

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



**TESE**

**SÍNTESE, COMPROVAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE ANTITUMORAL E  
ANTIPARASITÁRIA DE NOVOS DERIVADOS BENZODIOXOLICOS**

**WILLAMS LEAL SILVA**

**RECIFE - 2016**

**WILLAMS LEAL SILVA**

**SÍNTESE, COMPROVAÇÃO ESTRUTURAL E DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E  
ANTIPARASITÁRIA DE NOVOS DERIVADOS BENZODIOXOLICOS**

Tese de Doutorado apresentada a Banca do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas na área de concentração Síntese e Planejamento de Fármacos

**ORIENTADORA:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Alves de Lima

**CO-ORIENTADORES:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosali Maria Ferreira da Silva

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Tiago Bento de Oliveira

**RECIFE – 2016**

Catálogo na fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586s Silva, Willams Leal.  
Síntese, comprovação estrutural e atividade antitumoral e anti-parasitária de novos derivados benzodioxólicos / Willams Leal Silva. – 2016.  
120 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.  
Inclui referências.

1. Antitumoral. 2. Safrol. 3. Pirólise. 4. Antiparasitária. 5. Tiazolidinona  
I. Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2016-263)

**WILLAMS LEAL SILVA**

**"SÍNTESE, COMPROVAÇÃO ESTRUTURAL E DA ATIVIDADE ANTITUMORAL  
E ANTIPARASITÁRIA DE NOVOS DERIVADOS BENZODIOXOLICOS"**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 04/08/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente e Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anekécia Lauro da Silva (Examinadora Externa)

Universidade Federal Vale do São Francisco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivone Antônia de Souza (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaina de Albuquerque Couto (Examinadora Externa)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
REITOR**

**Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado**

**VICE-REITOR**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup> Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos**

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto**

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho**

**VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Prof. Dr. Vânia Pinheiro Ramos**

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria**

**VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim**

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley**

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes**

*Que darei eu ao SENHOR, por todos os benefícios que me tem feito? Salmos 116.12*

*A Deus por me dar força, coragem e iluminar meus passos todos os dias para que eu possa alcançar meus objetivos de cabeça erguida e com dignidade.*

## AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Laboratório de Química e Inovação Terapêutica /LQIT/GPIT/UFPE.

À FACEPE pelo suporte financeiro.

À minha orientadora e exemplar professora Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo Alves de Lima pela oportunidade concedida.

Aos Professores Dr<sup>a</sup> Ankecia Lauro, Dra Sinara Mônica, Dr<sup>a</sup> Rosali Maria Ferreira da Silva e Dr. Tiago Bento de Oliveira pelas contribuições e ao doutorando Cézár Amorin pelos esforços e contribuições no trabalho.

Ao professor Prof. Dr. Fábio pela colaboração e contribuições com o meu trabalho.

Ao Prof. Jamerson Oliveira pelas contribuições e suporte.

A Prof<sup>a</sup> Jorge Neves pelas contribuições e atenção de sempre.

---

Aos amigos e colegas de Laboratório de Química e Inovação Terapêutica do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

À Central Analítica do DQF.

## RESUMO

O câncer destaca-se como um importante problema de saúde pública, além de configurar uma das principais causas de morte no mundo. Considerando que em 2012 houve cerca de 8,2 milhões de mortes. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de novos derivados benzo-1,3-dioxol (NW), por estratégia de hibridação molecular a fim de reunir características estruturais em uma única estrutura com propriedades farmacológicas mista, dual ou dupla. A síntese consiste na reação em duas rotas paralelas partindo dos aldeídos benzo[*d*][1,3]dioxol-4-carbaldeído e benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído, seguida de reações de condensação com tiossemicarbazidas para obtenção de tiossemicarbazonas que podem ser conduzidas a uma ciclização com ácido monocloroacético formando o anel 4-tiazolidina. Todos os compostos tiveram suas estruturas comprovadas por RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, COSY, IV e pirólise acoplado a espectrometria de massas. Os compostos benzodioxois (NW) obtidos foram testados a fim de avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular frente várias linhagens tumorais. Para o teste antitumoral realizado os resultados obtidos mostram um derivado promissor NW-03 com GI<sub>50</sub> estabelecidas entre 2,9 a 14,4 μM, quando comparado ao controle positivo utilizado. Diante dos resultados obtidos os derivados foram classificados como ativos e mostraram um perfil citostático. Além disso, os resultados obtidos corroboram para uma associação de núcleos viáveis por meio da hibridação molecular entre o benzo-1,3-benzodioxol e tiossemicarbazona levando a resultados promissores. Posteriormente os compostos foram submetidos a ensaios de citotoxicidade e avaliação antiparasitária onde foi possível eleger os compostos promissores NW-03, NW-06 e NW-11 com baixa toxicidade para esplenócitos e atividade antiparasitária. Em relação à atividade tripanocida, o composto NW-13 (1-naftil) exibiu elevados níveis de atividade contra epimastigota e tripomastigota (IC<sub>50</sub> = 1,48 e 3,89 μM, respectivamente). Com o estudo de docking foi possível estabelecer correlação do encaixe de compostos NW-02 E NW-09 com o alvo cruzafina através de interações. O composto NW-03 foi avaliado como possível inibidor de tirosinase através de experimento de titulação por técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrofotometria.

Palavras-chave: Antitumoral. safrol. pirólise. antiparasitária e tiazolidinona

## ABSTRACT

The cancer stands out as a major public health problem, and configure one of the leading causes of death worldwide. Whereas in 2012 there were about 8.2 million deaths. This study aimed to obtain new derivatives benzo-1,3-dioxole (NW), by molecular hybridization strategy to gather structural features in a single structure with mixed pharmacological properties, dual or double. The synthesis consists of two parallel routes reaction starting from the aldehydes benzo [d] [1,3] dioxol-4-carbaldehyde and benzo [d] [1,3] dioxol-5-carbaldehyde, followed by condensation reactions to thiosemicarbazidas obtaining thiosemicarbazone that can be conducted with a cyclized with monochloroacetic acid to form the 4-thiazolidine ring. All compounds had their structures evidenced by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, COSY, IV and coupled pyrolysis mass spectrometry. Benzodioxoles The compounds (NW) have been tested in order to assess the antiproliferative activity in vitro using the sulforhodamine B assay (SBR) for evaluation of cell growth across various tumor cell lines. For antitumor test performed the results obtained show a promising derived NW-03 GI50 established between 2.9 to 14.4 uM when compared to the positive control used. Results obtained derivatives were classified as active and showed a cytostatic profile. Moreover, the results support an association of viable nuclei by means of molecular hybridization between the benzo-1,3-benzodioxole thiosemicarbazone leading to promising results. Later the compounds were subjected to cytotoxicity testing and antiparasitic assessment where it was possible to elect the promising compounds NW-03, NW 06 and NW-11 with low toxicity to splenocytes and antiparasitic activity. Regarding trypanocidal activity, NW-13 compound (1-naphthyl) exhibited high levels of activity against epimastigote and trypomastigote (IC<sub>50</sub> = 1.48 and 3.89 uM, respectively). With the docking study was possible to establish compounds fitting correlation NW-02 and NW-09 with the target cruzain through interactions. NW-03 The compound was evaluated as a possible inhibitor of tyrosinase by titration experiment for technical nuclear magnetic resonance spectroscopy, and spectrophotometry.

Keywords: Antitumor. safrole. pyrolysis. antiparasitic and thiazolidinone

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Taxas brutas de incidência das localizações primárias estimadas para 2014 por cem mil, em mulheres, Brasil	26
<b>Figura 2:</b>	Alvos terapêuticos do câncer	27
<b>Figura 3:</b>	Exemplos de Bioisosterismo na natureza (Adaptado de LIMA & BARREIRO, 2005).	31
<b>Figura 4:</b>	Bioisosterismo clássico entre a anilina (1) e o fenol (2)	32
<b>Figura 5:</b>	Bioisosterismo não-clássico entre o composto 3 e o composto 4.	32
<b>Figura 6:</b>	Bioisosterismo de anéis entre a Sulfadiazina (5) e o Sulfametoxazol (6)	33
<b>Figura 7:</b>	Descoberta da Ranitidina (8), fármaco denominado “me too”, a partir da Cimetidina (7), utilizando a estratégia do Bioisosterismo (Adaptado de BARREIRO e FRAGA, 2005).	34
<b>Figura 8:</b>	Representação do processo de Hibridação Molecular (Adaptado de BARREIRO e FRAGA, 2008).	34
<b>Figura 9:</b>	Esquema do processo de Hibridação Molecular (Adaptado de MONTANARI, 2011).	35
<b>Figura 10:</b>	Hibridização da Isoniazida com um derivado fluorquinolônico (Adaptado de SANTOS et al., 2012).	36
<b>Figura 11:</b>	Hibridização da Pirazinamida com um derivado Fluorquinolônico (Adaptado de SANTOS et al., 2012).	36
<b>Figura 12:</b>	Híbrido molecular obtido a partir da Talidomida com a Dapsona (Adaptado de BOSQUESI et al., 2011).	37
<b>Figura 13:</b>	Fármacos contendo o núcleo benzodioxol	39
<b>Figura 14:</b>	Derivado 5-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-3-(3-dimetilamino)propil)-2-(5-fluorindolin-3-ilideno)tiazolidin-4-ona com IC <sub>50</sub> 0.025 ± 0.008 frente a linhagem HT29.	39
<b>Figura 15:</b>	Derivado Leucettine L41	40
<b>Figura 16:</b>	(a)Tioacetazona e (b) Isoniazida.	41
<b>Figura 17:</b>	Estrutura da N-metilisatina tiossemicarbazona (Metisazona ®), com atividade antiviral	41
<b>Figura 18:</b>	2-(piridin-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida	42

<b>Figura 19:</b>	Tiossemicarbazona e sua atividade sobre a síntese bioquímica de desoxirribose	42
<b>Figura 20:</b>	Estrutura da 2-((3-aminopiridin-2-il)metileno)-hidrazinacarbotioamida (Triapina®)	43
<b>Figura 21</b>	Estrutura química da piperina	43
<b>Figura 22</b>	Representação gráfica da distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos utilizada no teste de atividade antiproliferativa. (TORRE, 2013)	52
<b>Figura 23</b>	RMN 1H do derivado benzo[d][1,3]dioxol-5-carbaldeído (NW-1)	59
<b>Figura 24</b>	Espectro de RMN 1H indicando os principais sinais para identificação dos compostos tiossemicarbazonas	66
<b>Figura 25</b>	Análise da espectroscopia de COSY do derivado NW-3	67
<b>Figura 26</b>	Análise da espectroscopia de RMN 1H do derivado NW-6	68
<b>Figura 27</b>	Análise da espectroscopia de COSY do derivado NW-5.	69
<b>Figura 28</b>	Pirograma do derivado NW06	80
<b>Figura 29</b>	Resultado DSC do derivado NW-11	87
<b>Figura 30</b>	Estrutura química do derivado NW-03	92
<b>Figura 31</b>	Similaridades e diferenças dos derivados NW-03, NW-04, NW-08 e NW-14.	92
<b>Figura 32</b>	Derivados NW-03, NW-04 e NW-14	93
<b>Figura 33</b>	Similaridade dos derivados NW-03 e NW-05	93
<b>Figura 34</b>	Similaridades dos derivados NW-05, NW-06, NW-11 e NW-03	94
<b>Figura 35</b>	A superposição de docking para compostos que inibem a cruzaina NW-02 (vermelho) e NW-09 (laranja) ligado a cruzaina (verde), e a estrutura cristalográfica da "KB2" co-cristalizadas	98
<b>Figura 36</b>	Vista detalhada das soluções de encaixe para o composto NW-2 (lado esquerdo) e NW-09 (lado direito). resíduos do cruzaina formando hidrofóbicas Contatos são coloridos em verde, enquanto os resíduos que formam ligações de hidrogênio são coloridos em azul.	99
<b>Figura 37</b>	Estrutura química do composto 2-(benzo[d][1,3]dioxol-4-ylmethylene)-N-(4-chlorophenyl)-thiosemicarbazone (NW03) e seus deslocamentos químicos (ppm) para os átomos de H.	101
<b>Figura 38</b>	Espectros sobrepostos do composto NW-03 na ausência e na presença	101

da tirosinase em diferentes volumes

**Figura 39** Espectros sobrepostos do composto NW-03 (região de Cromáticos) na ausência e na presença da tirosinase em diferentes volumes. 103

**Figura 40** Sobreposição de espectros de NW-03 1mM, NW-03 com adição de 10  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Cu}^{+2}$ , NW-03 com adição de 20  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Cu}^{+2}$ , NW-03 com adição de 30  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Cu}^{+2}$ , NW-03 com adição de 40  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Cu}^{+2}$ , NW-03 com adição de 50  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Cu}^{+2}$  108

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Linhagens celulares humanas empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.	50
<b>Tabela 2</b>	Parâmetros para cada coleta de dados da complexação com íons Cu <sup>++</sup>	57
<b>Tabela 3:</b>	Dados físico-químicos dos derivados NW obtidos a partir do derivado NW-0	61
<b>Tabela 4:</b>	Dados físico-químicos dos derivados NW obtidos a partir do derivado NW-1	63
<b>Tabela 5:</b>	Dados físico-químicos dos derivados NW-5; NW-6 e NW-7	64
<b>Tabela 6:</b>	Dados físico-químicos dos derivados NW-10; NW-11, NW-17, NW-18 e NW-19	65
<b>Tabela 7:</b>	Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H dos 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]-dioxol-5-ilmetileno)-N-fenilhidrazinacarbotiamidas (NW)	70
<b>Tabela 8:</b>	Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H dos 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-5-ilmetileno)hidrazona0-3-feniltiazolidin-4-onas (NW)	71
<b>Tabela 9:</b>	Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]-dioxol-4-ilmetileno)-N-fenilhidrazinacarbotiamidas (NW)	72
<b>Tabela 10:</b>	Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H dos 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-4-ilmetileno)hidrazona0-3-feniltiazolidin-4-onas (NW)	73
<b>Tabela 11:</b>	Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]-dioxol-5-ilmetileno)-N-fenilhidrazinacarbotiamidas (NW)	75
<b>Tabela 12</b>	Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]-dioxol-4-ilmetileno)-N-fenilhidrazinacarbotiamida (NW)s	76
<b>Tabela 13:</b>	Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-4-ilmetileno)hidrazona0-3-feniltiazolidin-4-onas (NW)	77
<b>Tabela 14:</b>	Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-5-ilmetileno)hidrazona0-3-feniltiazolidin-4-onas (NW)	78
<b>Tabela 15:</b>	Fragmentos moleculares do derivado NW-11 com as respectivas massas	81
<b>Tabela 16:</b>	Fragmentos moleculares do derivado NW-10 com as respectivas massas	82
<b>Tabela 17:</b>	Fragmentos moleculares do derivado NW-09 com as respectivas	83

	massas	
<b>Tabela 18:</b>	Fragmentos moleculares do derivado NW-03 com as respectivas massas	84
<b>Tabela 19:</b>	Fragmentos moleculares do derivado NW-04 com as respectivas massas	85
<b>Tabela 20:</b>	Fragmentos moleculares do derivado NW-06 com as respectivas massas	86
<b>Tabela 21</b>	resultados termoanalíticos para NW-11 com cristais obtidos	89
<b>Tabela 22:</b>	Valores de GI <sub>50</sub> (μM) para os derivados 1,3 benzodioxol-tiossemicarbazônicos	92
<b>Tabela 23</b>	Atividades tripanocida e leishmanicida de tiossemicarbazonas e tiazolidinonas derivados benzodioxol	97
<b>Tabela 24</b>	As interações intermoleculares observada após o cálculo de docking. HC significa "interações hidrofóbicas" e os números são as distâncias ligações de hidrogênio, em Angstroms.	100
<b>Tabela 25</b>	Variação de deslocamentos químicos do derivado NW-3 na presença de tirosinase.	104

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b>	Sintons funcionalizados a partir do safrol (Barreiro & Fraga, 1999).	38
<b>Esquema 2:</b>	Planejamento de síntese dos compostos	44
<b>Esquema 3:</b>	Diferentes condições reacionais para obtenção dos derivados benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-5-carbaldeído (NW-1) e benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-4-carbaldeído (NW-0)	60
<b>Esquema 4:</b>	Mecanismo reacional para obtenção dos derivados 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-4-ilmetileno)- ou 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-5-ilmetileno)- <i>N</i> -fenilhidrazidacarbotioamidas	61
<b>Esquema 5</b>	Mecanismo reacional para obtenção dos Derivados 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-4ilmetileno)hidrazana)- e 2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-5ilmetileno)hidrazana)-3-feniltiazolidin-4-ona	64

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b>	Curvas termogravimétricas dinâmicos da amostra NW-11 em diferentes taxas de aquecimento 1-1- 10,0,2 - 20,0, e 3 - 40,0 °C min-1 e taxa de aquecimento curvas logarítmicas (log A) função da temperatura (K-1).	89
<b>Gráfico 2:</b>	Perfil citostático da doxorrubicina	95
<b>Gráfico 3:</b>	Perfil citostático da NW-03	95
<b>Gráfico 4:</b>	Espectro de absorção composto NW-03 interagindo com Cu <sup>+2</sup>	106
<b>Gráfico 5:</b>	Espectro de emissão de tirosinase na presença de diferentes frações	107

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LQIT: Laboratório de Química e Inovação Terapêutica  
RMN 1H: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio  
RMN 13C: Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze  
AINE – Anti-inflamatórios não-esteróides  
COX – Cicloxigenase  
U251: linhagem celular humana de glioblastoma  
UACC-62: linhagem celular humana de melanoma  
MCF-7: linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama  
NCI-ADR/RES: linhagem celular humana de adenocarcinoma de ovário resistente à múltiplos fármacos  
NCI-H460: linhagem celular humana de adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células  
PC-3: linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata  
HT-29: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal  
K-562: linhagem celular de leucemia  
HaCat: linhagem celular humana de queratinócitos  
s – Simpleto  
d- dupleto  
dd – Duplo dupleto  
Hz – Hertz  
J – Constante de acoplamento  
m – Multipleto  
PPAR– Receptor ativador da proliferação de peroxissomos  
OMS- Organização mundial de saúde  
CIM: concentração inibitória mínima  
Rf – Razão de frente  
SBR-sulforrodamina  
SAR – Relação estrutura-atividade  
t – Tripleto  
WHO-World Health Organization  
SRB: Sulforrodamina B

T: absorvância amostra sem célula

T<sub>1</sub>: absorvância do branco de células.

T<sub>0</sub>: absorvância do controle de células na placa T<sub>0</sub>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>26</b>
3.1. O câncer .....	26
3.2. Estratégias para Obtenção de Novos Fármacos .....	29
3.2.1. Bioisosterismo .....	30
3.2.2. Hibridação Molecular .....	34
3.3. Safrol, Derivados Benzodioxois e tiossemicarbazonas .....	37
3.4. Planejamentos da série .....	43
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>46</b>
4.1 Parte experimental química .....	46
4.1.1 Materiais .....	46
4.1.2 Equipamentos .....	46
4.1.3. Procedimentos Experimentais .....	47
4.1.3 Pirólise acoplada a cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa (GC-Pyr-MS) .....	48
4.1.5 DSC Fotovisual .....	49
4.2. Parte experimental biológica .....	50
4.2.1. Avaliação da atividade antiproliferativa .....	50
<b>4.3.1 MANUTENÇÃO DOS PARASITOS</b>	<b>53</b>
<b>4.4 DOCKING</b>	<b>54</b>
<b>4.5 TITULAÇÃO RMN <sup>1</sup>H</b>	<b>55</b>
<b>4.6 ESPECTROFOTOMETRIA</b>	<b>55</b>
<b>4.7 INTERAÇÃO COM ÍONS COBRE</b>	<b>55</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
<b>5.1. DERIVADOS BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-CARBALDEÍDO (NW-1) E BENZO[D][1,3]DIOXOL-4-CARBALDEÍDO (NW-0)</b>	<b>59</b>
<b>5.2. Derivados 2-(benzo[d][1,3]dioxol-4-ilmetileno)- ou 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5- ilmetileno)-N-fenilhidrazidacarbotioamidas.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2 Caracterização Estrutural dos Derivados Benzodioxois (NW) .....</b>	<b>65</b>
<b>5.2.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-RMN <sup>1</sup>H das Tiossemicarbazonas .....</b>	<b>65</b>



## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com as últimas estimativas, o câncer destaca-se como um importante problema de saúde pública, além de configurar uma das principais causas de morte no mundo. Considerando que em 2012 houve cerca de 8,2 milhões de mortes atribuídos a referida problemática, estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que as doenças não transmissíveis podem alcançar 68% da mortalidade mundial. Inserido nesse contexto as neoplasias malignas representariam cerca de 15% das causas de morte em 2015 (WHO, 2014).

Nos últimos anos, há uma ênfase considerável para a obtenção de novos agentes antitumorais por meio da utilização de estratégias da química medicinal. Neste contexto, estão inseridos derivados com a presença do núcleo benzodioxol tanto de alcaloides de plantas como derivados sintéticos (Yaffe 2013, Hwang 2011). Além disso, sabe-se que a referida unidade química possui amplo espectro de atividades, destacando-se a atividade antitumoral, antiinflamatória, analgésica e tripanocida, entre outras (Maia, 2009).

Com o objetivo de obter uma nova alternativa de tratamento para o câncer, foi planejada uma série de compostos com base em técnicas de hibridação molecular e bioisosterismo. A união de tiossemicarbazonas ao grupamento benzodioxol é uma estratégia promissora uma vez que possuem ação biológica em comum e atuam por mecanismos diferentes (Pape, 2016; Al-Wabli, 2016)

A atividade antitumoral merece uma atenção especial, uma vez que o Etoposide® contém a unidade benzo [1,3]dioxol como essencial para sua atividade. Além disso, sabe-se que o mecanismo de ação do Etoposide® e análogos demonstrou atuar na inibição de topoisomerases (Amiri, 2013). Outras subunidades químicas de relevância biológica são as tiossemicarbazonas, uma vez que apresentam a capacidade de inibir a ribonucleosídeo difosfato redutase causando limitações na síntese de DNA. Dentre esses grupos de moléculas destaca-se a Triapine®, eleita entre drogas em fase clínica (Finch, 2000; Gojo, 2007).

