reacional foi diluída com água e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com água, seca com sulfato de sódio anidro e filtrada. O acetato de etila foi removido a pressão reduzida e a substância foi obtida após procedimentos apropriados.

3.2.2.1. Dados para: **Ácido [2-(*m*-nitro-benzilideno-hidrazono)-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4a):**

Tempo de reação: 18 horas. A substância **4a** precipitou após resfriamento e foi purificada após várias lavagens com hexano fornecendo um sólido amorfo de cor branca.

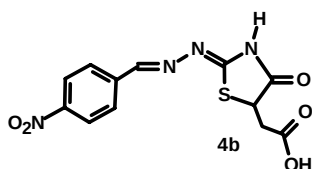


- Rendimento de 95%;
- Pf: 247 – 251 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 1734 (C=O; CO₂H), 1642 (C=O; lactama), 1350 (NCS);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 12,42 (2H, s largo, CO₂H e NH), 8,56 (2H, s largo, 1H CH=N e 1H arom), 8,28 (1H, d, *J* = 8 Hz, CH arom), 8,19 (1H, d, *J* = 8 Hz, CH arom), 7,75 (1H, t, *J* = 8 Hz, CH arom), 4,4 (1H, dd, *J*_{ax} = 8 Hz, *J*_{bx} = 4 Hz, CH), 3,04 (1H, dd, *J*_{ab} = 17 Hz, *J*_{bx} = 4 Hz, CH₂), 2,98 (1H, dd, *J*_{ab} = 17 Hz, *J*_{ax} = 8 Hz, CH₂);

- RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75.4 MHz / ppm): 36,59 (CH_2), 43,64 (CH), 121,85 (CH arom), 124,74 (CH arom), 130,40 (CH arom), 133,39 (CH arom), 135,99 (C_q , arom), 148,16 (C_q , arom), 154,24 (CH, $\text{CH}=\text{N}$), 165,98 (C_q , $\text{C}=\text{N}$), 171,69 (C_q , $\text{C}=\text{O}$ lactama), 175,40 (C_q , CO_2H).

3.2.2.2. Dados para: Ácido [2-(p-nitro-benzilideno-hidrazono)-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4b):

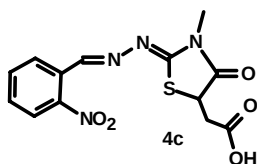
Tempo de reação: 9 horas. A substância **4b** foi lavada com hexano fornecendo um sólido amorfo de coloração branca.



- Rendimento de 52%;
- Pf: 258 – 261 °C;
- IV FT ($\nu \text{ cm}^{-1}$ KBr): 1717 ($\text{C}=\text{O}$; CO_2H), 1640 ($\text{C}=\text{O}$; lactama), 1342 (NCS);
- RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz / ppm): 12,31 (2H, s largo, CO_2H e NH), 8,53 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}$), 8,29 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, CH arom *meta* a função azometina), 7,99 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, CH arom *orto* a função azometina), 4,39 – 4,40 (1H, m, CH), 2,86 – 3,07 (2H, m, CH_2);
- RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz / ppm): 36,55 (CH_2), 43,67 (CH), 124,03 (2 CH arom), 128,52 (2 CH, arom), 140,32 (C_q , arom), 148,21 (C_q , arom), 154,22 (CH, $\text{CH}=\text{N}$), 166,80 (C_q , $\text{C}=\text{N}$), 171,68 (C_q , $\text{C}=\text{O}$ lactama), 175,42 (C_q , CO_2H).

3.2.2.3. Dados para: Ácido [2-(o-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-metil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4c):

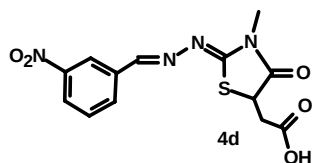
Tempo de reação: 18 horas. A substância **4c** foi purificada após coluna flash utilizando como sistema de eluição Hexano/Acetato de etila 60%, fornecendo um sólido amorfo de coloração laranja.



- Rendimento de 26%;
- Pf: 258 – 261 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 1714 (C=O; CO₂H), 1617 (C=O; lactama), 1356 (NCS);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 12,73 (1H, s largo, CO₂H), 8,74 (1H, s, CH=N), 8,07 (1H, dd, $J = 1,2$ Hz, $J = 8$ Hz, CH arom), 8,02 (1H, dd, $J = 1,2$ Hz, $J = 8$ Hz, CH arom), 7,79 – 7,85 (1H, m, CH arom), 7,68 – 7,74 (1H, m, CH arom), 4,43 (1H, dd, $J_{ax} = 9$ Hz, $J_{bx} = 4$ Hz, CH), 3,19 (3H, s, CH₃), 3,08 (1H, dd, $J_{ab} = 18$ Hz, $J_{bx} = 4$ Hz, CH₂), 2,91 (1H, dd, $J_{ab} = 18$ Hz, $J_{ax} = 9$ Hz, CH₂);
- RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz / ppm): 29,50 (CH₃), 36,64 (CH₂), 42,79 (CH), 124,62 (CH arom), 128,22 (C_q, arom), 129,05 (CH arom), 131,31 (CH arom), 133,65 (CH arom), 148,36 (C_q, arom), 153,58 (CH, CH=N), 166,44 (C_q, C=N), 171,69 (C_q, C=O lactama), 173,81 (C_q, CO₂H).

3.2.2.4. Dados para: Ácido [2-(m-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-metil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4d):

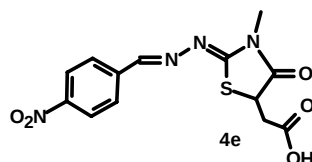
Tempo de reação: 19 horas. A substância **4d** precipitou após resfriamento e foi lavada várias vezes com hexano. A purificação foi obtida após recristalização em metanol fornecendo um sólido amorfo de cor branca.



- Rendimento de 36%;
- Pf: 194 – 196 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 1725 (C=O; CO₂H), 1617 (C=O; lactama), 1352 (NCS);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 8,63 (1H, s, CH=N), 8,56 (1H, m, CH arom), 8,26 – 8,29 (1H, m, CH arom), 8,17 – 8,20 (1H, m, CH arom), 7,72 – 7,77 (1H, m, CH arom), 4,42 (1H, dd, J_{ax} = 8,79 Hz, J_{bx} = 3,67 Hz, CH), 3,07 (1H, dd, J_{ab} = 17,58 Hz, J_{bx} = 3,67 Hz, CH₂), 2,92 (1H, dd, J_{ab} = 17,58 Hz, J_{ax} = 8,79 Hz, CH₂); o hidrogênio do ácido (CO₂H) não foi detectado;
- RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz / ppm): 29,48 (CH₃), 36,66 (CH₂), 42,76 (CH), 121,84 (CH arom), 124,92 (CH arom), 130,47 (CH arom), 133,60 (CH arom), 135,85 (C_q, arom), 148,20 (C_q, arom), 155,49 (CH, CH=N), 165,93 (C_q, C=N), 171,61 (C_q, C=O lactama), 173,80 (C_q, CO₂H).

3.2.2.5. Dados para: Ácido [2-(p-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-metil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4e):

Tempo de reação: 5 horas. A substância **4e** foi obtida após recristalização em acetato de etila / hexano, seguido por coluna flash utilizando como sistema de eluição Hexano/Acetato de etila 60%, fornecendo um sólido amorfo de cor creme.

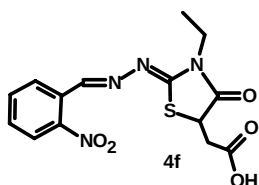


- Rendimento de 26%;
- Pf: 219 – 222 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 1714 (C=O; CO₂H), 1629 (C=O; lactama), 1344 (NCS);

- RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz / ppm): 12,80 (1H, s largo, CO_2H), 8,61 (1H, s, 1H $\text{CH}=\text{N}$), 8,29 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, CH arom *meta* a função azometina), 8 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, CH arom *orto* a função azometina), 4,44 (1H, dd, $J_{ax} = 8,7$ Hz, $J_{bx} = 3,6$ Hz, CH), 3,19 (3H, s, CH_3), 3,09 (1H, dd, $J_{ab} = 17,4$ Hz, $J_{bx} = 3,6$ Hz, CH_2), 2,93 (1H, dd, $J_{ab} = 17,4$ Hz, $J_{ax} = 8,7$ Hz, CH_2);
- RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz / ppm): 29,49 (CH_3), 36,66 (CH_2), 42,79 (CH), 124,04 (2 CH arom *orto* a função azometina), 128,63 (2 CH arom *meta* a função azometina), 140,16 (C_q , arom), 148,31 (C_q , arom), 155,50 (CH, $\text{CH}=\text{N}$), 166,73 (C_q , $\text{C}=\text{N}$), 171,66 (C_q , $\text{C}=\text{O}$ lactama), 173,78 (C_q , CO_2H)..

3.2.2.6. Dados para: Ácido [2-(o-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-etil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4f):

Tempo de reação: 19 horas. A substância **4f** foi obtida após recristalização em acetona/água fornecendo um sólido amorfo de cor amarela.

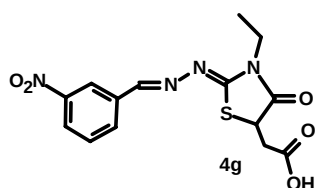


- Rendimento de 33%;
- Pf: 204 – 207 °C;
- IV FT ($\nu \text{ cm}^{-1}$ KBr): 1709 ($\text{C}=\text{O}$; CO_2H), 1614 ($\text{C}=\text{O}$; lactama), 1352 (NCS);
- RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz / ppm): 8,73 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}$), 8,01 – 8,07 (2H, m, CH arom), 7,79 – 7,84 (1H, m, CH arom), 7,68 – 7,73 (1H, m, CH arom), 4,42 (1H, dd, $J_{ax} = 7,88$ Hz, $J_{bx} = 4,03$ Hz, CH), 3,77 (2H, q, $J = 7,14$ Hz, CH_2), 3,04 (1H, dd, $J_{ab} = 17,58$ Hz, $J_{bx} = 4,03$ Hz, CH_2), 2,93 (1H, dd, $J_{ab} = 17,58$ Hz, $J_{ax} = 7,88$ Hz, CH_2); 1,18 (3H, t, $J = 7,14$ Hz, CH_3), o hidrogênio do ácido (CO_2H) não foi detectado;
- RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,4 MHz / ppm): 12,09 (CH_3), 36,50 (CH_2), 37,92 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 42,69 (CH), 124,56 (CH arom), 128,11 (CH arom), 129,07 (CH arom), 131,29 (CH

arom), 133,56 (C_q, arom), 148,35 (C_q, arom), 153,33 (CH, CH=N), 165,69 (C_q, C=N), 171,47 (C_q, C=O lactama), 173,61 (C_q, CO₂H).

3.2.2.7. Dados para: Ácido [2-(*m*-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-etil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4g):

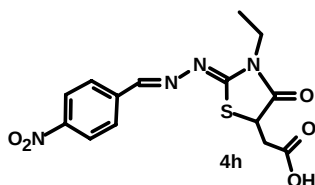
Tempo de reação: 18 horas. A substância **4g** foi obtida após recristalização em acetato de etila / hexano fornecendo um sólido amorfo de cor creme.



- Rendimento de 60%;
- Pf: 184 – 187 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 1711 (C=O; CO₂H), 1623 (C=O; lactama), 1362 (NCS);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 12,79 (1H, s largo, CO₂H), 8,66 (1H, s, 1H CH=N), 8,57 (1H, s, CH arom *orto* aos grupos azometina e nitro), 8,29 (1H, d, *J* = 6 Hz, CH arom *para* a função azometina), 8,2 (1H, d, *J* = 6 Hz, CH arom *orto* a função azometina), 7,76 (1H, t, *J* = 6 Hz, CH arom *meta* a função azometina), 4,43 (1H, s largo, CH), 3,77 (2H, d largo, CH₂- N), 2,91 – 3,09 (2H, m, CH₂), 1,18 (3H, s largo, CH₃);
- RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz / ppm): 12,16 (CH₃), 36,48 (CH₂), 37,91 (CH₂-N), 42,70 (CH), 121,89 (CH arom), 125,01 (CH arom), 130,54 (CH arom), 133,64 (CH arom), 135,89 (C_q, arom), 148,2 (C_q, arom), 155,44 (CH, CH=N), 165,42 (C_q, C=N), 171,67 (C_q, C=O lactama), 173,66 (C_q, CO₂H).

3.2.2.8. Dados para: Ácido [2-(p-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-etil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4h):

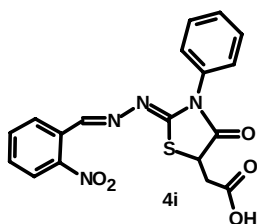
Tempo de reação: 21 horas. A substância **4h** precipitou após resfriamento, foi filtrada e recristalizada em acetona / água fornecendo um sólido amorfo de cor creme.



- Rendimento de 56%;
- Pf: 216 – 219 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 1714 (C=O; CO₂H), 1622 (C=O; lactama), 1341 (NCS);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 12,82 (1H, s largo, CO₂H), 8,64 (1H, s, 1H CH=N), 8,31 (2H, d, *J* = 9 Hz, CH arom *meta* a função azometina), 8,02 (2H, d, *J* = 9 Hz, CH arom *orto* a função azometina), 4,45 (1H, m, CH), 3,77 (2H, d largo, CH₂- N), 2,91 – 3,09 (2H, m, CH₂), 1,18 (3H, s largo, CH₃);
- RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz / ppm): 12,18 (CH₃), 36,56 (CH₂), 37,97 (CH₂-N), 42,78 (CH), 124,16 (2 CH arom *orto* a função azometina), 128,68 (2 CH arom *meta* a função azometina), 140,23 (C_q, arom), 148,33 (C_q, arom), 155,49 (CH, CH=N), 166,16 (C_q, C=N), 171,72 (C_q, C=O lactama), 173,70 (C_q, CO₂H).

3.2.2.9. Dados para: Ácido [2-(o-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-fenil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4i):

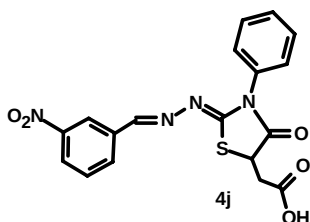
Tempo de reação: 24 horas. A substância **4i** foi obtida após resfriamento da mistura reacional e adição de hexano. O precipitado formado foi filtrado e recristalizado em acetona / água fornecendo um sólido amorfo de cor amarela.



- Rendimento de 65%;
- Pf: 215 – 217 °C;
- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 1737 (C=O; CO₂H), 1603 (C=O; lactama), 1347 (NCS);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 12,83 (1H, s largo, CO₂H), 8,53 (1H, s, 1H CH=N), 7,98 – 8,05 (2H, m, CH arom *meta* a função azometina), 7,78 – 7,83 (1H, m, CH arom *orto* a função azometina), 7,67 – 7,72 (1H, m, CH arom *para* a função), 7,38 – 7,56 (5H, m, CH arom), 4,56 – 4,6 (1H, m, CH), 3,12 – 3,14 (2H, m, CH₂);
- RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz / ppm): 36,66 (CH₂), 42,66 (CH), 124,54 (CH arom), 128,05 (C_q, arom), 128,15 (2 CH arom), 128,82 (CH arom), 129,11 (3 CH arom), 131,31 (CH arom), 133,54 (CH arom), 135,03 (C_q, arom), 148,32 (C_q, arom), 153,73 (CH, CH=N), 166,96 (C_q, C=N), 171,73 (C_q, C=O lactama), 173,79 (C_q, CO₂H).

3.2.2.10. Dados para: Ácido [2-(m-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-fenil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4j):

A substância **4j** foi purificada após duas colunas cromatográficas: a primeira em sistema hexano/acetato de etila 60% e a segunda em sistema diclorometano 100% fornecendo um sólido amorfo de cor creme. Tempo de reação: 15 horas.



- Rendimento de 50%;
- Pf: 238 – 240 °C;

- IV FT (ν cm⁻¹ KBr): 1717 (C=O; CO₂H), 1621 (C=O; lactama), 1353 (NCS);
- RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz / ppm): 12,82 (1H, s largo, CO₂H), 8,53 – 8,54 (1H, m, CH arom), 8,49 (1H, s, 1H CH=N), 8,26 – 8,30 (1H, m, CH arom), 8,14 – 8,17 (1H, m, CH arom), 7,71 – 7,77 (1H, m, CH arom), 7,38 – 7,56 (5H, m, CH arom), 4,57 – 4,64 (1H, m, CH), 3,13 – 3,19 (2H, m, CH₂);
- RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,4 MHz / ppm): 36,65 (CH₂), 42,62 (CH), 121,79 (CH arom), 124,99 (CH arom), 128,15 (2 CH arom), 128,80 (CH arom), 129,10 (2 CH arom), 130,49 (CH arom), 133,60 (CH arom), 135,07 (C_q, arom), 135,79 (C_q, arom), 148,16 (C_q, arom), 155,75 (CH, CH=N), 166,53 (C_q, C=N), 171,74 (C_q, C=O lactama), 173,78 (C_q, CO₂H).

3.3. Estudo Biológico

3.3.1. Determinação da atividade *in vitro* dos compostos sintetizados contra *T. gondii*

A atividade biológica anti-*Toxoplasma gondii* das substâncias sintetizadas foi realizada no laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF – sob a responsabilidade do Professor Edésio José Tenório de Melo.

3.3.1.1. Preparação da Cultura de Parasitas

Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* da linhagem virulenta RH foram mantidos por passagem intraperitoneal em camundongo Swiss e após 48 horas foram coletados em solução Ringer a pH 7,2. O fluido ascítico obtido a partir dos camundongos infectados foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos, a temperatura ambiente, para remover células e outros artefatos.

O sobrenadante, que continha os parasitas, foi coletado e centrifugado a 1000 x g por 10 min. A camada obtida foi lavada com solução salina tamponada com fosfato (PBS), a pH 7,2, e ressuspensa a uma densidade de 10^6 parasitas mL^{-1} em meio 199 sem soro fetal bovino (FCS). Os parasitas foram usados com 10 minutos após remoção dos animais infectados, e a viabilidade foi avaliada usando o teste de exclusão Tripán blue.

3.3.1.2. Preparação das Células Hospedeiras

Células Vero (fibroblastos de rim de macaco da floresta africana) foram mantidos em frascos plásticos Falcon usando meio 199 contendo 10% de FCS e submetidos a “tripsinação” quando a densidade celular aproximou-se a uma monocamada confluenta. Um dia antes do experimento, aproximadamente 2×10^5 células foram colocadas em placas de Tecido Limbro ou plaqueadas dentro de frascos de 25 cm^2 (3×10^5 células por frasco) e mantidas a 37°C durante a noite em incubadora contendo CO_2 a 5%.

3.3.1.3. Interação Parasita-Hospedeiro

Parasitas suspensos em meio 199 foram incubados por 2 horas na presença de células Vero usando uma proporção parasita:hospedeiro de 10:1. Após incubação as células foram lavadas com PBS, incubadas por 24 horas à 37°C e tratadas com as tiossemicarbazonas (**3a** – **3j**) e 4-tiazolidinonas (**4a** – **4j**) sintetizadas na concentração previamente estabelecida de 1 mM e com a hidroxauréia na concentração final de 4mM. As células infectadas foram incubadas na presença das substâncias por 24 horas. Após incubação, as células foram lavadas com PBS e observadas por microscopia ótica.

3.3.1.4. Microscopia Ótica

As culturas foram lavadas 3 vezes com PBS, fixadas com fixador de Bouin, coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico. A percentagem de células infectadas e o número significativo de parasitas intracelular por célula infectada, foram determinados pelo exame de no mínimo 400 células. Análises estatísticas foram realizadas utilizando teste *t Student*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

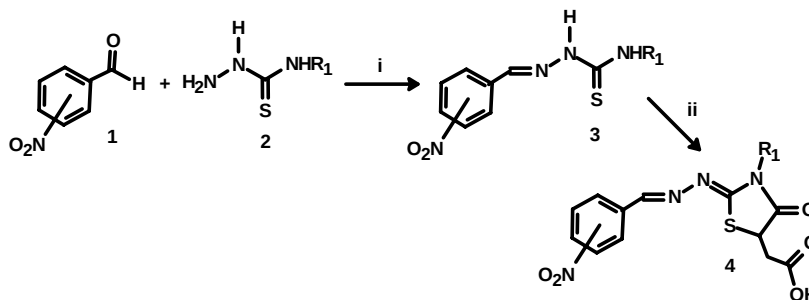
3.3.1.5. Microscopia Eletrônica

As culturas foram fixadas por 60 min à temperatura ambiente em solução contendo 1% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 5 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2) e 5% de sucrose em 0,1 M de tampão cacodilato a pH 7,2. As células foram fixadas posteriormente por 1 h numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de CaCl_2 em 0,1 M de tampão cacodilato a pH 7,2. As células foram lavadas com solução tampão, desidratadas em acetona e embebidas em Epon. Estruturas finas foram fixadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em microscópio eletrônico Zeiss 900.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESQUEMA DE SÍNTESE E MOLÉCULAS ALVO

O esquema 9 mostra a rota sintética empregada para a preparação dos compostos em estudo.



Reagentes e Condições experimentais: (i) H_2O , EtOH, ácido acético, refluxo (56-97%);
(ii) tolueno seco, anidrido maleico, DMF, Dean Stark, refluxo (26-95%).

Esquema 9. Rota sintética empregada na preparação das tiossemicarbazonas (3) e derivados de 4-tiazolidinonas (4).

4.1.1. Moléculas alvo

- Fórmulas Estruturais dos Nitro-Benzaldeídos Tiossemicarbazonas Substituídos

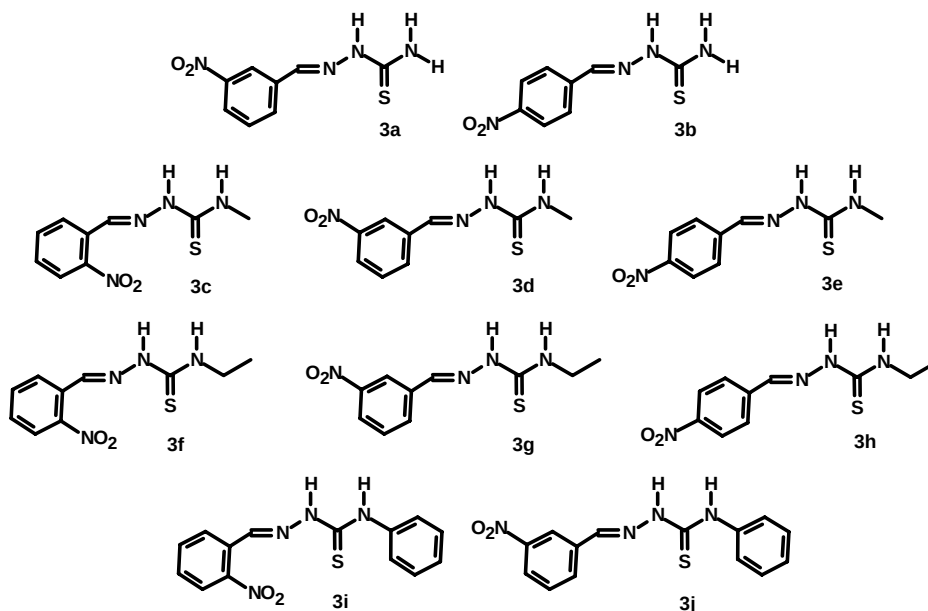


Figura 10. Fórmulas dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas substituídos (3a – 3j)

- Fórmulas Estruturais dos Derivados de 4-Tiazolidinonas Substituídos

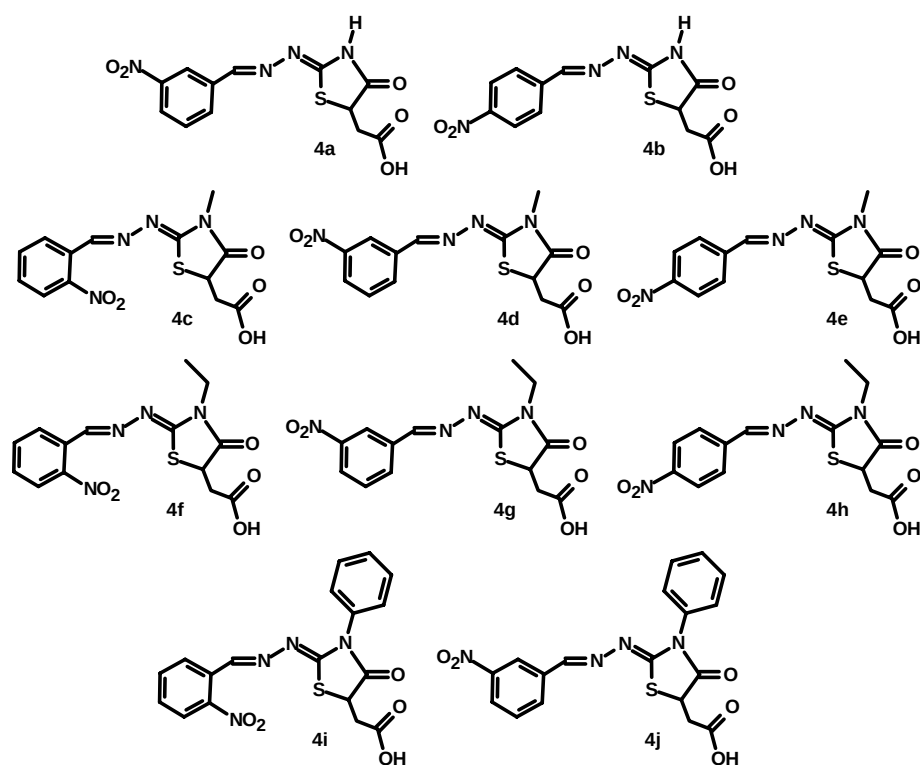
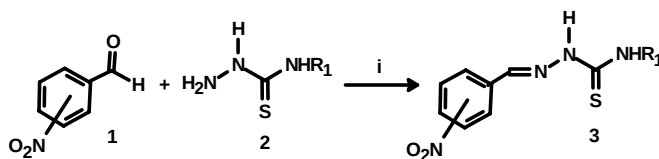


Figura 11. Fórmula dos derivados de 4-tiazolidinonas substituídos (4a – 4j)

4.2. METODOLOGIA DE SÍNTESE APLICADA

4.2.1 Obtenção dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas substituídos

Os nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas (**3a – 3j**) foram obtidos pelo método convencional, no qual consiste da reação equimolar entre um derivado carbonilado com a tiossemicarbazida em meio etanólico sob refluxo contendo quantidades catalíticas de ácido acético (BHARTI et al., 2002, HOLLA et al., 2003). Contudo, no nosso experimento utilizamos um ligeiro excesso dos nitro-benzaldeídos, em relação as tiossemicarbazidas (Esquema 10).