Assim sendo, foi realizada a síntese e caracterização de derivados benzo [1,3]dioxoltiossemicarbazônicos (NW) através de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, IV e pirólise acoplada a espectrometria de massa, bem como estudos *in vitro* com ensaios de atividade antitumoral e antiparasitário. Foi realizado também a avaliação da inibição de *tirosinase mushron* por meio de RMN <sup>1</sup>H e espectrofotometria.

***OBJETIVOS***

---

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais:

Planejar a síntese de novas moléculas derivados do núcleo benzodiol (NW) divididas em quatro séries: a) 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotioamida; b)-2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-4-ilmetileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotioamida, c)2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno-hidrazona)-3-feniltiazolidin-4-ona e d)2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-4-ilmetileno-hidrazona)-3-feniltiazolidin-4-ona candidatos a fármacos.

### 2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Sintetizar novas moléculas derivados do benzo[1,3]dioxoltiossemicarbazônicos (NW);
- ✓ Caracterizar e comprovar estruturalmente as séries de compostos derivados do núcleo benzodiol (NW) utilizando diferentes técnicas espectroscópica e espectrométricas através de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, infravermelho, massas e análise térmica/ Pyr-Ms;
- ✓ Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* dos derivados do núcleo benzodiol (NW) utilizando o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular;
- ✓ Avaliar o efeito dos derivados sobre a produção de óxido nítrico;
- ✓ Avaliar o efeito leishmanicida *in vitro* dos derivados sobre as fases promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- ✓ Avaliar o perfil de absorção espectrofotométrica de derivados benzodioxois;
- ✓ Avaliar a capacidade de inibição de tiossemicarbazonas frente a enzima tirosinase.



### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. O câncer

O câncer caracteriza-se pelo crescimento descontrolado e disseminação celular. Este crescimento é frequentemente invasivo, podendo evoluir para uma metástase. Os passos iniciais da invasão local incluem a ativação de vias de sinalização que controlam a dinâmica do citoesqueleto em células tumorais e junções celulares, seguido por migração de células tumorais para o tecido adjacente. A evolução deste processo depende de características adaptativas e de adesão ao microambiente (Wang et al., 2009; Sanz-moreno, 2010; Kienast et al., 2010).

No panorama mundial, houve grandes alterações do perfil epidemiológico dos países industrializados onde estas foram caracterizadas por uma queda progressiva da prevalência de doenças infecciosas e aumento progressivo de doenças crônico-degenerativas, dentre as quais, doenças cardiovasculares e câncer passaram a representar parcelas significativas (Araújo, 2012). O Brasil não segue a tendência da maioria dos países industrializados uma vez que há o predomínio de doenças transmissíveis e crônico-degenerativas (Schramm et al., 2004). Dentre essas doenças crônico-degenerativas houve aumento da incidência dos tipos de câncer geralmente associados ao *status* socioeconômico e condições de vulnerabilidade social (Inca 2014).

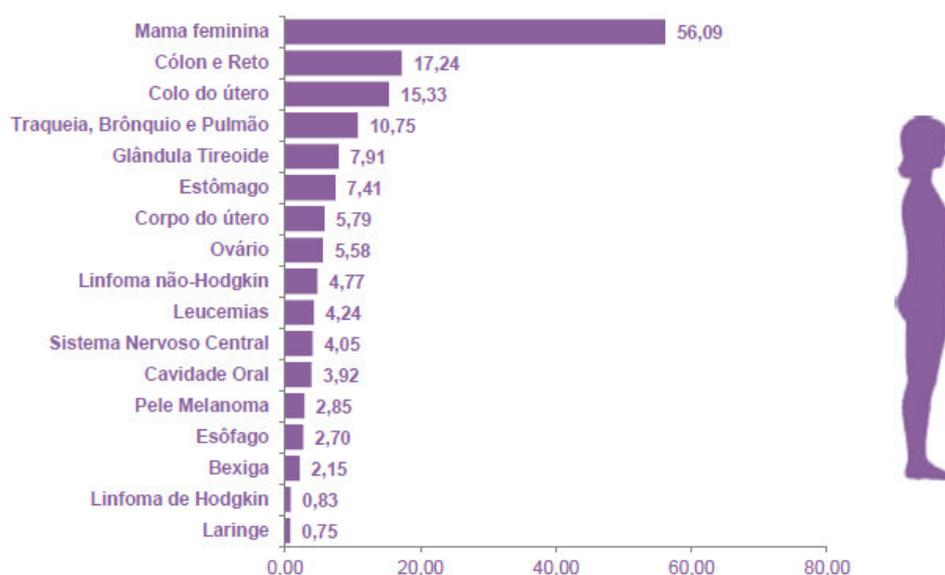


Figura 1. Taxas brutas de incidência das localizações primárias estimadas para 2014 por cem mil, em mulheres, Brasil (INCA 2014).

O câncer de mama é a forma mais frequente além de ser a principal causa de morte por câncer em mulheres no mundo (Figura 1). Segundo relatos, em 2008, cerca de 1.380.000 mulheres eram diagnosticadas (23% de todos os cânceres) e 458.400 morreram da doença (14% de todos os cânceres). No Brasil, o número de novos casos estimados para 2013 é de 52.680, com uma taxa de incidência de 52 casos para cada 100.000 mulheres (GONZAGA, 2014). Dados do Instituto nacional do câncer demonstram 70,42 casos novos de câncer de próstata para cada 100 mil homens, seguido do câncer de mama onde são esperados 56,09 casos novos para cada 100 mil mulheres, seguidos de neoplasias pulmonares, estômago, cólon e reto (Inca 2014).

A progressão do desenvolvimento de tumores depende de uma série de modificações celulares que variam de acordo com cada tipo de câncer. Além disso, o microambiente do tumor será determinante para o crescimento tecidual (Figura 2). Recentemente foram descritos os possíveis alvos farmacológicos para a terapêutica do câncer e os mecanismos envolvidos (Hanahan, 2011).

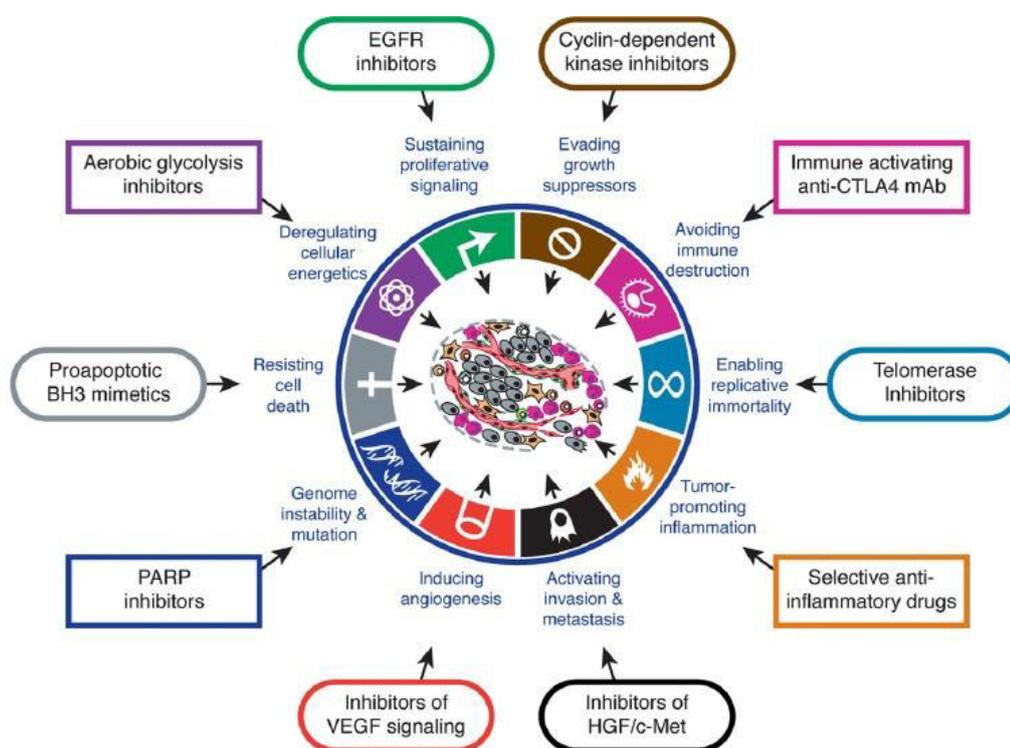


Figura 2. Alvos terapêuticos do câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2011)

Os cânceres estão associados com profundas alterações no genoma em vários níveis, mutações pontuais, deleções, duplicações e rearranjos cromossômicos. O que é menos

comumente apreciado é que essas mudanças ocorrem de forma heterogênea dentro um único tumor (CHENG, 2008). Centenas de mutações genéticas podem ser encontradas em tumores. Isto pode ocorrer pelo surgimento de um fenótipo modificador podendo ser induzido pela genética hereditária, infecções virais, ou variações nas condições do microambiente. Apesar de mutação, muitas vezes a níveis elevados, possivelmente devido à revogação do ciclo celular e pontos de controle de integridade do DNA, sabe-se da importância do processo de duplicação celular na progressão de tumores. Inerente a este processo, as enzimas topoisomerase II, já elucidadas, é um ponto chave para inibição da tumorigênese, uma vez que inviabiliza a quebra de ligações fosfodiéster do DNA torna-se inapto para transcrição e replicação (Pommier, 2013; Opegard, 2009; Campos-nebel, 2011; Godbole et al, 2014).

Além do alvo citado, ressalta-se também a importância de receptores nucleares de proliferação (PPAR), expressos significativamente em tumores de ovário. Estudos pré-clínicos evidenciaram que inibidores de PPAR como quimioterápicos promovem rádio sensibilização em linhagens de adenocarcinoma do ducto pancreático, PDAC. Sabe-se também que os PPAR são altamente expressos em razão da instabilidade genômica celular (Wang; Li, 2014).

A célula tumoral necessita de um aporte de oxigênio, como condição indispensável para o crescimento tecidual. Esta condição de crescimento é possível através de um processo de um aumento da produção de células endoteliais e o surgimento de novos vasos. No decorrer dessa neovascularização, a célula expressa diversos fatores de crescimento demasiadamente, dentre os quais o fator de crescimento endotelial vem sendo ligado à agressividade de diversos tipos de câncer, pelo fato da angiogênese ser um fato que antecede a metástase de tumores. O fator de crescimento endotelial vascular, VEGF na maioria dos tumores sólidos pode ser estimulado por fatores envolvidos no processo inflamatório. Estudos mostraram uma ligação entre o receptor NF- $\kappa$ B e o processo de angiogênese em tumores (Kai zhao, 2014). Em modelos pré-clínicos foi verificada a inibição da angiogênese através de silenciamento de gen de VEGF mediado por RNA (Yang ding, 2014). Embora diversos inibidores de angiogênese sejam relatado na literatura, estudos mostraram através de testes *in vitro* que mesmo células com a neovascularização comprometida podem se adaptar e progredir no crescimento tecidual (Azam, 2010).

Além disso, o comprometimento da oxigenação poderá levar a uma hipóxia, um alvo ainda pouco explorado. A hipóxia é uma característica da maioria dos tumores sendo um fator prognóstico e preditivo negativo, devido às suas múltiplas contribuições para

quimiorresistência, radiorresistência, angiogênese, vasculogênese, invasão, metástase, a resistência à morte celular, metabolismo alterado e instabilidade genômica (Jubb, 2010). No entanto, ainda há questões relevantes a serem resolvidas nos mecanismos da hipóxia, mas sabe-se que há formação de regiões de necrose no ambiente do tumor, supressão de apoptose, perda de estabilidade genômica devido às espécies reativas do oxigênio e seleção de genótipos que favorecem a lesão (William, 2011).

Além do exposto a translocação de várias oncoproteínas, supressores tumorais, e proteínas relacionadas ao câncer desempenham um papel crítico na progressão do câncer, metástase e resistência às drogas. Assim, o bloqueio da translocação da proteína é uma estratégia para o tratamento do câncer, altamente expressa em muitos tipos de cânceres. A proteína CRM1 (*chromosomal maintenance*) é responsável para a exportação nuclear de muitas proteínas supressoras de tumor, tais como p53, APC (*Adenomatous polyposis coli*), BRAC1 (*breast cancer 1, early onset*), e FOXO (*Forkhead box*). O bloqueio do transporte nuclear mediado por CRM1 de tais proteínas podem restaurar a sua função supressora de tumores (Behr, 1999; Ghobrial, 2005). Em estudos *in vitro*, compostos além de induzir a apoptose, inibem a proliferação de várias linhas celulares, incluindo o carcinoma das células renais, cólon, pancreático, mama, leucemia mielóide crônica e leucemia linfocítica (Smolewski, 2006).

Em particular no processo de melanoma a enzima tirosinase apresenta um papel chave na oxidação de fenóis e catecóis, etapa essencial na melanogênese. A melanina produzida por melanócitos possui capacidade de coordenar íons metálicos, como cobre e se ligar ao DNA. A melanina também inviabiliza o acesso de reparos enzimáticos em lesões no DNA. Tendo em conta que os íons de cobre no sítio ativo da tirosinase poderia ser responsável por ambas as atividades, formação de melanina e, possivelmente, crescimento de melanoma se faz necessário a busca de inibidores de tirosinase (Nunes, 2015; Monteiro 2013).

### **3.2. Estratégias para Obtenção de Novos Fármacos**

No conceito atual existem duas estratégias para o planejamento de novos fármacos: baseado no ligante (LBDD) e baseado na estrutura do alvo molecular (SBDD).

De acordo com esta nova visão definimos planejamento de fármacos baseado na estrutura do alvo molecular (SBDD) em casos onde o alvo macromolecular é conhecido e o ligante é desconhecido. Neste caso, as características tridimensionais do alvo biológico serão estudadas, no sentido de encontrar novas estruturas químicas, as quais possam ser adequadas

para o papel de ligantes. Já no planejamento de fármacos baseado no ligante (LBDD) o ligante é conhecido e o alvo biológico é desconhecido. Nesse caso, uma estrutura química de um ligante previamente determinado é alterada, com a finalidade de se descobrir novos análogos com propriedades semelhantes, como é o caso da estratégia do bioisosterismo (Montanari, 2011).

A seguir discutiremos apenas o bioisosterismo e a hibridação molecular, estratégias que utilizamos no trabalho apresentado.

### 3.2.1. Bioisosterismo

Dentre as estratégias de planejamento, desenho e modificação molecular, o bioisosterismo ocupa um lugar de destaque por sua enorme versatilidade (Barreiro; Fraga, 2008). Trata-se de uma estratégia da química medicinal para o planejamento de novos compostos, que se baseia na modificação molecular utilizando um composto protótipo. Para que essa estratégia seja bem aplicada, a estrutura química do composto protótipo deve ser bem estabelecida, o seu mecanismo de ação deve ser conhecido (inclusive no nível de interação com o receptor), e o seu grupo farmacofórico deve ser bem elucidado (Lima, Barreiro, 2005). Além disso, é uma técnica utilizada para melhorar a afinidade, a eficácia e especificidade; otimizar as qualidades farmacocinéticas e para variar as propriedades físico-químicas do composto-protótipo (Patani, Lavoie, 1996).

Em 1919, após estudos preliminares, Langmuir criou o conceito de isosterismo para definir átomos e moléculas orgânicas e inorgânicas que possuíam a mesma estrutura eletrônica e propriedades físico-químicas similares (Langmuir, 1919). Já em 1925, Grim formulou a Regra do Hidreto, a qual definia que a adição de um hidreto a um átomo fornece um pseudo-átomo, o qual apresenta as mesmas propriedades físico-químicas daqueles presentes na coluna imediatamente posterior da tabela periódica do átomo inicial (Korolkovas, 1982). Em 1932, Erlenmeyer amplia o conceito de isosterismo, definindo que isósteros são átomos, moléculas ou íons nos quais a camada periférica de elétrons pode ser considerada idêntica (Erlenmeyer e Leo, 1932 *apud* Lima e Barreiro, 2005). Já nos anos 50, Friedman introduz o termo bioisosterismo e revela que é o fenômeno observado entre duas substâncias estruturalmente relacionadas que apresentam propriedades biológicas similares ou antagônicas (Friedman, 1951 *apud* Lima e Barreiro, 2005).

Por volta de 1970, Burger classificou e dividiu os bioisósteros em clássicos e não-clássicos. O bioisosterismo clássico inclui átomos monovalentes, divalentes, trivalentes e

tetravalentes, e anéis equivalentes, e atende de maneira geral as exigências preconizadas pelas definições de Grim e Erlenmeyer. Já o bioisosterismo não-clássico está relacionado com grupos interconversíveis, não atende as regras eletrônicas e estéricas dos bioisómeros clássicos, mas produzem atividade biológica similar (Burger, 1991 apud Lima e Barreiro, 2005; Patani e Lavoie, 1996).

Na natureza há vários exemplos de bioisosterismo, como pode ser observado na figura 4 (Lima e Barreiro, 2005).

a) Bioisosterismo entre os aminoácidos essenciais: serina (1), cisteína (2) e tirosina (3); b) Bioisosterismo entre as bases púricas e pirimidínicas: citosina (4), uracila (5), adenina (6) e guanina (7); c) Bioisosterismo entre as xantinas: cafeína (8) e teofilina (9) (Figura 3).

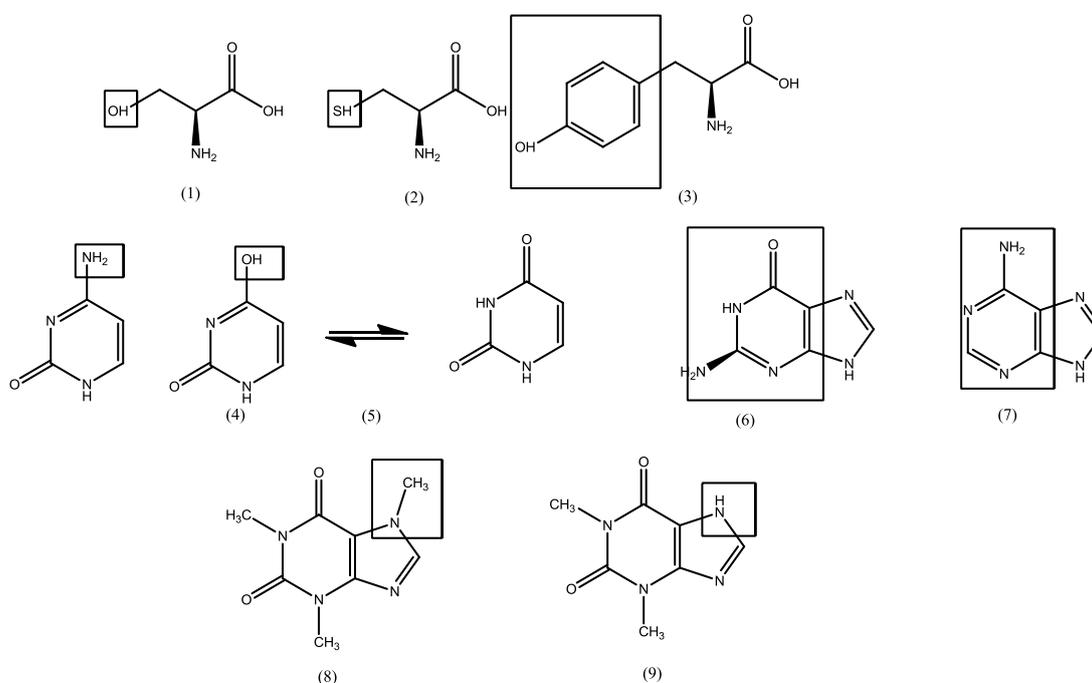


Figura 3: Exemplos de Bioisosterismo na natureza (Adaptado de LIMA & BARREIRO, 2005).

Foram obtidas diversas substâncias terapêuticamente ativas através tanto do bioisosterismo clássico, quanto pelo bioisosterismo não-clássico. No entanto, existe um número maior de exemplos de substâncias ativas de diversas categorias terapêuticas, obtidas através do bioisosterismo não-clássico. Para que seja aplicada de forma eficaz, alguns parâmetros devem ser observados (Lima e Barreiro, 2005): a) Tamanho, volume e distribuição eletrônica dos átomos, ou considerações sobre o grau de hibridização, polaridade

e efeitos mesoméricos ou indutivos; b) Grau de solubilidade aquosa ou lipídica, com o objetivo de prever as alterações nas propriedades físico-químicas; c) Reatividade química dos grupos funcionais ou subunidades estruturais bioisostéricas, com a finalidade de prever as alterações no processo de biotransformação; d) Fatores conformacionais, incluindo a capacidade de ligação de hidrogênio inter ou intra-moleculares.

Existem vários exemplos de bioisosterismo. Na Figura 4, é possível observar um exemplo de bioisosterismo clássico, onde a substituição da amina aromática presente na anilina pelo grupo hidroxila (levando à formação do fenol), conduz a uma alteração nas propriedades ácido-base do composto, e conseqüentemente do perfil farmacocinético. Além disso, devido à alteração do pK, há modificação no reconhecimento a nível de receptor, anulando a atividade original da molécula (Lima e Barreiro, 2005).

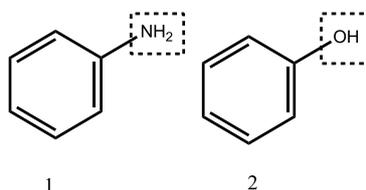


Figura 4: Bioisosterismo clássico entre a anilina (1) e o fenol (2).

Já na figura 5, pode-se observar um exemplo autêntico de bioisosterismo não-clássico entre os derivados adrenérgicos 3 e 4. Nesse caso, há uma substituição do grupo hidroxila fenólico (composto 3) pela unidade arilsulfonamida presente no composto 4. Devido ao grau de acidez semelhante, os grupos funcionais das duas moléculas interagem de forma semelhante com o receptor, possivelmente por ligações iônicas, o que explica o perfil de função biológica equivalente (Lima e Barreiro, 2005).

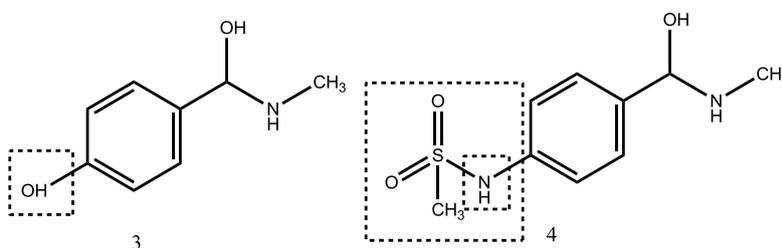


Figura 5: Bioisosterismo não-clássico entre o composto 3 e o composto 4.

Existem também exemplos de fármacos descobertos ou otimizados a partir da estratégia de bioisosterismo de anéis, como pode ser observado na figura 6 (Lima e Barreiro, 2005).

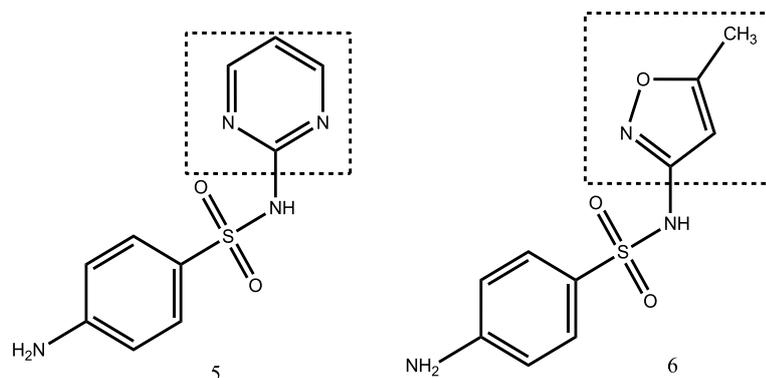


Figura 6: Bioisosterismo de anéis entre a Sulfadiazina (5) e o Sulfametoxazol (6).

A descoberta de fármacos através do bioisosterismo tem obtido sucesso nos laboratórios de pesquisa, onde há a busca de novos fármacos de uma mesma classe terapêutica, a partir da identificação de um fármaco inovador, descoberto por uma empresa concorrente. Isso acaba levando à produção de fármacos denominados “*me too*”, também chamados de “eu também” ou “cópia terapêutica” (Barreiro e Fraga, 2008). Os fármacos “*me too*” são estruturalmente semelhantes a um determinado fármaco conhecido, possuindo apenas algumas pequenas diferenças farmacoterapêuticas. Um exemplo de fármaco “*me too*” é a Ranitidina. A Ranitidina foi desenhada através de modificações bioisostéricas do anel imidazólico e do grupamento funcional cianoguanidina do protótipo Cimetidina, o que resultou no aumento da potência e seletividade dos receptores histaminérgicos tipo 2, alvo terapêutico de ambos os fármacos (Figura 7) (Barreiro e Fraga, 2005).

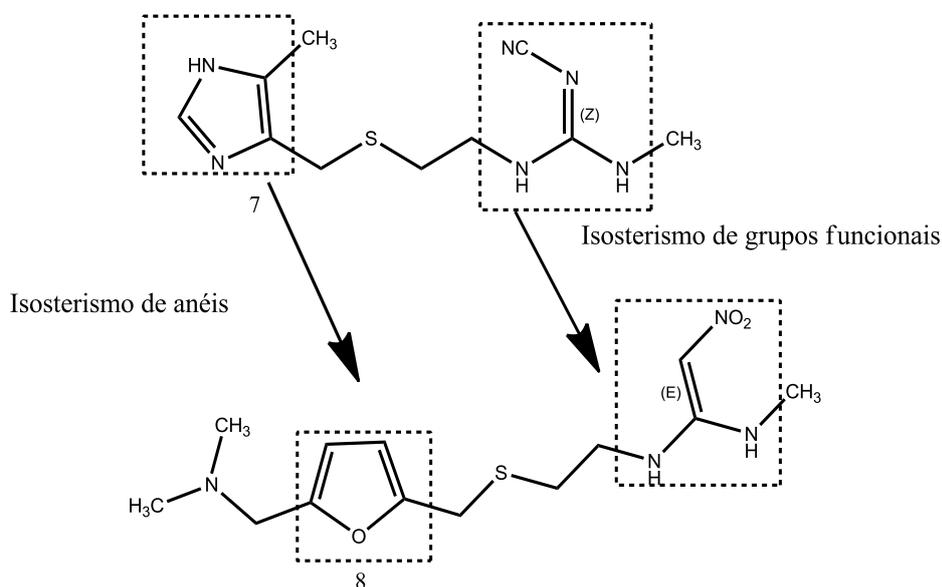


Figura 7: Descoberta da Ranitidina (8), fármaco denominado “*me too*”, a partir da Cimetidina (7), utilizando a estratégia do Bioisosterismo (Adaptado de Barreiro e Fraga, 2005).

### 3.2.2. Hibridação Molecular

A Hibridação Molecular compreende a reunião de características estruturais, parciais de dois compostos bioativos distintos em uma única estrutura, originando uma nova substância. Esta nova substância poderá apresentar a atividade de uma das moléculas originais, ou conjugar ambas as atividades em uma única molécula (Figura 8) (BARREIRO & FRAGA, 2008).

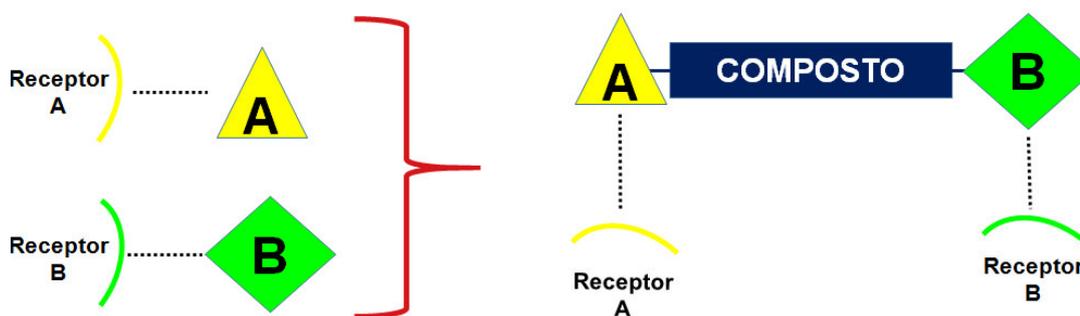


Figura 8: Representação do processo de Hibridação Molecular (Adaptado de Barreiro e Fraga, 2008).

A estratégia de hibridação molecular é realizada com a finalidade de se obter múltiplos ligantes com características farmacocinéticas favoráveis, os quais substituiriam o processo de administração de duas drogas diferentes concomitantemente (Barreiro et al., 2002). O termo “múltiplos ligantes” refere-se a drogas que reconhecem mais de um receptor, e isso faz com que haja algumas vantagens: ativação de vários alvos biológicos a partir de uma única molécula, aumentando a eficácia terapêutica; habilidade de modificar o perfil de biodisponibilidade na célula, e ser efetivamente eliminada pelo organismo após a sua ação (Bosquesi et al., 2011).

Considerando que sejam utilizadas moléculas com suas propriedades físico-químicas e farmacológicas, sua toxicidade e seu mecanismo de ação já elucidados, é possível criar uma extensa biblioteca química com centenas de híbridos moleculares homólogos, como pode ser observado na figura 9 (Viegas-junior et al, 2007; Montanari, 2011).

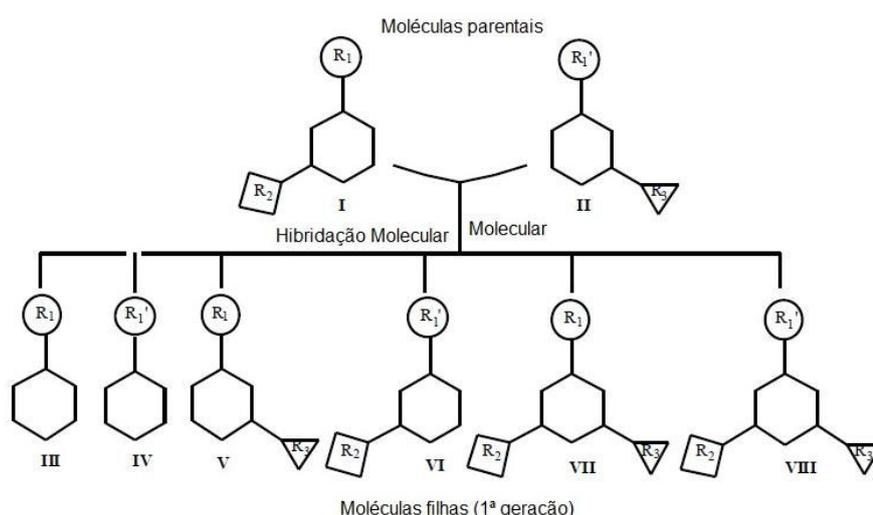


Figura 9: Esquema do processo de Hibridação Molecular (Adaptado de MONTANARI, 2011).

Existem vários exemplos de fármacos que foram obtidos através da técnica de hibridação molecular:

Hibridação molecular da Isoniazida e um derivado quinolônico com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobacteriana. O composto formado foi capaz de reduzir as Unidades Formadoras de Colônia *in vivo* (UFC), além de ter sido capaz de promover a redução de esplenomegalia (Figura 10) (Santos et al., 2012).

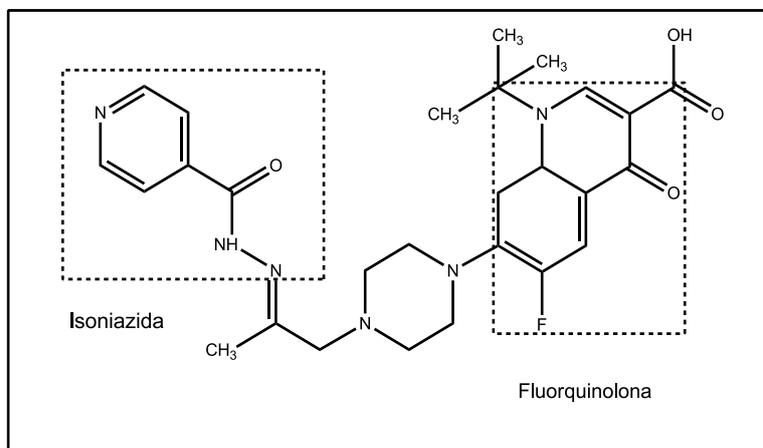


Figura 10: Hibridização da Isoniazida com um derivado fluorquinolônico (Adaptado de Santos et al., 2012).

Hibridação molecular de um derivado fluorquinolônico com a Pirazinamida. Os compostos obtidos tiveram atividade antituberculosa *in vivo* e *in vitro*. O composto apresentado na figura 11 demonstrou melhor logP do que a Pirazinamida. A avaliação do logP é importante devido ao grau lipofílico da parede do *M. tuberculosis*. O novo composto teve melhores resultados no estudo *in vitro* do que a Pirazinamida, além do que foi capaz de reduzir a carga bacteriana no pulmão e nos tecidos esplênicos (Santos et al., 2012)

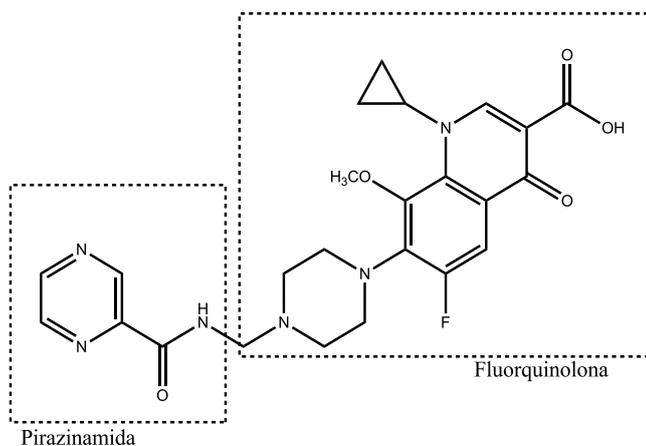


Figura 11: Hibridização da Pirazinamida com um derivado Fluorquinolônico (Adaptado de SANTOS et al., 2012).

Hibridação do grupo farmacofórico da Talidomida com a Dapsona (eficácia contra *Mycobacterium tuberculosis*) deu origem a um híbrido molecular com atividade antiinflamatória e analgésica (figura 12)(Bosquesi et al., 2011):

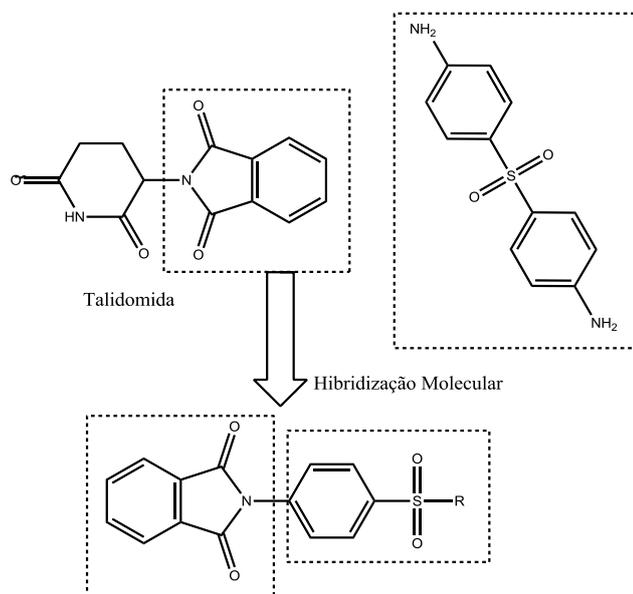
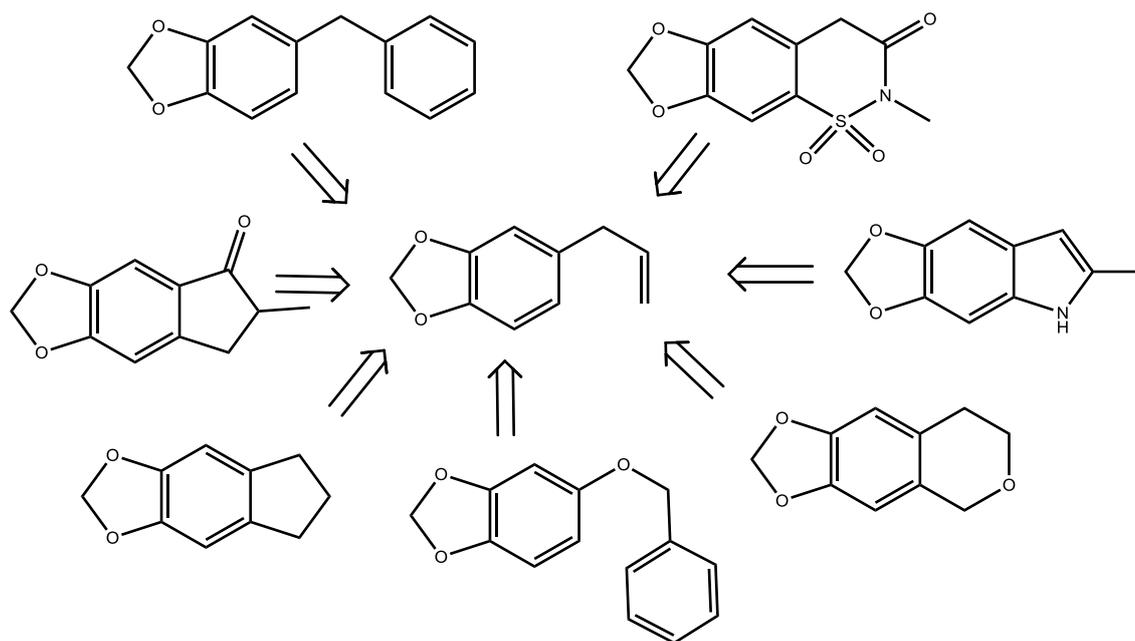


Figura 12: Híbrido molecular obtido a partir da Talidomida com a Dapsona (Adaptado de BOSQUESI et al., 2011).

### 3.3. Safrol, Derivados Benzodioxois e tiossemicarbazonas

O safrol é um derivado alilbenzênico oxigenado oriundo do óleo de Sassafrás (*Ocotea* sp.). Conhecido por ser um componente químico dos óleos essenciais mais presentes na flora brasileira (Rizzini, Mors, 1976; French, 1995). Caracteriza-se por uma elevada versatilidade química com diversos "sintons" funcionalizados (Barreiro e Fraga, 1999). Com isso, houve a possibilidade da formação de novos protótipos de fármacos a partir do safrol pelas posições 2, 5 e 6 do anel 1,3-benzodioxolânico (Esquema 01) (Araújo-Jr, 1999).



Esquema 01: Sintons funcionalizados a partir do safrol (Barreiro & Fraga, 1999).

Vários trabalhos indicam que o safrol induz a carcinogênese em células animais por indução de apoptose através da ativação das caspases 3, 8 e 9 (Daimon et al., 1997; Liu et al., 2004). A unidade de metilenodioxido, encontrada no safrol, pode ser identificada nos agentes antitumorais Etoposide (Vepesid®), e Teniposídeo (Vumon®) (Chen et al., 1984). O núcleo benzodioxol tem sido descrito como grupamento farmacóforo em várias atividades biológicas tais como: antitumoral, antiinflamatória, analgésica e tripanocida, entre outras. A ocorrência do núcleo benzodioxólico em várias substâncias bioativas de diferentes classes terapêuticas mostra relevância dessa classe, como por exemplo: Paroxetina (Pondera®) e Tadalafil (Cialis®) (Figura 13) (Deschant e Clissold, 1991, Cunha et al., 2011).

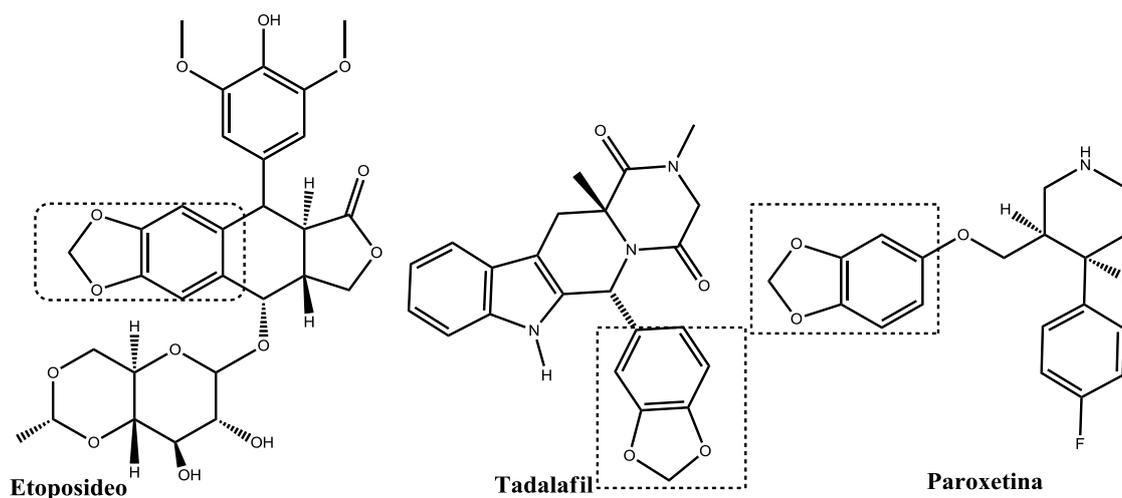


Figura 13. Fármacos contendo o núcleo benzodioxol

Buscando a obtenção de novos agentes antitumorais através de uma possível inibição dos alvos VEGFR, *c*-Kit (*proto-oncogene c*-Kit), FLT3 (*Tirosino-quinase 3 Fms-relacionado*), PDGFR- $\alpha$ / $\beta$  (*Alpha-type platelet-derived growth factor receptor*), e CSF-1-R (*Colony stimulating factor 1 receptor*), Wang avalia derivados sintéticos contendo tiazolidinona, benzodioxólico e indol (Figura 14). A avaliação do potencial antitumoral dos compostos planejados com hibridação molecular por meio do ensaio colorimétrico MTT a fim de determinar a concentração inibitória mínima, frente às linhagens HT-29 (*Human colon adenocarcinoma grade II cell line*), H460 (*stem-like cell*), MDA-MB-231 (*Breast from human*) e SMMC-7721 (*Liver*) (Wang, 2011).

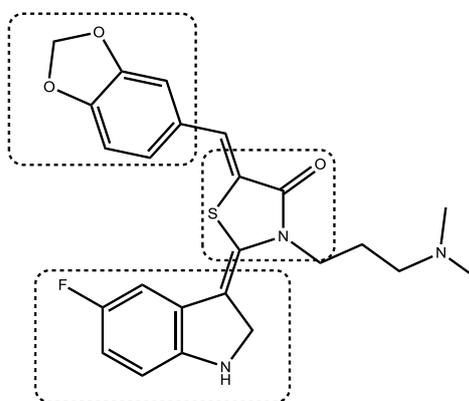


Figura 14. Derivado (2*E*, 5*Z*)-5-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-3-(3-dimetilamino)propil)-2-(5-fluorindolin-3-ilideno)tiazolidin-4-ona com  $IC_{50}$   $0.025 \pm 0.008$  frente a linhagem HT29.

Um resultado promissor foi obtido com a hibridação molecular do benzodioxol com o núcleo dihidropirimidina. Este é um núcleo análogo de inibidores de mitose além de ser considerado um heterociclo promissor no desenvolvimento de novos agentes anticâncer. Em avaliação da citotoxicidade foi possível verificar resultados promissores que podem estar relacionados da interação do protótipo a nível de tirosina quinase, uma vez que as mesmas desempenham papel significativo no splicing do mRNA. O referencial para síntese é a Leucettine L41 já patenteado e comercializado, descrito como potencial inibidor de quinases cdc-2 (Figura 15) (Debdab, 2011; Burgy, 2013).