Reagentes e Condições experimentais: (i) H₂O, EtOH, ácido acético, refluxo (56-97%)

Esquema 10. Obtenção dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas substituídos

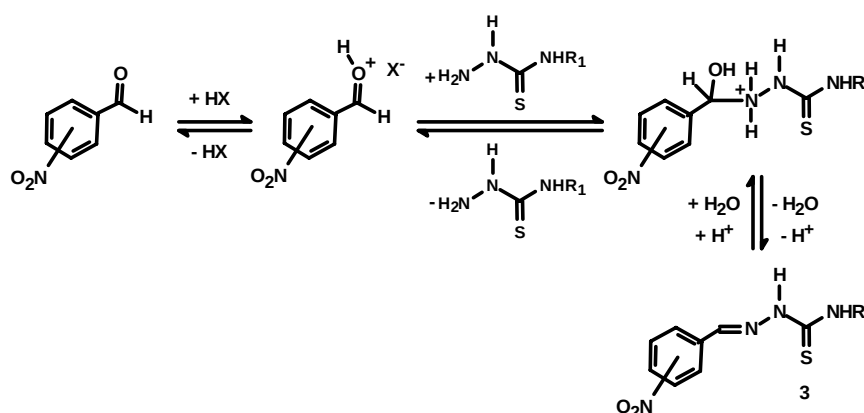
Todas as tiossemicarbazonas foram obtidas em rendimentos satisfatórios (56-97%), após purificação por lavagem com solvente apropriado. A tabela 1 abaixo, mostra a relação das tiossemicarbazonas obtidas com os seus respectivos rendimentos:

Tabela 1. Rendimentos e propriedades físico-químicas das tiossemicarbazonas (3a – 3j)

Nº	R ₁	NO ₂	F. Estrutural	M. M.	P. F. °C	CCD (Eluente)	R _f	R %
3a	H	<i>m</i>	C ₈ H ₈ N ₄ SO ₂	224,23	226-229	Hex/AcOEt 70%	0,5	94
3b	H	<i>p</i>	C ₈ H ₈ N ₄ SO ₂	224,23	213-215	CHCl ₃ /EtOH 95%	0,6	56
3c	CH ₃	<i>o</i>	C ₉ H ₁₀ N ₄ SO ₂	238,26	206-210	Hex/AcOEt 70%	0,5	75
3d	CH ₃	<i>m</i>	C ₉ H ₁₀ N ₄ SO ₂	238,26	233-234	Hex/AcOEt 60%	0,52	70
3e	CH ₃	<i>p</i>	C ₉ H ₁₀ N ₄ SO ₂	238,26	230-232	Hex/AcOEt 70%	0,45	88
3f	C ₂ H ₅	<i>o</i>	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ SO ₂	252,29	208-212	Hex/AcOEt 70%	0,5	60
3g	C ₂ H ₅	<i>m</i>	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ SO ₂	252,29	204-207	Hex/AcOEt 70%	0,5	60
3h	C ₂ H ₅	<i>p</i>	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ SO ₂	252,29	234-238	Hex/AcOEt 70%	0,5	60
3i	C ₆ H ₅	<i>o</i>	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ SO ₂	300,33	179-184	Hex/AcOEt 70%	0,5	97
3j	C ₆ H ₅	<i>m</i>	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ SO ₂	300,33	189-191	Hex/AcOEt 70%	0,5	98

4.2.2. Mecanismo da reação

O mecanismo de formação de tiossemicarbazonas é semelhante ao descrito para a formação de iminas e derivados (COSTA et al., 2003). Inicia-se com a protonação do oxigênio da carbonila para formar o intermediário íon oxônio, seguido de ataque nucleofílico do nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida para formar o intermediário hemiaminal protonado. Este perde uma molécula de água e após neutralização forma-se a tiossemicarbazona (Esquema 11).



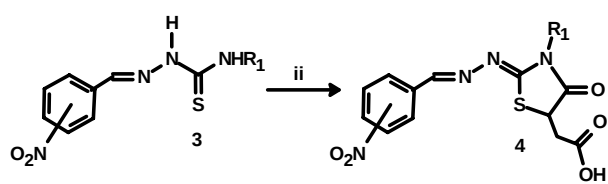
Esquema 11. Mecanismo de formação dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas (3a – 3j)

Segundo Amaral e Bastos (1971) a velocidade desta reação é determinada pelo ataque nucleofílico do nitrogênio (N-1) da tiossemicarbazida. Em adição, esta pode ser obtida na configuração *E* ou *Z* dependendo dos grupos substituintes do aldeído utilizado (KARABATSOS et al., 1964).

No presente estudo, entretanto, não foi possível fazer a determinação da configuração das moléculas sintetizadas, apesar dos esforços realizados empregando as metodologias propostas por Karabatsos et al. (1964) e Temperini et al., (1995) como será descrito mais adiante. Contudo, para todas as tiossemicarbazonas foi detectado a presença de apenas um isômero na cromatografia em camada delgada (CCD) sugerindo, segundo Ota et al. (1998) e Costa et al. (2003) que estas deveriam estar na configuração *E*, termodinamicamente mais estável. Para tanto, são necessários mais estudos.

4.2.3. Obtenção dos derivados de 4-tiazolidinonas

Os nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas (**3a – 3j**) foram utilizados em seguida para a preparação das 4-tiazolidinonas (**4a – 4j**), substituídas na posição cinco com o grupo ácido acético. Uma vez que a função ácida introduz um sítio adicional para futuras mudanças estruturais, nós empregamos a reação de adição tia-Michael utilizando o anidrido maléico como receptor de elétrons (BALASUBRAMANIYAN et al., 1990). A reação foi realizada em tolueno seco contendo quantidades suficientes de DMF para solubilizar (Esquema 12).



Reagentes e Condições experimentais:
(ii) tolueno seco, anidrido maléico, DMF, Dean Stark, refluxo (26-95%)

Esquema 12. Obtenção dos derivados de 4-tiazolidinonas

Nesta reação o anidrido maléico foi primeiramente utilizado com um excesso de 3 equivalentes em relação as tiossemicarbazonas. Como a faixa de rendimento final estava baixa (26 – 56%), resolvemos aumentar a quantidade para 4,5. Com isto conseguimos obter algumas 4-tiazolidinonas com rendimentos satisfatórios, entre 50% e 95%.

Ao fim da reação, todos os compostos foram purificados por recristalização em solvente apropriado e/ou coluna cromatográfica, segundo a metodologia de Still et al. (1978). A tabela 2 mostra os rendimentos e propriedades físico-químicas dos derivados de 4-tiazolidinonas **4** obtidos.

Tabela 2. Rendimentos e propriedades físico-químicas dos derivados de 4-tiazolidinonas (**4a – 4j**)

Nº	R ₁	NO ₂	F. Estrutural	M. M.	P. F. °C	CCD (Eluente)	R _f	R %
4a	H	<i>m</i>	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ SO ₅	322,29	247-251	AcOEt/Hex 60%	0,5	95
4b	H	<i>p</i>	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ SO ₅	322,29	258-261	AcOEt/MeOH 80%	0,4	52

Continuação da **tabela 2**

Nº	R ₁	NO ₂	F. Estrutural	M. M.	P. F. °C	CCD (Eluente)	R _f	R %
4c	CH ₃	<i>o</i>	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ SO ₅	336,32	233-236	AcOEt/Hex 60%	0,4	26
4d	CH ₃	<i>m</i>	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ SO ₅	336,32	194-196	AcOEt/Hex 60%	0,5	36
4e	CH ₃	<i>p</i>	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ SO ₅	336,32	219-222	AcOEt/Hex 60%	0,45	26
4f	C ₂ H ₅	<i>o</i>	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ SO ₅	350,34	204-207	AcOEt/Hex 60%	0,5	33
4g	C ₂ H ₅	<i>m</i>	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ SO ₅	350,34	184-187	AcOEt/Hex 60%	0,5	60
4h	C ₂ H ₅	<i>p</i>	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ SO ₅	350,34	216-219	AcOEt/Hex 60%	0,5	56
4i	C ₆ H ₅	<i>o</i>	C ₁₈ H ₁₄ N ₄ SO ₅	398,40	215-217	AcOEt/Hex 60%	0,5	65
4j	C ₆ H ₅	<i>m</i>	C ₁₈ H ₁₄ N ₄ SO ₅	398,40	215-218	AcOEt/Hex 60%	0,5	50

4.2.4. Mecanismo da reação

O mecanismo de formação das 4-tiazolidinonas a partir de tiossemicarbazonas e o anidrido maléico, é ainda incerto. Contudo, evidências sugerem que este deve ser semelhante ao que ocorre quando esta reação é feita com a tiouréia.

Segundo Balasubramaniyan et al. (1990) e Augustin e Kohler (1976) as reações da tiouréia com o anidrido maléico e seus derivados para formar 4-tiazolidinonas pode ser visualizada por duas as direções: (i) adição tia-Michael em um dos carbonos da função C=C, seguido de aminólise na carbonila adjacente; ou (ii) aminólise inicial com conseqüente adição tia-Michael no carbono vizinho.

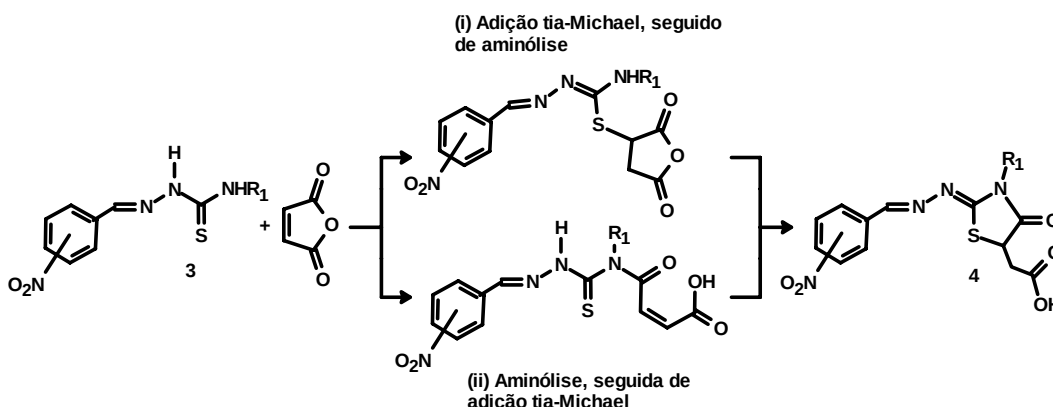
Conforme citado na revisão bibliográfica, esta reação acontece devido à reatividade do anidrido maléico e seus derivados frente a dinucleófilos (BALASUBRAMANIYAN et al., 1990). Sendo assim, tal como a tiouréia, as tiossemicarbazonas são versáteis 1,3-dinucleófilos, além de possuírem outras características químicas semelhantes. De acordo com Casas et al. (2000) e Allen et al. (1987) o comprimento médio da ligação C=S, obtido por

difração de raios-X, em tiossemicarbazonas e tiouréias é próximo a 1,685 Å, confirmando o seu acentuado caráter de ligação simples. De fato, em nossos experimentos de espectrometria no infravermelho (IV) foi observado que a banda da tiocarbonila aparecia sempre entre 1044 e 1106 cm^{-1} .

Em adição, tanto a tiouréia quanto as tiossemicarbazonas apresentam as formas tautoméricas tiol e tiona, apresentadas anteriormente no esquema 2, em equilíbrio (SINGH et al., 1981; BHARTI et al., 2003). Tal característica molecular é responsável pela etapa de adição tia-Michael ao anidrido maléico e pode ser facilmente evidenciada pela técnica de IV ou de RMN ^1H , esta última devido ao caráter parcialmente duplo da ligação C-NH₂ que torna os hidrogênios diastereotópicos (BHARTI et al., 2003; TARASCONI et al., 2000).

Novamente, nossos resultados de RMN ^1H confirmaram esta observação uma vez que os dois hidrogênios da posição N-4 nos compostos **3a** e **3b** aparecem como dois singletos largos não equivalentes à baixa temperatura (~ 293 K) e coalescem quando a temperatura é elevada (~ 310 K), devido ao aumento da velocidade de rotação que os torna enantiotópicos (FERRARI et al., 1994). Mais adiante, este tópico será retomado.

Assim, com base nos dados que foram apresentados, pode-se sugerir que o mecanismo reacional de formação dos derivados de 4-tiazolidinonas a partir de tiossemicarbazonas, deve-se seguir o que foi apresentado anteriormente por Balasubramaniyan et al. (1990) e Augustin e Kohler (1976) em razão das similaridades químicas com a tiouréia (Esquema 13).



Esquema 13. Mecanismo de formação de 4-tiazolidinonas (**4**) a partir de tiossemicarbazonas (**3**) e anidrido maléico

4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS

4.3.1. Espectros de infravermelho (IV) dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas substituídos (3a – 3j)

As principais bandas dos espectros de infravermelho das substâncias **3a** – **3j** mostraram-se muito similares, como pode ser observado na tabela 3.

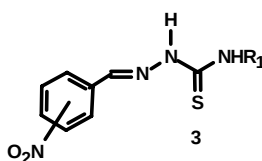


Tabela 3. Principais bandas de absorção do espectro de IV para os compostos **3a** – **3j**

Nº	R ₁	NO ₂	v (N-H)	v (C=N)	v (C=S)
3a	H	<i>m</i>	3397 (vm ^a), 3243 (vm), 3156 (vf ^b)	1525 (vF ^c)	1106 (vm)
3b	H	<i>p</i>	3492 (vF), 3366 (vF), 3143 (vf)	1527 (vF)	1099 (vm)
3c	CH ₃	<i>o</i>	3370 (vm), 3149 (vf)	1513 (vF)	1104 (vm)
3d	CH ₃	<i>m</i>	3360 (vF), 3155 (vm)	1521 (vF)	1044 (vm)
3e	CH ₃	<i>p</i>	3375 (vm), 3142 (vf)	1516 (vF)	1094 (vm)
3f	C ₂ H ₅	<i>o</i>	3351 (vm), 3139 (vm)	1521 (vF)	1102 (vm)
3g	C ₂ H ₅	<i>m</i>	3365 (vm), 3139 (vf)	1520 (vF)	1103 (vm)
3h	C ₂ H ₅	<i>p</i>	3364 (vm), 3143 (vf)	1511 (vF)	1104 (vm)
3i	C ₆ H ₅	<i>o</i>	3343 (vm), 3131 (vf)	1509 (vF)	1089 (vm)
3j	C ₆ H ₅	<i>m</i>	3224 (vf), -	1526 (vF)	1069 (vm)

^a m = média; ^b f = fraca; ^c F = forte

No espectro de IV dos compostos **3a** e **3b** as bandas na região 3243 - 3492 cm^{-1} foram atribuídas às frequências de estiramento assimétrico e simétrico da função NH_2 . Segundo Tarasconi et al. (2000) e Ferrari et al. (2000) a vibração de estiramento da ligação NH hidrazínico aparece entre 3141 – 3178, contudo esta banda é geralmente larga devido à superposição pela banda de C-H azometínico. Nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura, tendo em vista que a banda de estiramento da ligação N-H hidrazínico (ν_{NH}) de todas as tiossemicarbazonas obtidas apareceram entre 3131 a 3156 cm^{-1} . A figura 12 abaixo mostra o espectro de IV do *p*-nitro-benzaldeído tiossemicarbazona **3b**.

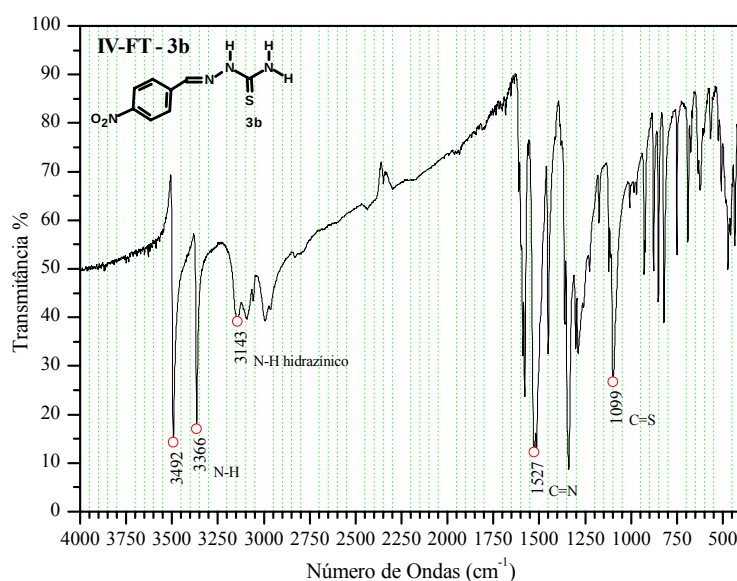


Figura 12. Espectro IV do *p*-nitro-benzaldeído tiossemicarbazona **3b** mostrando as principais bandas

Para as tiossemicarbazonas monossustituídas, apenas duas bandas são assinaladas para o estiramento de N-H, uma para a ligação N-H hidrazínica, já mencionada anteriormente, e a outra para a ligação $\text{R}_1\text{N-H}$ terminal, entre 3343 e 3375 cm^{-1} . Entretanto, para a tiossemicarbazona **3j** observou-se um deslocamento negativo para 3224 cm^{-1} além da não visualização da banda de estiramento N-H hidrazínica. Baseando-se nos dados de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, no qual o hidrogênio hidrazínico aparece em 9,94 ppm em clorofórmio deuterado, indicando a sua alta acidez, supõe-se que a presença de umidade na amostra tenha causado a sobreposição da banda.

Típicas bandas de C-H alifático podem ser visualizadas nas substâncias **3c** – **3h** entre 2950 a 3095 cm^{-1} , enquanto o estiramento de C=N aparece como uma banda forte na faixa de 1509 a 1540 cm^{-1} superposta com a banda larga de C=C ($\sim 1595 \text{ cm}^{-1}$). De fato, as substâncias

3i e **3j** mostraram bandas muito largas nessa região, devido principalmente ao acúmulo de ligações C=C.

A ausência da banda de S-H, observada em geral entre 2500 – 2600 cm^{-1} e a presença da banda de C=S em 1044 – 1106 cm^{-1} confirma as estruturas de todas as tiossemicarbazonas na forma tiona (BHARTI et al., 2003; TARASCONI et al., 2000). Abaixo, podem-se ver os espectros de IV das substâncias **3d** e **3i** (Figura 13).

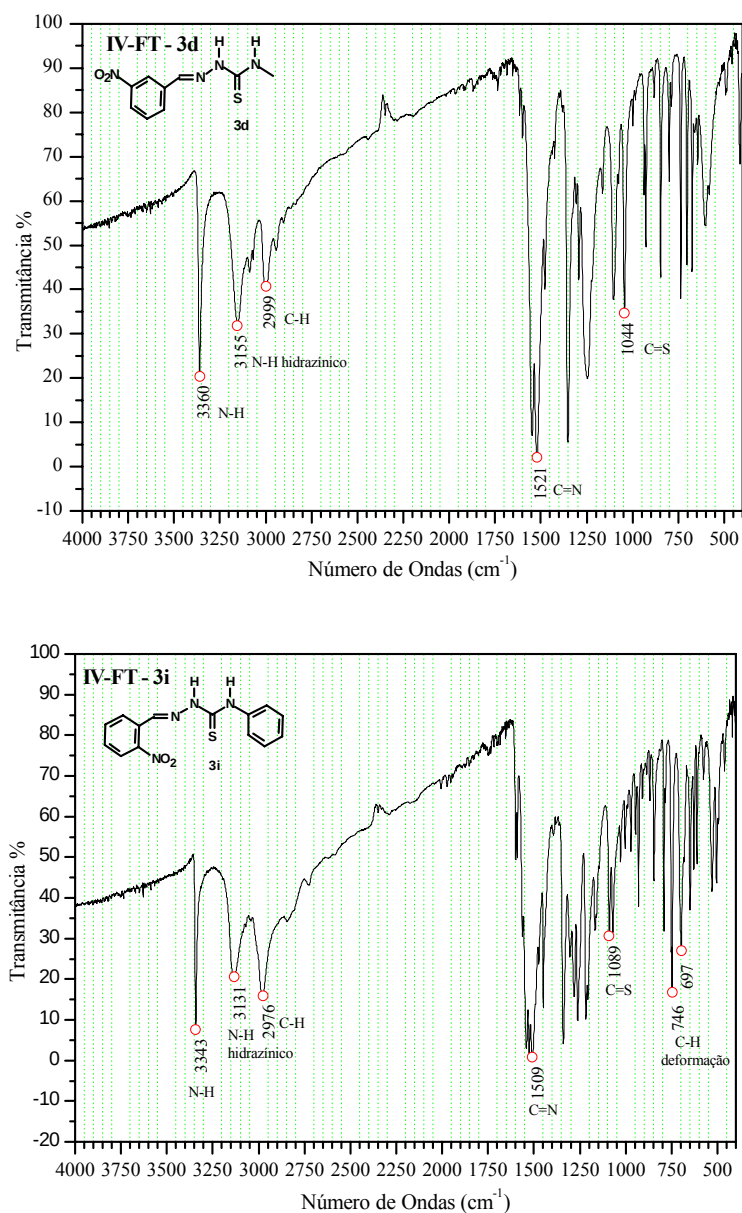


Figura 13. Espectros de IV das substâncias: *m*-nitro-benzaldeído-4-metil-tiossemicarbazona (**3d**) e do *o*-nitro-benzaldeído-4-fenil-tiossemicarbazona (**3i**), respectivamente

4.3.2. Espectros de Infravermelho dos Derivados de 4-Tiazolidinonas (4a – 4j)

A tabela 4 abaixo apresenta as principais bandas de absorção das substâncias **4a** a **4j**. Foram selecionadas as vibrações de estiramento das ligações C=O, da função ácida, a banda de amida I de C(=O)-N, e a banda de deformação do grupo funcional NCS, segundo El-gendy et al. (1990).

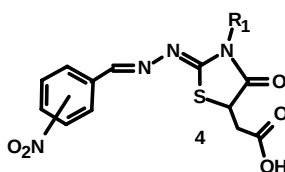


Tabela 4. Principais bandas de absorção do espectro de IV para os compostos **4a – 4j**

Nº	R ₁	NO ₂	ν (C=O, CO ₂ H)	N (C(=O)-N)	ν (NCS)
4a	H	<i>m</i>	1734 (vF ^a)	1642 (vF)	1350 (vF)
4b	H	<i>p</i>	1717 (vF)	1640 (vF)	1342 (vF)
4c	CH ₃	<i>o</i>	1714 (vF)	1617 (vF)	1356 (vF)
4d	CH ₃	<i>m</i>	1725 (vF)	1617 (vF)	1352 (vF)
4e	CH ₃	<i>p</i>	1714 (vF)	1629 (vF)	1344 (vF)
4f	C ₂ H ₅	<i>o</i>	1709 (vF)	1614 (vF)	1352 (vF)
4g	C ₂ H ₅	<i>m</i>	1711 (vF)	1623 (vF)	1362 (vF)
4h	C ₂ H ₅	<i>p</i>	1714 (vF)	1622 (vF)	1341 (vF)
4i	C ₆ H ₅	<i>o</i>	1737 (vF)	1603 (vF)	1347 (vF)
4j	C ₆ H ₅	<i>m</i>	1717 (vF ^b)	1621 (vF)	1353 (vF)

^a F = forte; ^b f = fraca

Todas as 4-tiazolidinonas (**4a – 4j**) sintetizadas apresentaram a banda de estiramento de C=O entre 1709 – 1737 cm⁻¹, características da função ácida. Em adição, a banda de C(=O)-N

da lactama também foi detectada, conforme é mostrado na tabela acima, provindo evidência confirmatória da formação do heterociclo.

Nas substâncias **4a** e **4b** as bandas de estiramento de N-H não foram devidamente detectadas devido à superposição da banda larga de O-H presente em todas os espectros. Entretanto, para a 4-tiazolidinona **4b** é possível observar uma banda larga de intensidade fraca em 3401 cm^{-1} atribuída ao estiramento de N-H.

Uma banda forte na região de $1341 - 1362\text{ cm}^{-1}$ apareceu no espectro de IV de todas as 4-tiazolidinonas e, segundo El-gendy et al. (1990) é devido à deformação angular do grupo funcional NCS. Nos espectros de IV das substâncias **4c** – **4h** as bandas de estiramento de C-H alifático apareceram na faixa de $2854 - 3090\text{ cm}^{-1}$.

Duas bandas, uma na região de $1518 - 1539\text{ cm}^{-1}$, e a outra em $1555 - 1583\text{ cm}^{-1}$, foram atribuídas as vibrações de estiramento da função C=N, azometina e exocíclica, respectivamente para todas as substâncias obtidas. Para as substâncias **4i** e **4j** foram observadas as bandas de estiramento C-H aromático na faixa de $3060 - 3081\text{ cm}^{-1}$ e as bandas em 687 e 743 cm^{-1} características de aromáticos monosubstituídos. Abaixo estão os espectros das substâncias **4b**, **4c** e **4j** (Figuras 14, 15 e 16).

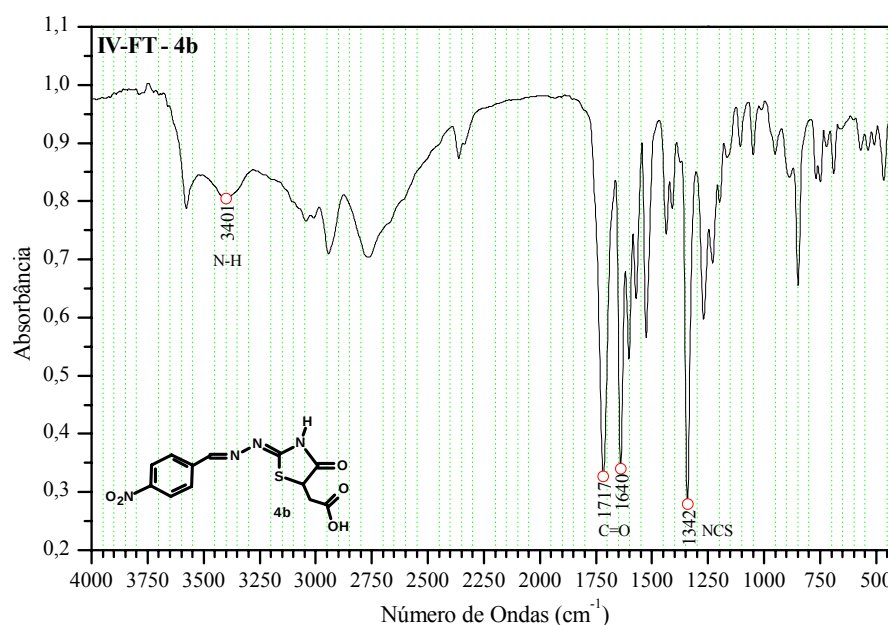


Figura 14. Espectro de IV do ácido [2-(p-nitro-benzilideno-hidrazono)-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (**4b**) mostrando as principais bandas

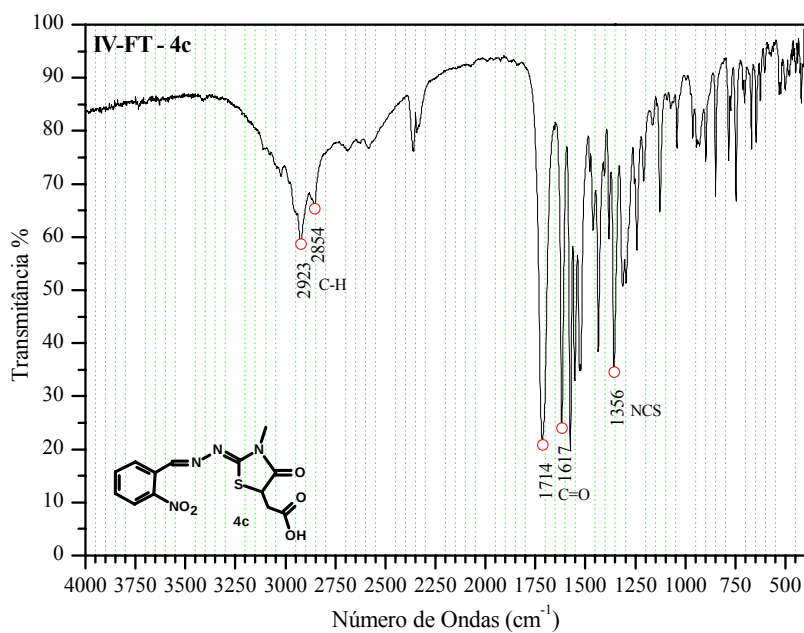


Figura 15. Espectro de IV do ácido [2-(o-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-metil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4c)

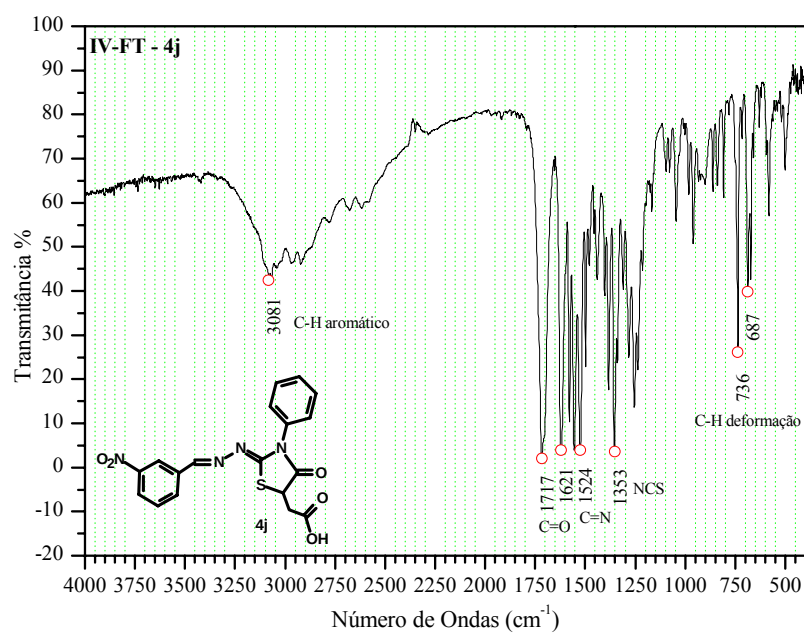


Figura 16. Espectro de IV do ácido [2-(m-nitro-benzilideno-hidrazono)-3-fenil-4-oxo-1,3-tiazolidin-5-il] acético (4j)

4.3.3 Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) dos nitro-benzaldeídos tiossemicarbazonas substituídos (**3a** – **3j**)

A tabela 5 apresenta os principais deslocamentos químicos do espectro de RMN ^1H de todas as tiossemicarbazonas (**3a** – **3j**) obtidas.

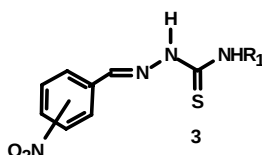


Tabela 5. Principais deslocamentos químicos de RMN ^1H (300 MHz, ppm, DMSO- d_6) das substâncias **3a** – **3j**

N ^o	R ₁	NO ₂	NH _{hidrazínico}	NHR ₁	CH=N
3a	H	<i>m</i>	11,60 (1H, s)	8,25 e 8,3 (2H, s largo)	8,14 (1H, s)
3b	H	<i>p</i>	11,72 (1H, s)	8,27 e 8,42 (2H, s largo)	8,11 (1H, s)
3c	CH ₃	<i>o</i>	11,80 (1H, s)	8,66 (1H, q largo)	8,47 (1H, s)
3d	CH ₃	<i>m</i>	11,67 (1H, s)	8,73 (1H, q largo)	8,14 (1H, s)
3e	CH ₃	<i>p</i>	11,78 (1H, s)	8,75 (1H, q largo)	8,12 (1H, s)
3f^a	C ₂ H ₅	<i>o</i>	9,27 (1H, s)	7,36 (1H, t largo)	8,32 (1H, s)
3g^a	C ₂ H ₅	<i>m</i>	9,93 (1H, s)	7,45 (1H, t largo)	7,94 (1H, s)
3h	C ₂ H ₅	<i>p</i>	11,70 (1H, s)	8,78 (1H, t largo)	8,12 (1H, s)
3i	C ₆ H ₅	<i>o</i>	12,12 (1H, s)	10,21 (1H, s)	8,58 (1H, s)
3j^a	C ₆ H ₅	<i>m</i>	9,94 (1H, s)	9,16 (1H, s)	7,98 (1H, s)

^a solvente utilizado CDCl₃

À temperatura ambiente, os espectros de RMN ^1H das substâncias **3a** à **3e** e da substância **3h**, mostraram um singlete na faixa de 11,60 a 11,80 ppm relativo ao N-H hidrazínico, em DMSO- d_6 . Já nas substâncias **3f**, **3g** e **3j** o mesmo hidrogênio sofreu um

deslocamento para 9,27 a 9,94 ppm, devido à utilização de clorofórmio deuterado na obtenção do espectro, conforme é apresentado na tabela acima.

Na substância **3i**, o sinal do hidrogênio hidrazínico apareceu como um singlete em 12,12 ppm devido ao incremento do efeito diamagnético causado pelo grupo fenil substituído na posição N-4. Menos pronunciada é a diferença de deslocamento químico observado para o hidrogênio da função azometina (CH=N) nas tiossemicarbazonas *meta* e *para* nitro substituídas (7,94 – 8,14 ppm). Entretanto, este hidrogênio sofre um acentuado efeito de desblindagem (8,32 – 8,58 ppm) quando o grupo nitro localiza-se em posição *orto*, devido ao efeito anisotrópico causado pela proximidade espacial, mesmo em diferentes solventes. Em todas as substâncias, os hidrogênios aromáticos apareceram entre 7,20 - 8,65 ppm.

É interessante notar a presença de dois singletos largos para os dois hidrogênio de NH₂ nos compostos **3a** e **3b**, em 8,25 e 8,30 ppm, e 8,27 e 8,42 ppm, respectivamente. Isto significa que a rotação livre em torno da ligação C-N é bloqueada em virtude do caráter parcialmente duplo da ligação (FERRARI et al., 2000; TARASCONI et al., 2000). A temperatura de coalescência desses sinais foi obtida experimentalmente, sendo aproximadamente 310,6 K e 313,1 K, respectivamente. Na figura 17 abaixo, é mostrado o experimento de coalescência do sinal pela variação da temperatura, da substância **3b**, obtidos em DMSO-d₆, onde pode-se observar que com o aumento da temperatura para 313,1 K ocorre a coalescência do sinal em 8,33 ppm (FONTOURA et al., 2002).

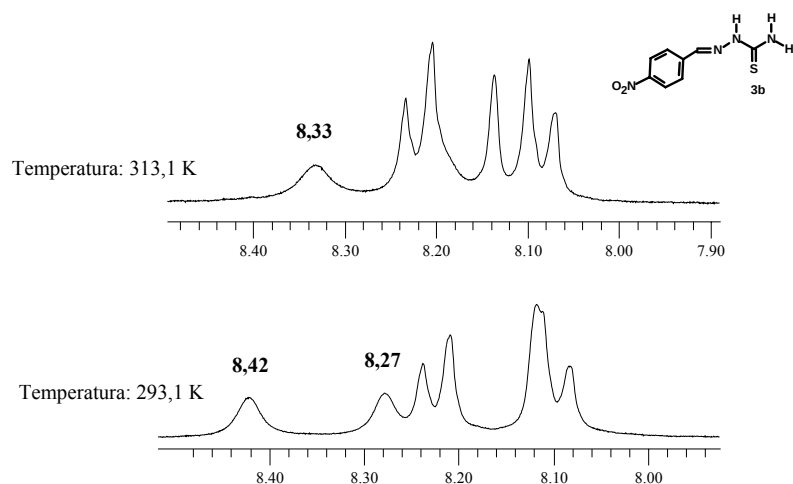


Figura 17. Espectros de RMN ¹H da substância **3b** em DMSO-d₆, mostrando a coalescência do sinal pelo experimento de variação da temperatura

Este fenômeno pode ser explicado pela planaridade de tiossemicarbazonas não substituídas, como relatou Casas et al. (2000), que permite uma maior sobreposição dos orbitais não-ligantes causando dessa forma a deslocalização dos elétrons π . De fato, segundo um modelo proposto por Wiberg e Rablen (1995), a ressonância de tioamidas pode ser representada por duas estruturas: **1** e **2** (Figura 18).

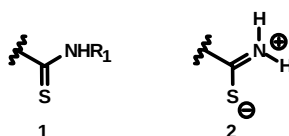


Figura 18. Modelo de ressonância de duas estruturas para tioamidas

Este modelo explica fenômenos tais como, o elevado comprimento de ligação da função C=S, em tioamidas, assim como o caráter de ligação dupla de C-N, observado no experimento de RMN mostrado acima (Lauvergnat; Hiberty, 1997; Vassilev; Dimitrov, 2003).

Nas substâncias monossustituídas (**3c** – **3h**), o deslocamento químico do hidrogênio aparece entre 7,36 a 8,78 ppm acoplando com os hidrogênios de metila (CH₃) ou metileno (CH₂) com ³J variando de 4,2 Hz a 6,9 Hz. Em adição, nos compostos **3i** e **3j** o hidrogênio terminal (N-4) aparece como um singlete bastante desblindado em 10,21 e 9,16 ppm, respectivamente. Já para os hidrogênios alifáticos de carbonos diretamente conectados ao nitrogênio, foi observado um acentuado efeito diamagnético de desblindagem devido ao grupo tiocarbonila fortemente polarizado (Galabov et al., 2003).

Sendo assim, considerando o que foi mencionado anteriormente, os hidrogênios de metila *alfa* ao nitrogênio (N-CH₃) tiveram o deslocamento químico em aproximadamente ~ 3,03 ppm enquanto os hidrogênios de metileno (N-CH₂CH₃) apareceram um pouco mais desblindados entre 3,06 – 3,81 ppm. Para os hidrogênios de metila *beta* ao nitrogênio (N-CH₂CH₃), presente nas substâncias **3f**, **3g** e **3h**, é observado um deslocamento na faixa de 1,16 a 1,35 ppm, como esperado. Como exemplo, tem-se o espectro da substância **3g** (figura 19).

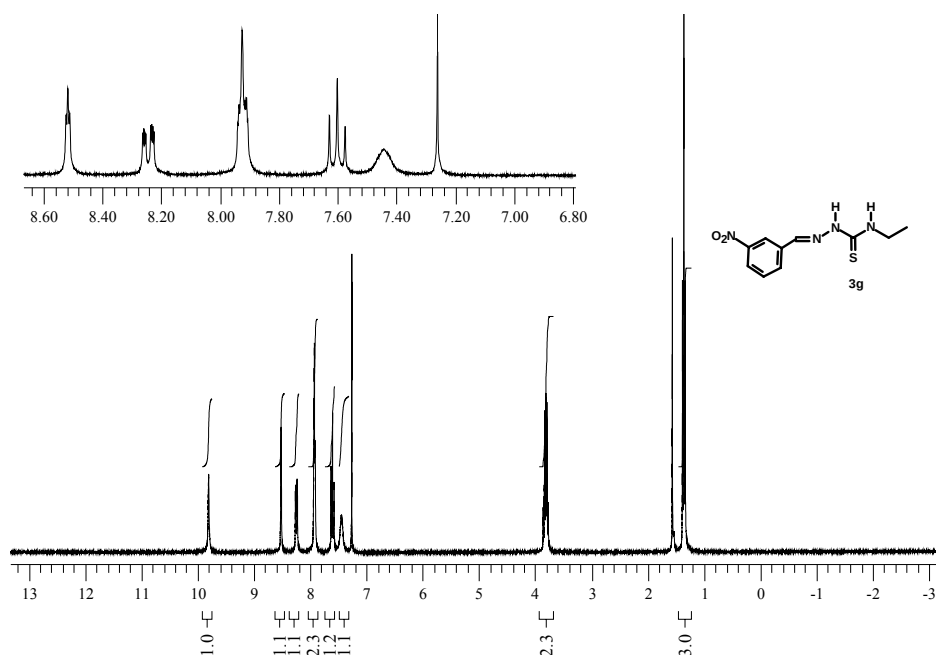


Figura 19. Espectro de RMN ^1H da substância **3g** em CDCl_3

Na ampliação dos sinais abaixo, pode-se ver um triplete em 1,35 ppm ($^3J = 7,2$ Hz), relativo aos hidrogênios de metila, devido ao seu acoplamento com os hidrogênios de metileno que aparecem em 3,81 ppm como um duplo quadrupeto ($^3J = 7,2$ Hz e $^3J = 5,7$ Hz) em razão do acoplamento com o hidrogênio de N-H terminal. Este aparece em 7,45 ppm como um triplete largo mal resolvido em virtude do efeito quadrupolar do nitrogênio (Figura 20).

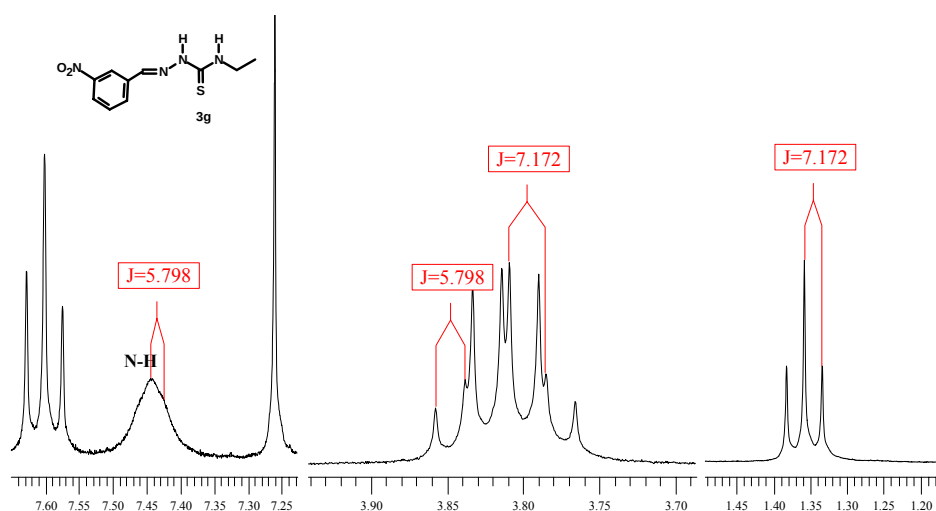


Figura 20. Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância **3g**, mostrando os acoplamentos entre os hidrogênios de metila, metileno e N-H terminal

Como mencionado anteriormente, as tiossemicarbazonas podem ser obtidas na configuração *Z* ou *E* (Karabatsos et al., 1964). Além disso, alguns estudos indicam que em certos solventes há isomerização da configuração *Z* para a *E* devido a maior estabilidade termodinâmica desta última (Ota et al., 1998).

Com o objetivo de detectar possível isomerização, realizamos uma série de experimentos segundo a metodologia relatada por Temperini et al. (1995) na qual consiste em manter a temperatura constante, obter os espectros de RMN ^1H variando-se o tempo e observar se ocorre mudança no deslocamento químico do hidrogênio azometina ($\text{CH}=\text{N}$). O experimento foi realizado em DMSO-d_6 e escolhemos a substância **3b** para representar o todo, devido aos sistemas de spins das tiossemicarbazonas obtidas serem muito parecidos em todos os compostos.

A figura abaixo mostra a ampliação dos espectros obtidos nas condições experimentais descritas acima (Figura 21). Como pode ser observado, não houve mudança na posição do sinal do hidrogênio azometina ($\text{CH}=\text{N}$) em 8,11 ppm, bem como, não houve o aparecimento de outros sinais, sugerindo que a tiossemicarbazona em estudo encontra-se preferencialmente sob uma única configuração. De fato, na cromatografia em camada delgada é observado apenas um ponto para todas as tiossemicarbazonas, entretanto outros estudos são necessários para estabelecer a configuração estrutural.

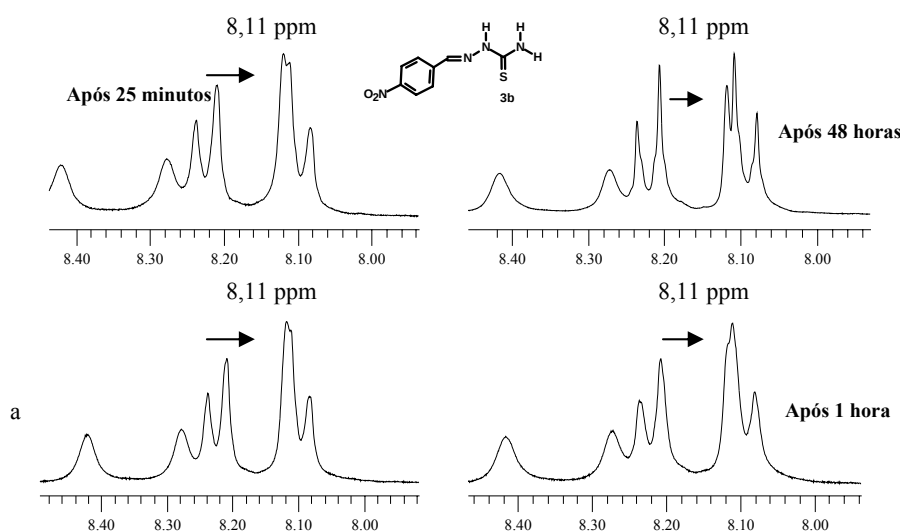


Figura 21. Espectros de RMN ^1H da substância **3b**, mostrando apenas um isômero configuracional em DMSO-d_6 pelo experimento de variação do tempo. (a) Espectro obtido logo após a preparação da amostra.

Em adição, é mostrado o espectro da substância **3i** (figura 22).

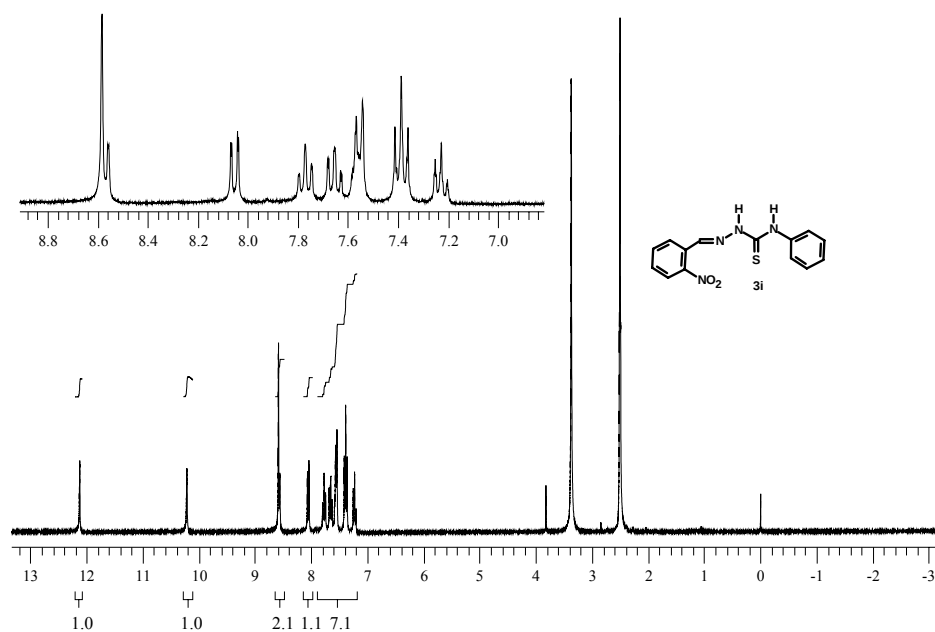


Figura 22. Espectro de RMN^1H da substância **3i** em $\text{DMSO}-d_6$

4.3.4. Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C) dos derivados de 4-tiazolidinonas (4a – 4j)

As tabelas 6 e 7 apresentam os principais deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente, referentes às 4-tiazolidinonas obtidas. A formação do heterociclo foi indicada pelo aparecimento do deslocamento característico para o CH adjacente ao átomo de enxofre em 4,39 a 4,64 ppm, e pelo sinal de carbono quaternário em 171,47 a 171,74 ppm, relativo a carbonila (lactama) (Seebacher et al., 2004).

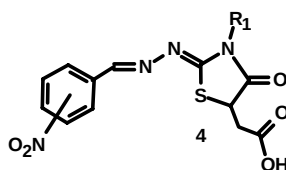


Tabela 6. Principais deslocamentos químicos de RMN ^1H (300 MHz, ppm, DMSO- d_6) das substâncias 4a – 4j

Nº	R ₁	NO ₂	CH	CH ₂
4a	H	<i>m</i>	4,4 (1H, dd)	2,98 e 3,04 (1H cada, dd)
4b	H	<i>p</i>	4,39 – 4,40 (1H, m)	2,86 – 3,07 (2H, m)
4c	CH ₃	<i>o</i>	4,43 (1H, dd)	2,91 e 3,08 (1H cada, dd)
4d	CH ₃	<i>m</i>	4,42 (1H, dd)	2,92 e 3,07 (1H cada, dd)
4e	CH ₃	<i>p</i>	4,44 (1H, dd)	2,93 e 3,09 (1H cada, dd)
4f	C ₂ H ₅	<i>o</i>	4,42 (1H, dd)	2,93 e 3,04 (1H cada, dd)
4g	C ₂ H ₅	<i>m</i>	4,43 (1H, s largo)	2,91 – 3,09 (2H, m)
4h	C ₂ H ₅	<i>p</i>	4,45 (1H, m)	2,91 – 3,09 (2H, m)
4i	C ₆ H ₅	<i>o</i>	4,56 – 4,60 (1H, m)	3,12 – 3,14 (2H, m)
4j	C ₆ H ₅	<i>m</i>	4,57 – 4,64 (1H, m)	3,13 – 3,19 (2H, m)

Todas as substâncias mostraram um típico sistema de spins ABX característico do acoplamento $CH - CH_2$, como foi relatado por Singh et al. (1981) e Balasubramaniyan et al. (1990), entretanto, devido a problemas de homogeneidade de campo, algumas substâncias apresentaram uma leve distorção no sinal, sendo atribuído nesses casos como multiplete. Por outro lado, o espectro de RMN ^{13}C confirmou, de forma inequívoca, todas as estruturas propostas (Tabela 7).

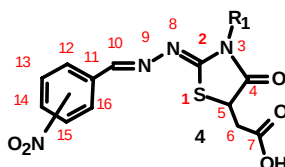


Tabela 7. Principais deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (75,4 MHz, ppm, DMSO- d_6) das substâncias **4a** – **4j**

N°	R ₁	NO ₂	C2	C4	C5	C6	C7	C10
4a	H	<i>m</i>	165,98	171,69	43,64	36,56	175,40	154,24
4b	H	<i>p</i>	166,80	171,68	43,67	36,55	175,42	154,22
4c	CH ₃	<i>o</i>	166,44	171,69	42,79	36,64	173,81	153,58
4d	CH ₃	<i>m</i>	165,93	171,61	42,76	36,66	173,80	155,49
4e	CH ₃	<i>p</i>	166,73	171,66	42,79	36,66	173,78	155,50
4f	C ₂ H ₅	<i>o</i>	165,69	171,47	42,69	36,50	173,61	153,33
4g	C ₂ H ₅	<i>m</i>	165,42	171,67	42,70	36,48	173,66	155,44
4h	C ₂ H ₅	<i>p</i>	166,16	171,72	42,78	36,56	173,70	155,49
4i	C ₆ H ₅	<i>o</i>	166,96	171,73	42,66	36,66	173,79	153,73
4j	C ₆ H ₅	<i>m</i>	166,53	171,74	42,62	36,65	173,78	155,75

O espectro de RMN ^1H da substância **4a** mostra um típico sistema ABX com constantes de acoplamentos $J_{ab} = 17$ Hz, $J_{ax} = 8$ Hz e $J_{bx} = 4$ Hz. Segundo, Takahashi (1964) o alto valor de J_{ab} é devido ao “efeito carbonila” exercido na constante de acoplamento de hidrogênios

geminais adjacentes à função C=O. O deslocamento químico desses hidrogênios pode ser visto na tabela 6 acima. O espectro pode ser visualizado abaixo (Figura 23).