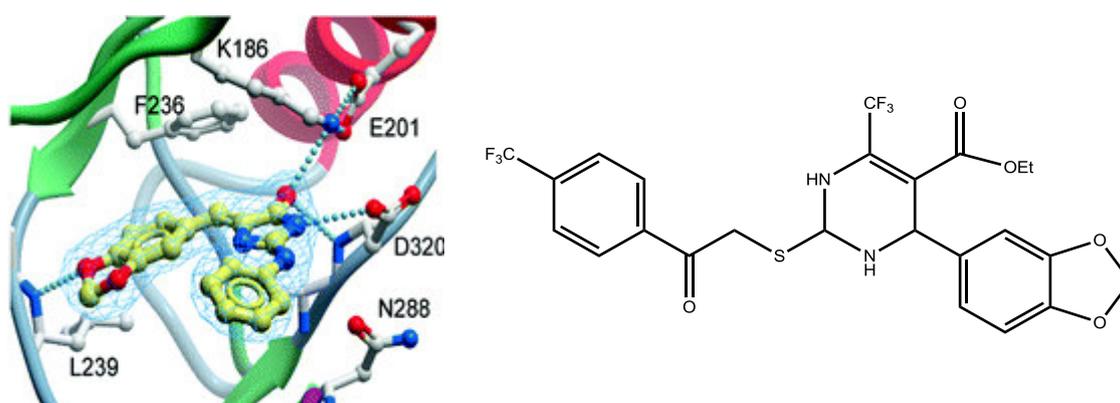


Figura 15. Derivado Leucettine L41

As tiossemicarbazonas possuem inúmeras aplicações biológicas descritas na literatura, abrangendo várias atividades tais como antitumorais, antivirais, antifúngicas, antibacterianas e antimaláricos (Beralto, 2004). Geralmente, a atividade biológica desta classe de moléculas é atribuída à capacidade de se coordenar a metais de transição. As estratégias para a aplicação biológica das tiossemicarbazonas são elaboradas a partir da racionalização de estruturas "queladas" com metais, ora considerando sua semelhança com um ente bioquímico *natural*, ora explorando as propriedades antioxidantes deste grupo (Cunha et al., 2011).

As tiossemicarbazonas tiveram sua indicação para uso na clínica por Domagk et al. em 1946, através de estudos que demonstraram que algumas tiossemicarbazonas possuíam atividade antituberculose *in vitro*, se manifestando também *in vivo*, em alguns casos (BROCKMAN, 1956). Contudo apenas a 2-(4-(prop-1-en-2-ilamino)-benzilideno)-hidrazinacarbotoamida (Tiacetazona®) (Figura 16a), é o único composto da classe empregado clinicamente contra a tuberculose, apresentando baixo custo, mas eficiência comprometida por efeitos colaterais como a indução de diabetes melitus e reações cutâneas. Na África do Sul é o medicamento de escolha no tratamento da tuberculose junto com a

piridina-4-carbohidrazida (Isoniazida ®) (Figura 16b), a fim de minimizar os mecanismos de resistência química do microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* à terapêutica aplicada (Cunha et al., 2011).

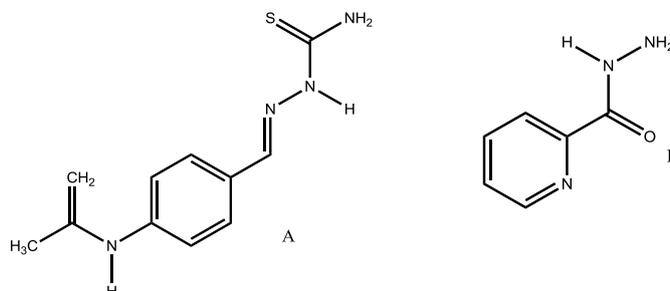


Figura 16. (a)Tioacetazona e (b) Isoniazida.

Quatro anos depois da descoberta da ação antituberculose das tiossemicarbazonas, Hamre et al. expuseram, em 1950 que grupos benzilidenos-hidrazinacarbotoamidas eram ativas contra infecção por neurovaccinia vírus. Em 1963, Bauer et al. demonstraram também que a *N*-metilisatina tiossemicarbazona (Metisazona ®) (Figura 17) era efetiva na profilaxia do vírus da varíola (Alves et al., 1993; Beraldo, 2004).

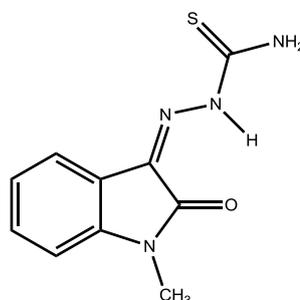


Figura 17. Estrutura da N-metilisatina tiossemicarbazona (Metisazona ®), com atividade antiviral.

Outro exemplo marcante é a 2-(piridin-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (Figura 18) demonstra atividade anti-leucêmica descrita desde 1956 e com sua descoberta também foram abertas as portas para a elucidação do mecanismo de ação das tiossemicarbazonas sobre as células cancerígenas (Brockman et al., 1956).

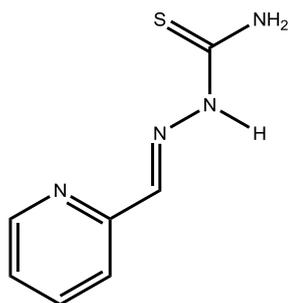


Figura 18. 2-(piridin-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida

A partir de estudos dos derivados da 2-(piridin-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida, identificou-se a enzima ribonucleotídeo redutase (RDR) como o alvo biológico desta classe de compostos (Levinson et al., 1973). Esta enzima pertence a uma cascata redox que catalisa a síntese biológica de desoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeos, estando como o último elemento enzimático na biossíntese deste carboidrato desoxirribosídeo. Esta enzima é constituída de duas subunidades, denominadas R1 e R2, onde se encontram os sítios de contato com o substrato e o sítio de transformação final da ribose a desoxirribose, respectivamente, que utiliza o radical tirosila como elemento chave para esta reação redox (Figura 19) (Thelander e Graslund, 1983; Cunha et al., 2011).

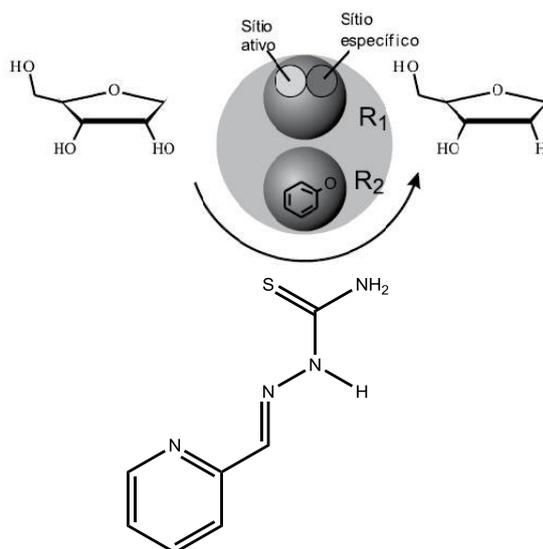


Figura 19. Tiossemicarbazona e sua atividade sobre a síntese bioquímica de desoxirribose

A 2-((3-aminopiridin-2-il)metileno)-hidrazinacarbotoamida (Triapina®) (figura 20) é um potente inibidor da ribonucleotídeo reductase, tendo como alvo biológico o DNA. Fato que direcionou a sua seleção com base nos resultados do estudo, como o inibidor mais provável de

doenças neoplásicas humanas. A Triapina® partir de 2006, está sendo desenvolvido pelas indústrias "Vion Pharmaceuticals". Submeteu-se a Fase 1 e Fase 2 de ensaios clínicos. A Triapina® também foi protegida através de patentes de uso relativos à atividade antiviral e antifúngica de (Cunha et al., 2011, Ishiguro et al., 2014).

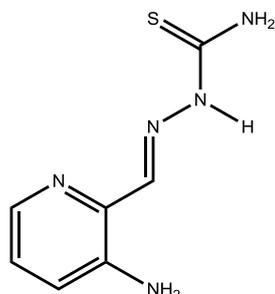


Figura 20. Estrutura da 2-((3-aminopiridin-2-il)metileno)-hidrazinacarbotoamida (Triapina®)

Além dos derivados já citados, o alcaloide da piperina (figura 22), derivados de frutos de pimenta do reino, tem apresentado propriedades antitumorais quando submetidos a análise frente a várias linhagens. Em ensaios realizados com linhagem HT-1080 foi possível verificar uma diminuição de cerca de 25% da viabilidade celular. Dentre os prováveis mecanismos que o alcaloide pode agir, tem sido proposta a inibição de MMP (*Matrix metalloproteinases*) considerado um ponto chave no processo de angiogênese, inflamação tecidual e metástase (Hwang, 2011).

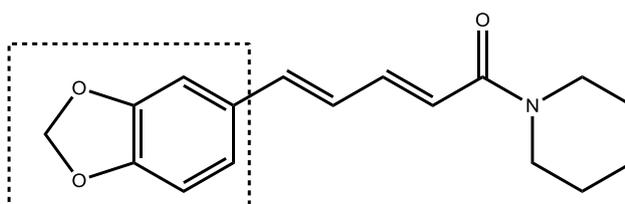


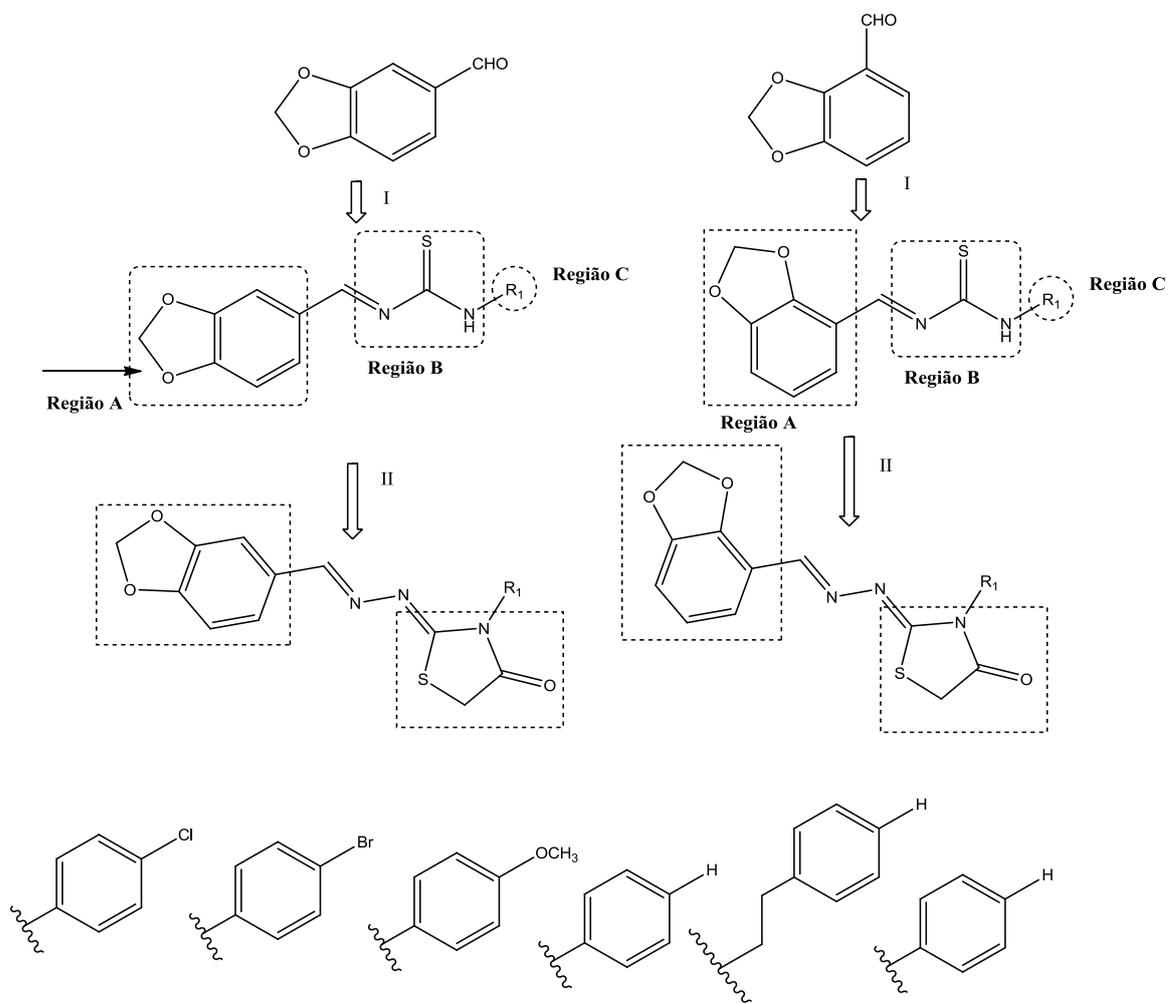
Figura 21. Estrutura química da piperina

### 3.4. Planejamentos da série

Os métodos empregados por meio de reações orgânicas visam à obtenção de uma série de moléculas caracterizadas pela presença da tiossemicarbazona e benzodioxol, que poderá ser conduzida a formação do anel 4-tiazolidona (Esquema 2).

A obtenção da série consiste em duas rotas paralelas, partindo da obtenção do aldeído benzo[*d*][1,3]benzodioxol-5-carbaldeído sintético e benzo[*d*][1,3]benzodioxol-4-carbaldeído de origem comercial, os dois aldeídos foram submetidos a reação com tiossemicarbazidas

levando a formação de tiossemicarbazonas, as quais foram conduzidas a formação do anel 4-tiazolidinona por meio de uma reação de ciclização. Com destaque na rota as tiossemicarbazonas apresentam 3 regiões nas moléculas: Região A benzodioxol, região B unidade da tiossemicarbazida e região C grupo aromático.



I: Tiossemicarbazidas, AcONa e EtOH; II: Cloroacetato de Etila, AcONa e EtOH

Esquema 2. Planejamento de síntese dos compostos



## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Parte experimental química

#### 4.1.1 Materiais

Os reagentes utilizados foram: 2,3-dihidroxi-benzaldeído, 3,4-dihidroxi-benzaldeído, *N*-fenilhidrazinacarbotioamida, *N*-(4-bromofenil)hidrazinacarbotioamida, *N*-(4-clorofenil)hidrazinacarbotioamida, *N*-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotioamida, *N*-(naftaleno-1-il)hidrazinacarbotioamida, *N*-(fenileetil)hidrazinacarbotioamida, benzo[*d*][1,3]dioxole-4-carbaldeído, etanol absoluto, acetato de sódio, cloroacetato de etila, dibromometano, carbonato de potássio, dimetilformamida, ácido acético glacial. Os reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos e para suas análises pertencem às marcas Sigma, Aldrich, Acros, Merck, Vetec ou Quimis.

Na cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 Merck F254, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366 nm) ou através de vapores de iodo.

#### 4.1.2 Equipamentos

A caracterização estrutural foi realizada através da espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), em espectrofotômetro FTIR Bruker Modelo IFS 66, pastilhas de KBr.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e de carbono (RMN <sup>13</sup>C) foram efetuados em espectrofotômetros Varian Modelo Plus de 300 MHz e de 400MHz. Nos espectros de ressonância magnética nuclear, os deslocamentos químicos estão expressos em ppm. A multiplicidade dos sinais está representada por: simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd), tripleto (t) e multiplete (m) e as constantes de acoplamento (J) estão expressas em Hz (Hertz).

Para determinação dos pontos de fusão será utilizado aparelho Quimis Modelo 340.27.

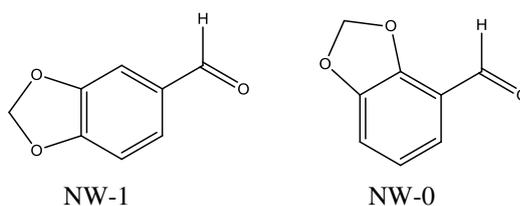
A Análise de pirólise foi conduzida com um pirolizador acoplado a um Cromatógrafo Gasoso e um espectrômetro de massa Shimadzu, GCMS-QP5050A.

As curvas de DSC foram obtidas em um aparelho Shimadzu calorimétrico diferencial, Modelo DSC-50, com atmosfera de nitrogênio de 50 mL min<sup>-1</sup> e velocidade de aquecimento de 5, 10, 15 e 20 °C numa faixa de temperatura de 25 a 400 °C. Ao DSC tem acoplado um microscópio Olympus e conectado a uma câmera Sanyo com imagem interligada ao software.

Espectrômetro de massa apresentou uma fonte de impacto eletrônico (EI) para promover a ionização de eletros utilizado na energia de ionização de 70 eV e temperatura da fonte de íons de 600 ° C.

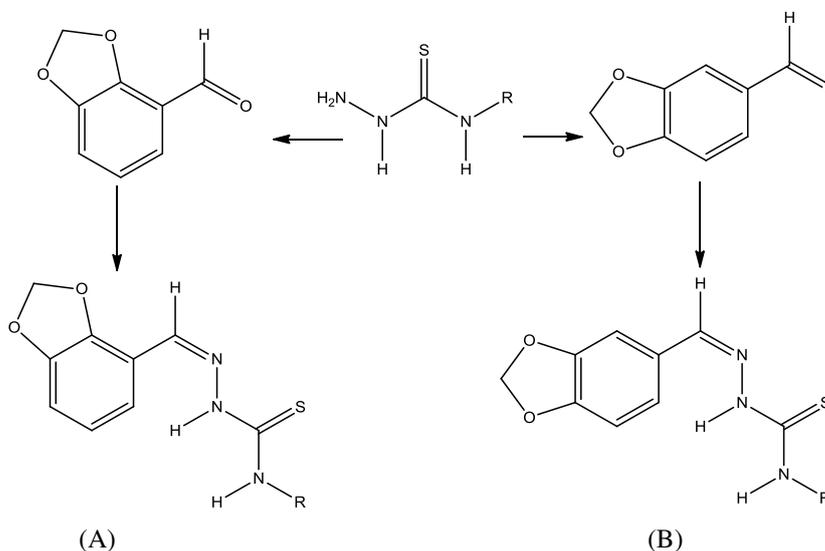
### 4.1.3. Procedimentos Experimentais

#### 4.1.3.1 Síntese dos benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído (NW-1) e benzo[*d*][1,3]dioxol-4-carbaldeído (NW-0)



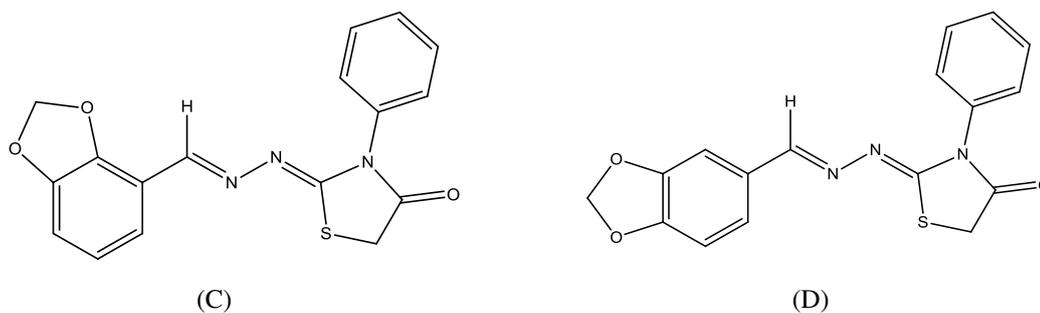
Em um balão de fundo redondo foram adicionados 2,3-dihidroxi-benzaldeído ou 2,3-dihidroxi-benzaldeído, dimetilformamida, carbonato de potássio e em uma razão molar de 6 equivalentes foi adicionado o dibromometano. A mistura reacional foi aquecida a temperatura de refluxo por 24 horas. O produto obtido foi filtrado, rotaevaporado e extrado com acetato de etila. Realizamos a purificação através de recristalização em solvente adequado. Produto (NW-0 ou NW-1) armazenado a -20 °C.

#### 4.1.3.2 Procedimento Geral para Síntese dos derivados 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-4-ilmetileno)- (A) ou 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-*N*-fenilhidrazidacarbotioamidas (B)



Em um balão de fundo redondo foram adicionados quantidades equimolares de tiossemicarbazida, dos aldeídos sintetizados (benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído (NW-1) e benzo[*d*][1,3]dioxol-4-carbaldeído (NW-0), na presença de etanol absoluto e uma quantidade catalítica de ácido acético. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 24 horas. Decorrido o referido tempo, a mistura reacional foi filtrada e lavada com etanol gelado. Em seguida a água mãe foi levada ao freezer por 12 horas e após esse período, o precipitado formado foi novamente filtrado e lavado com etanol gelado.

#### 4.1.3. Procedimento Geral para Síntese dos derivados 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-4ilmetileno)hidrazana)- (C) e 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5ilmetileno)hidrazana)-3-feniltiazolidin-4-ona (D)



Em um balão foram adicionados 0,0017 moles dos derivados dos derivados 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-4-ilmetileno)- (A) ou 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-*N*-fenilhidrazidacarbotioamidas (B), 0,0019 moles de cloroacetato de etila (1,1 eq.), 0,0069 moles de acetato de sódio anidro (4 eq.) e 25 mL de etanol. A mistura foi agitada nas mesmas condições sob temperatura de refluxo até o término da reação, acompanhamento por CCD. Após, a solução final foi resfriada e lavada com etanol gelado. Em seguida a água mãe foi levada ao freezer por 12 horas e após esse período e o precipitado formado novamente foi filtrado e lavado com etanol gelado.