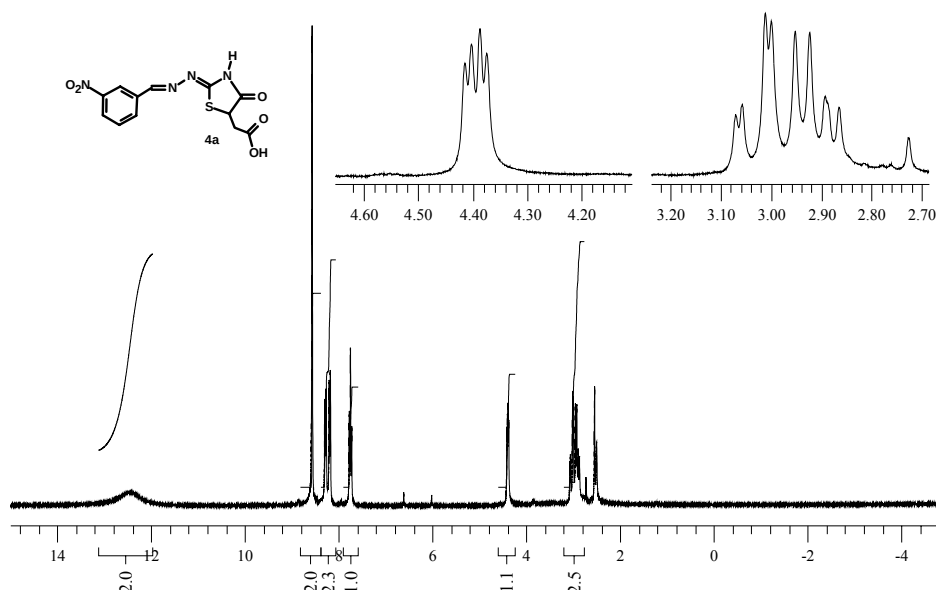


Figura 23. Espectro de RMN ^1H da substância **4a** em $\text{DMSO}-d_6$

A ressonância dos átomos de carbono do heterociclo foi assinalada segundo, Seebacher et al. (2004), Shih e Ke (2004), Küçükgülzel et al. (2002) e Ergenç et al. (1999). A tabela 7 acima, destaca aqueles sinais que indicam evidência confirmatória para a formação do anel. Os carbonos das funções imina, **C2** e **C10**, foram facilmente distinguíveis, a partir do espectro DEPT 135, aparecendo na faixa de 165,42 a 166,96 ppm e 152,22 a 155,75 ppm, respectivamente.

Os sinais das carbonilas do ácido **C7** e da lactama **C4**, apareceram entre 173,61 a 175,47 ppm e 171,47 a 171,74 ppm. Em adição, o aparecimento dos sinais em 36,48 a 36,66 ppm e em 42,62 a 43,70 ppm, atribuídos apropriadamente aos carbonos **C6** e **C5**, forneceram as evidências irrefutáveis para a formação do heterociclo (Seebacher et al, 2004; Balasubramaniyan et al, 1990).

Os demais sinais, especificamente os sinais dos carbonos aromáticos e os carbonos *N*-alquilas, não apresentaram mudanças significativas no deslocamento químico. Abaixo, nas figuras 24 e 25, são mostrados os espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 da substância **4b**.

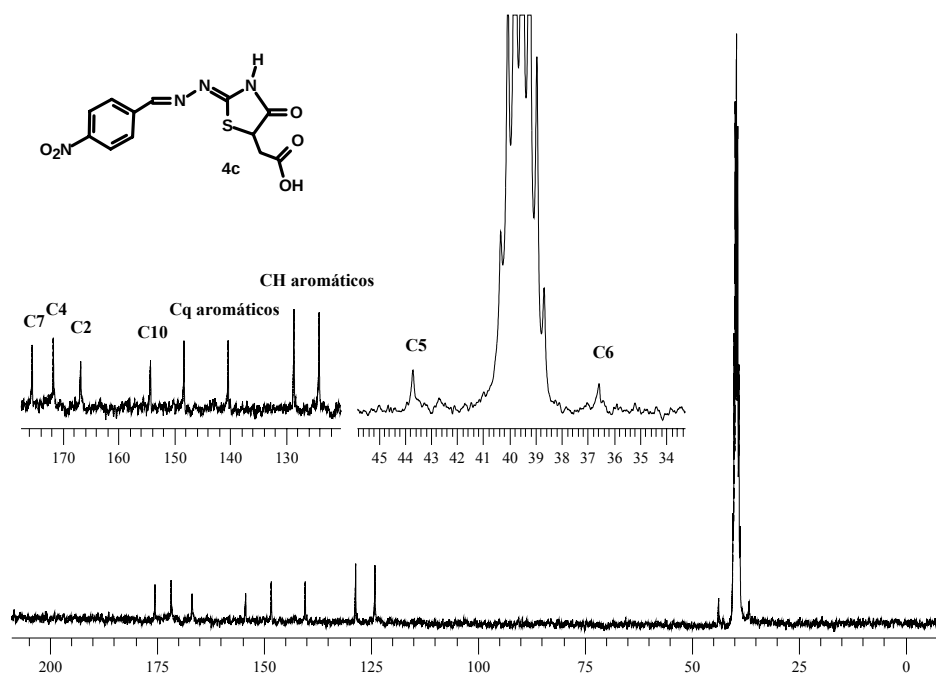


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C da substância **4b** em DMSO-d_6

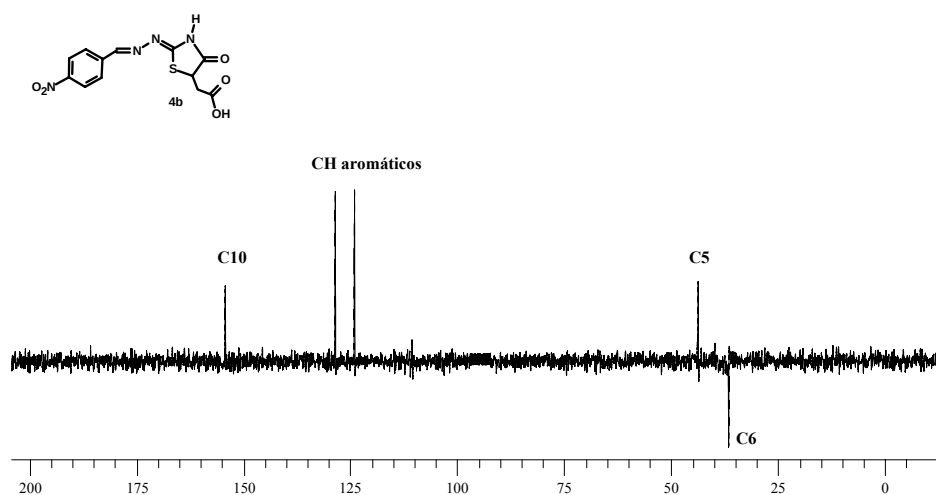


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C , seqüência de pulsos DEPT 135, da substância **4b**

4.4. Resultados do estudo biológico

As culturas infectadas com os parasitas foram incubadas com as substâncias segundo os métodos descritos por Melo et al. (2000) e Melo e Beiral (2003). As células Vero foram infectadas com os taquizoítas de *T. gondii* na proporção de 1:10, e incubadas à 37 °C por 24 horas. Após esse tempo, as culturas foram infectadas com os compostos sintetizados na concentração final de 1 mM e com a hidroxiuréia na concentração de 4 mM por 24 horas.

Essas concentrações foram estabelecidas em estudos anteriores de modo a mostrar os efeitos antiparasitários (Melo et al, 2000). Após incubação, as culturas foram observadas e contadas utilizando o microscópio ótico AXIOPLAN equipado com objetivas de 63x. A análise estatística foi realizada pelo teste *t student*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Na presença das tiossemicarbazonas (**3a – 3j**) e dos derivados de 4-tiazolidinonas (**4a – 4j**), uma drástica redução de células hospedeiras infectadas com *T. gondii* foi observada. Esta redução foi acompanhada pela diminuição dos parasitas intracelulares (Tabela 8).

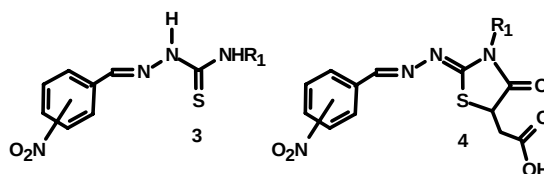


Tabela 8. Atividade biológica *in vitro* contra *T. gondii* das substâncias sintetizadas

Nº	R ₁	NO ₂	% Células Vero Infectadas		Número Médio de Parasites Intracelulares	
			Não Tratado	Tratado	Não Tratado	Tratado
3a	-H	<i>m</i>	76±9	4±2	768±142	3±3
3b	-H	<i>p</i>	65±12	5±2	698±94	4±6
3c	-CH ₃	<i>o</i>	81±4	9±5	783±84	2±3
3d	-CH ₃	<i>m</i>	84±3	9±3	642±92	1±1
3e	-CH ₃	<i>p</i>	89±6	12±4	683±60	72±28

Continuação da **tabela 8**

Nº	R ₁	NO ₂	% Células Vero Infectadas		Número Médio de Parasites Intracelulares	
			Não Tratado	Tratado	Não Tratado	Tratado
3f	-CH ₂ CH ₃	<i>o</i>	81±4	8±2	783±84	1±2
3g	-CH ₂ CH ₃	<i>m</i>	76±9	7±3	768±142	5±6
3h	-CH ₂ CH ₃	<i>p</i>	86±4	17±3	852±140	9±2
3i	-C ₆ H ₅	<i>o</i>	84±3	7±3	642±92	3±2
3j	-C ₆ H ₅	<i>m</i>	65±15	7±4	442±69	11±12
4a	-H	<i>m</i>	80±6	15±8	840±116	4±3
4b	-H	<i>p</i>	85±3	16±5	732±69	4±3
4c	-CH ₃	<i>o</i>	84±3	15±5	888±143	3±3
4d	-CH ₃	<i>m</i>	85±2	11±4	628±74	2±3
4e	-CH ₃	<i>p</i>	87±4	13±6	726±115	2±2
4f	-CH ₂ CH ₃	<i>o</i>	86±4	14±5	663±16	3±2
4g	-CH ₂ CH ₃	<i>m</i>	85±3	19±5	732±69	3±2
4h	-CH ₂ CH ₃	<i>p</i>	80±2	7±4	627±81	2±2
4i	-C ₆ H ₅	<i>o</i>	83±4	8±3	687±103	2±2
4j	-C ₆ H ₅	<i>m</i>	72±22	13±4	786±79	2±2
HU^a	-	-	80±5	26±6	913±123	186±52

^a Hidroxiuréia foi utilizada como referência; os dados são representativos de quatro (04) experimentos em triplicata.

No período de incubação, não foram observadas alterações morfológicas nas células hospedeiras, sendo constatado o seu desenvolvimento normal após a retirada das substâncias sintetizadas do meio.

Todas as substâncias foram mais eficazes em eliminar os parasitas intracelulares em relação a hidroxiuréia. Em adição, entre os compostos das duas séries houve apenas uma pequena diferença na atividade biológica observada (Figura 26).

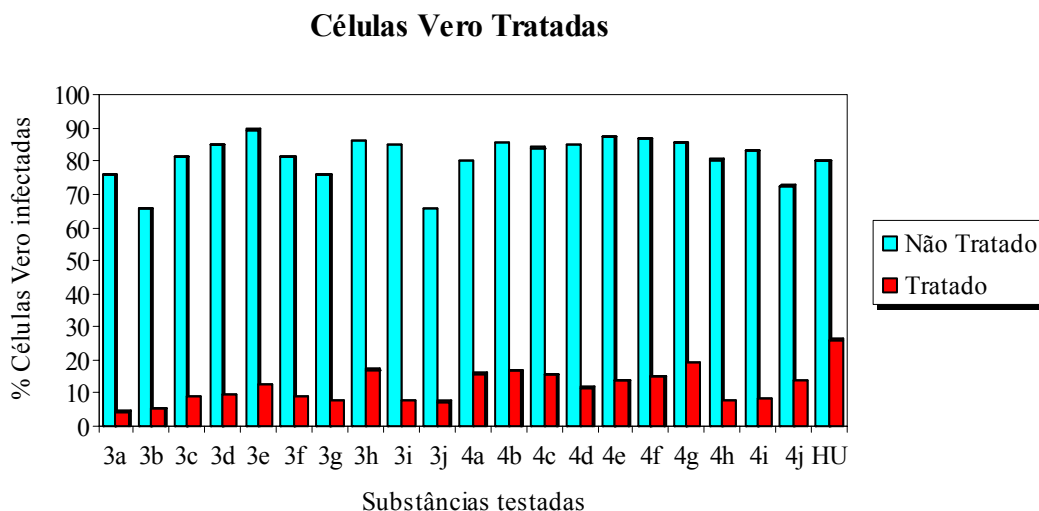


Figura 26. Células hospedeiras infectadas tratadas com as substâncias sintetizadas e com a hidroxiuréia após 24 horas de incubação

A partir do gráfico mostrado é possível observar que a tiossemicarbazona **3a** causou a maior redução na percentagem de células Vero infectadas. Entretanto, os compostos **3d** e **3f** eliminaram, quase que completamente os taquizoítas de *T. gondii*, como é possível observar no gráfico abaixo (Figura 27).

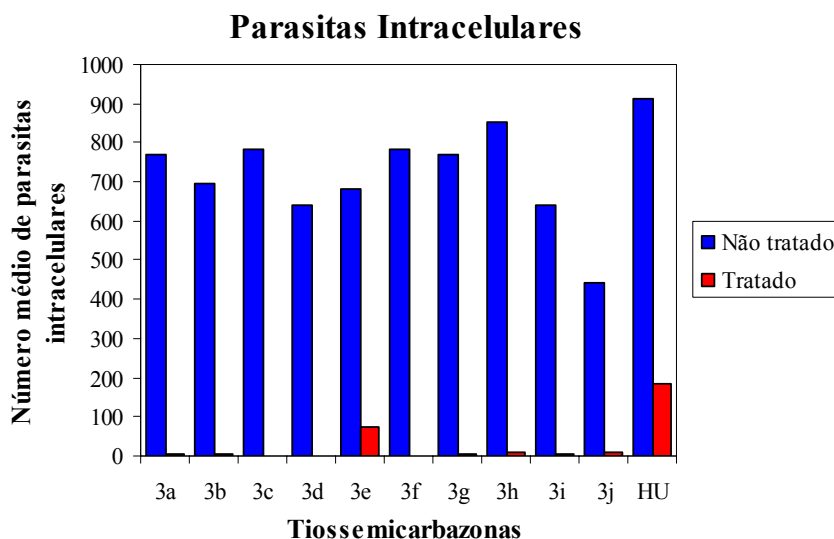


Figura 27. Número relativo de parasitas intracelulares em células Vero infectadas após o tratamento com as substâncias **3a – 3j** e com a hidroxiuréia após 24 horas de incubação

Para as 4-tiazolidinonas, observou-se uma resposta muito similar para todas as substâncias, entretanto, os compostos **4d**, **4e**, **4h**, **4i** e **4j**, estatisticamente, destacaram-se dos demais em relação à eliminação de parasitas intracelulares (Figura 28).

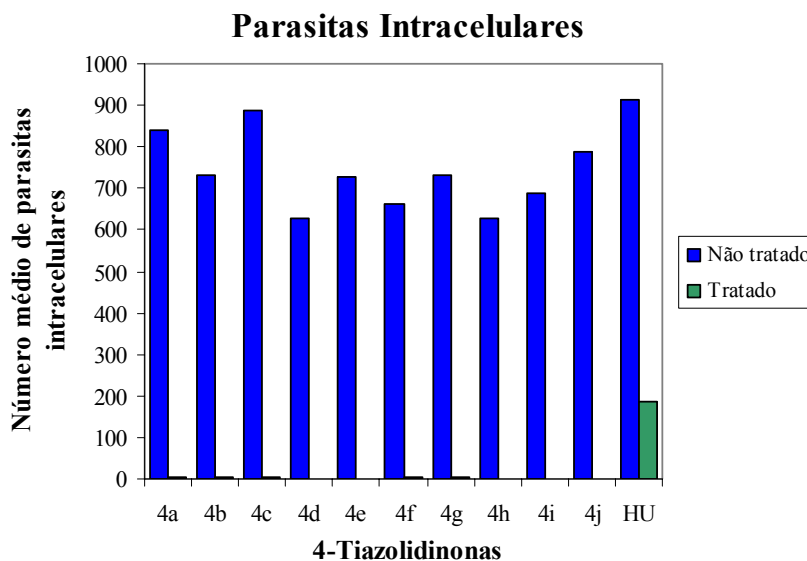


Figura 28. Número relativo de parasitas intracelulares em células Vero infectadas após o tratamento como as substâncias **4a** – **4j** e com a hidroxiuréia após 24 horas de tratamento

Abaixo é mostrada a microscopia ótica de culturas de células Vero infectadas com *T. gondii* por 24 h (Figura 29 **a**) e após incubação com as substâncias **4i** (Figura 29 **b**) e **4a** (Figura 29 **c** e **d**). Pode-se observar que após o tratamento das células infectadas com estas substâncias houve uma drástica alteração morfológica nos parasitas intracelulares em comparação com a cultura não tratada.

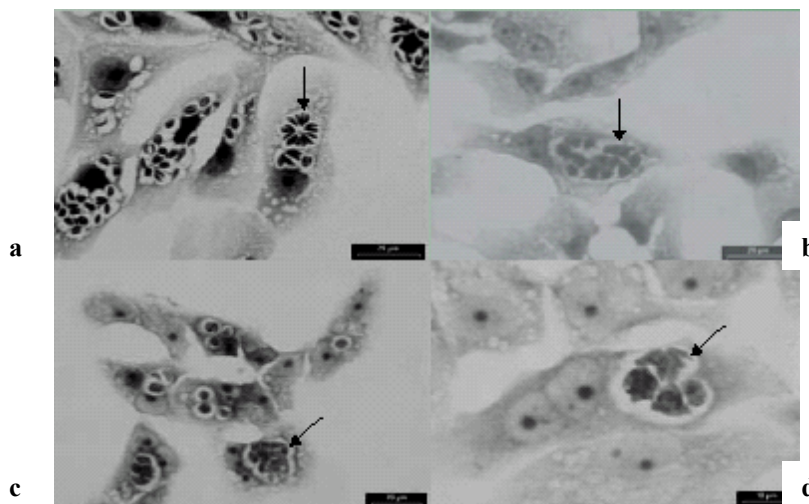


Figura 29. Microscopia ótica de células Vero infectadas com *T. gondii* por 24 h (**a**) e após incubação com as substâncias **4i** (**b**) e **4a** (**c** e **d**). Barra: 20 μ m.

As culturas de células Vero infectadas com *T. gondii* incubadas com a substância **4b** foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. Após 24 horas de incubação,

drásticas alterações morfológicas foram observadas no taquizoíta intracelular. A membrana vacuolar encontrava-se distendida, entretanto, o citoplasma do parasita mostrou-se compacto e sem vacuolizações. Em adição, o complexo membranar envolvendo o parasita também estava inalterado, assim como mitocôndrias apresentavam-se junto ao vacúolo parasitóforo (Figura 30).

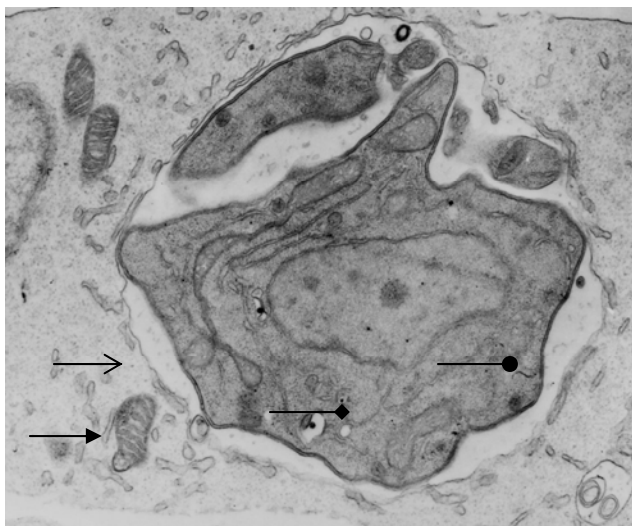


Figura 30. Microscopia eletrônica mostrando alterações na morfologia de *T. gondii* após o tratamento com a substância **4b**. As setas representam: —→ Vacúolo parasitóforo; —→ citoplasma; —→ complexo membranar; —→ mitocôndria.

4.5. Discussão do Estudo Biológico

Nos resultados mostrados acima, ficou claro que todas as tiossemicarbazonas, bem como os derivados de 4-tiazolidinonas apresentaram atividade significativa em relação ao seu potencial inibitório sobre desenvolvimento de taquizoítas de *T. gondii*. Entretanto, alguns comentários são necessários de modo a esclarecer, tais observações.

Em primeiro lugar, a percentagem de células Vero infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, após incubação com as tiossemicarbazonas, apresentou um comportamento dependente, mais dos grupos substituintes na posição N-4 que propriamente da posição do grupamento nitro no anel aromático (Figura 31).

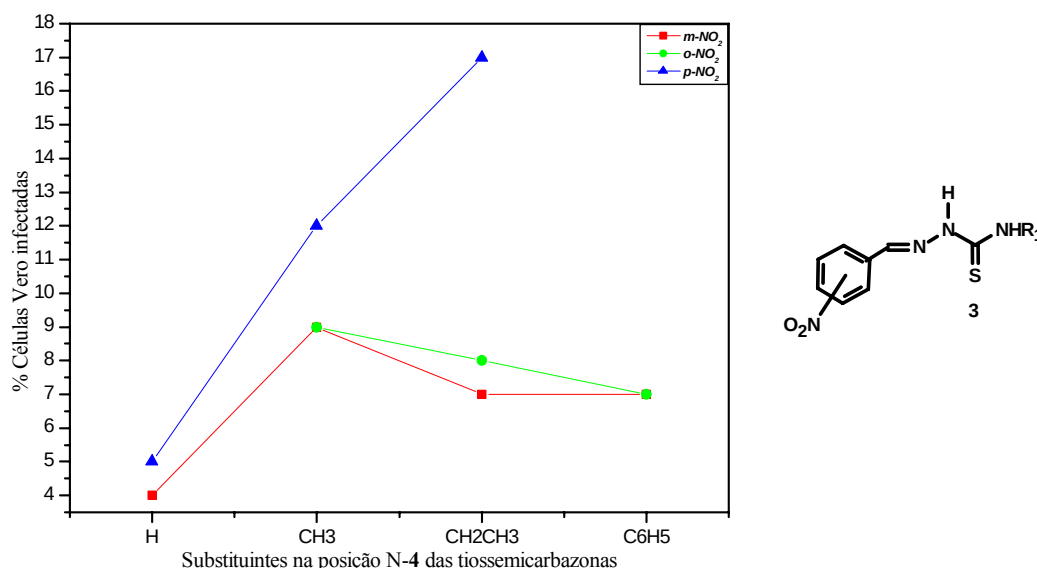


Figura 31. Relação estrutura-atividade das tiossemicarbazonas contra células infectadas com *T. gondii*.

De acordo com o gráfico acima, percebe-se que a mudança do átomo de hidrogênio por qualquer outro grupamento, dentre os explorados, leva uma perda da atividade, embora tal fenômeno seja mais acentuado nas tiossemicarbazonas substituídas com o grupo nitro na posição *para*. Tais resultados estão de acordo com artigos recentemente publicados (Greebaum et al, 2004; Fujii et al 2005).

Em relação às 4-tiazolidinonas, houve uma menor redução da percentagem de células Vero infectadas, se comparada à observada para as tiossemicarbazonas. Neste caso, por outro

lado, é interessante notar que o aumento da lipofilia, em geral, levou a um incremento da atividade biológica, com exceção das 4-tiazolidinonas substituídas com o grupo nitro na posição *meta*, que apresentaram um comportamento oscilatório, como pode ser visualizado na figura abaixo (Figura 32 e 33).

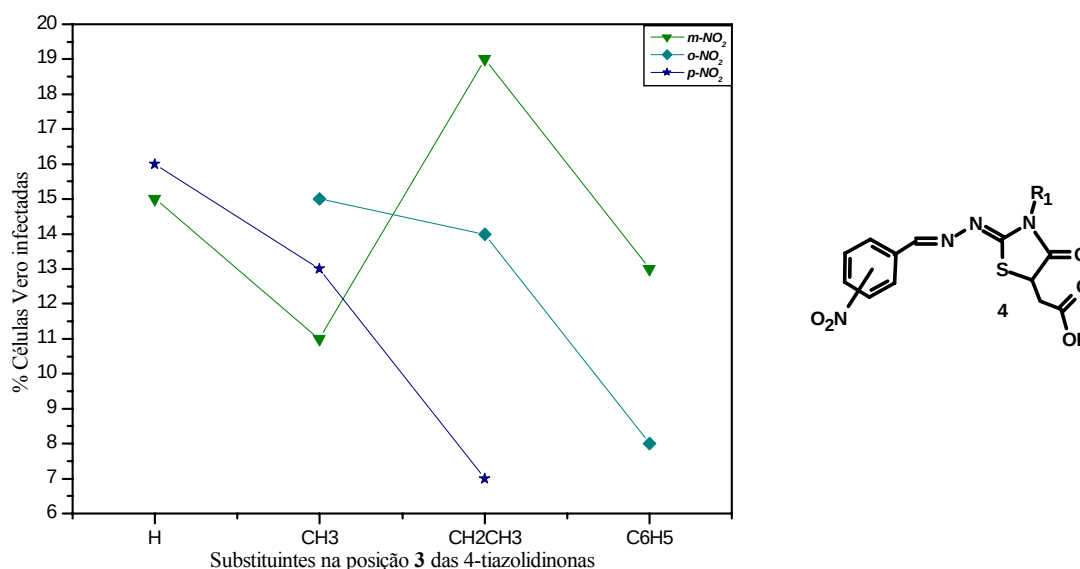


Figura 32. Relação estrutura-atividade dos derivados de 4-tiazolidinonas contra células infectadas com *T. gondii*.

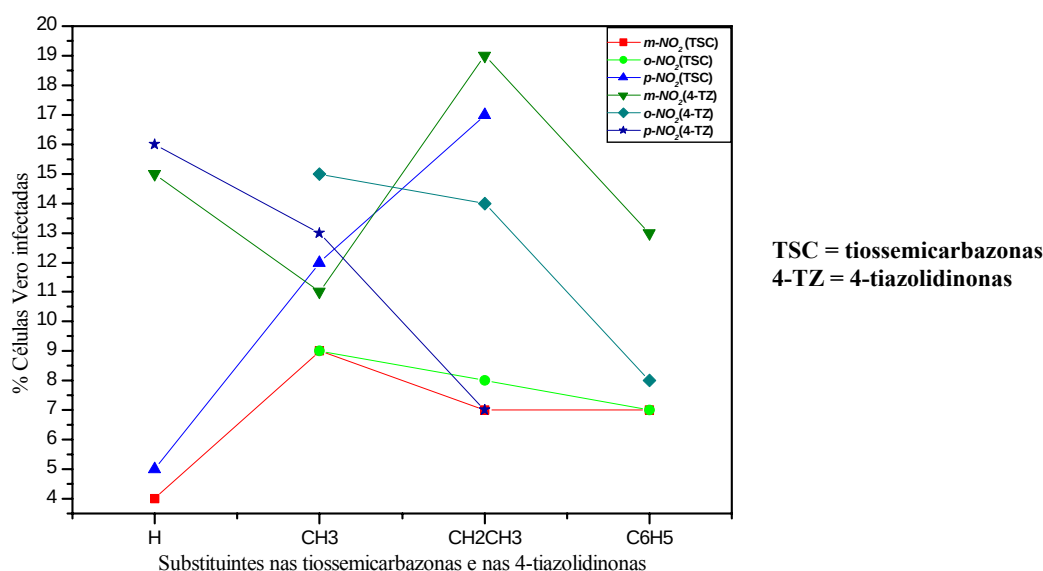


Figura 33. Comparação do potencial em reduzir o número de células infectadas com *T. gondii* das tiossemicarbazonas e dos derivados de 4-tiazolidinonas.

Curiosamente, ao investigar o efeito das substâncias obtidas na eliminação dos parasitas intracelulares, constatou-se que as tiossemicarbazonas, em oposição às 4-

tiazolidinonas, não apresentaram uma linearidade entre a redução da percentagem de células Vero infectadas com a diminuição de parasitas intracelulares, denotando que a atividade biológica das tiossemicarbazonas não deve estar relacionada apenas com a eliminação dos parasitas mas também com algum outro mecanismo não esclarecido.

Com este resultado, pode-se sugerir que a atividade biológica das tiossemicarbazonas em células infectadas com *T. gondii* deve ser mediada por outros alvos, além da já conhecida inibição da ribonucleotídeo redutase (RR), enzima responsável pelo passo limitante da divisão celular. Entretanto, outros estudos serão necessários para melhor entender o mecanismo de ação destas substâncias.

Em relação às estruturas das tiossemicarbazonas versus a redução do número de parasitas intracelulares, observou-se que, em geral, não houve uma alteração significativa da resposta biológica quanto ao incremento do grupamento substituinte ou da posição do radical nitro, com exceção da substância **3e** que mostrou a menor redução (Figura 34).

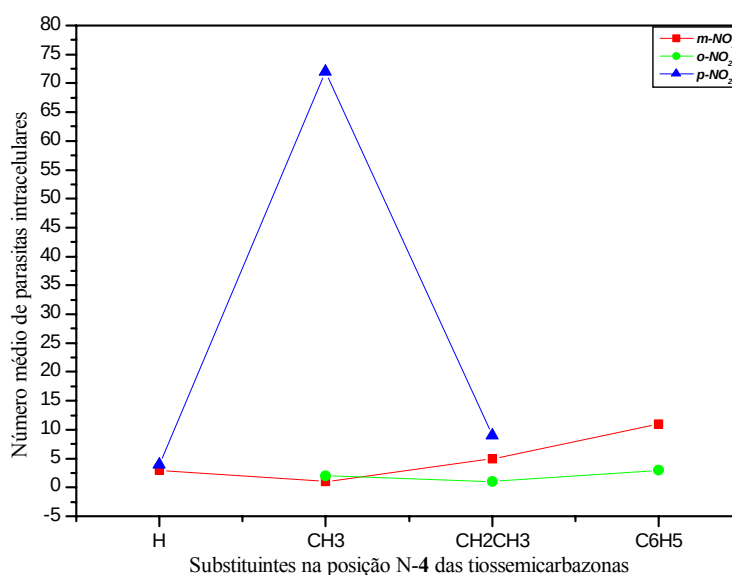


Figura 34. Relação estrutura-atividade das tiossemicarbazonas versus o número médio de parasitas intracelulares.

Quanto às 4-tiazolidinonas, novamente fica evidenciado que a presença de grupos volumosos na posição **3** do heterociclo, favorece a resposta biológica em detrimento da não substituição. Desse modo, é possível observar o aumento da atividade biológica sobre o número de parasitas intracelulares nas séries de 4-tiazolidinonas substituídas com o grupo

nitro nas posições *orto* e *para* com o aumento da lipofilia, enquanto que na série *m*-nitro, o comportamento oscilatório foi novamente visualizado (Figura 35).

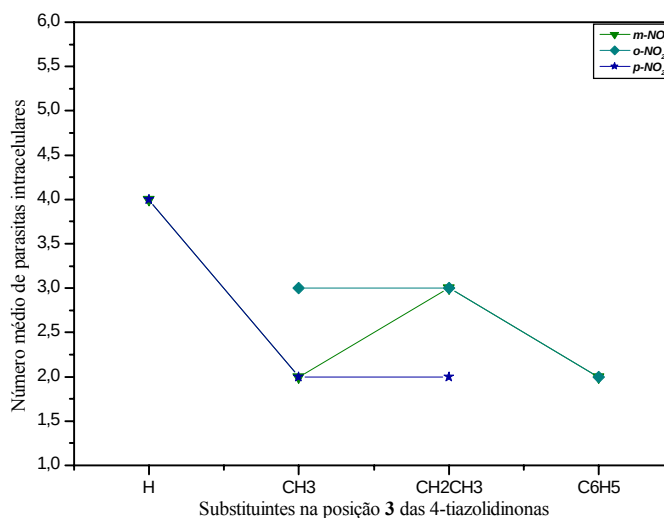


Figura 35. Relação estrutura-atividade dos derivados de 4-tiazolidinonas versus o número médio de parasitas intracelulares.

Com este resultado pode-se sugerir que, as 4-tiazolidinonas devem causar seus efeitos biológicos em razão da eliminação dos parasitas intracelulares, uma vez que tanto a diminuição na percentagem de células Vero infectadas quanto a diminuição do número médio de parasitas intracelulares, seguem o mesmo padrão nos gráficos apresentados.

No nosso estudo, todas as tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas exploradas tiveram uma ação biológica significativa em relação à hidroxiuréia utilizada como referência.

De fato a hidroxiuréia demonstrou, em trabalhos desenvolvidos por Melo et al. (2000) e Melo e Beiral (2003), ser uma potente substância na eliminação de taquizoítas de *T. gondii*, bem como, capaz de interferir na morfologia de *L. amazonensis* e *T. cruzi* sem afetar a célula hospedeira. Seu mecanismo de ação parece envolver a interrupção da divisão celular pela inibição da enzima RR, mencionada anteriormente (Melo et al, 2000).

Atualmente, as tiossemicarbazonas tem sido relacionadas como possíveis agentes antiparasitários devido aos importantes resultados encontrados tanto na pesquisa acadêmica quanto nas próprias indústrias farmacêuticas (Aguirre et al, 2004; Fujii et al, 2005; Du et al, 2002). Os nossos resultados confirmam esta tendência, em virtude da grande redução no número de células Vero infectadas. Porém, como citado antes, tal atividade não está apenas

relacionada com a eliminação de parasitas intracelulares, mas também com algum outro mecanismo ainda não esclarecido.

5. CONCLUSÃO

5.1. Conclusão

As substâncias estudadas foram sintetizadas por protocolos de simples aplicação e versatilidade, e apresentaram ao final, rendimentos satisfatórios. Nesse sentido, é importante ressaltar que algumas tiossemicarbazonas foram sintetizadas com mais de 90% de rendimento.

Todas as substâncias foram devidamente caracterizadas baseando-se em seus dados de RMN e IV. Todos os dados espectrais foram assinalados com base na literatura. Quanto à determinação da configuração das tiossemicarbazonas, constatou-se que estas se encontram sob um único diastereoisômero. Com os nossos resultados em conjunto com dados reportados na literatura, pode-se sugerir que estas devem estar sob a configuração *E*.

No nosso estudo biológico, ficou claro que as tiossemicarbazonas assim como as 4-tiazolidinonas constituem uma importante classe de substâncias contra a toxoplasmose. Todos os compostos obtidos reduziram drasticamente a percentagem de células Vero infectadas em relação a hidroxiuréia. Dentre estes, as substâncias **3a** (94,74%) e **3b** (92,31%) entre as tiossemicarbazonas, e as substâncias **4h** (91,25%) e **4i** (90,37%) entre as 4-tiazolidinonas mostraram os melhores índices de redução de células Vero infectadas. Além disso, nenhum dos compostos pareceu causar alterações morfológicas nas células hospedeiras, o que é de grande valor quando relacionado à toxicidade.

Em relação às estruturas das substâncias testadas, as tiossemicarbazonas mostraram que, em geral, com o aumento do grupo substituinte na posição N-4 ocorre uma perda substancial do potencial em reduzir a percentagem de células infectadas com *T. gondii*, enquanto que o oposto foi observado para as 4-tiazolidinonas.

Quanto ao mecanismo de ação, não foi possível determiná-lo, entretanto, as duas classes de substâncias parecem atuar por mecanismos distintos, como foi citado anteriormente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.1. Referências Bibliográficas

AFRASIABI, Z.; SINN, E.; PADHYE, S.; DUTTA, S.; PADHYE, S.; NEWTON, C.; ANSON, C. E.; POWELL, A. K. Transition metal complexes of phenanthrenequinone thiosemicarbazone as potential anticancer agents: synthesis, structure, spectroscopy, electrochemistry and in vitro anticancer activity against human breast cancer cell-line, T47D. **J. Inorg. Biochem.** v. 95, p. 306-314, 2003.

ALLEN, F. H.; KENNARD, O.; WATSON, D. G.; BRAMMER, L.; ORPEN, A. G.; TAYLOR, R. Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. 1. Bond lengths in organic compounds. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.** v. 2, p. 1-19, 1987.

ALLEN, F. H.; KENNARD, O.; TAYLOR, R. Systematic analysis of structural data as a research technique in organic-chemistry. **Acc. Chem. Res.** v. 16, p. 146-153, 1983.

ALLEN, S.; NEWHOUSE, B.; ANDERSON, A. S.; FAUBER, B.; ALLEN, A.; CHANTRY, D.; EBERHARDT, C.; ODINGO, J.; BURGESS, L. E. Discovery and SAR of trisubstituted thiazolidinones as CCR4 antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 14, p. 1619-1624, 2004.

ALVES, A. J.; LEITE, A. C. L.; SANTANA, D. P.; BELTRÃO, T. M.; COELHO, M. R. D. Synthesis of some 4-oxo- Δ^2 -thiazolin-2-ylhydrazones as potential antiprotozoal agents. **II Farmaco** v. 48, p. 1167-1171, 1993.

AMARAL, L.; BASTOS, M. P. Kinetics and mechanism for benzaldehyde phenylhydrazone formation. **J. Org. Chem.** v. 36, p. 3412-3417, 1971.

ANTONINI, I.; CLAUDI, F.; FRANCHETTI, P.; GRIFANTINI, M.; MARTELI, S. Elucidation of structure of antineoplastic agents, 2-formylpyridine and 1-formylisoquinoline thiosemicarbazones. **J. Med. Chem.** v. 20, p. 447-449, 1977.

AUGUSTIN, M.; KOHLER, M. Reactions of n-(aryl)-methylmaleamates. **Tetrahedron** v. 32, p. 2141-2145, 1976.

AVELINO, M. M.; CAMPOS, D.; PARADA, J. C. B.; CASTRO, A. M. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. **Eur. J. of Obst. & Gynecol. and Repr. Biol.** v. 108, p. 19-24, 2003.

BABAOGLU, K.; PAGE, M. A.; JONES, V. C.; MCNEIL, M. R.; DONG, C.; NAISMITH, J. H.; LEE, R. E. Novel inhibitors of an emerging target in *Mycobacterium tuberculosis*; substituted thiazolidinones as inhibitors of dTDP-rhamnose synthesis. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 13, p. 3227-3230, 2003.

BALASUBRAMANIYAN, V.; BALASUBRAMANIYAN, P.; WANI, M. J. Heterocyclisation of maleic anhydride derivatives with thiourea: synthesis of 5-substituted-2-imino-4-oxo-1,3-thiazolidines. **Indian J. Chem.** v. 29b, p. 1092-1096, 1990.

BARRECA, M. L.; CHIMIRRI, A.; DE LUCA, L.; MONFORTE, A.; MONFORTE, P.; RAO, A.; ZAPPALÀ, M.; BALZARINI, J.; DE CLERQ, E.; PANNECOUQUE, C.; WITVROUW, M. Discovery of 2,3-diaryl-1,3-thiazolidin-4-ones as potent anti-HIV-1 agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 11, p. 1793-1796, 2001.

BENBROOK, D. M.; MADLER, M. M.; SPRUCE, L. W.; BIRCKBICHLER, P. J.; NELSON, E. C.; SUBRAMANIAN, S.; WEERASEKARE, G. M.; GALE, J. B.; PATTERSON, M. K.; WANG, B.; WANG, W.; LU, S.; ROWLAND, T. C.; DISEVESTRO, P.; LINDAMOOD, C.; HILL, D. L.; BERLIN, D. Biologically active heteroarotinoids

exhibiting anticancer activity and decreased toxicity. **J. Med. Chem.** v. 40, p. 3567-3583, 1997.

BERSENEVA, V. S.; TKACHEV, A. V.; MORZHERIN, Y. Y.; DEHAEN, W.; LUYTEN, I.; TOPPET, S.; BAKULEV, A. Synthesis of novel thiazolidin-4-ones by reaction of malonothioamide derivatives with dimethyl acetylenedicarboxylate. **J. Chem. Soc.** v. 1, p. 2133-2136, 1998.

BHARTI, N.; ATHAR, F.; MAURYA, M. R.; AZAM, A. Synthesis, characterization and in vitro anti-amoebic activity of new palladium (II) complexes with 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde N(4)-substituted thiosemicarbazones. **Bioorg. Med. Chem.** v. 12, p. 4679-4684, 2004.

BHARTI, N.; SHAIENDRA; SHARMA, S.; NAQVI, F.; AZAM, A. New Palladium(II) complexes of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones: Synthesis, spectral studies and *in vitro* anti-amoebic activity. **Bioorg. Med. Chem.** v. 11, p. 2923-2929, 2003

BHARTI, N.; HUSAIN, K.; GARZA, M. T. G.; VEGA, D. E. C.; GARZA, J. C.; CARDENAS, B. D. M.; NAQVI, F. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 12, p. 3475-3478, 2002.

BHOPALE, G. M. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. **Microbes and Infection** v. 5, p. 457-462, 2003.

BHOPALE, G. M. Pathogenesis of toxoplasmosis. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.** v. 26, p. 213-222, 2003.

BLANCHET, J.; ZHU, J. Reeve's synthesis of 2-imino-4-thiazolidinone from alkyl (aryl) trichloromethyl carbinol revisited, a three-component process from aldehyde, chloroform and thiourea. **Tetrahedron Lett.** v. 45, p. 4449-4452, 2004.

BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; SILVA, E. M. K.; BORTOLIERO, A. L. Surto de Toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado bovino. **Rev. Soc. Bra. Med. Tro.** v. 30, p. 21-25, 1997.

BONDE, C. G.; GAIKWAD, N. J. Synthesis and preliminary evaluation some pyrazine containing thiazolines and thiazolidinones as antimicrobial agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 12, p. 2151-2161, 2004.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: Do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology** v. 5, p. 438-442, 2002.

BOSSI, P.; CAUMES, E.; ASTAGNEAU, P.; LI, T. S.; PARIS, L.; MENGUAL, X.; KATLAMA, C.; BRICAIRE, F. Caractéristiques épidémiologiques des toxoplasmoses cérébrales chez 399 patients infectés par le VIH suivis entre 1983 et 1994. **Rev. Méd. Interne** v. 19, p. 313-317, 1998.

BROWN, F. C. 4-Thiazolidinones. **Chem. Rev.** v. 61, p. 463-521, 1961.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. 1^a ed. Porto Alegre / MG: Ed. ARTMED, 2004, 255p.

CAMPAGNA A. C. Pulmonary toxoplasmosis. **Semin. Respir. Infect.** v. 12, p. 98-105, 1997.

ÇAPAN, G.; ULUSOY, N.; ERGENÇ, N.; KIRAZ, M. New 6-phenylimidazo[2,1-*b*]thiazole derivatives: synthesis and antifungal activity. **Monatshefte Für Chemie** v. 130, p. 1399-1407, 1999.

CASAS, J. S.; TASENDE, M. S. G.; SORDO, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. **Coord. Chem. Rev.** v. 209, p. 197-261, 2000.

CASERO, R. A.; KLAYMAN, D. L.; CHILDS, G. E.; SCOVILL, J. P.; DESJARDINS, R. E. E. Activity of 2-acetylpyridine thiosemicarbazones against *Trypanosoma rhodesiense* *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 18, p. 317-322, 1980.

CHANDE, M. S.; SURYANARAYAN, V. Michael additions: a Regioselective approach to the synthesis of spirothiazolidinones. **Tetrahedron Lett.** v. 43, p. 5173-5175, 2002.

CHIYANZU, I.; HANSELL, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and evaluation of isatins and thiosemicarbazone derivatives against cruzain, falcipain-2 and rhodesain. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 13, p. 3527-3530, 2003.

CORY, J. G. Ribonucleotide reductase as a chemotherapeutic target. **Adv. in Enz. Reg.** v. 27, p. 437-455, 1988.

COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. **Substâncias carboniladas e seus derivados**. 1^a ed. Porto Alegre/MG: Ed. Bookman, 2003. 411p.

COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; COURA, C.; MARZOCHI, M. C. A.; AMENDOEIRA, M. R. Levantamento dos resultados das reações de imunofluorescência indireta para

toxoplasmose em 6.079 pacientes de ambulatório ou gestantes no rio de janeiro realizadas durante os anos de 1971 a 1977. **Rev. Inst. Méd. Trop. de São Paulo** v. 23, p. 48-56, 1981.

CREWS, P.; RODRÍGUEZ, J.; JASPARS, M. **Organic structure analysis**. 1^a ed. New York: Ed. Oxford University Press, Inc, 1998. 552p.

DEGERLI, K.; KILIMCIOGLU, A. A.; KURT, Ö.; TAMAY, T.; OZBILGIN, A. Efficacy of azithromycin in a murine Toxoplasmosis model, employing a *Toxoplasma gondii* strain from Turkey. **Acta Tropica** v. 88, p. 45-50, 2003.

DODD, R. H.; OUANNÈS, C.; GÉRO, M. R.; POTIER, P. Hybrid molecules: growth inhibition of *Leishmania donovani* promastigotes by thiosemicarbazones of 3-carboxy- β -carboline. **J. Med. Chem.** v. 32, p. 1272-1276, 1989.

DRIESSEN, L. H. B.; VERBRAAK, F. D.; SCHULTEN, M. S. A. S.; RUYVEN, R. L. J. V.; KLOK, A. M.; HOYNG, C. B.; ROTHOVA, A. A prospective, randomized trial of pyrimethamine and azithromycin vs pyrimethamine and sulfadiazine for the treatment of ocular toxoplasmosis. **Am. J. Ophthalmol.** v. 134, p. 34-40, 2002.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Par.** 28, p. 1019-1024, 1998.

DU, X.; GOU, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **J. Med. Chem.** v. 45, p. 2695-2707, 2002.

EL-GENDY, Z.; ABDEL-RAHMAN, R. M.; FAWZY, M. M.; MAHMOUD, M. B. Biologically active thiazolidinone. Part II. Synthesis and fungi toxicities of isolated and fused thiazolidinones derived from thiosemicarbazones. **J. Indian Chem. Soc.** v. 67, p. 927-929, 1990.

ERGENÇ, E.; ÇAPAN, G.; GÜNAY, N. S.; ÖZKIRIMLI, S.; GÜNGÖR, M.; ÖZBEY, S.; KENDİ, E. Synthesis and hypnotic activity of new 4-thiazolidinone and 2-thioxo-4,5-imidazolidinone derivatives. **Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.** v. 332, p. 343-347, 1999.

FERRARI, M. B.; CAPACCHU, S.; REFFO, G.; PELOSI, G.; TARASCONI, P.; ALBERTINI, R.; PINELLI, S.; LUNGHI, P. Synthesis, structural characterization and biological activity of *p*-fluorobenzaldehyde thiosemicarbazones and of nickel complex. **J. Inorg. Biochem.** v. 81, p. 89-97, 2000.

FERRARI, M. B.; BONARDI, A.; FAVA, G. G.; PELIZZI, C.; TARASCONI, P. Synthesis, spectroscopic and structural characterization of methyl pyruvate- and pyridoxal-hydrazinopyruvoylthiosemicarbazones. **Inor. Chim.** v. 223, p. 77-86, 1994.

FEUN, L.; MODIANO, M.; LEE, K.; MAO, J.; MARINI, A.; SAVARAJ, N.; PLEZIA, P.; ALMASSIAN, B.; COLACINO, E.; FISCHER, J.; MACDONALD, S. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 50, p. 223-229, 2002.

FONTOURA, L. A. M.; RIGOTTI, I. J. C.; CORREIA, C. R. D. Experimental and theoretical studies on the rotational barrier of 1-acyl- and 1-alkoxycarbonyl-2-pyrrolines. **J. Mol. Struct.** v. 609, p. 73 – 81, 2002.

FUJII, N.; MALLARI, J. P.; HANSELL, E. J.; MACKEY, Z.; DOYLE, P.; ZHOU, Y. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H.; GUY, R. K. Discovery of potent

thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 15, p. p. 121-123, 2005.

GAGNE, S. S. Toxoplasmosis. **Prim. Care Update Ob/Gyns** v. 8, p. 122-126, 2001.

GALABOV, B.; HIEVA, S.; HADJIEVA, B.; DINCHOVA, E. On the origin of higher rotational barrier in thioamides than in amides. Remote substituent effects on the conformational stability of the thioamide group in thioacetanilides. **J. Phys. Chem. A** v. 107, p. 5854-5861, 2003.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C.; GARCIA, S. M. F.; LEITE, J. Soroepidemiologia da Toxoplasmose e avaliação ocular pela tela de Amsler, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.** v. 32, p. 671-676, 1999.

GREENBAUM, D. C.; MACKEY, Z.; HANSELL, E.; DOYLE, P.; GUT, J.; CAFFREY, C. R.; LEHRMAN, J.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and structure-activity relationships of parasitocidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei, and Trypanosoma cruzi. **J. Med. Chem.** v. 47, p. 3212-3219, 2004.

GWILT, P. R.; TRACEWELL, W. G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyurea. **Clin. Pharm.** v. 34, p. 347-358, 1998.

HANG, H. C.; BERTOZZI, C. R. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. **Acc. Chem. Res.** v. 34, p. 727-736, 2001.

HOLLA, B. S.; MALINI, K. V.; RAO, B. S.; SAROJINI, B. K.; KUMARI, N. S. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and driti-inflammatory agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 38, p. 313-318, 2003.

JOLLY, V. S.; SHARMA, K. P. Studies on aryl thiosemicarbazones and 2-oxo- Δ^2 -thiazolin-2-ylhydrazones. **J. Indian Chem. Soc.** v. 67, p. 412-413, 1990.

JOUAD, E. M.; RIOU, A.; ALLAIN, M.; KHAN, M. A.; BOUET, G. M. Synthesis, structural and spectral studies of 5-methyl 2-furaldehyde thiosemicarbazone and its Co, Ni, Cu, and Cd complex. **Polyhedron** v. 20, p. 67-74, 2001.

KARABATSOS, G. J.; VANE, F. M.; TALLER, R. A.; HSI, N. Structural studies by nuclear magnetic resonance .8. Ring-substituted phenylhydrazones semicarbazones + thiosemicarbazones. **J. Am. Chem. Soc.** v. 86, p. 3351-3358, 1964.

KARAH, N. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-2,3-dione derivatives. **Eur. J. Med. Chem.** v. 37, p. 909-918, 2002.

KASPER, L. H.; BUZONI-GATEL, D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. **Parasitology Today** v. 14, p. 150-156, 1998.

KASUGA, N. C.; SEKINO, K.; ISHIKAWA, M.; HONDA, A.; YOKOYAMA, M.; NAKANO, S.; SHIMADA, N.; KOUMO, C.; NOMIYA, K. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands **J. Inorg. Biochem**, v. 96, 298-310, 2003.

KLAYMAN, D. L.; SCOVILL, J. P.; BARTOSEVICH, J. F.; BRUCE, J. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. Derivatives of 2-acetylquinoline as potencial antimalarial agents. **Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther.** v. 19, p. 49-53, 1984.

KÜÇÜKGÜZEL, S. G.; ORUÇ, E. E.; ROLLAS, S.; SAHIN, F.; ÖZBEK, A. Synthesis, characterization and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds. **Eur. J. Med. Chem.** v. 37, p. 197-206, 2002.

LAURENT, D. R. S.; GAO, Q.; WU, D.; SERRANO-WU, M. H. Regioselective synthesis of 3-(heteroaryl)-iminothiazolidin-4-ones. **Tetrahedron Lett.** v. 45, p. 1907-1910, 2004.

LAUVERGNAT, D.; HIBERTY, P. C. Role of conjugation in stabilities and rotational barriers of formamide and thioformamide. An ab initio valence-bond study. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 119, p. 9478-9482, 1997.

LEMKE, T. L.; SHEK, T. W.; CATES, L. A.; SMITH, L. K. Synthesis of 5,6-dihydro-8(7h)-quinolinone thiosemicarbazones as potential antitumor agents. **J. Med. Chem.**, 20, 1351-1354, 01977.

LI, J.; CHEN, S.; LI, X.; NIU, C.; DOYLE, T. W. Efficient synthesis of ribonucleotide reductase inhibitors 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) and 3-amino-4-methylpyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AMP) *via* palladium mediated cross-coupling reactions. **Tetrahedron** v. 54, p. 393-400, 1998a.

LI, J.; LUO, X.; WANG, Q.; ZHENG, L.; KING, I.; DOYLE, T. W.; CHEN, S. Synthesis and biological evaluation of a water soluble phosphate prodrug of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP). **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 8, p. 3159-3164, 1998b.

LOUIE, A. Y.; MEADE, T. J. Metal complexes as enzyme inhibitors. **Chem. Rev.** v. 99, p. 2711-2734, 1999.

LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **TRENDS in Parasitology** v. 18, p. 198-201, 2002.

MCLEAN, J.; WILSON, F. J. The reaction between thiosemicarbazones and maleic anhydride. **J. Chem. Soc.** p. 1048-1050, 1939.

SOMOGYL, L. Reactions of flavonoid thiosemicarbazones under acetylating conditions. **Tetrahedron**, v. 47, p. 9305-9316, 1991.

MELO, E. J. T.; BEIRAL, H. J. Effect of hydroxyurea on the intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 36, p. 65-69, 2003.

MELO, E. J. T.; MAYERHOFFER, R. O.; SOUZA, W. Hydroxyurea inhibits intracellular *Toxoplasma gondii* multiplication. **FEMS Microbiology Letters** v. 185, p. 79-82, 2000.

MOHAMED, R. M.; AOSAI, F.; CHEN, M.; MUN, H. S.; NOROSE, K.; BELAL, U. S.; PIAO, L. X.; YANO, A. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP30 and SAG1 genes. **Vaccine** v. 21, p. 2852-2861, 2003.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M.; **Parasitologia humana**. 10^a ed. São Paulo/SP: Ed. Atheneu, 2000. 428p.