#### 4.1.3 Pirólise acoplada a cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa (GC-Pyr-MS)

As amostras foram adicionadas a um recipiente de platina e introduzidas pirolisador que apresentou temperatura estável de 600 °C. A separação foi conseguida utilizando uma coluna capilar com fase estacionária fenil: dimetilpolissiloxano (5:95), com 30 m de

comprimento, 0,25 milímetros de diâmetro interno e 0,25 m de tamanhos de partículas. A coluna capilar do cromatógrafo gasoso foi operado em um programa de temperatura, que consistia em duas fases: em primeiro lugar, a temperatura da coluna foi elevada de 50 ° C até à temperatura final de 600 ° C a uma taxa de aquecimento de 10 ° C. min<sup>-1</sup>. Finalmente, a coluna foi arrefecida para a temperatura inicial. Gás hélio foi utilizado como gás transportador, a um caudal de 1,7 mL. min<sup>-1</sup>, com razão de separação de 1: 5. A pirólise de NW-11 foi realizada por meio do ajuste do espectrómetro de massa para detectar os fragmentos de pirólise. Espectrómetro de massa apresentou uma fonte de impacto electrónico (EI) para promover a ionização de eletros utilizado na energia de ionização de 70 eV e temperatura da fonte de íons de 600 ° C. O espectrómetro de massa foi operado em modo de verificação para detectar os íons na gama de massa de  $m/z$ .

#### **4.1.5 DSC Fotovisual**

A amostra de NW-11 foi acoplada a uma célula de alumínio hermeticamente fechada com massa de  $2 \pm 4$  mg. Os dados da análise térmica do DSC fotovisual foram obtidos usando um microscópio Olympus e conectado a uma câmera Sanyo com imagem interligada ao software.

#### **4.1.6 Termogravimetria (TG)**

As curvas termogravimétricas dinâmicas foram obtidas em uma termobalança (Shimadzu®, modelo TGA-50) utilizando cadinho de alumina. O aparelho foi calibrado com oxalato de cálcio monohidratado. Os experimentos foram conduzidos no intervalo de temperatura de 25-900 °C nas razões de aquecimento de 10, 20 e 40 °C.min<sup>-1</sup>. No estudo dinâmico foram avaliadas duas atmosferas diferentes, uma inerte utilizando nitrogênio com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup> e outra oxidativa utilizando ar sintético e nitrogênio com fluxo de 20 e 50 mL.min<sup>-1</sup>, respectivamente. A massa da amostra foi de  $2,0 \pm 0,1$  mg.

As curvas TG isotérmicas foram obtidas no mesmo equipamento sob as mesmas condições de atmosfera oxidativa e de massa das curvas TG dinâmicas. As temperaturas utilizadas para os estudos isotérmicos foram: 255, 265, 275, 285 e 295 °C. Os dados da TG dinâmica foram analisados usando o Software TasyS da Shimadzu®.

## 4.2. Parte experimental biológica

### 4.2.1. Avaliação da atividade antiproliferativa

Os compostos sintetizados foram avaliados quanto a sua atividade antiproliferativa em células tumorais humanas utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular (MONKS et al, 1991).

As linhagens celulares tumorais foram doadas pelo Frederick Cancer Research & Development Center, National Cancer Institute (NCI, EUA), enquanto a linhagem HaCat foi doada pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta (FOP/UNICAMP) (Tabela 1). Todas as linhagens foram mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm<sup>3</sup> (Costar/Corning) com 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> (Tabela 1) .

**Tabela 1:** Linhagens celulares humanas empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

<b>Linhagem</b>	<b>Órgão/Doença</b>	<b>Origem Embrionária</b>	<b>Densidade de Inoculação (10<sup>4</sup> cel/mL)</b>
U251	SNC; glioma	Ectoderme	4,0
UACC-62	Pele; melanoma	Ectoderme	4,0
MCF-7	Mama; adecarcinoma	Ectoderme	6,0
NCI-ADR/RES *	Ovário; adenocarcinoma	Ectoderme	5,0
786-0	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme	5,0
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme	4,0
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme	4,5
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme	7,0
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme	5,0
K562	Medula óssea; Leucemia mielóide crônica	Mesênquima	6,0
HaCaT	Pele (queratinócito)/Não tumoral	Ectoderme	4,0

\* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos

Foram inoculados 100µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc<sup>®</sup>), de cada suspensão celular, na densidade de inoculação descrita na tabela 1, em meio RPMI/5% SFB, acrescido de penicilina e estreptomicina (1000U/mL:1000µg/mL, 1%). Após 24h de incubação, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados

100 $\mu$ L/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250  $\mu$ g/mL) (Figura 22).

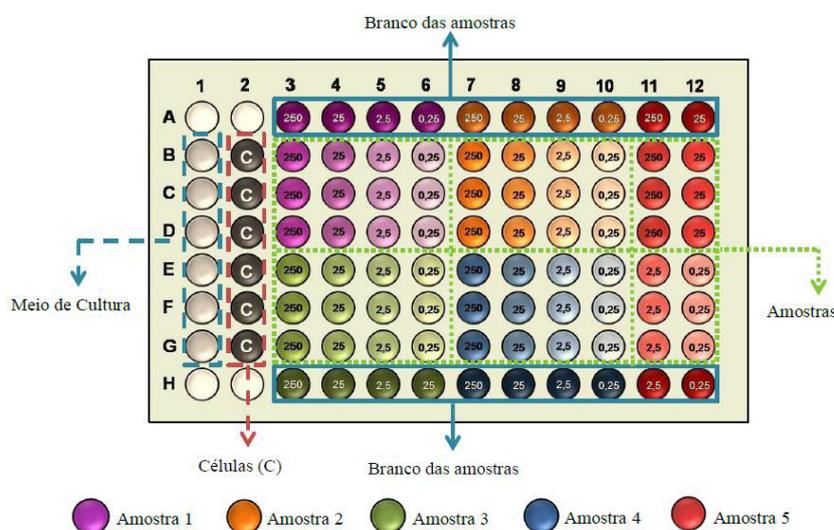


Figura 22. Representação gráfica da distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos utilizada no teste de atividade antiproliferativa. (TORRE, 2013)

Para preparação das amostras, uma alíquota de 5 mg de cada amostra dos derivados testados foi dissolvida em 50  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 25  $\mu$ L dessa solução-mãe foram dispersos em 475  $\mu$ L de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi então diluída sucessivamente em meio de cultura para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250  $\mu$ g/mL. A concentração final de DMSO (0,25% na maior concentração de amostra) não interfere no crescimento celular.

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25  $\mu$ g/mL. No momento da adição das amostras, foi realizada a fixação com ácido tricloroacético (TCA) a 50% da placa controle chamada To, o que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50 $\mu$ L/compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1h a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente à temperatura ambiente, as células foram coradas com 50 $\mu$ L/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas quatro vezes, com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às

proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma<sup>®</sup>), 10 $\mu$ M e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração de cada amostra, o crescimento celular expresso em porcentagem foi calculado segundo as seguintes fórmulas:

Se  $T > T_1 \rightarrow$  estímulo de crescimento celular

Se  $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$  atividade citostática:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$

Se  $T < T_0 \rightarrow$  atividade citocida:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

T<sub>1</sub> = absorbância do branco de células.

T<sub>0</sub> = absorbância do controle de células na placa T<sub>0</sub>.

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada para cada uma das linhagens testadas. Três concentrações efetivas denominadas GI<sub>50</sub> (do inglês *growth inhibition*, concentração necessária para interromper em 50% o crescimento celular). TGI foram calculadas por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 8.0.

### 4.3 Avaliação da atividade leishmanicida

#### 4.3.1 Manutenção dos parasitos

A espécie *L. amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016) foi utilizada para avaliação da atividade leishmanicida *in vitro*. As formas promastigotas foram mantidas em garrafas de cultura em 5 mL de meio Schneider com 10% de SFB em estufa BOD, a 27 °C. No momento do ensaio, os parasitos foram transferidos para tubos Falcon e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em meio Schneider. Fez-se, então, a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, para posterior plaqueamento e realização dos experimentos.

#### 4.3.2 Ensaio de viabilidade de promastigotas *in vitro*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas a 26° C em meio Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino. Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos. Os parasitas (106 células/mL) foram incubados a 26°C na presença de diferentes concentrações destes compostos (0,19 a 100µg/mL) por 96h. Parasitas incubados apenas com meio de cultura e com Anfotericina B foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Foi realizada também incubação com a mesma faixa de concentração de DMSO (0,01 a 1%) presente na diluição dos compostos. O crescimento foi avaliado e a IC<sub>50</sub>/96h foi determinada por análise de regressão. As concentrações usadas para a determinação da IC50 (concentração capaz de inibir em 50% o crescimento dos parasitas) foram: 0.19, 1.56, 6.25, 25 e 100 µg/mL. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

#### 4.3.3 Avaliação da atividade tripanocida

##### Manutenção das culturas

Formas epimastigotas (cepa Dm28 c) foram mantidas a 28°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. Para os experimentos foram utilizados parasitas de culturas de 3 dias (fase exponencial). Para obtenção das formas tripomastigotas, 5 ml de cultura de células vero de 2 dias foram infectadas com 100 µL de suspensão de tripomastigotas (cepa Y) concentradas a 10<sup>6</sup> células/ml. Esta cultura foi mantida em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) em estufa a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub> até que formas tripomastigotas fossem observadas no sobrenadante.

### **Ensaio de viabilidade de epimastigotas *in vitro***

Formas epimastigotas (Dm 28c) foram contadas num hemocitômetro e em seguida foram incubadas em placa de 96 poços em meio LIT, contendo  $10^6$  células/poço. Os compostos foram dissolvidos em DMSO (1%) e depois diluídos em meio LIT em uma diluição em série (1.23; 3.70; 11.11; 33.33 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) e adicionou-se nos respectivos poços, em triplicata. A placa foi incubada durante 96h a 26°C. O crescimento e as alterações morfológicas da cultura foram acompanhados por microscopia óptica. Alíquotas de cada poço foram recolhidas, e o número de parasitas viáveis foram contadas numa câmara de Neubauer e comparada com a cultura de parasitas não tratada. A concentração inibidora de 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) foi calculada utilizando regressão não-linear em GraphPad Prism software 4.0. Benznidazol foi utilizado como o fármaco de referência.

### **Ensaio de viabilidade de tripomastigotas *in vitro***

Formas tripomastigotas foram recolhidas a partir do sobrenadante de células LLC-MK2 infectadas e, em seguida, inoculadas em  $4 \times 10^5$  células/poço em um meio RPMI-1640. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO (1%) e depois diluídos em série em meio RPMI-1640 (1.23, 3.70, 11.11, 33.33 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) e adicionados aos respectivos poços, em triplicado. As placas foram incubadas durante 24 h a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Alíquotas de cada poço foram colhidas e o número de parasitas viáveis foram contados numa câmara de Neubauer. A percentagem de inibição foi calculada em relação às culturas não tratadas. A concentração citotóxica para cálculo de 50% ( $\text{CC}_{50}$ ) também foi realizada por meio de regressão linear em Prism GraphPad software 4.0. Benznidazol e nifurtimox foram utilizados como os fármacos de referência.

## **4.4 Docking**

Todas as estruturas moleculares foram otimizadas pela aplicação da abordagem do modelo semi-empírico RM1, que está disponível como parte do programa SPARTAN 08 , usando as configurações de padrões internos para critérios de convergência. A estrutura de destino, Não peptídicos tetrafluorofenoximetil cetona cruzaina inibidores como novas moléculas promissoras para quimioterapia para cálculo de ancoragem e a análise foi cruzaina *T. cruzi*, disponíveis na Protein Data Bank RCSB (PDB ID: 3IUT), que é constituído como um complexo com um inibidor de co-cristalizado, que se refere como " KB2 ". O local de ligação foi definida com todos os átomos dentro de um raio de 6,0 Å do ligante co-

cristalizado. Os resíduos GLN19, CYS25, SER61, LEU67, MET68, ASN70, ASP161, HIS162 e TRP184 foram tratados com flexibilidade durante os cálculos, a fim de considerar alguns efeitos induzidos. O programa de GOLD 5,2 foi utilizado para o cálculo de docking, seguido do programa BINANA, o qual foi utilizado para a análise das interações moleculares, particularmente para as melhores soluções de acoplamento obtidos em cada caso. Uma configuração padrão foi utilizado durante a análise, exceto para a distância H-ligação, que foi alterado para um máximo de 3,5 Å. Todos os valores foram produzidos com o PyMOL, software.

#### 4.5 Titulação RMN $^1\text{H}$

O estudo de titulação de RMN através da interação do composto NW-03 e tirosinase. Foi realizado utilizando solução de NW-03 15mg/500  $\mu\text{L}$  em DMSO- $\text{d}_6$  foi preparada e titulada com solução aquosa de tirosinase a  $7,196 \times 10^{-5}\text{M}$  usando micropipeta com razão de 10  $\mu\text{L}$ . Após adição da tirosinase foram coletados os espectros em equipamento de RMN 300 MHz.

#### 4.6 Espectrofotometria

As intensidades de fluorescência foram coletadas utilizando um espectrofluorímetro FP-6300 Jasco com um comprimento de onda de excitação de 280 nm e fenda de emissão e excitação de 5 nm. A solução de *Tyrosinase mushroom* foi preparada na proporção de 1 $\mu\text{L}$  de molaridade  $7,196 \times 10^{-5}\text{M}$  para 999  $\mu\text{L}$  de PBS. O espectro de excitação foi coletado na região de 300 a 500 nm usando excitação de 280 nm. Todo experimento foi realizado a 25 °C em cubeta de quartz retangular um comprimento de 1 cm. Titulações de fluorescência foram realizadas por adição 7de quantidades crescentes do derivado NW-03 (0-80  $\mu\text{L}$ ) diretamente para dentro da célula contendo solução em solução de *Tyrosinase mushroom*.

#### 4.7 Interação com íons cobre

Para investigar a interação entre os íons de cobre e o composto NW-3, foi utilizada solução de reserva de composto NW-03 (50  $\mu\text{M}$ ) foram preparadas em DMSO e a solução aquosa de  $\text{CuSO}_4$  0,50 mM. Os espectros de absorção foram registados entre 200 e 600 nm foram tomadas após 10 segundos utilizando um espectrofotômetro de UV-2450, os quais foram comparados com o composto NW-03 sozinho. A concentração do composto NW-03 foi mantido constante com diferentes concentrações de  $\text{CuSO}_4$ .

Concentração CuSO <sub>4</sub> (0,5 mM)	Volume solução mãe ( $\mu$ L)	Volume H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	Concentração NW-03 (50 $\mu$ M)
2	4	946	50
4	8	942	50
6	12	938	50
8	16	934	50
10	20	930	50
12	24	926	50
14	28	922	50
16	32	918	50
18	36	914	50
20	40	910	50
24	48	902	50

Tabela 2. Parâmetros para cada coleta de dados da complexação com íons Cu<sup>++</sup>





## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as rotas sintéticas adotadas para os derivados NW mostraram-se eficazes. A maioria dos compostos sintetizados foram obtidos com bons rendimentos e sem a necessidade de purificação por cromatografia em coluna, sendo apenas necessárias etapas de lavagens e recristalização em solventes adequados.

### 5.1. Derivados benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído (NW-1) e benzo[*d*][1,3]dioxol-4-carbaldeído (NW-0)

A reação de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) em meio básico ocorre da seguinte forma. Na primeira etapa da síntese dos derivados benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído (NW-1) e benzo[*d*][1,3]dioxol-4-carbaldeído (NW-0) acontece a desprotonação das hidroxilas levando a formação de um sal. Este ataca o dibromometano que se comporta como eletrófilo na reação, levando a formação do produto final. A síntese do derivado foi adaptada da rota sintética empregada por ABOUL-ENEIN et al. 2010, mostrando a importância da utilização de bases duras na obtenção destes tipo de derivados. Os derivados benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído (NW-1) e benzo[*d*][1,3]dioxol-4-carbaldeído (NW-0) foram obtidos com um rendimento de 38 e 25% respectivamente.

Segundo ABOUL-ENEIN et al 2010, a espectroscopia RMN  $^1H$  é fundamental para a caracterização do derivado. O sinal em forma de singleto em aproximadamente 6 ppm confirma a formação do ciclo pentamérico. O sinal aparece no deslocamento químico já mencionado em razão dos efeitos de desblindagem (Figura 24).

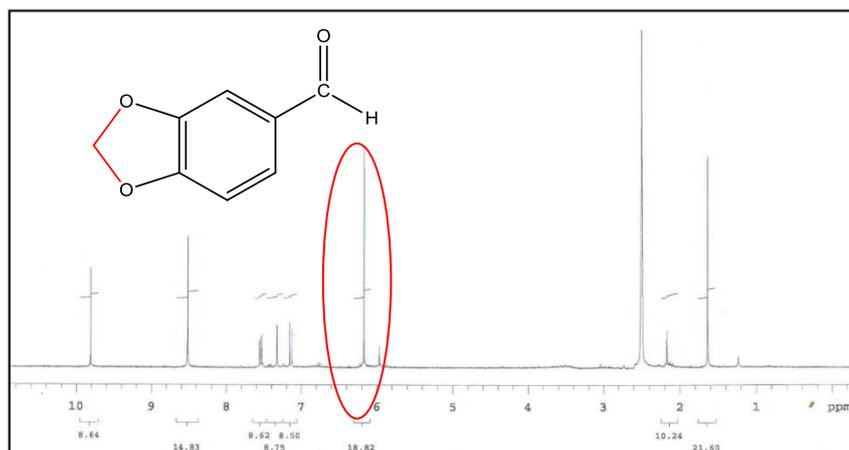
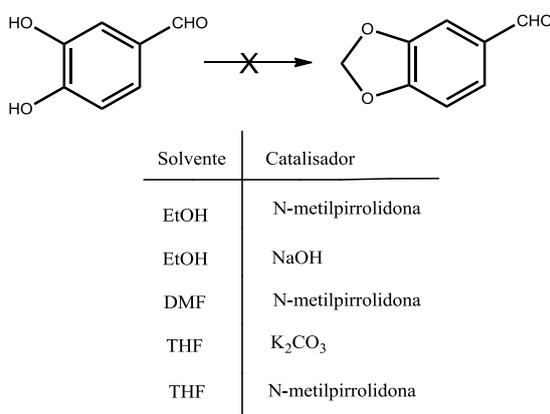


Figura 23. Espectro RMN  $^1H$  do derivado benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído (NW-1)

Vale salientar que diversas tentativas de obtenção do aldeído foram realizadas, no entanto, não foi obtido sucesso, tendo em vista a necessidade de desprotonação de hidroxilas e a baixa polaridade do reagente 3,4-dihidroxi-benzaldeído, a seleção do solvente e catalisador são fundamentais, primeiro por estar envolvido uma reação de substituição e a necessidade de uma base forte para abstração dos hidrogênios das hidroxilas. Esta etapa é fundamental na obtenção da série uma vez que os aldeídos do benzodioxóis são a primeira etapa da rota sintética já apresentada (Esquema 3).



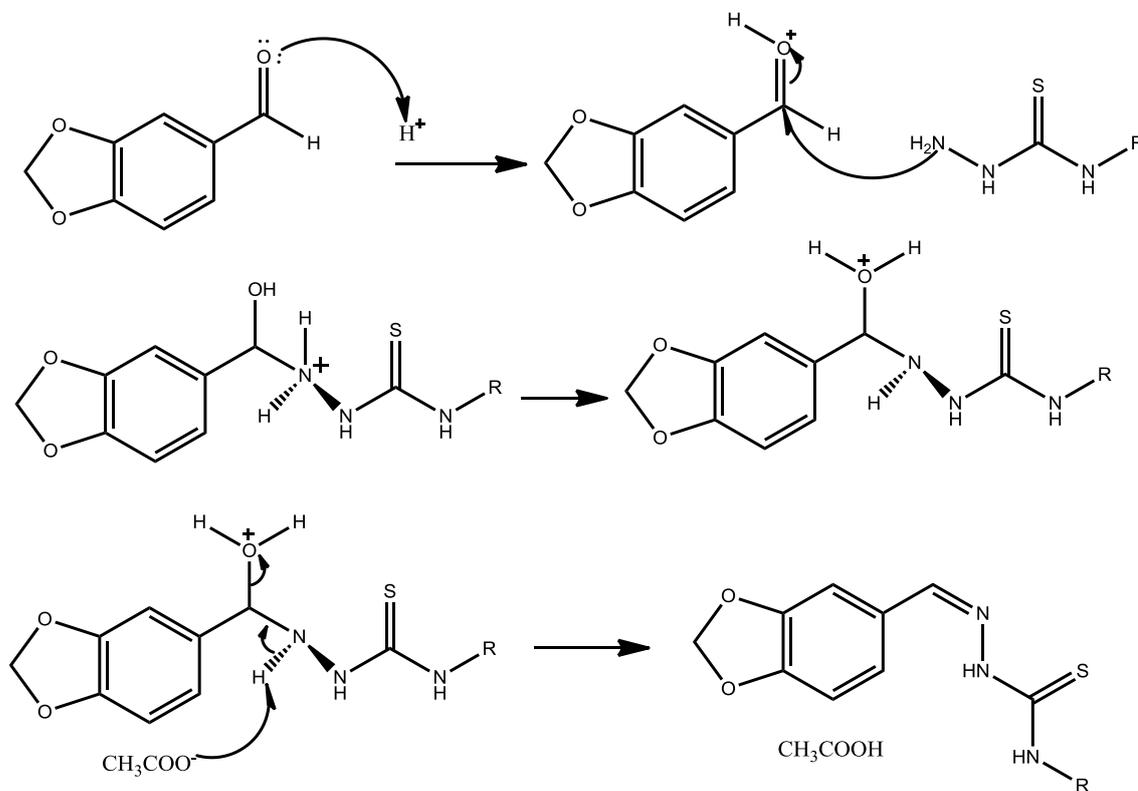
Esquema 3. Diferentes condições reacionais para obtenção do dos derivados benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído (NW-1) e benzo[*d*][1,3]dioxol-4-carbaldeído (NW-0)

A síntese do aldeído benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído foi obtida com melhores rendimentos a partir da oxidação do álcool piperonílico, em diclorometano a temperatura de 25° C. A reação consiste em uma proporção estequiométrica de um equivalente de álcool piperonílico para dezesseis equivalentes de MnO<sub>2</sub>.