OTA, A. T.; TEMPERINI, M. L. A.; ARÊAS, E. P. G.; LOOS, M. Modeling of the interconversion between Z and E isomeric forms of pyridine-2-formyl thiosemicarbazone. **J. Mol. Struct. (Theochem)**, v. 451, p. 269-275, 1998.

PANICO, R.; POWELL, W. H.; RICHER, J. C. **IUPAC – Nomenclature of organic compounds**. London: Ed. Blackwell, 1993. 105p.

PALENIK, G. J.; RENDLE, D. F.; CARTER, W. S. Crystal and molecular structures of thiosemicarbazones – Antitumor agents 5-hydroxy-2-formylpyridine thiosemicarbazone sesquihydrate and inactive acetone thiosemicarbazone. **Acta Crystallogr. Sect. B**, v. 30, p. 2390-2395, 1974.

RAO, A.; BALZARINI, J.; CARBONE, A.; CHIMIRRI, CLERQ, E. D.; MONFORTE, A. M.; MONFORTE, P.; PANNECOUQUE, C.; ZAPPALÁ, M. Synthesis of new 2,3-diaryl-1,3-thiazolidin-4-ones as anti-HIV agents. **Il Farmaco** v. 59, p. 33-39, 2004.

ROBERTS, T.; MURRELL, K. D.; MARKS, S. Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. **Parasitology Today** v. 10, p. 419-423, 1994.

RODRIGUEZ, E. C.; MARCAURELLE, L. A.; BERTOZZI, C. R. Aminooxy-, hydrazide-, and thiosemicarbazide-functionalized saccharides: versatile reagents for glycoconjugate synthesis. **J. Org. Chem.** v. 63, p. 7134-7135, 1998.

RUDNICHENKO, A. V.; TIMOSHENKO, V. M.; SHERMOLOVICH, Y. G. Cycloaddition reactions of polyfluoroalkylthioncarboxylic acid derivatives with dimethyl acetylenedicarboxylate (DMAD). **J. Fluorine Chem.** v. 125, p. 439-444, 2004.

SARODNICK, G.; HEYDENREICH, M.; LINKER, T.; KLEINPETER, E. Quinoxalines. Part 12: Synthesis and structural study of 1-(thiazol-2-yl)-1H-pyrazolo[3,4-b]quinoxalines - the dehydrogenative cyclization with hydroxylamine hydrochloride. **Tetrahedron**, v. 59, p. 6311-6321, 2003.

SEEBACHER, W.; BRUN, R.; WEIS, R. New 4-aminobicyclo[2.2.2]octane derivatives and their activities against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma b. rhodesiense*. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 21, p. 225-233, 2004.

SIDDIQUI, I. R.; SINGH, P. K.; SINGH, J.; SINGH, J. Synthesis and fungicidal activity of novel 4-4'-bis(2''-aryl-5''-methyl/unsubstituted-4''-oxo-thiazolidin-3''-yl) bibenzyl. **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 7062-7065, 2003.

SILVA, L. A.; VIEIRA, R. S.; SERAFINI, L. N.; JUNIOR, C. G. C.; FIGUEIREDO, J. F. C. Toxoplasmose do sistema nervoso central em paciente sem evidência de imunossupressão: relato de caso. **Rev. Soc. Bra. Méd. Tro.** v. 34, p. 487-490, 2001.

SILVA, M. J.; ALVES, A. J.; NASCIMENTO, S. C. Synthesis and cytotoxic activity of *N*-substituted thiosemicarbazones of 3-(3,4-methylenedioxy)-phenylpropanal. **IL Farmaco** v. 53, p. 241-243, 1998.

SINGH, I. P.; SAXENA, A. K.; SINHA, J. N.; SHANKER, K. Synthesis and anti-inflammatory activity of thiazolidinones and imidazolidinones derived from thiosemicarbazones. **Eur. J. Med. Chem.** v. 20, p. 283-286, 1985.

SINGH, S.; BHARTI, N.; NAQVI, F.; AZAM, A. Synthesis, characterization and in vitro Antiamoebic Activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their palladium (II) and ruthenium (II) complexes. **Eur. J. Med. Chem.** v. 39, p. 459-465, 2004.

SINGH, S. P.; PARMAR, S. S.; RAMAN, K.; STENBERG, V. I. Chemistry and biological activity of thiazolidinones. **Chem. Rev.** v. 81, p. 175-203, 1981.

SHAIENDRA; BHARTI, N.; NAQVI, F.; AZAM, A. Synthesis, spectral studies and screening for amoebicidal activity of new palladium (II) complexes derived from thiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 13, p. 689-692, 2003.

SHIH, M.; KE, F. Synthesis and evaluation of antioxidant activity of sydnonyl substituted thiazolidinone and thiazole derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** v. 12, p. 4633-4643, 2004.

SOLDATI, D. The apicoplast as a potential therapeutic target in *Toxoplasma* and other apicomplexan parasites. **Parasitology Today** v. 15, p. 5-7, 1999.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **J. Org. Chem.** v. 43, p. 2923-2925, 1978.

TAKAHASHI, T. Spin-spin coupling constants for methylene groups adjacents to carbonyl. **Tetrahedron Lett.** v. 5, p. 565-572, 1964.

TARASCONI, P.; CAPACCHI, S.; PELOSI, G.; CORNIA, M.; ALBERTINI, R.; BONATI, A.; DALL'AGLIO, P. P.; LUNGHI, P.; PINELLI, S. Synthesis, spectroscopic characterization and biological properties of new natural aldehydes thiosemicarbazones. **Bioorg. Med. Chem.** v. 8, p. 157-162, 2000.

TEITZ, Y.; RONEN, D.; VANSOVER, A.; STEMATSKY, T.; RIGGS, J. L. Inhibition of human-immunodeficiency-virus by n-methylisatin-beta/4'-diethylthiosemicarbazone and n-allylisatin-beta-4/4'-diallylthiosemicarbazone. **Antiviral Res.** v. 24, p. 305-314, 1994.

TEMPERINI, M. L. A.; SANTOS, M. R.; MONTEIRO, V. R. P. Spectroscopic study of the isomerization of *z*-pyridine-2-formyl to *e*-pyridine-2-formyl thiosemicarbazone. **Spectrochim. Acta, Part A** v. 51, p. 1517-1524, 1995.

TENÓRIO, R. P. et al. **Resumos da 27^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Salvador, Brasil, 2004.

VASSILEV, N. G.; DIMITROV, V. S. Ab initio SCF study of the barrier to internal rotation in simple amides. Part 3. Thioamides. **J. Mol. Struct.**, v. 654, p. 27-34, 2003.

VIGORITA, M. G. et al. Chiral 3,3'-(1,2-ethanediyl)-bis[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-thiazolidinones] with anti-inflammatory activity. Part 11: Evaluation of COX-2 selectivity and modeling. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 11, p. 999-1006, 2003.

WALCOURT, A.; LOYEVSKY, M.; LOVEJOY, D. B.; GORDEUK, V. R.; RICHARDSON, D. R. Novel aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators with anti-malarial activity against chloroquine – resistente and – sensitive parasites. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** v. 36, p. 401 – 407, 2004.

WAUGH, K. M.; BERLIN, K. D.; FORD, W. T.; HOLT, E. M.; CARROL, J. P. Synthesis and characterization of selected heteroarotinoids - pharmacological activity as assessed in vitamin-a deficient hamster tracheal organ-cultures - single-crystal x-ray-diffraction analysis of 4,4-dimethylthiochroman-6-yl methyl ketone 1,1-dioxide and ethyl (*e*)-p[2-(4,4-dimethylthiochroman-6-yl)propenyl]benzoate. **J. Med. Chem.**, v. 28, p. 116-124, 1985.

WIBERG, K. B.; RABLEN, P. R. Why does thioformamide have a larger rotational barrier than formamide. **J. Am. Chem. Soc.** v. 117, p. 2201-2209, 1995.

YAZAR, S. et al. Investigation of probable relationship between *Toxoplasma gondii* and cryptogenic epilepsy. **Seizure** v. 12, p. 107-109, 2003.

Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity

Rômulo P. Tenório,^a Cristiane S. Carvalho,^b Carla S. Pessanha,^b José G. de Lima,^c Antônio R. de Faria,^c Antônio J. Alves,^c Edésio J. T. de Melo^b and Alexandre J. S. Góes^{a,*}

^aDepartamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil

^bLaboratório de Biologia Celular, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro 28015-620, Brazil

^cDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil

Received 2 December 2004; revised 8 March 2005; accepted 14 March 2005

Available online 9 April 2005

Abstract—Thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives were synthesized in one and two step, respectively, from thiosemicarbazide, in satisfactory yields. Then, the synthesized compounds were submitted to evaluation against host cells infected with *Toxoplasma gondii*. The present studies showed that thiosemicarbazones **2** and 4-thiazolidinone derivatives **3** were effective against intracellular *T. gondii*.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

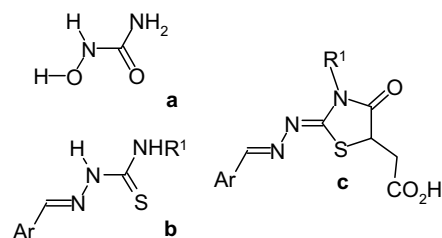
1. Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoa able to infect a large number of vertebrate cells.¹ After host cell invasion, the infected form of *T. gondii*, called tachyzoite, localized in the cytoplasm within a membrane-bounded vacuole, known as parasitophorous vacuole (PV), multiplying at intervals of 6 h.² In humans, it is responsible for toxoplasmosis, a disease known for its great importance to immunodepressed patients due to its opportunistic character.³ With the advent of AIDS, the worldwide incidence of infections caused by *T. gondii* has been rising.⁴ In the USA, between 18% and 25% of patients with AIDS will suffer from symptomatic toxoplasmosis during the course of their illness.³ Besides this, the current chemotherapy against human toxoplasmosis involve undesirable side effects and it is not effective in eliminating the parasite located in the central nervous system.^{5,6}

Recent studies using hydroxyurea (HU) demonstrate its efficacy, in vitro, in eliminating the intracellular parasites of *T. gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* (Fig. 1a).⁷ HU acts by blocking the activity of the enzyme ribonucleotide reductase, arresting the

cell cycle in the G1/S phase and, then, inactivating the DNA synthesis.² However, HU has a low affinity for the ribonucleotide reductase and a short half-life in humans.⁸ On the other hand, thiosemicarbazones are known inhibitors of this enzyme, being approximately 1000 times more potent than hydroxyurea (Fig. 1b).⁹

Biological activities of these thiosemicarbazones are related to their abilities to form complex with metal cations, by bonding through the sulfur and azomethine nitrogen atoms.¹⁰ Several works demonstrate their activity against extracellular protozoan as *Plasmodium falciparum*, *Trichomonas vaginalis*, *T. cruzi* and other parasites.^{10–12} However, no study about their biological properties against intracellular *T. gondii* was even related.



Ar = aryl group; R¹ = H, alkyl, aryl

Figure 1. Hydroxyurea (a), thiosemicarbazone (b) and 4-thiazolidinone (c).

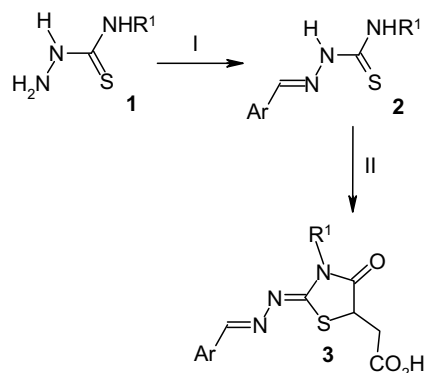
Keywords: Thiosemicarbazones; 4-Thiazolidinones; *Toxoplasma gondii*.

*Corresponding author. Tel.: +55 81 21268886; fax: +55 81 21268346; e-mail: ajsg@ufpe.br

In addition, thiosemicarbazones may also be seen as structure analogues of 4-thiazolidinones carrying a hydrazone moiety in the two position (Fig. 1c). Compounds bearing a 4-thiazolidinone heterocycle are usually of biological interest, due to their large spectrum of activity.^{13–17} In this communication, we described a cost-effective synthesis, in one and two steps, of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives, their structure elucidation and in vitro biological activities against *T. gondii*.

Scheme 1 shows the synthetic route employed for the preparation of the compounds. As can be seen, a simple synthesis was carried out, initiating from the commercially available benzaldehyde derivatives and the appropriate thiosemicarbazide substitutes **1**, in water/ethanolic media containing a few drops of acetic acid as the catalyst. At the end of the reaction, the isolated benzaldehyde thiosemicarbazone derivatives **2** were obtained as solids of yellow colour. This procedure was adapted from an article previously reported by Bharti et al.¹² and gave us satisfactory yields.

Furthermore, the obtained benzaldehyde thiosemicarbazone derivatives **2** were utilized for the preparation of 4-thiazolidinones substituted in the five position with an acetic acid group. Since the presence of an acid function

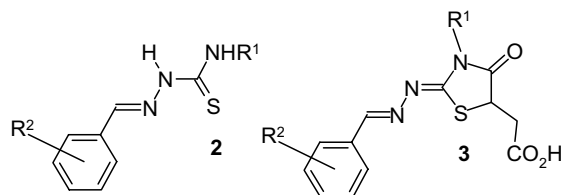


Scheme 1. Reagents and conditions: (I) ArCHO, H₂O, EtOH, acid acetic, reflux (56–97%); (II) dry toluene, anhydride maleic, DMF, Dean-Stark, reflux (26–95%).

introduces an additional diversity point to further structural tuning, we utilized a thia-Michael addition reaction with the employment of anhydride maleic as the acceptor of Michael.¹⁸ The reaction was carried out in dry toluene and DMF and, as expected, gave us the 4-thiazolidinones substituted **3**.

The synthesized compounds were obtained in satisfactory yields (Table 1). The structures of all compounds

Table 1. Synthesized compounds, their yields, melting points and in vitro activities against *T. gondii*



Compounds	R ¹	R ²	Yield (%)	Mp (°C)	% Infected Vero cells		Mean number of intracellular parasites	
					Untreated	Treated	Untreated	Treated
2a	–H	<i>m</i> -NO ₂	93	226–228	76 ± 9	4 ± 2	768 ± 142	3 ± 3
2b	–H	<i>p</i> -NO ₂	56	229–230	65 ± 12	5 ± 2	698 ± 94	4 ± 6
2c	–CH ₃	<i>o</i> -NO ₂	75	234–235	81 ± 4	9 ± 5	783 ± 84	2 ± 3
2d	–CH ₃	<i>m</i> -NO ₂	70	233–234	84 ± 3	9 ± 3	642 ± 92	1 ± 1
2e	–CH ₃	<i>p</i> -NO ₂	87	230–232	89 ± 6	12 ± 4	683 ± 60	72 ± 28
2f	–CH ₂ CH ₃	<i>o</i> -NO ₂	60	232–233	81 ± 4	8 ± 2	783 ± 84	1 ± 2
2g	–CH ₂ CH ₃	<i>m</i> -NO ₂	60	207–208	76 ± 9	7 ± 3	768 ± 142	5 ± 6
2h	–CH ₂ CH ₃	<i>p</i> -NO ₂	96	228–229	86 ± 4	17 ± 3	852 ± 140	9 ± 2
2i	–C ₆ H ₅	<i>o</i> -NO ₂	96	197–198	84 ± 3	7 ± 3	642 ± 92	3 ± 2
2j	–C ₆ H ₅	<i>m</i> -NO ₂	97	189–191	65 ± 15	7 ± 4	442 ± 69	11 ± 12
3a	–H	<i>m</i> -NO ₂	95	249–250	80 ± 6	15 ± 8	840 ± 116	4 ± 3
3b	–H	<i>p</i> -NO ₂	52	267–268	85 ± 3	16 ± 5	732 ± 69	4 ± 3
3c	–CH ₃	<i>o</i> -NO ₂	26	247–248	84 ± 3	15 ± 5	888 ± 143	3 ± 3
3d	–CH ₃	<i>m</i> -NO ₂	36	194–196	85 ± 2	11 ± 4	628 ± 74	2 ± 3
3e	–CH ₃	<i>p</i> -NO ₂	26	202–204	87 ± 4	13 ± 6	726 ± 115	2 ± 2
3f	–CH ₂ CH ₃	<i>o</i> -NO ₂	33	213–215	86 ± 4	14 ± 5	663 ± 16	3 ± 2
3g	–CH ₂ CH ₃	<i>m</i> -NO ₂	60	187–188	85 ± 3	19 ± 5	732 ± 69	3 ± 2
3h	–CH ₂ CH ₃	<i>p</i> -NO ₂	56	220–221	80 ± 2	7 ± 4	627 ± 81	2 ± 2
3i	–C ₆ H ₅	<i>o</i> -NO ₂	65	238–240	83 ± 4	8 ± 3	687 ± 103	2 ± 2
3j	–C ₆ H ₅	<i>m</i> -NO ₂	50	215–217	72 ± 22	13 ± 4	786 ± 79	2 ± 2
HU ^a	—	—	—	—	80 ± 5	26 ± 6	913 ± 123	186 ± 52

^a Hydroxyurea; data is reported as mean ± SD of four independent experiments (*p* < 0.05) compared to untreated cells (Student *t*-test).

were established on the basis of their NMR spectroscopic data, IR and, only for the 4-thiazolidinones, mass spectroscopy.¹⁹

2. Biological studies

2.1. In vitro activity against *T. gondii*

The cultures infected with tachyzoites were treated with the drugs as described by Melo et al.² and Melo and Beiral.⁷ Concisely Vero cells (kidney fibroblast from African green monkeys) were infected with tachyzoites of *T. gondii* (1:10) and incubated at 37 °C for 24 h. After that the cultures were allowed in presence of thiosemicarbazone compounds **2** (1 mM), 4-thiazolidinone derivatives **3** (1 mM) and hydroxyurea (4 mM) for 24 h. These concentrations were screened in early studies to shown anti-parasite effects. After that the cultures were processed in light microscopy and counted using AXIOPLAN microscope equipped with x63 objective. Statistical analysis was carried out using the Student *t*-test, with the level of significance set at $p < 0.05$. The data shown are representative of four experiments in triplicate.

In presence of thiosemicarbazones (**2a–j**) and 4-thiazolidinone derivatives (**3a–j**), a drastic decrease in infected host cells with *T. gondii* was observed (Table 1). This reduction of infected host cells was due to elimination of intracellular parasites (Table 1). The treated host cells not present morphologic alterations after 24 h of drugs treatment and they continued their development after drugs were withdrawn from the medium (data not shown). This potentiality of the compounds as inhibitors of reductase activity suggests further that arrest parasite cycle induced to decrease of the infection and elimination of intracellular parasites. These new compounds also were most effective than hydroxyurea (HU) to eliminate intracellular *T. gondii* (Table 1, Fig. 2). The two series of compounds showed little differences in the anti-*T. gondii* effect at 1 mM (Fig. 2). The IC₅₀ of some representative compounds was determined (Table 2).

Table 2. IC₅₀ values for representative compounds of the two series

Compounds	Infected cells IC ₅₀ (mM)	Intracellular parasites IC ₅₀ (mM)
2a	2 ± 0.05	0.1 ± 0.06
2b	1.5 ± 0.05	0.5 ± 0.06
2c	2 ± 0.06	0.5 ± 0.05
2d	1.5 ± 0.04	0.5 ± 0.05
2e	10 ± 1	3 ± 0.4
2f	2 ± 0.05	0.5 ± 0.05
2g	1 ± 0.05	0.08 ± 0.002
2h	2.5 ± 0.05	0.5 ± 0.05
2i	1 ± 0.05	0.5 ± 0.05
2j	1 ± 0.05	0.08 ± 0.004
3a	2 ± 0.05	0.5 ± 0.06
3b	2.5 ± 0.04	0.5 ± 0.04
3c	2 ± 0.07	0.5 ± 0.06
3h	2 ± 0.06	0.5 ± 0.06
HU ^a	0.1 ± 0.004	0.1 ± 0.003
SULF ^b	0.09 ± 0.04	0.1 ± 0.07

^a Hydroxyurea.

^b Sulfadiazine; each single compound was tested in a series dilution (0.1, 1, 10, 20, 30 mM) in triplicate per assay. The IC₅₀ values (mean ± SD) were determinate by a non-linear regression using exclusion test with trypan blue.

After 24 h exposure in the concentrations range of 0.01–30 mM, the IC₅₀ values of most compounds were observed (Table 2). In the infected cells, the IC₅₀ values of **2a–f,h** were ≥1.5 mM whereas **2g,i,j** were 1 mM. However, all compounds showed lower cytotoxicity than hydroxyurea and sulfadiazine. The toxicity of all compounds were more effective against intracellular parasites (Table 2) where IC₅₀ were ≤0.5 mM with exception to compounds **2g,j** (0.08 mM) and **2a** (0.1 mM). Some studies showed that thiosemicarbazones have been effective against extracellular parasites.^{20,21} However, very little is known about the effect of thiosemicarbazones on intracellular parasites. The present studies showed that the presence of thiosemicarbazones **2** and 4-thiazolidinone derivatives **3** were also effective against intracellular *T. gondii*. Studies using these compounds

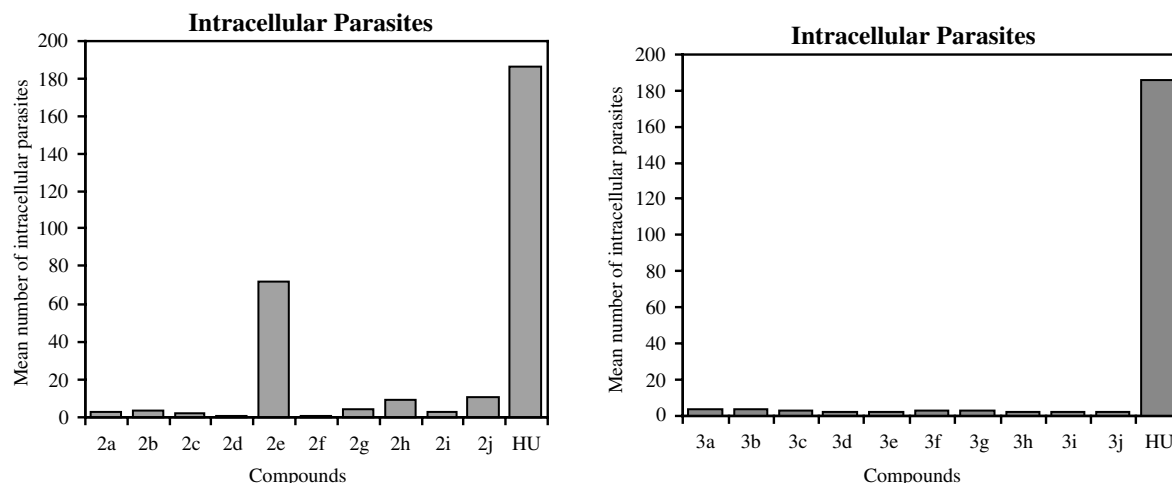


Figure 2. Relative number of intracellular parasites in infected host cells after treatment with the compounds.

against other intracellular parasites are also currently being conducted in our laboratory.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We also thank CAPES and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) for the student fellowships.

References and notes

- Mohamed, R. M.; Aosai, F.; Chen, M.; Mun, H.; Norose, K.; Belal, U. S.; Piao, L.; Yano, A. *Vaccine* **2003**, *21*, 2852.
- Melo, E. J. T.; Mayerhoffer, R. O.; Souza, W. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *185*, 79.
- Kasper, L. H.; Buzoni-Gatel, D. *Parasitol. Today* **1998**, *14*, 150.
- Campagna, A. C. *Sem. Respir. Infect.* **1997**, *12*, 98.
- Degerli, K.; Kilimcioglu, A. A.; Kurt, Ö.; Tamay, T.; Ozbilgin, A. *Acta Trop.* **2003**, *88*, 45.
- Bhopale, G. M. *Microbes Infect.* **2003**, *5*, 457.
- Melo, E. J. T.; Beiral, H. J. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2003**, *36*, 65.
- Gwilt, P. R.; Tracewell, W. G. *Clin. Pharmacokinet.* **1998**, *34*, 347.
- Liu, M.-C.; Lin, T.-S.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3672.
- Walcourt, A.; Loyevsky, M.; Lovejoy, D. B.; Gordeuk, V. R.; Richardson, D. R. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 401.
- Greenbaum, D. C.; Mackey, Z.; Hansell, E.; Doyle, P.; Gut, J.; Caffrey, C. R.; Lehrman, J.; Rosenthal, P. J.; Mckerrow, J. H.; Chibale, K. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3212.
- Bharti, N.; Husain, K.; Garza, M. T. G.; Vega, D. E. C.; Garza, J. C.; Cardenas, B. D. M.; Naqvi, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3475.
- Bonde, C. G.; Gaikwad, N. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2151.
- Rao, A.; Balzarini, J.; Carbone, A.; Chimirri, A.; Clerq, E.; Monforte, A. M.; Monforte, P.; Pannecouque, C.; Zappalá, M. *Il Farmaco* **2004**, *59*, 33.
- Vigorita, M. G.; Ottanà, R.; Monforte, F.; Maccari, R.; Monforte, M. T.; Trovato, A.; Taviano, M. F.; Miceli, N.; Luca, G.; Alcaro, S.; Ortuso, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 999.
- Ergenç, E.; Çapan, G.; Günay, N. S.; Özkirimli, S.; Güngör, M.; Özbey, S.; Kendi, E. *Arch. Pharm. Med. Chem.* **1999**, *332*, 343.
- Alves, A. J.; Leite, A. C. L.; Santana, D. P.; Beltrão, T. M.; Coelho, M. R. D. *Il Farmaco* **1993**, *48*, 1167.
- Balasubramanian, V.; Balasubramanian, P.; Wani, M. J. *Indian J. Chem., Sect. B* **1990**, *29*, 1092.
- All the compounds were fully characterized. Structural data for **2c** and **3c** is present here. Compound **2c**: FTIR (ν cm⁻¹ KBr): 3370 (NHCH₃), 1513 (C=N), 1098 (C=S); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz/ppm): 11.8 (1H, s, NH), 8.66 (1H, br q, *J* = 4.5 Hz, NHCH₃), 8.47 (1H, s, CH=N), 8.42 (1H, dd, *J* = 8.1 Hz and *J* = 1.2 Hz, CH arom), 8.03 (1H, dd, *J* = 8.1 Hz and *J* = 1.2 Hz, CH arom), 7.74–7.79 (1H, m, CH arom), 7.60–7.65 (1H, m, CH arom), 3.02 (3H, br d, *J* = 4.5 Hz, NHCH₃). Compound **3c**: FTIR (ν cm⁻¹ KBr): 1714 (C=O; CO₂H), 1617 (C=O; lactam), 1356 (NCS); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz/ppm): 12.73 (1H, br s, CO₂H), 8.74 (1H, s, CH=N), 8.07 (1H, dd, *J* = 8 Hz and *J* = 1.2 Hz, CH arom), 8.02 (1H, dd, *J* = 8 Hz and *J* = 1.2 Hz, CH arom), 7.79–7.85 (1H, m, CH arom), 7.68–7.74 (1H, m, CH arom), 4.43 (1H, dd, *J* = 9 Hz and *J* = 4 Hz, CH), 3.19 (3H, s, CH₃), 3.08 (1H, dd, *J* = 18 Hz and *J* = 4 Hz, CH₂), 2.91 (1H, dd, *J* = 18 Hz and *J* = 9 Hz, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.4 MHz/ppm): 29.50 (CH₃), 36.64 (CH₂), 42.79 (CH), 124.62 (CH arom), 128.22 (C_q, arom), 129.05 (CH arom), 131.31 (CH arom), 133.65 (CH arom), 148.36 (C_q, arom), 153.58 (CH, CH=N), 166.44 (C_q, C=N), 171.69 (C_q, C=O lactam), 173.81 (C_q, CO₂H); Mass *m/e*, *M*⁺ = 335.
- Aguirre, G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Fernández, M.; Gonzáles, M.; Denicola, A.; Otero, L.; Gambino, D.; Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Faundez, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4885.
- Singh, S.; Bharti, N.; Naqvi, F.; Azam, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 459.