## 5.2. Derivados 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-4-ilmetileno)- ou 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-*N*-fenilhidrazidacarbotioamidas

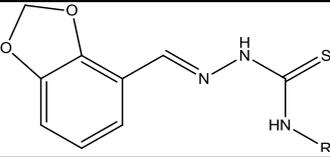
A segunda etapa da síntese caracteriza-se por uma reação onde o par de elétrons da amina livre ataca o carbono da carbonila dos derivados benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído (NW-1) e benzo[*d*][1,3]dioxol-4-carbaldeído (NW-0) (Esquema 4). Nesta reação, o carbono da carbonila dos derivados benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído (NW-1) e benzo[*d*][1,3]dioxol-4-carbaldeído (NW-0) se tornam mais suscetível ao ataque na presença de um ácido em quantidade catalítica que permite a formação do íon oxônio. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do nitrogênio da posição 1 da tiossemicarbazida, através de um processo

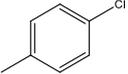
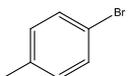
biomolecular, gerando o intermediário hemiaminal N-protonado correspondente. Por fim, uma rápida transferência de próton do nitrogênio para o oxigênio (prototropismo), seguida de uma desidratação e posterior neutralização, desloca o equilíbrio para a formação da função imina (Esquema 4) (SMITH, MARCH, 2001; COSTA, 2003; CAREY, SUNDBERG, 2007).



Esquema 4. Mecanismo reacional para obtenção dos derivados 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-4-ilmetileno)- ou 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-*N*-fenilhidrazidacarbotioamidas

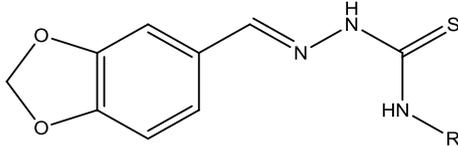
Nas tabelas 3 e 4 encontram-se as características físico-químicas dos derivados obtidos.

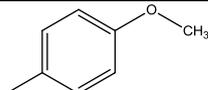
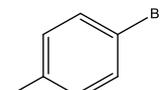
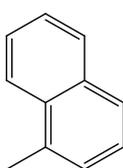
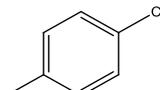
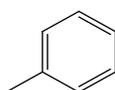
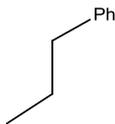
**Tabela 3.** Dados físico-químicos dos derivados NW obtidos a partir do derivado NW-0


Composto	Substituinte	Faixa de fusão	Log P *	Rdt %	Rf **
NW-02		190-191 °C	3,66	46	0,60
NW-03		215-216 °C	4,22	50	0,55
NW-04		216 °C	4,49	70	0,60

\* Os valores obtidos foram calculados pelo software ChemDraw Ultra 12.0

\*\* Os valores de Rf foram obtidos utilizando eluente hexano/AcOEt 7:3

**Tabela 4.** Dados físico-químicos dos derivados NW obtidos a partir do derivado NW-1


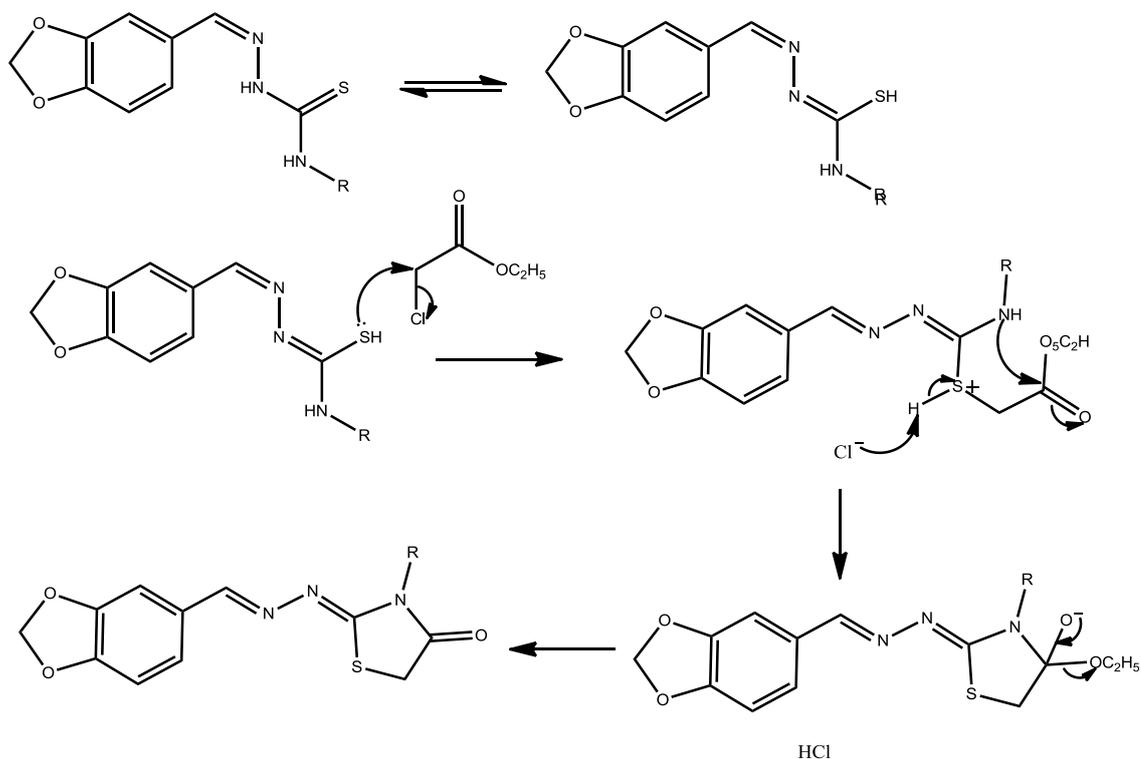
Composto	Substituinte	Faixa de fusão	Log P *	Rdt %	Rf
NW-09		196-197 °C	3,57	60	0,65
NW-08		187 °C	4,49	60	0,5
NW-13		179 °C	4,66	42	0,60
NW-14		182 °C	4,22	45	0,50
NW-15		195-196 °C	3,66	54	0,5
NW-16		197 °C	4,01	56	0,6

\* Os valores obtidos foram calculados pelo software ChemDraw Ultra 12.0

\*\* Os valores de Rf foram obtidos utilizando eluente hexano/AcOEt 8:2

## 5.2. Derivados 2-(benzo[d][1,3]dioxol-4ilmetileno)hidrazana)- e 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5ilmetileno)hidrazana)-3-feniltiazolidin-4-ona

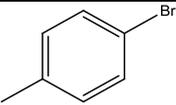
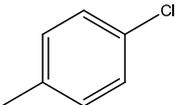
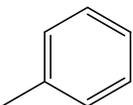
A terceira etapa consiste na formação do anel 4-tiazolidinona. O mecanismo se inicia pela condensação do cloroacetato de etila com o átomo de enxofre. Em seguida, ocorre um ataque intramolecular por parte do par de elétrons livre do nitrogênio na carbonila da função éster, seguido de perda de etanol, o qual leva a formação do heterociclo não substituído na posição C-5 (Esquema 5) (Jolly et al., 1990; Alves et al., 1993; Gürsoy et al., 1997; Abbady et al., 2003).



Esquema 5. Mecanismo reacional para obtenção dos Derivados 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-4ilmetileno)hidrazana)- e 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5ilmetileno)hidrazana)-3-feniltiazolidin-4-ona

Nas tabelas 5 e 6 encontram-se as características físico-químicas dos derivados obtidos.

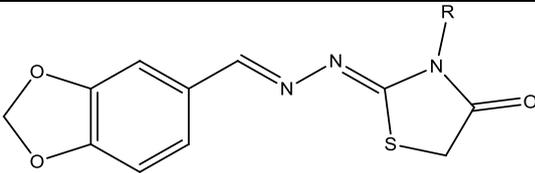
**Tabela 5.** Dados físico-químicos dos derivados NW-5; NW-6 e NW-7

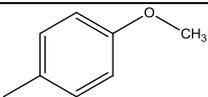
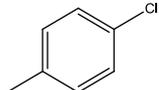
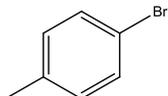
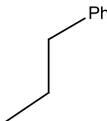
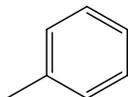
Composto	Substituinte	Faixa de fusão	Log P *	Rendimento %	R <sub>f</sub> **
NW-05		216	4,87	75	0,6
NW-06		221	4,6	72	0,5
NW-07		220	4,04	45	0,55

\* Os valores obtidos foram calculados pelo software ChemDraw Ultra 12.0

\*\* Os valores de Rf foram obtidos utilizando eluente hexano/AcOEt 7:3

**Tabela 6.** Dados físico-químicos dos derivados NW-10; NW-11, NW-17, NW-18 e NW-19



Composto	Substituinte	Faixa de fusão	Log P *	Rdt %	Rf
NW-10		195-196	3,91	70	0,58
NW-11		248	4,53	45	0,6
NW-17		175	4,87	60	0,6
NW-18		210	4,39	50	0,65
NW-19		205	4,04	48	0,57

\* Os valores obtidos foram calculados pelo software ChemDraw Ultra 12.0

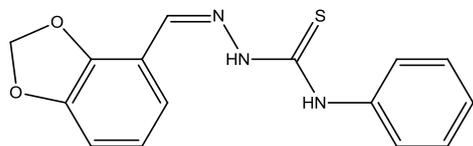
\*\* Os valores de Rf foram obtidos utilizando eluente hexano/AcOEt 8:2

## 5.2 Caracterização Estrutural dos Derivados Benzodioxois (NW)

### 5.2.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-RMN <sup>1</sup>H das tiossemicarbazonas

A análise de espectros de RMN <sup>1</sup>H permitiu confirmar estruturalmente os derivados benzodioxois (NW) sintetizados. Na figura 24, apresenta-se o espectro de RMN <sup>1</sup>H do derivado NW-02 em que nota-se um singleto 6.11 ppm correspondente aos hidrogênios metilênicos do anel metilenodioxí. Entre 6.84 e 7.72 ppm são encontrados os deslocamentos correspondentes aos hidrogênios aromáticos. A formação da tiossemicarbazona é confirmada pela formação da ligação -HC=N-, cujo espectro evidencia um singleto no deslocamento de 8.26 ppm em razão do efeito de desblindagem causado pela presença de átomo de elevada

eletronegatividade. Além disso, singletos relativos aos hidrogênios de “NH” estão presentes em 10.12 e 12.01 ppm com integração para um hidrogênio cada (Figura 24).



RMN  $^1\text{H}$ : (DMSO): NW-02:  $\delta$  12,01 1H (s, NH); 10,12 1H (s, NH); 8,26 1H (s, -HC=); 1H 6.86 (t, Ar,  $J_3=8$  Hz); 1 H 6.96 (d, Ar,  $J_3=7.6$  Hz); 2 H 7.4 (d, Ar,  $J_3=8.8$  Hz); 2 H (d, Ar,  $J_3=8.8$  Hz); 1H 7.70 (d, Ar,  $J_3=8$  Hz); 2H 6.11 (s,  $\text{CH}_2$ ).

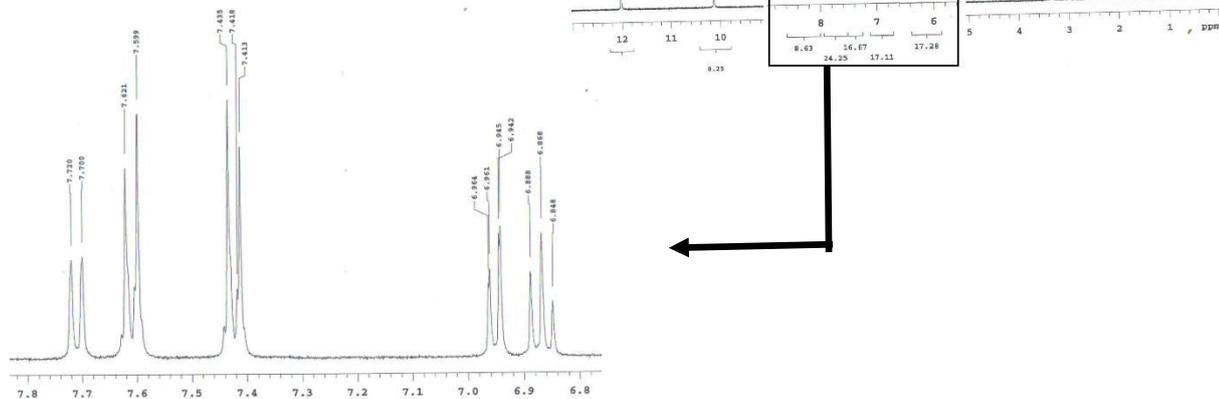


Figura 24. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  indicando os principais sinais para identificação dos compostos tiossemicarbazonas .

Além de derivados ciclizados, foi possível analisar as correlações de hidrogênios de moléculas tiossemicarbazonas. A análise do NW03 corrobora com a espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$ , uma vez que os acoplamentos são evidenciados através das correlações dos hidrogênios 8 e 9 (7,42 ppm), 10 e 11 (7,61 ppm). A correlação entre os hidrogênios 2,3 e 3,4.

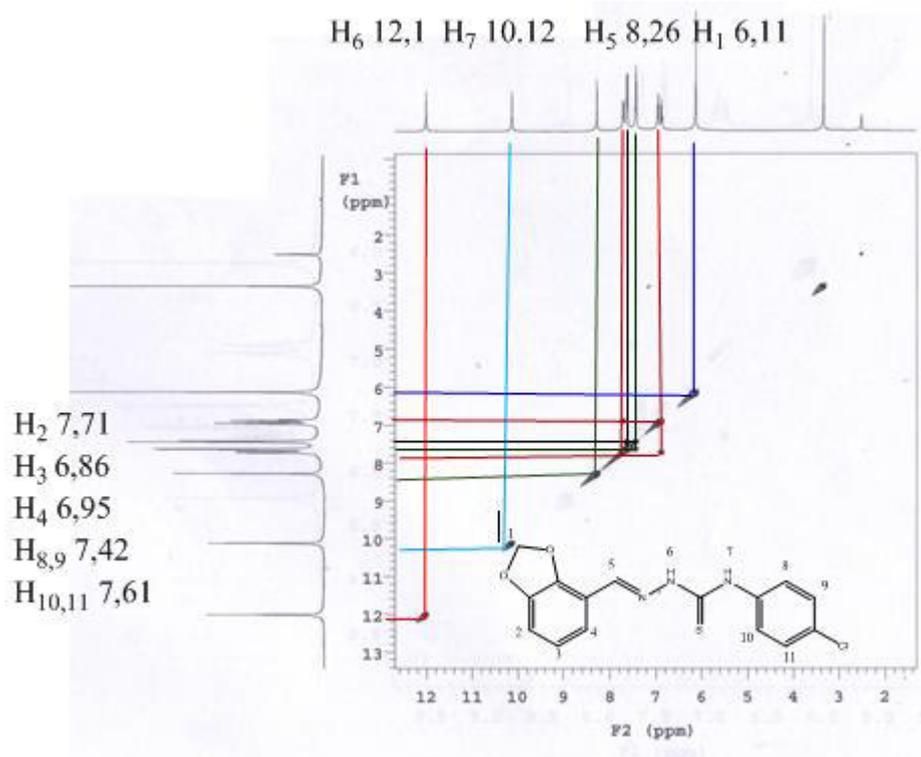


Figura 25. Análise da espectroscopia de COSY do derivado NW-3

Os derivados da série foram caracterizados através de deslocamentos químicos característicos. Na figura, apresenta-se a o espectro de  $RMN^1H$  da molécula NW-06, no qual nota-se o aparecimento de um sinal em 4.08 ppm caracterizando a formação do anel 4-tiazolidinona. Além disso, não aparecem no espectro, os sinais correspondentes aos singletos de  $-NH$ , conforme apresentados nas tabelas abaixo (Figura 26). Os demais resultados encontram-se nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

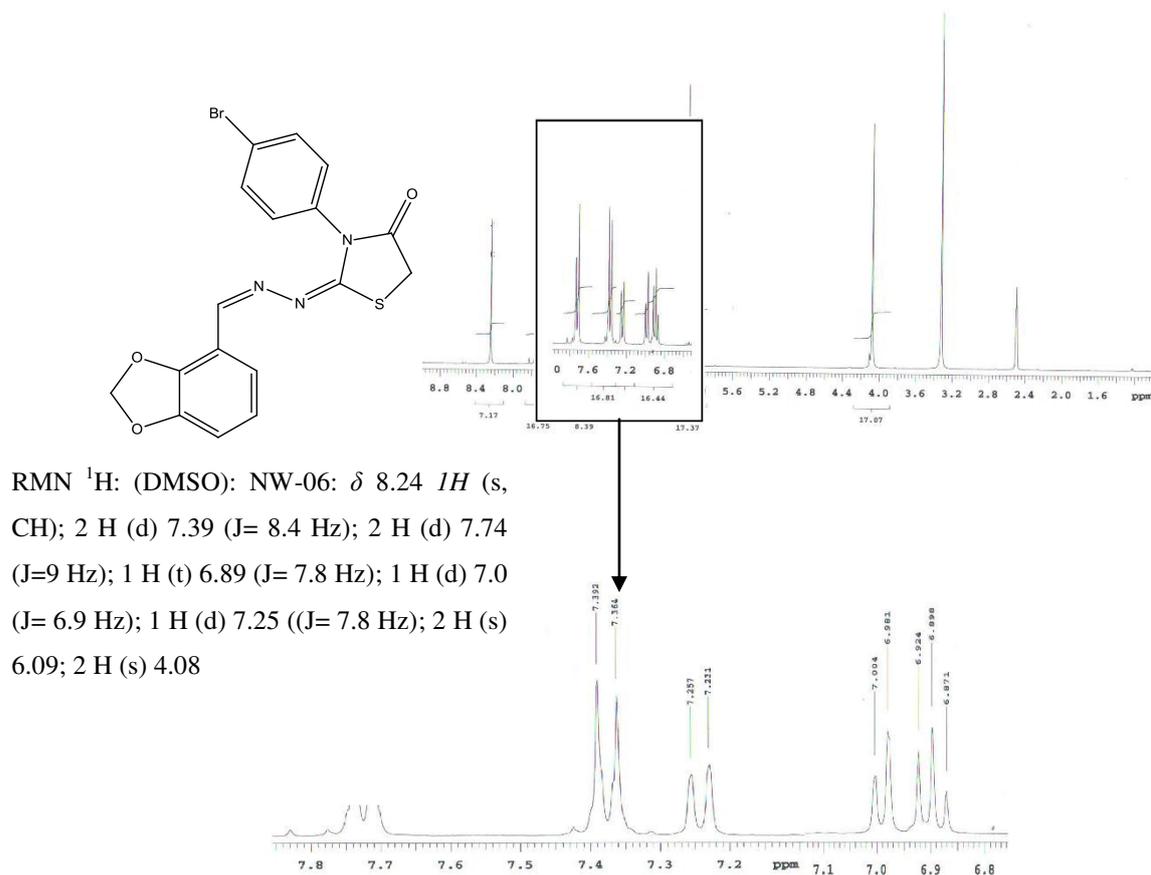


Figura 26. Análise da espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  do derivado NW-6

Na análise bidimensional foi possível verificar deslocamentos químicos. Na figura 27, apresenta-se o espectro de COSY da molécula NW-05, no qual nota-se algumas correlações. Observe-se o acoplamento dos hidrogênios aromáticos 7-8 e 9-10 em 7.4 ppm e 7.58 ppm respectivamente.