TIOSSEMICARBAZONAS: MÉTODOS DE OBTENÇÃO, APLICAÇÕES SINTÉTICAS E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

Rômulo P. Tenório e Alexandre J. S. Góes*

Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife - PE

José G. de Lima, Antônio R. de Faria, Antônio J. Alves e Thiago M. de Aquino

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50470-521 Recife - PE

Recebido em 4/8/04; aceito em 2/3/05; publicado na web em 2/8/05

THIOSEMICARBAZONES: PREPARATION METHODS, SYNTHETIC APPLICATIONS AND BIOLOGICAL IMPORTANCE. Thiosemicarbazones are a class of compounds known by their chemical and biological properties, such as antitumor, antibacterial, antiviral and antiprotozoal activity. Their ability to form chelates with metals has great importance in their biological activities. Their synthesis is very simple, versatile and clean, usually giving high yields. They are largely employed as intermediates, in the synthesis of others compounds. This article is a survey of some of these characteristics showing their great importance to organic and medicinal chemistry.

Keywords: thiosemicarbazone; preparation methods; synthetic applications.

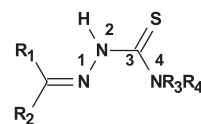
INTRODUÇÃO

A enzima ribonucleotídeo redutase (RR) vem sendo relacionada como um alvo promissor na terapia do câncer^{1,2} e doenças protozoárias³. Esta enzima existe em todas as células vivas e apresenta a função de catalisar o passo limitante na síntese dos deoxiribonucleotídeos necessários para síntese do DNA⁴. É constituída por duas sub-unidades, conhecidas como R₁ e R₂. A sub-unidade R₂ contém um radical livre tirosila, que é estabilizada por um centro de ferro não-heme. Ambos, o ferro e o grupo tirosila, são essenciais para a atividade catalítica⁵.

Os inibidores desta enzima são extremamente efetivos em bloquear a biossíntese de DNA, por conta dos baixos níveis intracelulares dos deoxiribonucleotídeos⁶. A gentamicina e a hidroxiuréia são os únicos inibidores desta enzima aprovados pela "Food and Drug Administration (FDA)", sendo que a hidroxiuréia atua na sub-unidade R₂ da enzima^{1,7}.

A hidroxiuréia, entretanto, é pouco efetiva uma vez que possui pouca afinidade pela RR e um curto tempo de meia-vida no plasma⁸. Dentre outras substâncias conhecidas por também apresentarem atividade inibitória sobre esta enzima, estão a 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (trapiina – 3-AP) e a 3-aminopiridina-4-metil-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (3-AMP)⁹. Segundo Liu *et al.*⁹, essas substâncias são 1000 vezes mais potentes que a hidroxiuréia para inibir a ribonucleotídeo redutase em células da leucemia L-1210. Estudos indicam que a atividade inibitória destas substâncias sobre a RR é devida ao complexo formado entre elas e o átomo de ferro presente no sítio catalítico da RR¹⁰. Atualmente, a triapiina está sendo avaliada em testes clínicos de fase II como possível fármaco antitumoral¹¹. Estas duas substâncias fazem parte da classe das tiossemicarbazonas.

As tiossemicarbazonas são compostos de considerável interesse científico, devido as suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antitumoral¹¹, antibacteriana¹², antiviral¹³, antiprotozoária¹⁴, citotóxica¹⁵, dentre outras. A estrutura química das



R₁, R₂, R₃ e R₄ = H, Alquil e aril

Figura 1. Numeração das tiossemicarbazonas

tiossemicarbazonas e a numeração dos seus átomos segundo a IUPAC¹⁶ é mostrada na Figura 1.

Estes compostos são geralmente obtidos pela reação de condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas, e recebem a denominação da classe tiossemicarbazona após o nome do respectivo aldeído ou cetona condensado^{17,18}. São conhecidos, também, pelas suas excelentes propriedades para formarem complexos organometálicos, comportando-se como agentes quelantes^{17,19}.

Do ponto de vista sintético, apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, assim como sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final²⁰.

CONSIDERAÇÕES MOLECULARES E ELETRÔNICAS

Segundo Casas e colaboradores¹⁷, as tiossemicarbazonas não substituídas na posição N-4 apresentam estrutura básica, C=N-NH-CS-NH₂, aproximadamente planar, com o átomo de enxofre em posição *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina (1, Figura 2). Fatores eletrônicos e estéricos contribuem para este arranjo estrutural, porém, possivelmente o fator mais importante é que o átomo de enxofre em posição *anti* possibilita a ocorrência de ligação de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio da imina e os hidrogênios da tioamida²¹. Por outro lado, este arranjo estrutural muda significativamente se forem adicionados grupos substituintes na po-

*e-mail: ajsg@ufpe.br

sição N-4, favorecendo a conformação *sin* entre o átomo de nitrogênio da imina e o átomo de enxofre (2, Figura 2)²¹.

As tiossemicarbazonas apresentam-se como sistemas com extrema deslocalização eletrônica, principalmente quando há grupos aromáticos ligados ao carbono da imina. Esta afirmação está baseada nos trabalhos pioneiros de Palenik e colaboradores²². A Figura 2b mostra, esquematicamente, a influência nos comprimentos de ligação devido à deslocalização dos elétrons π nas tiossemicarbazonas.

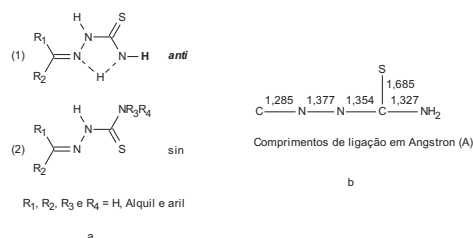
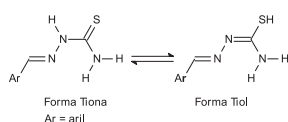


Figura 2. Arranjo estrutural e comprimentos de ligação de tiossemicarbazonas

Pode-se observar que o fragmento $\text{N}-\text{C}-\text{N}$ apresenta um comprimento de ligação muito próximo ao observado para as duplas ligações ($\text{C}=\text{C}$, 1,201–1,246 Å)²³, enquanto que na ligação $\text{C}-\text{S}$ (1,685 Å) ocorre exatamente o inverso, indicando que o átomo de enxofre permite um maior envolvimento das duas ligações $\text{C}-\text{N}$ na deslocalização dos elétrons π ¹⁷.

O caráter parcialmente duplo da ligação $\text{C}-\text{N}$ pode também ser facilmente evidenciado pela técnica de espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), uma vez que os hidrogênios em NH_2 aparecem como dois sinais não equivalentes. Isto acontece devido à rotação restrita da ligação $\text{C}-\text{NH}_2$ por conta da dupla ligação parcial que, desta forma, torna os hidrogênios diastereotópicos^{24,25}. A temperaturas elevadas (~ 323 K) estes sinais coalescem como mostra o trabalho de Ferrari e colaboradores²⁶.

Devido a esta deslocalização eletrônica, as tiossemicarbazonas podem coexistir na forma tiona ou tiol em equilíbrio tautomérico (Esquema 1).



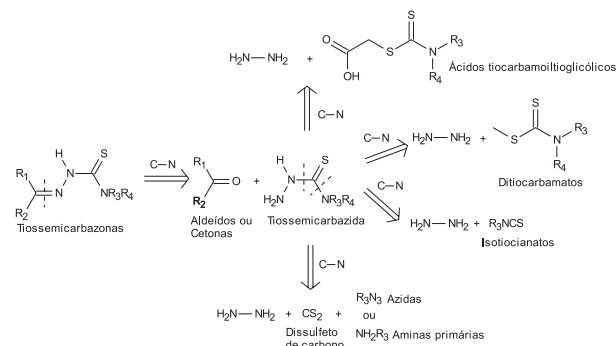
Esquema 1. Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas

O espectro de infravermelho (IV) mostra a forma predominante deste tautomerismo, uma vez que o aparecimento de uma banda forte na região de 1028–1082 cm^{-1} indica a presença da tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$). Contudo, a ausência desta banda e o aparecimento de outra na região de 2500–2600 cm^{-1} demonstra que a forma tiol é mais predominante^{27,28}. Vale ressaltar que o baixo valor da banda de estiramento de $\text{C}=\text{S}$ é devido ao seu acentuado caráter de ligação simples, e que esta pode variar de acordo com o ambiente químico^{29–32}.

Obviamente, complexos metálicos de tiossemicarbazonas mudam consideravelmente a posição destas bandas, principalmente aquelas que estão envolvidas na ligação coordenada^{25,33}. Bharti e colaboradores²⁷ obtiveram complexos de paládio e observaram deslocamentos negativos (14–39 cm^{-1}) para a banda de $\text{C}=\text{N}$, que aparece normalmente entre 1556–1630 cm^{-1} , indicando o envolvimento da função azometina na ligação coordenada, assim como para a tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$), onde as bandas foram deslocadas para frequências menores (13–35 cm^{-1}).

OBTENÇÃO DE TIOSSEMICARBAZONAS

A preparação de tiossemicarbazonas é extensamente explorada e descrita na literatura^{6,24,34–36}. Na análise retrossintética, em geral, duas estratégias podem ser empregadas: obtenção direta, pela reação quimiosseletiva de aldeídos e/ou cetonas com as tiossemicarbazidas, e obtenção indireta, através da preparação prévia das tiossemicarbazidas, utilizando hidrazina (NH_2-NH_2) e diferentes reagentes, seguida de condensação com o derivado carbonilado específico (Esquema 2).

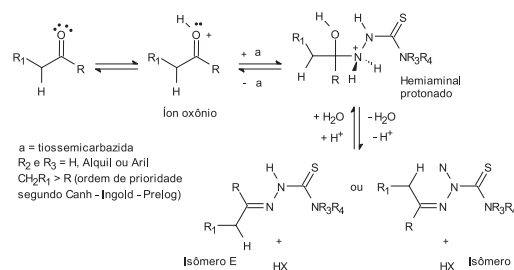


Esquema 2. Análise retrossintética de tiossemicarbazonas

Obtenção direta das tiossemicarbazonas a partir de tiossemicarbazidas

As tiossemicarbazidas podem ser adquiridas comercialmente. A síntese é descrita pela condensação equimolar de um derivado carbonilado, do tipo aldeído ou cetona, com tiossemicarbazidas em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido^{35,37–39}. Esta reação é bastante conhecida por sua alta quimiosseletividade, versatilidade e rapidez, apresentando geralmente altos rendimentos^{18,40,41}.

O mecanismo reacional é semelhante ao de formação de iminas. Inicia-se com a protonação do oxigênio da carbonila para formar o intermediário íon oxônio, seguida de ataque nucleofílico do nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida para formar o intermediário hemiaminal protonado. Este perde uma molécula de água e, após neutralização, forma-se a tiossemicarbazona^{42,43} (Esquema 3).



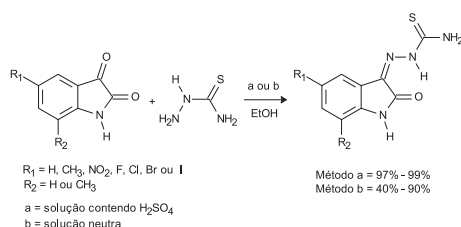
Esquema 3. Mecanismo de formação de tiossemicarbazonas

Apesar da reação ser favorável à formação das tiossemicarbazonas, é fácil notar o caráter reversível de todas as etapas de sua síntese, daí a importância da utilização da catálise ácida em pH controlado. Em geral, a formação da tiossemicarbazona é mais rápida em pH entre 4 e 5. Em valores de pH menores que 4, há possibilidade de ocorrer protonação do nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida e, conseqüentemente, a velocidade de condensação será mais lenta. Por outro lado, em $\text{pH} > 5$, a velocidade de reação também diminui, visto que a carbonila se encontrará progressivamente menos protonada^{42,43}.

Vários derivados de tiossemicarbazona foram obtidos utilizando-se as condições reacionais descritas acima. Karah¹⁵, trabalhando com derivados de isatina, reagiu estes com a tiossemicarbazida e obteve tiossemicarbazonas em rendimentos muito altos, alguns variando de 97 a 99% (Esquema 4a). Neste trabalho, a síntese foi realizada em solução etanólica, sob refluxo, contendo quantidades catalíticas de ácido sulfúrico concentrado. Em outro estudo, Benbrook e colaboradores⁴⁰ sintetizaram tiossemicarbazonas derivadas de heteroarotinóides, um conhecido sistema molecular derivado de retinóides⁴⁴, utilizando ácido acético como catalisador. Aqui, a condensação da tiossemicarbazida com o aldeído correspondente também forneceu facilmente a molécula alvo em rendimentos satisfatórios de 83%.

Alguns autores, efetuaram uma pequena modificação neste método e observaram que as tiossemicarbazonas também poderiam ser sintetizadas em solução neutra indicando que, possivelmente, o emprego do ácido não seria uma condição indispensável para formação dessas moléculas^{34,45,46}.

Neste sentido, Chiyanzu e colaboradores⁴⁶ demonstraram que as tiossemicarbazonas derivadas de isatina, que tinham sido anteriormente obtidas por Karah¹⁵ utilizando o método convencional, também eram facilmente sintetizadas sem o auxílio de catalisadores (Esquema 4b).



Esquema 4. Obtenção de tiossemicarbazonas pelo método convencional (a) e em solução neutra (b)

As tiossemicarbazonas são geralmente obtidas como misturas de isômeros *E* e *Z* no estado sólido⁴⁷. Em solução, há isomerização da configuração *Z* para *E*, devido a sua maior estabilidade termodinâmica⁴⁸. Utilizando técnicas de espectroscopia Raman e RMN ¹H, Temperini e colaboradores⁴⁹ mostraram a predominância do isômero *E* da 2-formil-piridina tiossemicarbazona em DMSO e em meio aquoso.

A isomerização é extremamente influenciada pela presença de ácido e pela natureza dos grupos substituintes ligados ao carbono azometina, bem como pelos substituintes ligados ao nitrogênio da tioamida (N-4).

Karabatsos e colaboradores⁵⁰ mostraram, em estudos utilizando a técnica de RMN ¹H, que os hidrogênios azometina de tiossemicarbazonas na configuração *E* ressonam a campo magnético baixo em relação a tiossemicarbazonas em configuração *Z*, mesmo em diferentes solventes. Resultado semelhante foi obtido por Antonini e colaboradores²⁸, alguns anos depois.

Como regra geral, as tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos tendem a formar preferencialmente o isômero *E*, termodinamicamente mais estável, enquanto que nas derivadas de cetonas assimétricas a proporção entre *E* e *Z* depende da estrutura dos substituintes ligados à carbonila⁴².

Obtenção indireta das tiossemicarbazonas pela preparação prévia de tiossemicarbazidas, utilizando hidrato de hidrazina como material de partida

Conforme mencionado, as tiossemicarbazonas são obtidas atra-

vés de reação entre compostos carbonilados e tiossemicarbazidas comercialmente obtidas ou previamente preparadas. A seguir, são descritos alguns métodos de obtenção de tiossemicarbazidas a partir de hidrato de hidrazina.

Reação com ácido tiocarbamoiltioglicólico

Este método fornece uma rota bem interessante quando se pretende obter tiossemicarbazidas substituídas na posição N-4 com grupos incomuns, não encontrados comercialmente. A reação ocorre em meio alcalino, sob refluxo, contendo ácido tiocarbamoiltioglicólico e hidrato de hidrazina. Estes reagem para formar a tiossemicarbazida, liberando o ácido tioglicólico¹⁴ (Esquema 5, Equação 1). Os ácidos tiocarbamoiltioglicólicos, por sua vez, podem ser obtidos segundo metodologia desenvolvida por O'Sullivan e colaboradores⁵¹.

Reação com ditiocarbamatos

O método que usa ditiocarbamatos e hidrato de hidrazina é, de forma geral, bem semelhante ao descrito anteriormente. Neste caso, a obtenção das tiossemicarbazidas ocorre após adição nucleofílica da hidrazina ao carbono da tiocarbonila, com conseqüente remoção do grupo S-CH₃ (Esquema 5, Equação 2)⁵².

O derivado ditiocarbamato de metila pode ser obtido a partir de aminas primárias ou secundárias, em reação com dissulfeto de carbono e uma base forte em meio alcoólico fazendo-se, em seguida, a reação de *S*-metilação com iodeto de metila^{52,53}.

Uma modificação na metodologia descrita acima é comumente utilizada na síntese de tiossemicarbazonas. Ao invés de fazer uso dos ditiocarbamatos, utiliza-se hidrazinacarboditiolato de metila e aminas primárias ou secundárias^{54,55}. Esta modificação apresenta uma vantagem, uma vez que a estrutura básica da tiossemicarbazona já estará formada após a remoção do grupo S-CH₃ (Esquema 5, Equação 3).

Como esperado, quanto mais nucleofílica for a amina utilizada mais rápida será a formação da tiossemicarbazona⁵⁵.

Reação com isotiocianatos

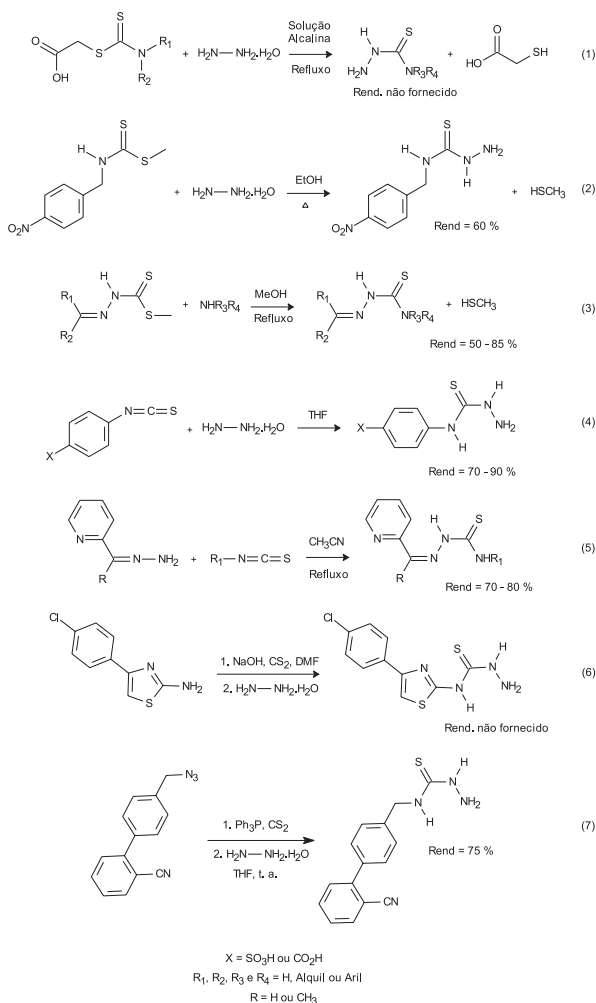
O hidrato de hidrazina reage com isotiocianatos para formar tiossemicarbazidas⁵⁶⁻⁵⁸. Esta reação geralmente apresenta rendimentos entre 70 e 90% (Esquema 5, Equação 4).

Este método também apresenta uma modificação semelhante ao que foi observado com os ditiocarbamatos. Utilizando-se hidrazonas como nucleófilos, no lugar de hidrato de hidrazina, tem-se a formação direta das tiossemicarbazonas (Esquema 5, Equação 5)^{59,60}.

Reação com dissulfeto de carbono

A reação de derivados de amina com dissulfeto de carbono, seguida da adição de hidrato de hidrazina é um método muito útil na preparação de tiossemicarbazidas. Pandeya e colaboradores⁶¹ utilizaram esta metodologia para sintetizar, em uma única etapa, a tiossemicarbazida a partir de 2-amino-4-(*p*-cloro-fenil)-tiazol (Esquema 5, Equação 6).

Outra forma de obtenção de tiossemicarbazidas utilizando dissulfeto de carbono é através do método de Tsuge e colaboradores⁵². Neste método, tiossemicarbazidas são sintetizadas a partir de azidas. Estas são tratadas inicialmente com trifetilfosfina e dissulfeto de carbono para fornecer os isotiocianatos correspondentes e, em seguida, faz-se a adição da hidrazina (Esquema 5, Equação 7).



Esquema 5. Métodos de obtenção de tiossemicarbazidas e tiossemicarbazonas

APLICAÇÕES SINTÉTICAS DE TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas são substâncias muito empregadas como intermediários na síntese orgânica de importantes heterociclos. Sua vasta aplicação deve-se, entre outros fatores, a sua já mencionada versatilidade de obtenção e manipulação, em detrimento de outras substâncias que exigem alto grau de cuidado. São substâncias de fácil estocagem, não necessitando de armazenagem especial, nem tampouco são sensíveis à luz. Devido à natureza quimiosseletiva de sua formação, podem ser empregadas em diversas situações.

Obtenção de tiazol

Os tiazóis e seus derivados são importantes heterociclos e estão relacionados com um grande número de aplicações biológicas. Dentre estas, podem-se citar atividades antimicrobiana, antifúngica e antiinflamatória³⁵.

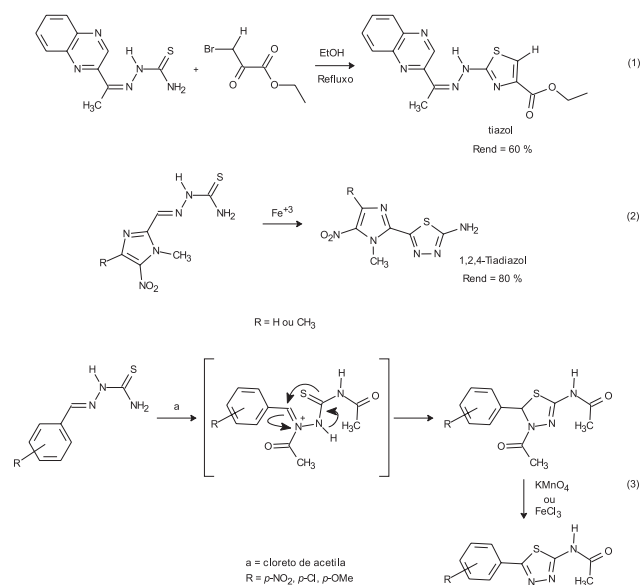
As tiossemicarbazonas, em presença de compostos do tipo α -halogeno-cetonas, funcionam muito bem na síntese de tiazóis. Isto acontece porque as α -halogeno-cetonas são muito reativas frente ao grupo tioamida nucleofílico presente na estrutura das tiossemicarbazonas e, conseqüentemente, levam à ciclização para formar o heterociclo. Sarodnick e colaboradores³⁷ sintetizaram derivados tiazóis empregando tiossemicarbazonas e 3-bromopiruvato de etila em etanol sob refluxo (Esquema 6, Equação 1).

Obtenção de 1,3,4-tiadiazol

Tiossemicarbazonas também podem ser utilizadas na obtenção de 1,3,4-tiadiazóis^{62,63}. Chauvière e colaboradores⁶² sintetizaram 5-nitroimidazol-1,3,4-tiadiazol, utilizando reação de ciclização oxidativa com íons férricos e tiossemicarbazona (Esquema 6, Equação 2).

Outro método de obtenção de 1,3,4-tiadiazóis a partir de tiossemicarbazonas é através da ciclização destas em presença de anidrido acético ou haletos de acila, seguida de oxidação com permanganato de potássio ou cloreto de ferro(III)⁶³.

A formação destes derivados por este método pode ser explicada pelo mecanismo proposto por Kubota e colaboradores⁶³, onde primeiramente formar-se-ia um intermediário com os dois átomos de nitrogênio, presentes nos grupos azometina e tioamida, das tiossemicarbazonas *N*-acilados. Este sofreria um rearranjo favorecendo a ciclização e formação do anel 1,3,4-tiadiazol após oxidação (esquema 6, Equação 3).



Esquema 6. Obtenção de tiazol; 1,3,4-tiadiazol; e mecanismo de formação 2-acetamido-1,3,4-tiadiazol, a partir de tiossemicarbazonas

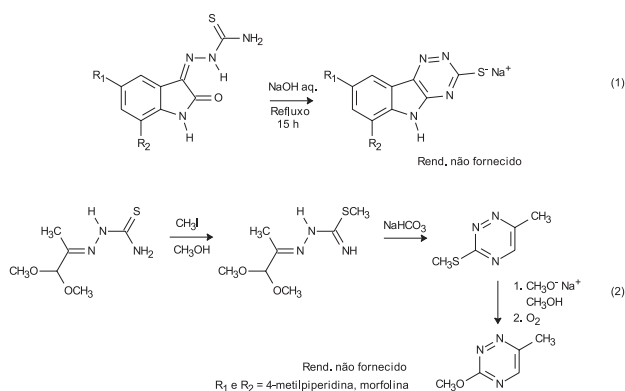
Obtenção de 1,2,4-triazina

1,2,4-triazinas podem ser obtidas, como demonstraram Ivanchtchenko e colaboradores⁶⁴, utilizando-se tiossemicarbazonas derivadas de isatinas. Nesta síntese, o anel triazina é formado pela ciclização da tiossemicarbazona quando esta é tratada com hidróxido de sódio aquoso sob refluxo (Esquema 7, Equação 1).