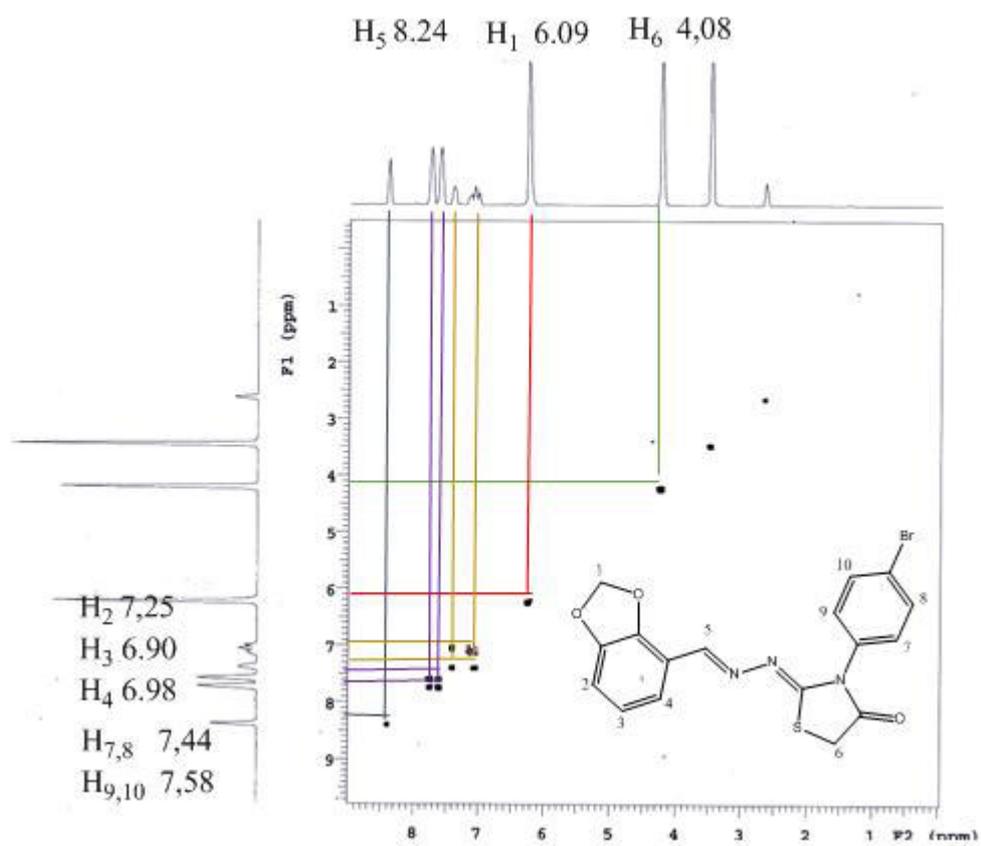
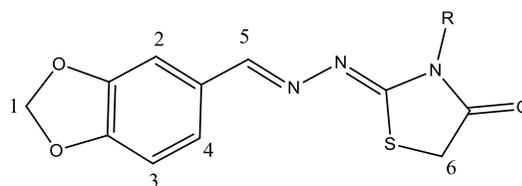


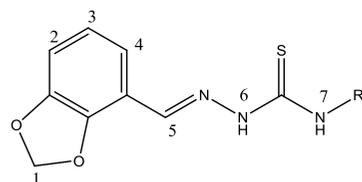
Figura 27. Análise da espectroscopia de COSY do derivado NW-5

**Tabela 7.** Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup>H dos 2-(benzo[d][1,3]-dioxol-5-ilmetileno)-N-fenilhidrazinacarbotiamidas (NW)

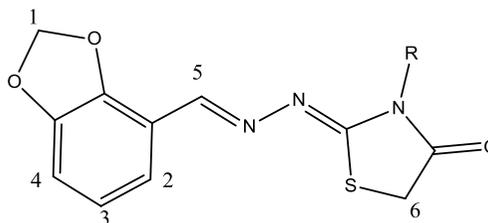
<i>Código</i>	<b>R</b>	<b>8,9-NH-(S)</b>	<b>7-HC=(s)</b>	<b>10, 11, 12, 13, 14 Ph</b>	<b>5, 4 ,6 Ar</b>	<b>1-OCH<sub>2</sub>O (s)</b>	<b>-CH<sub>2</sub>-</b>	<b>-CH<sub>3</sub> 14</b>
<i>NW-14</i>		(s) 11.81 (s) 10.12	(s) 8.06	2H; (d) 7.43 (J= 8.8Hz) 2H; (d)7.60 (J= 8,8 Hz)	1 H (d) 6.94 (J=7,6 Hz) 1 H (d) 7.15 (J= 6.8 Hz) 1H (s) 7.8	(s) 6.00	-	-
<i>NW-15</i>		(s) 11.70 (s) 10.08	(s) 8.06	1 H; (d) 7.20 (7,2 Hz) 1 H; (d) 7.54 (J=7,6) 3 H; (m) 7.36	1 H; (d) 6.91 (J= 7,6) 1 H; (d) 7.30 (J= 7,6) 1 H; (s) 7.83	(s) 6.07	-	-
<i>NW-08</i>		(s) 11.79 (s) 10.09	(s) 8.06	2H; (d) 7.54 (J= 0,8 Hz) 2H; (d)7.55 (J= 0,8 Hz)	1 H; (d) 6.94 (J= 8 Hz) 1 H; (d) 7.15 (J= 8Hz) 1 H; (s) 7.81	(s) 6.08	-	-
<i>NW-16</i>		(s) 11.40 (s) 8.55	(s) 7.96	1 H; (d) 7.08 (J= 6,8 Hz) 1 H; (d) 7.06 (J= 6,8Hz) 3 H; (m) 7.22 (J= 6,8 Hz)	1 H; (d) 6.94 (J= 7,6 Hz) 1 H; (d) 7.32 ( J= 7,6 Hz) 1 H; (s) 7.59	(s) 6.08	(m) 2.91 (dd) 3.76	-
<i>NW-09</i>		(s) 11.64 (s)10.0	(s) 8.04	(d) 7.13 (J= 9,2 Hz) (d)7.38 (J=8,8)	1 H; (d) 6.93 ( J= 8 Hz) 1 H; (d) 7.11 ( J= 8 Hz) 1H; (s) 7.83	(s) 6.06	-	(s) 3,76
<i>NW-13</i>		(s) 11.82 (s) 10.39	(s) 8.12	3 H (m) 7.87 4 H (m) 7.54	1H; (d) 6.96 (J= 8 Hz) 1H; (d) 7.17 ( J= 8 Hz) 1H; (s) 7.90	(s) 6.06	-	-

**Tabela 8:** Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup>H dos 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)hidrazona0-3-feniltiazolidin-4-onas (NW)

<i>Código</i>	<b>R</b>	<b>5-HC=(s)</b>	<b>Ph</b>	<b>2, 3, 4 Ar</b>	<b>1-OCH<sub>2</sub>O</b>	<b>-CH<sub>2</sub>-</b>	<b>-CH<sub>2</sub></b>	<b>CH<sub>3</sub></b>
NW-19		1 H (s) 8.23	2 H (d) 7,71 (J= 12 Hz) 2 H (d) 7.35 (J= 12 Hz)	1 H (d) 7.0 (J= 10.8 Hz) 1H (d) 7,22 (J= 10.8 Hz) (s) 7.27	6,08	4.07	-	-
NW-11		1 H (s) 8,22	2 H (d) 7,40 (J= 8 Hz) 2 H (d) 7,57 (J= 8 Hz)	1 H (d) 6.99 (J= 8 Hz) 1H (d) 7,22 (J= 8 Hz) 1 H (s) 7,27	6,08	4,08	-	-
NW-17		1 H (s) 8.23	2 H (d) 7,40 (J= 8 Hz) 2 H (d) 7,57 (J= 8 Hz)	1 H (d) 6.99 (J= 8 Hz) 1H (d) 7,22 (J= 8 Hz) 1 H (s) 7,27	6,08	4,08	-	-
NW-18		1 H (s) 8.39	3 H (m) 7.29 2 H (m) 7.27	1H (d) 7.22 (J= 6.9 Hz) 1 H (d) 6.98 (J= 7,6 Hz) 1 H (s) 7.92	6.07	3.87	2 H (m) 3.89 2 H (m) 2.89	
NW-10		1 H (s) 8.22	2 H (d) 7,05 (J= 8,8 Hz) 2 H (d) 7,26 (J=8,4 Hz)	1 H (d) 6.99 (J= 7,6 Hz) 1 H (d) 7.22 (J= 8.4 Hz) 1H (s) 7.26	6.08	4.06	-	3.8

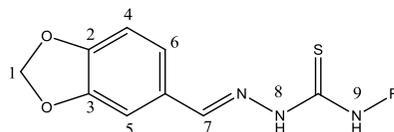
**Tabela 9.** Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup>H 2-(benzo[d][1,3]-dioxol-4-ilmetileno)-N-fenilhidrazinacarbotiamidas (NW)

<i>Código</i>	<b>R</b>	<b>8,9-NH- (S)</b>	<b>7-HC=(s)</b>	<b>8, 9, 10, 11, 12 Ph</b>	<b>2, 3, 4 Ar</b>	<b>1-OCH<sub>2</sub>O (S)</b>
<i>NW-02</i>		1 H (s) 12.01 1 H (s) 10.12	1 H (s) 8.26	1 H (d) 6.94 1 H (d) 7.41; 3 H(m) 7.62	1 H (t) 6.86 2 H (d) 7.70	2 H (s) 6.11
<i>NW-03</i>		1 H (s) 12.01 1 H (s) 10.12	1 H (s) 8.26	2 H (d) 7.60 2 H (d) 7.41	2 H(d) 7.70 1 H (t) 6.86	2 H (s) 6.11
<i>NW-04</i>		1 H (s) 12.0 1 H (s) 10.1	1 H (s) 8.26	2 H (d) 6.95 2 H (d) 7.56	2 H (d) 7.71 1 H (t) 6.88	2 H (s) 6.11

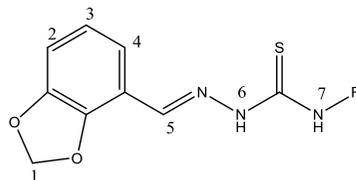
**Tabela 10.** Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup>H dos 2-(benzo[d][1,3]dioxol-4-ilmetileno)hidrazona0-3-feniltiazolidin-4-onas (NW)

<i>Código</i>	<b>R</b>	<b>7-HC=(s)</b>	<b>8, 9, 10, 11, 12 Ph</b>	<b>2, 3, 4 Ar</b>	<b>1-OCH<sub>2</sub>O (S)</b>	<b>-CH<sub>2</sub>-</b>
<i>NW-07</i>		1 H (s) 8.23	3 H (m) 7.52 2 H(d) 7.47 (J= 7.6 Hz) 2 H(d) 7.54 (J= 8 Hz)	1 H (t) 6.90 (J= 8 Hz) 1 H (d) 7.00 (J= 7.2 Hz) 1 H (d) 7.25 (J= 8 Hz)	2 H (s) 6.10	2 H (s) 4.09
<i>NW-06</i>		1 H (s) 8.24	2 H (d) 7.57 (J= 12 Hz) 2 H (d) 7.42 (J=12 Hz)	1 H (t) 6.89(J= 10 Hz) 1 H (d) 7.00 (J= 10 Hz) 1 H (d) 7.25 (J= 10 Hz)	2 H (s) 6.09	2 H (s) 4.08
<i>NW-05</i>		1 H (s) 8.24	2 H (d) 7.39 (J= 8.4 Hz) 2 H (d) 7.74 (J=9 Hz)	1 H (t) 6.89 (J= 7.8 Hz) 1 H (d) 7.0 (J= 6.9 Hz) 1 H (d) 7.25 ((J= 7.8 Hz)	2 H (s) 6.09	2 H (s) 4.08

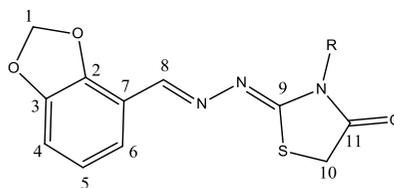


**Tabela 11.** Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  dos 2-(benzo[d][1,3]-dioxol-5-ilmetileno)-N-fenilhidrazinacarbotiamidas (NW)

<i>Código</i>	<b>R</b>	<b>C9</b>	<b>C8</b>	<b>C Aromáticos</b>	<b>C1</b>	<b>C (CH2)</b>	<b>C (CH2)</b>
NW-14		175.9 (1 C)	155.9 (1 C)	105.7 a 155.8 (12 C)	101.6(1 C)	-	-
NW-15		176.1(1 C)	149.58 (1 C)	105.5 a 149.1(12 C)	101.1(1 C)	-	-
NW-08		175(1 C)	142(1 C)	105.5 a 149.1(12 C)	101(1 C)	-	-
NW-16		177.1(1 C)	149.2 (1 C)	105.5 a 149.1 (12C)	101(1 C)	45(1 C)	35(1 C)

**Tabela 12.** Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  dos 2-(benzo[*d*][1,3]-dioxol-4-ilmetileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotiamida (NW)s

<i>Código</i>	<b>R</b>	<b>C9</b>	<b>C8</b>	<b>C Aromáticos</b>	<b>C1</b>	<b>C (CH2)</b>	<b>C (CH2)</b>
<i>NW-03</i>		175.9 (1 C)	147.5 (1 C)	109.37 a 146.6 (12C)	101.6 (1C)	-	-
<i>NW-02</i>		176.1 (1 C)	149.58(1 C)	105.5 a 149.1 (12C)	101.1 (1C)	-	-
<i>NW-04</i>		175.7 (1 C)	147.57 (1 C)	109.37 a 146.6 (12C)	101 (1C)	-	-

Tabela 13. Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  dos 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-4-ilmetileno)hidrazona0-3-feniltiazolidin-4-onas (NW)

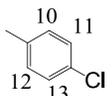
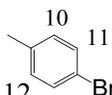
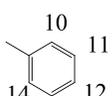
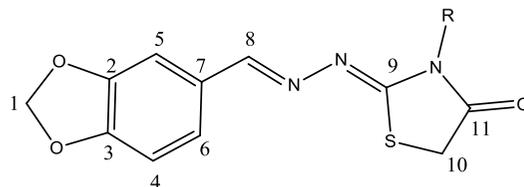
<i>Código</i>	<b>R</b>	<b>C11</b>	<b>C9</b>	<b>C8</b>	<b>C Aromáticos</b>	<b>C1</b>	<b>C10</b>
<i>NW-06</i>		171.7 (1 C)	165.3 (1 C)	151.7 (1 C)	109.9 – 147.7 (12C)	101.6 (1 C)	32.25 (1 C)
<i>NW-05</i>		171.8 (1 C)	165.6 (1 C)	151.9 (1 C)	110.1 – 147.8 (12C)	101.7 (1 C)	32.25 (1 C)
<i>NW-07</i>		199.9 (1 C)	187.9 (1 C)	148.1 (1 C)	115 a 139.6 (12C)	99.9 (1 C)	29.33 (1 C)

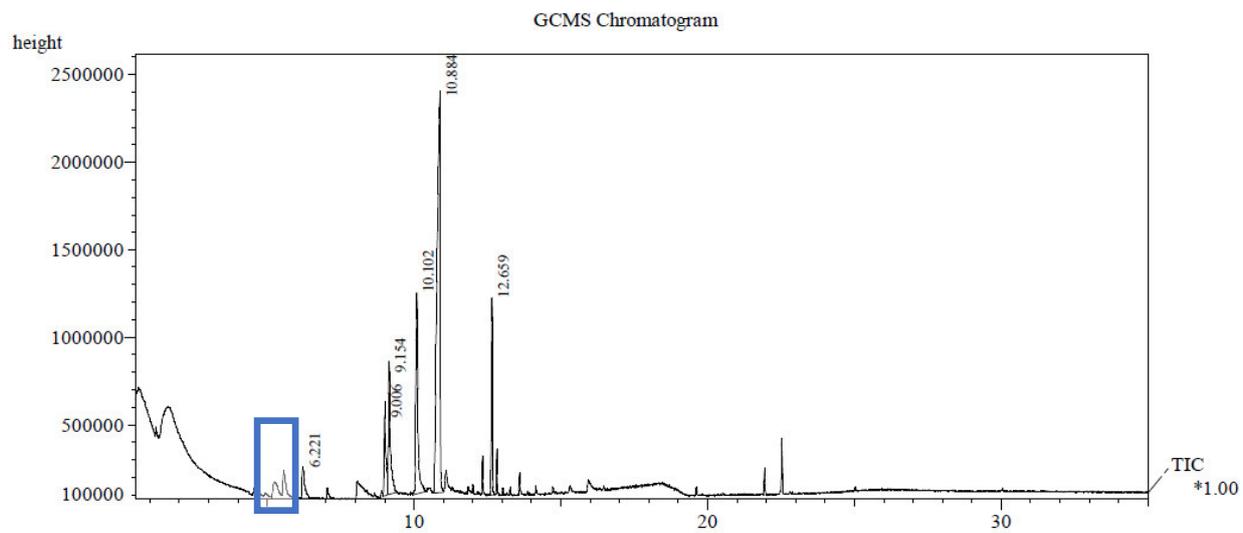
Tabela 14. Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  dos 2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)hidrazona0-3-feniltiazolidin-4-onas (NW)

<i>Código</i>	<b>R</b>	<b>C11</b>	<b>C9</b>	<b>C8</b>	<b>C Aromáticos</b>	<b>C1</b>	<b>C10</b>	<b>C(CH3)</b>
NW-11		171.8 (1 C)	164.2 (1 C)	157.4 (1 C)	105.6 a 149.7(12C)	101.6 (1 C)	32.3 (1 C)	-
NW-19		176.1(1 C)	149.5 (1 C)	157(1 C)	105.5 a 149.1 (12C)	101.1 (1 C)	32,2 (1 C)	-
NW-17		171 (1 C)	164 (1 C)	157.4 (1 C)	105.6 a 149.7 (12C)	101.6 (1 C)	32.3 (1 C)	-
NW-16		177.1 (1 C)	149.2 (1 C)	155 (1 C)	105.5 a 149.1 (12C)	101 (1 C)	45 (1 C)	-
NW-10		172.1 (1 C)	164.8 (1 C)	159.1 (1 C)	105.6 a 157.1 (12C)	101 (1 C)	32.3 (1 C)	55.3 (1 C)

### 5.3 A pirólise acoplada a cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa (GC-Pyr-MS)

Com base na análise dos resultados foi possível elencar algumas quebras possíveis de ligações nas moléculas de derivados tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas (Figura 28). A princípio as ligações mais polarizadas sofreram quebras mais rapidamente como mostram os resultados nas tabelas 14 a 19. Com os resultados obtidos foi possível caracterizar em todas as amostras o benzo-1,3-dioxol com pico de massa 121, a caracterização do fragmento reforça os dados já obtidos pela espectroscopia. Como é possível ver no pirograma abaixo o derivado NW06 no *real time* 5,6 apresenta um pico relativamente abundante no espectro de massa correspondente ao benzo-1,3-dioxol. Além disso, para cada derivado foi comprovado fragmentos característicos conforme as tabelas a seguir.

A tabela 14 mostra fragmentos de pirólise do NW-11 identificado como 2-benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylenehydrazono)-3-(4-chlorophenyl)thiazolidin-4-one a 600 °C. A degradação do derivado NW-11 corresponde a figura 28 e evidencia vários fragmentos de decomposição térmica que correlacionam com a análise dos parâmetros cinéticos referentes as diferentes frações de decomposição ( $\alpha$ ), evidenciando que a razão de aquecimento influencia diretamente na energia ativação e fator frequência, onde razão de aquecimento superior promove uma mudança no mecanismo cinéticos de decomposição, confirmado que a decomposição do NW-11 ocorre em quatro etapas com variação na ordem de reação. Os dados Pyr-MS do NW-11 m/z 373,02 mostram fragmentos gerados, no qual apenas dois fragmentos são característicos da estrutura química comprovados através da análise espectral, sendo o composto com tempo de retenção de 5,75 identificado como um radical correspondente ao benzodioxol m/z 121 ( $C_7H_5O_2^{\cdot}$ ) e um segundo sendo aromático p-cloro com tempo de retenção de 7,7 substituído m/z 125 correspondente a outro fragmento do derivado NW-11, através de uma possível quebra no anel 4-tiazolidinona. Os sinais encontrados mostram correlação com a estrutura do derivado e corroboram para caracterização do mesmo.



Line#1 R.Time:5.600(Scan#:613)  
MassPeaks:24 BasePeak:32.00(55346)  
RawMode:Single 5.600(613)  
BG Mode:None

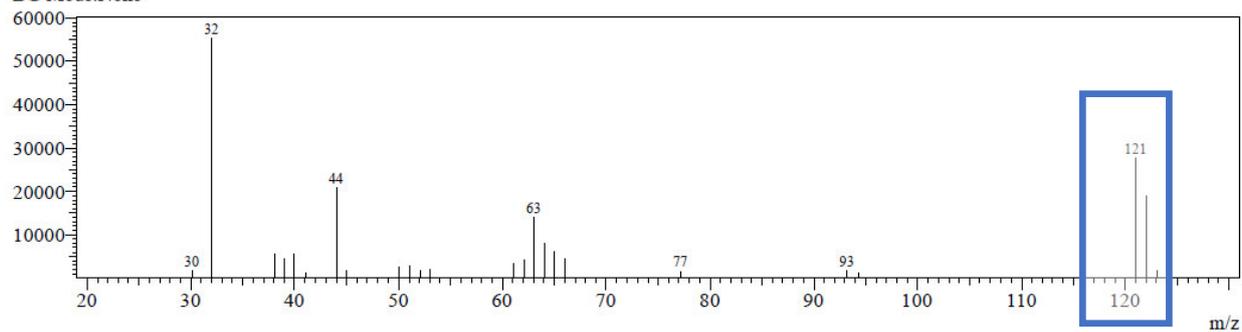


Figura 28. Pirograma do derivado NW06

Tabela 15. Fragmentos moleculares do derivado NW-11 com as respectivas massas

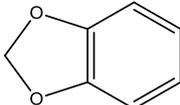
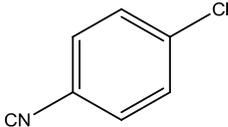
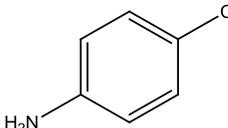
NW 11			
Real time	Fragmento	Formula Molecular	Massa
5.750		$C_6H_8O_2$	121
7.700		$C_7H_4ClN$	153
8.858		$C_6H_6ClN$	127

Tabela 16. Fragmentos moleculares do derivado NW-10 com as respectivas massas

NW 10			
Real time	Fragmento	Formula	Massa
Molecular			
8.975		$C_7H_9NO$	123
5.675		$C_6H_8O_2$	121

Tabela 17 . Fragmentos moleculares do derivado NW-09 com as respectivas massas

Real Time	Fragmento	Formula Molecular	Massa
NW 09			
5.63		$C_6H_8O_2$	121
9.08		$C_7H_9NO$	123
14.52		$C_{10}H_{10}$	178
12.9		$C_8H_7NOS$	165

Tabela 18. Fragmentos moleculares do derivado NW-03 com as respectivas massas

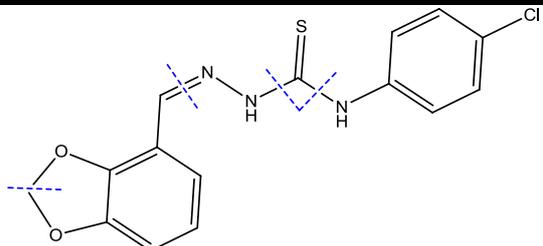
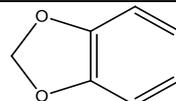
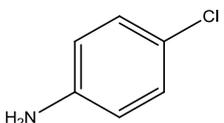
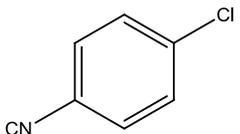
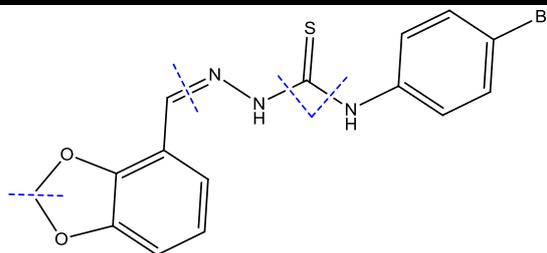
Real Time	Fragmento	Formula Molecular	Massa
NW 03			
			
5.63		$C_6H_8O_2$	121
8.78		$C_6H_6ClN$	127
7.133		$C_7H_4ClN$	137

Tabela 19. Fragmentos moleculares do derivado NW-04 com as respectivas massas

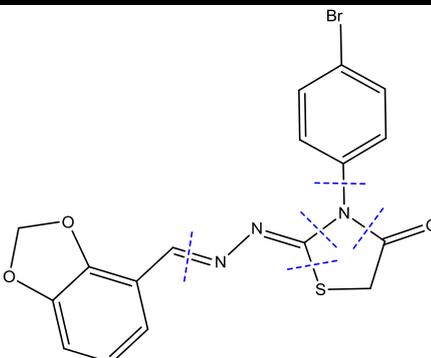
NW 04

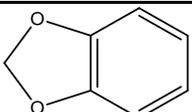
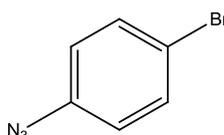
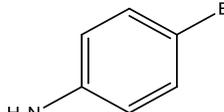


Real Time	Fragmento	Formula Molecular	Massa
10.17		$C_6H_6BrN$	170.
5.67		$C_6H_8O_2$	121

Tabela 20. Fragmentos moleculares do derivado NW-06 com as respectivas massas

NW 06



Real Time	Fragmento	Formula Molecular	Massa
5.60		$C_6H_8O_2$	121
9.08		$C_6H_4BrN_3$	197
10.17		$C_6H_6BrN$	173

#### 5.4. 3.2 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) and DSC *photovisual*

A curva DSC do NW-11 na razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  apresenta um pico endotérmico em aproximadamente  $247^{\circ}\text{C}$  com  $\Delta H_{\text{fus}} 133 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ , observou-se um único processo endotérmico no intervalo  $25\text{-}300^{\circ}\text{C}$ , correspondente ao processo de fusão do derivado, o qual apresenta alargamento devido à fusão seguida de decomposição. No intervalo  $303.94$  a  $318.35^{\circ}\text{C}$  há dois eventos endotérmicos consecutivos seguido de um exotérmico entre  $318.35$  a  $345.87^{\circ}\text{C}$  com uma elevada entalpia de decomposição evidenciada na TG (Fig 2).