Bobek, Glowka e Parthasarathy⁶⁵ obtiveram 1,2,4-triazina utilizando um método um pouco diferente. A tiossemicarbazona foi primeiramente tratada com iodeto de metila para, em seguida, ser ciclizada com bicarbonato de sódio em meio aquoso. Pode-se observar que o grupo *S*-metil foi estrategicamente colocado para funcionar na etapa seguinte como grupo de saída frente ao metóxido de sódio (Esquema 7, Equação 2).

Obtenção de 1,2,4-ditiazolidinas

As tiossemicarbazonas também são empregadas na síntese de 1,2,4-ditiazolidinas⁶⁶⁻⁶⁸. All e colaboradores⁶⁷ obtiveram derivados ditiazolidinas em três etapas a partir de tiossemicarbazonas, utilizando reações de debenzilação oxidativa como etapa chave. Pri-



Esquema 7. Preparação de 1,2,4-triazina

meiramente, as tiossemicarbazonas foram benziladas e, em seguida, tratadas com derivados aril isotiocianatos. O composto formado foi então oxidado com bromo em clorofórmio para fornecer a ditiazolidina esperada (Esquema 8, Equação 1).

Obtenção de 4-tiazolidinonas

As 4-tiazolidinonas são derivados carbonilados das tiazolidinas. Sua estrutura química apresenta-se formada por um anel de cinco membros, contendo dois heteroátomos, um enxofre e um nitrogênio, e um grupo carbonila na posição 4⁶⁹. Estes compostos são muito importantes na química medicinal devido às suas atividades biológicas, tais como antimicrobiana⁵⁷, antiprotozoária⁷⁰, fungicida⁷¹, antituberculose⁷², entre outras.

As 4-tiazolidinonas podem ser sintetizadas a partir de tiossemicarbazonas como demonstraram Reeve e Barron⁷³. Nesse trabalho, as tiazolidinonas foram obtidas da reação entre tiossemicarbazonas e fenil (triclorometil) carbinol, como único produto reacional, com rendimentos variando entre 31 a 79% (Esquema 8, Equação 2).

Há evidências que o mecanismo reacional nesta síntese envolva a formação inicial de um intermediário epóxido do derivado carbinol, seguida de ataque nucleofílico do ânion tienolato ao carbono α do epóxido. Isto levaria à formação de um intermediário cloreto de ácido que, finalmente, ciclizaria para formar a tiazolidinona⁷³.

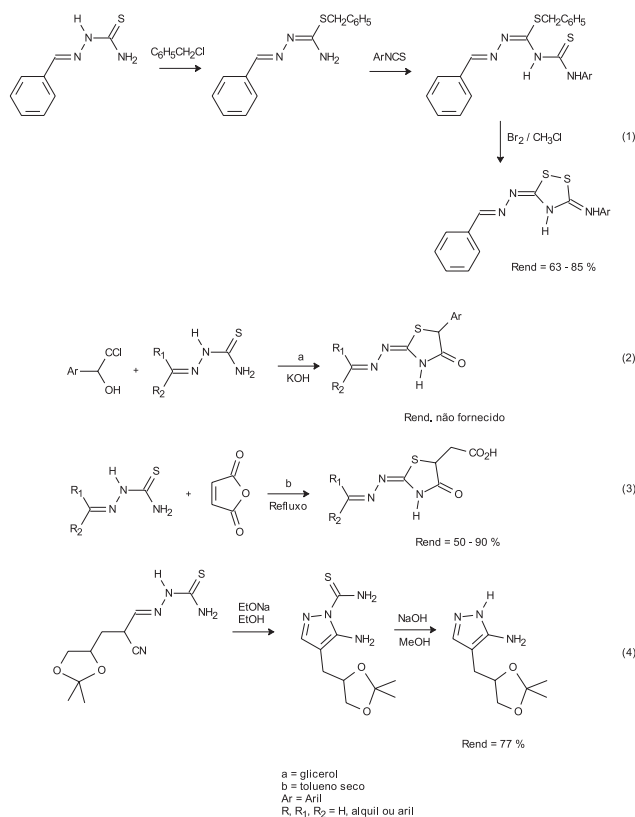
Outra forma de obter 4-tiazolidinonas substituídas na posição 5, a partir de tiossemicarbazonas, é através da reação destas com anidrido maléico^{69,74} (Esquema 8, Equação 3).

A utilização de compostos α -bromo ou α -cloro carbonilados também é muito empregada nas reações de ciclização objetivando a síntese de 4-tiazolidinonas^{57,72,75}.

Obtenção de 5-aminopirazol

Em 1988, Ullas e colaboradores⁷⁶ trabalharam na síntese de tiossemicarbazonas, visando sua aplicação na obtenção de análogos nucleosídeos do tipo adenina. As tiossemicarbazonas foram utilizadas com o propósito de preparar, com bons rendimentos, o intermediário 5-aminopirazol, que seria utilizado como material de partida na síntese de vários análogos do aciclovir (fármaco empregado no tratamento de Herpes tipo-2).

A tiossemicarbazona utilizada na síntese para formar o núcleo 5-aminopirazol foi obtida a partir da 2-formilpropionitrila. A síntese iniciou-se com o tratamento da tiossemicarbazona com etóxido de sódio em solução etanólica, onde, após a formação do composto 2-(tiocarbamoil)-3-aminopirazol, fez-se a hidrólise com hidróxido de sódio em meio metanólico (Esquema 8, Equação 4).



Esquema 8. Aplicação de tiossemicarbazonas na obtenção de ditiazolidinas, 4-tiazolidinonas e 5-aminopirazol

CONSIDERAÇÕES BIOLÓGICAS DE TIOSSEMICARBAZONAS E DE ALGUNS DE SEUS COMPLEXOS METÁLICOS⁷⁷

Como mencionado anteriormente, as tiossemicarbazonas pertencem a uma classe de substâncias bastante conhecidas por suas aplicações importantes na pesquisa de novos fármacos, em função de seu largo espectro de ação⁷⁸. Alguns autores atribuem esta propriedade à alta afinidade que as tiossemicarbazonas apresentam pela enzima ribonucleotídeo redutase, responsável pelo passo crucial na síntese do DNA e, conseqüentemente, da divisão celular^{1,2}. Outros consideram que suas propriedades biológicas são devidas à capacidade que apresentam de formar complexos com cátions metálicos, formando quelatos²⁷. Por outro lado, Greenbaum e colaboradores⁷⁹ sugeriram que o mecanismo de ação das tiossemicarbazonas é ainda complexo e deve acontecer através da inibição de múltiplos alvos.

Neste sentido, as tiossemicarbazonas apresentam-se como ligantes versáteis tanto na forma neutra quanto na forma aniônica, podendo formar ligação coordenada com metais através do átomo de enxofre e do átomo de nitrogênio azometina (C=N)^{27,34}. Esta capacidade de formar ligação coordenada é aumentada se houver grupos doadores de elétrons ligados ao carbono da função azometina¹⁷. A seguir, são descritas as atividades biológicas de algumas tiossemicarbazonas de potencial valor biológico e de alguns complexos metálicos importantes.

Atividade antiprotozoária

Diversos tipos de protozoários foram estudados quanto às suas suscetibilidades às tiossemicarbazonas, como relatam trabalhos publicados recentemente^{14,80,81}.

Bharti e colaboradores¹⁴ efetuaram testes antiprotozoários de

alguns derivados tiossemicarbazonas e obtiveram bons resultados biológicos frente à *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis*, utilizando metronidazol como fármaco de referência. A substância 5-nitro-tiofeno-2-carbaldeído-*N*(4)-hexametilimina tiossemicarbazona (5-NT-HMINTSC) apresentou em concentrações de 1,71 μM , inibição de 50% de crescimento (CI_{50}) de *Entamoeba histolytica*, em comparação com 2,10 μM de metronidazol necessários para igual inibição (Figura 3a). Outro derivado, 5-nitro-tiofeno-2-carbaldeído-*N*(4)-butil tiossemicarbazona (5-NTBuTSC) apresentou uma CI_{50} de 1,49 μM em atividade tricomonocida, em comparação com o valor de metronidazol necessário (1,92 μM) para o mesmo efeito (Figura 3a).

Também foi relatada atividade antimalárica para algumas tiossemicarbazonas. Klayman e colaboradores⁸² observaram que os grupos tiocarbonila e azometina eram necessários para esta atividade biológica. Outros resultados mostram que as propriedades das tiossemicarbazonas de formar quelatos com os cátions metálicos são responsáveis pelas atividades antiprotozoárias^{27,80}. Outras atividades, como antitripanossoma^{20,83} e leishmanicida⁸⁴, foram também relatadas.

Bharti e colaboradores²⁷ também relataram a atividade antiamebocida de tiossemicarbazonas complexadas com Pd(II) e constataram que seus complexos eram mais ativos contra este protozoário que as tiossemicarbazonas livres.

Atividade antiviral

Atividade inibitória sobre a enzima transcriptase reversa (RT), presente em vírus do tipo HIV, foi reportada para tiossemicarbazonas, derivadas de piridoxal, complexadas com estanho(IV) (Figura 3b). Segundo Casas *et al.*⁸⁵, a complexação de tiossemicarbazonas em geral causa um aumento da atividade biológica quando comparada ao ligante livre.

Atividade anti HIV também foi relatada para tiossemicarbazonas por Teitz e colaboradores¹³. Foram estudadas duas tiossemicarbazonas: *N*-metilisatina-4':4'-dietiltiossemicarbazona (M-IBDET) e *N*-alilisatina-4':4'-dialiltiossemicarbazona (A-IBDAT). Ambas demonstraram atuar sobre a síntese de proteínas estruturais do HIV.

Genova e colaboradores⁸⁶, por outro lado, compararam a atividade inibitória da benzil bis (tiossemicarbazona) e seu respectivo complexo metálico de paládio(II) sobre linhagens de vírus do tipo HSV 1 e 2 (herpes simples 1 e 2) e observaram que o complexo metálico exibe melhora significativa na atividade antiviral em comparação com a tiossemicarbazona livre (Figura 3c).

Atividade antitumoral

Liu e colaboradores⁹ e Niu e colaboradores⁸⁷ demonstraram a grande potencialidade da substância 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (trapiina – 3-AP) como uma das principais substâncias orgânicas no combate a tipos específicos de células tumorais, tais como carcinoma de fígado M-109, carcinoma de ovário humano A2780 e em ratos apresentando leucemia L1210.

Tiossemicarbazonas derivadas de α -(*N*)-heterociclos carboxaldeído apresentam a propriedade de formar complexos fortes com metais de transição, como ferro e cobre. Estudos indicam que a triapina atua inativando a atividade da ribonucleotídeo redutase, através do complexo organometálico formado com o átomo de ferro inibindo, desta forma, a etapa limitante da síntese de DNA^{5,33,87}.

Li e colaboradores⁷ desenvolveram um pró-fármaco desta tiossemicarbazona, pela inclusão do grupamento bezoil fosfato, com objetivo de melhorar as propriedades farmacocinéticas e, também,

sua utilidade terapêutica frente a células tumorais M-109 (Figura 3d). Segundo os autores, a bioativação do pró-fármaco ocorreria após uma quebra na ligação fósforo – oxigênio, mediada por uma fosfatase alcalina, levando a um intermediário que passaria por uma série de fragmentações para formar, finalmente, a 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona⁷.

Estudos pré-clínicos de fase I da triapina indicaram resultados promissores em pacientes em estágio avançado de câncer utilizando doses variando de 5 mg/m² a 105 mg/m², incluindo atividade sobre tumores resistentes à hidroxiuréia, sem o aparecimento de toxicidade significativa¹¹. Atualmente, esta substância encontra-se em ensaios clínicos de fase II^{77,79}.

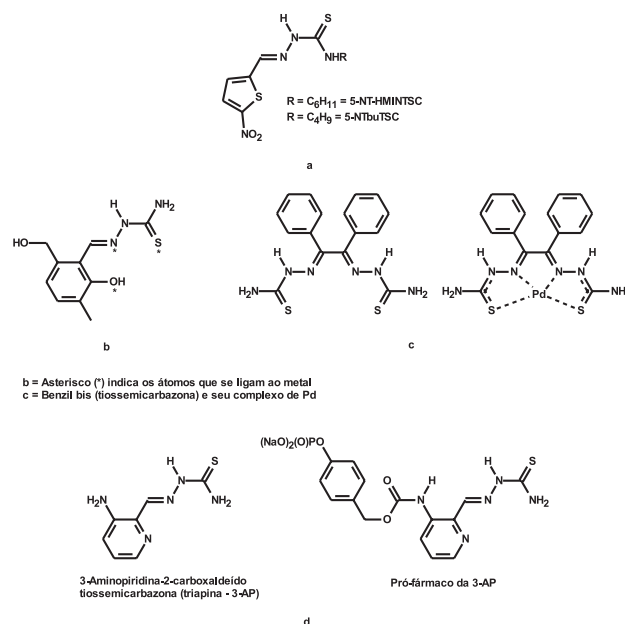


Figura 3. Estruturas de algumas tiossemicarbazonas de importância biológica

CONCLUSÃO

As tiossemicarbazonas fazem parte de uma classe de moléculas altamente versáteis quanto à sua obtenção e aplicação. Devido à sua natureza quimiosseletiva, as tiossemicarbazidas e os compostos carbonilados formam rapidamente as tiossemicarbazonas que, geralmente, apresentam elevados rendimentos. Seu emprego na síntese de importantes heterociclos é conhecido por utilizarem reações simples e apresentarem alta estabilidade em diferentes condições reacionais.

Quanto a seu potencial biológico, diversos trabalhos mostram a eficácia destas moléculas como potentes inibidores da síntese do DNA. Esta propriedade confere às tiossemicarbazonas a possibilidade de serem aplicadas na busca por novas substâncias terapêuticas em diversos campos de pesquisa. Dentre estas, as atividades antitumorais e antiprotozoárias aparecem, sem dúvida, como as mais relevantes, devido aos importantes resultados encontrados na pesquisa acadêmica e industrial.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à Capes, pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado concedida e a todos aqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Louie, A. Y.; Meade, T. J.; *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2711.
- Cory, J. G.; *Adv. Enzyme Regul.* **1988**, 27, 437.
- Melo, E. J. T.; Mayerhoffer, R. O.; Souza, W.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 185, 79.
- Finch, R. A.; Liu, M. C.; Grill, S. P.; Rose, W. C.; Loomis, R.; Vasquez, K. M.; Cheng, Y. C.; Sartorelli, A. C.; *Biochem. Pharmacol.* **2000**, 59, 983.
- Finch, R. A.; Liu, M. C.; Cory, A. H.; Cory, J. G.; Sartorelli, A. C.; *Adv. Enzyme Regul.* **1999**, 39, 12.
- Li, J.; Chen, S.; Li, X.; Niu, C.; Doyle, T. W.; *Tetrahedron* **1998**, 54, 393.
- Li, J.; Luo, X.; Wang, Q.; Zheng, L.; King, I.; Doyle, T. W.; Chen, S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3159.
- Gwilt, P. R.; Tracewell, W. G.; *Clinical Pharmacokinetics* **1998**, 34, 347.
- Liu, M.; Lin, T.; Sartorelli, A. C.; *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3672.
- Sartorelli, A. C.; Agrawal, K. C.; Tshtsoglu, A. S.; Moore, E. C.; *Adv. Enzyme Regul.* **1977**, 15, 117.
- Feun, L.; Modiano, M.; Lee, K.; Mao, J.; Marini, A.; Savaraj, N.; Plezia, P.; Almassian, B.; Colacino, E.; Fischer, J.; Macdonald, S.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, 50, 223.
- Kasuga, N. C.; Sekino, K.; Ishikawa, M.; Honda, A.; Yokoyama, M.; Nakano, S.; Shimada, N.; Koumo, C.; Nomiya, K.; *J. Inorg. Biochem.* **2003**, 96, 298.
- Teitz, Y.; Ronen, D.; Vansover, A.; Stematsky, T.; Riggs, J. L.; *Antiviral Res.* **1994**, 24, 305.
- Bharti, N.; Husain, K.; Garza, M. T. G.; Vega, D. E. C.; Garza, J. C.; Cardenas, B. D. M.; Naqvi, F.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 3475.
- Karah, N.; *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37, 909.
- Panico, R.; Powell, W. H.; Richer, J. C.; eds.; *IUPAC – Nomenclature of organic compounds*; Blackwell: London, 1993.
- Casas, J. S.; Tasende, M. S. G.; Sordo, J.; *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 209, 197.
- Hang, H. C.; Bertozzi, C. R.; *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 727.
- Antonini, I.; Claudii, F.; Cristalli, G.; Franchetti, P.; Grifantini, M.; Martelli, S.; *J. Med. Chem.* **1981**, 24, 1181.
- Du, X.; Gou, C.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; Caffrey, C. R.; Holler, T. P.; Mckerrow, J. H.; Cohen, F. E.; *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2695.
- Chattopadhyay, D.; Mazumdar, S. K.; Banerjee, T.; Sheldrick, W. S.; *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **1989**, 45, 314.
- Palenik, G. J.; Rendle, D. F.; Carter, W. S.; *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **1974**, 30, 2390.
- Allen, F. H.; Kennard, O.; Taylor, R.; *Acc. Chem. Res.* **1983**, 16, 146.
- Tarasconi, P.; Capacchi, S.; Pelosi, G.; Cornia, M.; Albertini, R.; Bonati, A.; Dall'aglio, P. P.; Lunghi, P.; Pinelli, S.; *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 157.
- Jouad, E. M.; Riou, A.; Allain, M.; Khan, M. A.; Bouet, G. M.; *Polyhedron* **2001**, 20, 67.
- Ferrari, M. B.; Bonardi, A.; Fava, G. G.; Pelizzi, C.; Tarasconi, P.; *Inorg. Chim. Acta* **1994**, 223, 77.
- Bharti, N.; Shailendra; Sharma, S.; Naqvi, F.; Azam, A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 2923.
- Antonini, I.; Claudii, F.; Franchetti, P.; Grifantini, M.; Martelli, S.; *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 447.
- Galabov, B.; Ilieva, S.; Hadjieva, B.; Dinchova, E.; *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 5854.
- Lauvergnat, D.; Hiberty, P. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9478.
- Vassilev, N. G.; Dimitrov, V. S.; *J. Mol. Struct.* **2003**, 654, 27.
- Crews, P.; Rodríguez, J.; Jaspars, M.; *Organic structure analysis*, 1st ed., Oxford University Press, Inc: New York, 1998.
- Saha, N. C.; Saha, A.; Butcher, R. J.; Chaudhuri, S.; Saha, N.; *Inorg. Chim. Acta* **2002**, 339, 348.
- Shailendra; Bharti, N.; Naqvi, F.; Azam, A.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 689.
- Holla, B. S.; Malini, K. V.; Rao, B. S.; Sarojini, B. K.; Kumari, N. S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 313.
- Gupta, R. P.; Narayana, N. L.; *Pharmaceutica Acta Helveticae* **1997**, 72, 43.
- Sarodnick, G.; Heydenreich, M.; Linker, T.; Kleinpeter, E.; *Tetrahedron* **2003**, 59, 6311.
- Somogyi, L.; *Tetrahedron* **1991**, 47, 9305.
- Weinstock, L. T.; Cheng, C. C.; *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 594.
- Benbrook, D. M.; Madler, M. M.; Spruce, L. W.; Birckbichler, P. J.; Nelson, E. C.; Subramanian, S.; Weerasekare, G. M.; Gale, J. B.; Patterson, M. K.; Wang, B.; Wang, W.; Lu, S.; Rowland, T. C.; Disevestro, P.; Lindamood, C.; Hill, D. L.; Berlin, D.; *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3567.
- Rodríguez, E. C.; Marcaurelle, L. A.; Bertozzi, C. R.; *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7134.
- Costa, P.; Pilli, R.; Pinheiro, S.; Vasconcellos, M.; *Substâncias carboniladas e seus derivados*, 1^a ed., Bookman: Porto Alegre/MG, 2003.
- Solomons, G.; Fryhle, C.; *Química orgânica*, 7^a ed., LTC – Livros técnicos científicos Ed. S. A: Rio de Janeiro/RJ, 2002, vol. 2.
- Waugh, K. M.; Berlin, K. D.; Ford, W. T.; Holt, E. M.; Carrol, J. P.; *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 116.
- Chiyanzu, I.; Hansell, E.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Mckerrow, J. H.; Chibale, K.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3527.
- Afrasiabi, Z.; Sinn, E.; Padhye, S.; Dutta, S.; Padhye, S.; Newton, C.; Anson, C. E.; Powell, A. K.; *J. Inorg. Biochem.* **2003**, 95, 306.
- Lemke, T. L.; Shek, T. W.; Cates, L. A.; Smith, L. K.; *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 1351.
- Ota, A. T.; Temperini, M. L. A.; Arêas, E. P. G.; Loos, M.; *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1998**, 451, 269.
- Temperini, M. L. A.; Santos, M. R.; Monteiro, V. R. P.; *Spectrochim. Acta, Part A* **1995**, 51, 1517.
- Karabatsos, G. J.; Vane, F. M.; Taller, R. A.; Hsi, N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 3351.
- O'sullivan, D. G.; Sadler, P. W.; Webley, C.; *Chemotherapy* **1963**, 7, 17.
- Ashton, W. T.; Cantone, C. L.; Chang, L. L.; Hutchins, S. M.; Strelitz, R. A.; Maccoss, M.; Chang, R. S. L.; Lotti, V. J.; Faust, K. A.; Chen, T.; Bunting, P.; Schorn, T. W.; Kivlighn, S. D.; Siegl, P. K. S.; *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 591.
- Kaneko, T.; Willner, D.; Monkovic, I.; Knipe, J. O.; Braslawsky, G. R.; Greenfield, R. S.; Vyas, D. M.; *Bioconjugate Chem.* **1991**, 2, 133.
- Easmon, J.; Heinisch, G.; Holzer, W.; Rosenwirth, B.; *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3288.
- Klayman, D. L.; Lin, A. J.; McCall, J. W.; Wang, S. Y.; Townson, S.; Grögl, M.; Kinnamon, K. E.; *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1422.
- Duffy, K. J.; Shaw, A. N.; Delorme, E.; Dillon, S. B.; Erickson-miller, C.; Giampa, L.; Huang, Y.; Keenan, R. M.; Lamb, P.; Liu, N.; Miller, S. G.; Price, A. T.; Rosen, J.; Smith, H.; Wiggall, K. J.; Zhang, L.; Luengo, J. I.; *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3573.
- Gürsoy, A.; Terzioğlu, N.; Ötük, G.; *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, 32, 753.
- Papastakoudi, T. S.; Tsotinis, A.; Raptopoulou, C.; Sambani, C.; Thomou, H.; *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, 30, 107.
- Demilo, A. B.; Redfern, R. E.; Borkovec, A. B.; *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31, 713.
- Klayman, D. L.; Scovill, J. P.; Bartosevich, J. F.; Mason, C. J.; *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 1367.
- Pandeya, S. N.; Sriram, D.; Nath, G.; Declercq, E.; *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, 9, 25.
- Chauvière, G.; Bouteille, B.; Enanga, B.; Albuquerque, C.; Croft, S. L.; Dumas, M.; Périé, J.; *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 427.
- Kubota, S.; Ueda, Y.; Fujikane, K.; Toyooka, K.; Shibuya, M.; *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1473.
- Ivanchchenko, A. V.; Il'yin, A. P.; Kobak, V. V.; Zolotarev, D. A.; Boksha, L. V.; Trifilenkov, A. S.; Ugoleva, D. M.; *J. Comb. Chem.* **2002**, 4, 419.
- Bobek, M.; Glowka, M.; Parthasarathy, R.; *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 913.
- Ral, S. K.; Tiwarl, U. K.; Srivastava, P. K.; *J. Chem. Eng. Data* **1985**, 30, 515.
- All, M. R.; Singh, R.; Verma, V. K.; *J. Chem. Eng. Data* **1983**, 28, 276.
- Srivastava, P. K.; Ral, S. K.; *J. Chem. Eng. Data* **1980**, 25, 400.
- Brown, F. C.; *Chem. Rev.* **1961**, 61, 463.
- Alves, A. J.; Leite, A. C. L.; Santana, D. P.; Beltrão, T. M.; Coelho, M. R. D.; *Il Farmaco* **1993**, 48, 1167.
- Liu, H. L.; Li, Z.; Anthonsen, T.; *Molecules* **2000**, 5, 1055.
- Küçükgülzel, S. G.; Oruç, E. E.; Rollas, S.; Sahin, F.; Özbek, A.; *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37, 197.
- Reeve, W.; Barron, E. R.; *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 1917.
- Tenório, R. P.; Lima, J. G.; Faria, A. R.; Alves, A. J.; Melo, E. J. T.; Goês, A. J.; *Resumos da 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Salvador, Brasil, 2004.
- Abbady, M. A.; Hafez, S. H. A.; Kandeel, M. M.; Monem, M. I. A.; *Molecules* **2003**, 8, 622.
- Ullas, G. V.; Chu, C. K.; Ahn, M. K.; Kosugi, Y.; *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 2413.
- Beraldo, H.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 461.
- Silva, M. J.; Alves, A. J.; Nascimento, S. C.; *Il Farmaco* **1998**, 53, 241.
- Greenbaum, D. C.; Mackey, Z.; Hansell, E.; Doyle, P.; Gut, J.; Caffrey, C. R.; Lehrman, J.; Rosenthal, P. J.; Mckerrow, J. H.; Chibale, K.; *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3212.
- Walcourt, A.; Loyevsky, M.; Lovejoy, D. B.; Gordeuk, V. R.; Richardson, D. R.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, 36, 401.
- Singh, S.; Bharti, N.; Naqvi, F.; Azam, A.; *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 459.
- Klayman, D. L.; Scovill, J. P.; Bartosevich, J. F.; Bruce, J.; *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther.* **1984**, 19, 49.

83. Casero, R. A.; Klayman, D. L.; Childs, G. E.; Scovill, J. P.; Desjardins, R. E.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1980**, *18*, 317.
84. Dodd, R. H.; Ouannès, C.; Géro, M. R.; Potier, P.; *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1272.
85. Casas, J. S.; Argüelles-rodríguez, M. C.; Russo, U.; Sánchez, A.; Sordo, J.; López-Vázquez, A.; Pinelli, S.; Lunghi, P.; Bonati, A.; Albertini, R.; *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *69*, 283.
86. Genova, P.; Varadinova, T.; Matesanz, A. I.; Marinova, D.; Souza, P.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, *197*, 107.
87. Niu, C.; Li, J.; Doyle, T. W.; Chen, S.; *Tetrahedron* **1998**, *54*, 6311.