A análise de DSC photovisual evidencia uma liberação de gás em  $304,37^{\circ}\text{C}$  a  $313,78^{\circ}\text{C}$ , comprovado por mudanças físicas características de processos exotérmicos da curva DSC, e acima disso há mudanças de coloração, caracterizando processo de degradação da mesma (Fig 29).

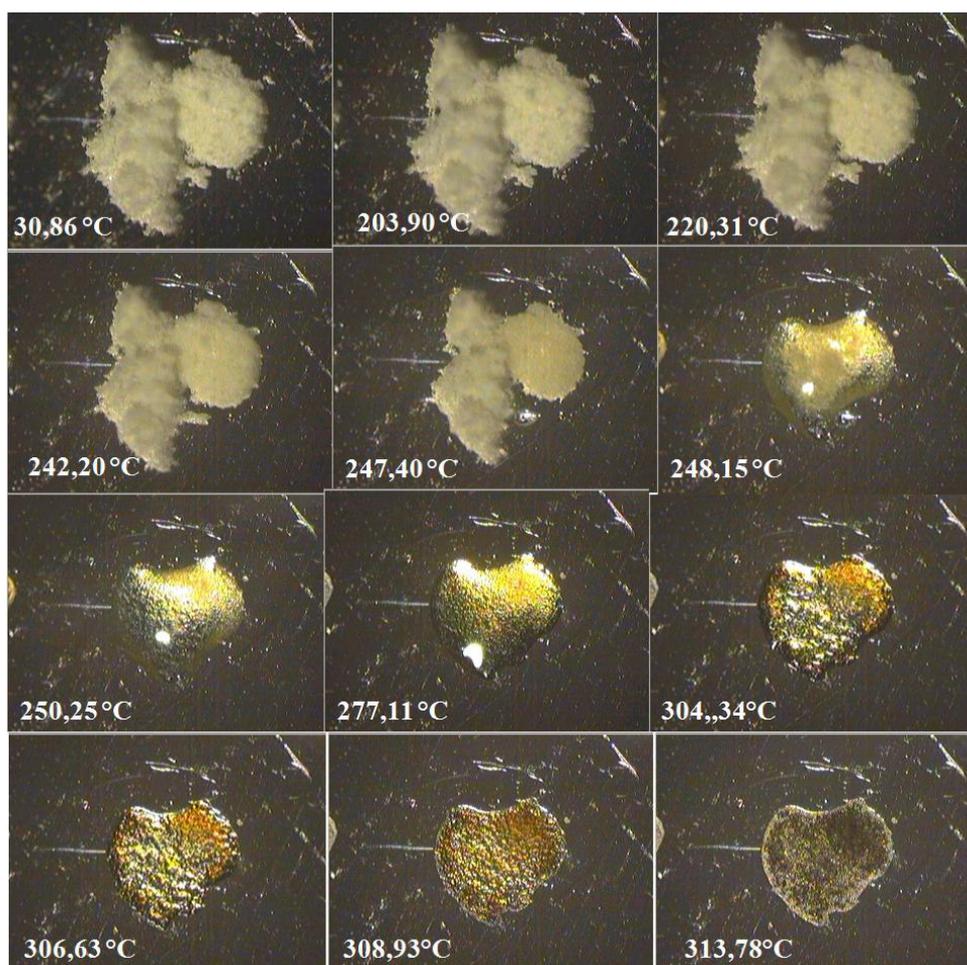


Figura 29. Resultado DSC do derivado NW-11

### 3.3 Termogravimetria (TG)

#### 3.3.1 Estudo dinâmico

A análise dos dados de TG nas diferentes razões de aquecimento estudadas, mostram que nas razões de aquecimento de 10 e 20° C.min<sup>-1</sup> pode ser verificado diferenças no comportamento térmico nas temperaturas *onset* e *endset* nas quatro etapas determinadas de perda de massa nas condições de atmosfera de ar e nitrogênio no intervalo de 25 a 900°C (Gráfico 4). As curvas termogravimétricas mostram mudanças no perfil de degradação do composto nas diferentes razões de aquecimento, principalmente na segunda e terceira etapa característico de reações paralelas observadas em maior razão, evidenciadas pelas variações nas perdas de massas. O aumento da razão de aquecimento também provocou um aumento do resíduo final do composto da ordem de 10,31; 13,60 e 19,56% para as razões de 10, 20 e 40°C.min<sup>-1</sup> respectivamente (tabela 20). As curvas de TG indicam uma perda de massa lenta e continua causada pela formação de carbono elementar a partir da decomposição, como consequência da ruptura do anel aromático (Krzyzak, 2015)

Tabela 21. resultados termoanalíticos para NW-11 com cristais obtidos de TG

ESTÁGIOS	Razões de Aquecimento (°C.min <sup>-1</sup> )			ESTÁGIOS	Razões de Aquecimento (°C.min <sup>-1</sup> )		
1ª estágio	RZ 10	RZ 20	RZ 40	3ª stage	RZ 10	RZ 20	RZ 40
T <sub>onset</sub> (°C) <sup>a</sup>	319.90	335.19	357.20	T <sub>onset</sub> (°C)	605.92	666.32	-
T <sub>endset</sub> (°C) <sup>a</sup>	352.17	367.32	386.66	T <sub>endset</sub> (°C)	651.50	705.65	-
Δm%	49.55	52.56	54.05	Δm%	12.04	13.78	-
2ª estágio				4ª stage			
T <sub>onset</sub> (°C) <sup>a</sup>	493.47	540.22	433.05	T <sub>onset</sub> (°C)	795.26	835.53	770.77
T <sub>endset</sub> (°C) <sup>a</sup>	533.76	562.45	738.11	T <sub>endset</sub> (°C)	-	-	-
Δm%	9.48	10.08	11.62	Δm%	15.30	7.47	12.60

%Δm = %mf-%mi representa a porcentagem de perda de massa

<sup>a</sup> Tstart/°C and Tend/°C referere-se a temperature inicial e final respectivamente

A realização de estudos cinéticos revela importantes informações sobre o mecanismo de decomposição e estabilidade, podendo ser obtido da análise de energia de ativação ( $E_a$ ), ordem de reação ( $n$ ) e o fator de pré-exponencial ( $A$ ).

A cinética de degradação térmica do NW-11 foi calculada usando o método de Ozawa na fração decomposta ( $\alpha$  0.1-0.9) (Tita, 2011; Macêdo 2002)

Os dados obtidos mostraram comportamento cinético de ordem zero para NW-11, energia de ativação correspondente a  $128 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  e um fator de frequência  $5,56 \cdot 10^{10} \text{ min}^{-1}$ .

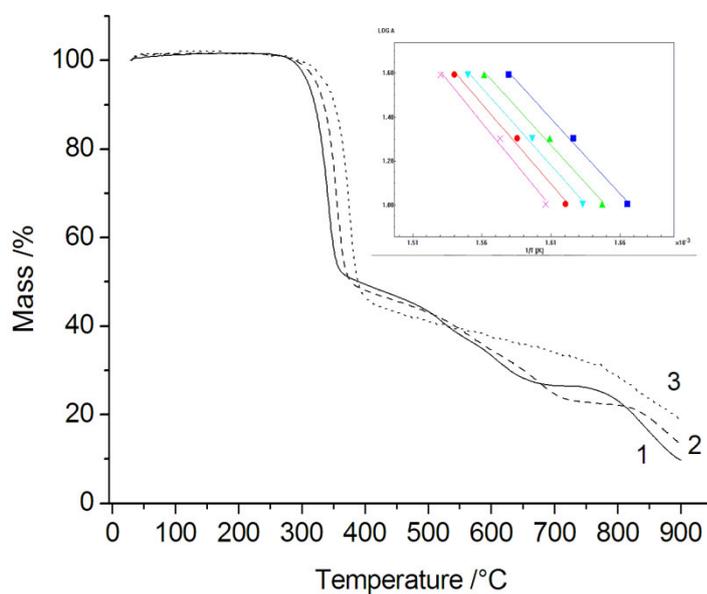


Gráfico 1. Curvas termogravimétricas dinâmicas da amostra NW-11 em diferentes taxas de aquecimento 1-1- 10,0, 2 - 20,0, e 3 - 40,0 °C min<sup>-1</sup> e taxa de aquecimento curvas logarítmicas (log A) função da temperatura (K-1).

## 5.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

### 5.5.1 .*SCREENING* ANTITUMORAL

Neste modelo, uma das formas de se inferir a porcentagem de crescimento é através da leitura espectrofotométrica da absorbância de proteínas celulares coradas com Sulforrodamina B (SRB), um corante aniônico de coloração rosa brilhante.

Esse corante é capaz de ligar-se às terminações básicas de aminoácidos protéicos de células vivas fixadas com ácido tricloroacético (TCA), sendo assim um ensaio independente do metabolismo celular e permitindo uma quantificação sensível de proteínas de modo linear com o número de células da cultura. O ensaio de SRB é consideravelmente rápido, simples e apresenta sensibilidade comparável àquelas das metodologias fluorescentes e superior aos ensaios que utilizam corantes visíveis, mesmo em baixas densidades celulares (1000 a 2500 células por compartimento) (Skehan et al, 1990).

Este ensaio permite avaliar a atividade antitumoral através da exposição de células tumorais humanas, em fase exponencial de crescimento, a diferentes concentrações da amostra e verificar se essa exposição induziu uma interrupção na taxa de crescimento sem morte celular (atividade citostática) ou se provocou a morte celular (atividade citocida). Para mensurar a atividade poderão ser calculadas três diferentes concentrações efetivas denominadas  $GI_{50}$  (do inglês *growth inhibition*, concentração necessária para interromper em 50% o crescimento celular), TGI (do inglês *total growth inhibition*, concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular) e  $LC_{50}$  (do inglês *lethal concentration*, concentração necessária para que ocorra 50% de morte celular) (Shoemaker, 2006).

O quimioterápico doxorrubicina foi empregado como controle positivo. Mais do que um padrão de comparação, o objetivo principal do uso desse controle foi de verificar se todas as linhagens empregadas mantinham o perfil de resposta ao quimioterápico. Isto porque com as sucessivas passagens necessárias para a manutenção da cultura de células, existe a possibilidade de mutação da linhagem em cultivo, e essa mutação poderia ser detectada pela mudança de resposta frente à doxorrubicina. Além disso, a fim de se minimizar a ocorrência de mutações, as linhagens só são perpetuadas por no máximo 16 passagens, quando então são substituídas por novas células da mesma linhagem, que estavam mantidas congeladas.

Todos os compostos apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens avaliadas, dentre eles o NW-03 foi o que mostrou maior potência sobre a inibição do crescimento de todas as linhagens, de acordo com os valores de  $GI_{50}$  ( $\mu M$ ) representados na Tabela 20.

Foram verificados efeitos antiproliferativos de quatorze novos derivados tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas frente a sete linhagens tumorais e a uma linhagem não tumoral, utilizando a doxorrubicina como padrão conforme pode ser visualizado na Tabela 20.

A tabela 21 mostra os resultados da avaliação antiproliferativa dos derivados 1,3-benzodioxol tiossemicarbazônicos e 4-tiazolidinônicos expressos em  $GI_{50}$  (concentração inibitória para inibir cinquenta por cento do crescimento celular). Dentre todos os compostos avaliados podemos destacar os derivados NW-03 e NW-04, os quais apresentaram valores de  $GI_{50}$  de 2,9 a 14,4  $\mu M$  e 7,2 a 12,3 respectivamente. O NW-03 possui o 1,3-benzodioxol, tiossemicarbazonas e um fenil p-clorosubstituído diretamente ligado a  $N_3$ , de maneira similar o derivado NW-04 diferencia do NW-03 apenas a substituição de um cloro por bromo, mantendo a característica de efeito retirador do substituinte (Figura 30).

Tabela 22: Valores de  $GI_{50}$  ( $\mu M$ ) para os derivados 1,3 benzodioxol-tiossemicarbazônicos

	<b>2*</b>	<b>A*</b>	<b>7*</b>	<b>4*</b>	<b>P*</b>	<b>O*</b>	<b>H*</b>	<b>K*</b>	<b>CaT#</b>
<b>NW-3</b>	8,1	5,7	6,8	14,4	9,5	2,9	8,8	-	10,4
<b>NW-4</b>	10,8	12,0	7,9	12,3	7,2	7,4	8,8	-	9,5
<b>NW-8</b>	28,0	>100	9,3	>100	33,7	9,5	44,2	-	>100
<b>NW-9</b>	>100	>100	75,3	>100	>100	26,2	>100	-	>100
<b>NW-14</b>	8,9	19,0	8,9	14,1	8,1	8,2	60,6	-	17,1
<b>NW-15</b>	83,6	82,0	20,9	79,4	81,5	73,6	19,4	-	71,5
<b>NW-17</b>	71,7	>100	>100	>100	>100	67,8	>100	-	>100
<b>NW-5</b>	75,6	50,1	35,3	66,4	>100	25,3	>100	>100	42,5
<b>NW-6</b>	11,4	10,2	11,4	23,3	31,0	10,1	15,2	47,1	10,0
<b>NW-10</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>NW-11</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>NW-13</b>	61,2	12,5	32,6	7,5	12,4	7,8	7,4	5,5	5,4

\*Linhagens celulares tumorais humanas: 2 (U251, glioma), A (NCI/ADR-res, ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 7 (786-0, rim), 4 (NCI-H460, pulmão tipo não pequenas células), P (PC-3, próstata), O (OVCAR-3, ovário), H (HT-29, cólon), K (K-562, leucemia). Linhagem celulares não-tumoral: Cat (HaCaT, queratinócito humano).

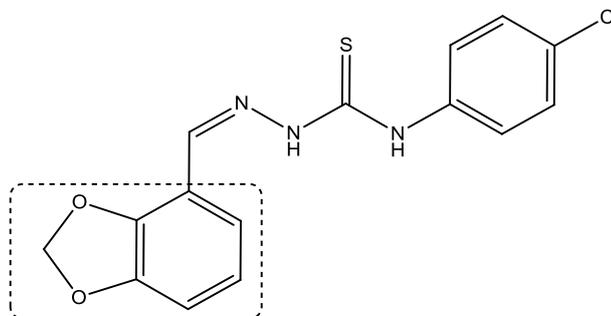


Figura 30. Estrutura química do derivado NW-03.

Os derivados NW-08 e NW-14 possuem também a substituição *p*-clorofenil e *p*-bromofenil respectivamente, no entanto, os derivados NW-03 e NW-04 possuem o grupamento 1,3-benzodioxol ligado a tiossemicarbazona através da posição 4, já os compostos NW-08 e NW-14 são ligados através da posição 5. A referida diferença entre o modo de ligação causou diferenças significativas na atividade citostática, onde o NW-08 e NW-14 apresentaram valores de GI<sub>50</sub> de 9,3 a >100 μM e 8,1 a 60,6 μM respectivamente. Haja vista as diferenças já citadas, o NW-08 mostrou um perfil seletivo para as linhagens 786-0 (rim) e OVCAR-3 (ovário) (Figura 31).

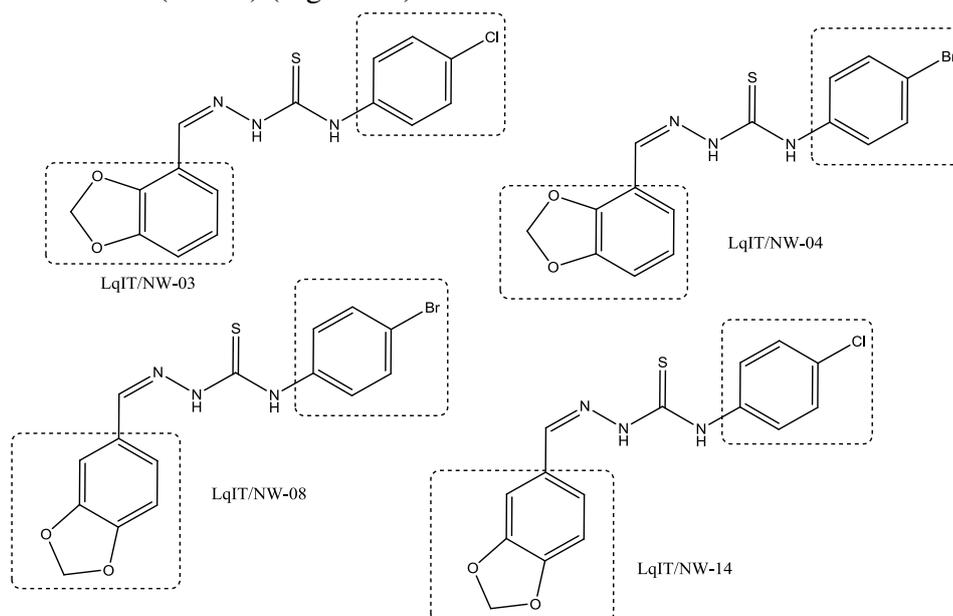


Figura 31. Similaridades e diferenças dos derivados NW-03, NW-04, NW-08 e NW-14.

Além dos referidos compostos, vale salientar o resultado do NW-13, o qual possui a substituição de um fenil por um naftil e mudança na substituição do anel benzodioxólico. Os valores de  $GI_{50}$  variam de 5,4 a 32,6. A referida atividade do NW-13 pode ser atribuída às alterações de hidrofobicidade da molécula em razão da aquisição de mais um anel aromático (Figura 32).

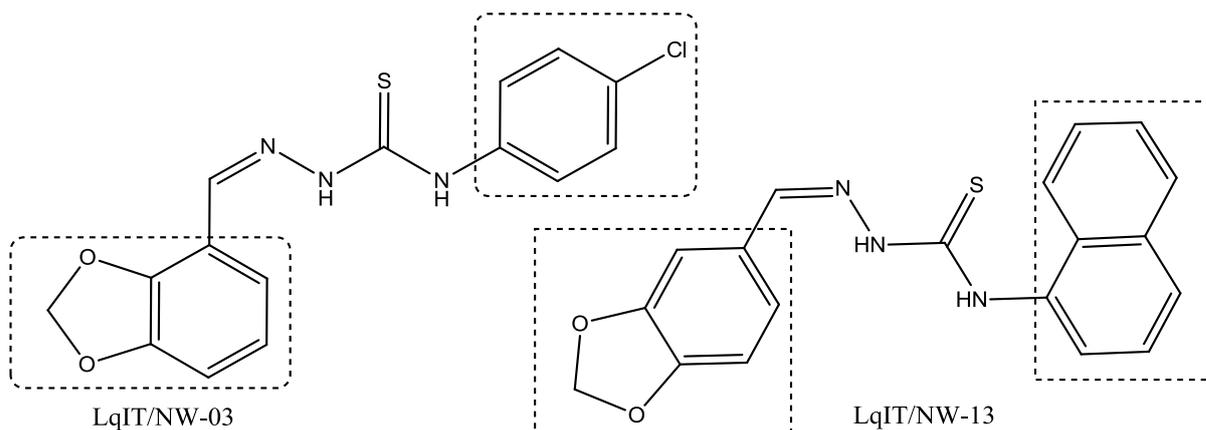


Figura 32. Derivados NW-03, NW-04 e NW-14,

Os derivados que sofreram a reação para a formação da 4-tiazolidinona (NW-05, NW-06, NW-11 e NW-17) tiveram diminuição na atividade antiproliferativa em relação às tiossemicarbazonas correspondentes. A formação do ciclo pentamérico compromete a formação de ligações de hidrogênio na molécula, além de alterar as propriedades físico-químicas (Figura 33).

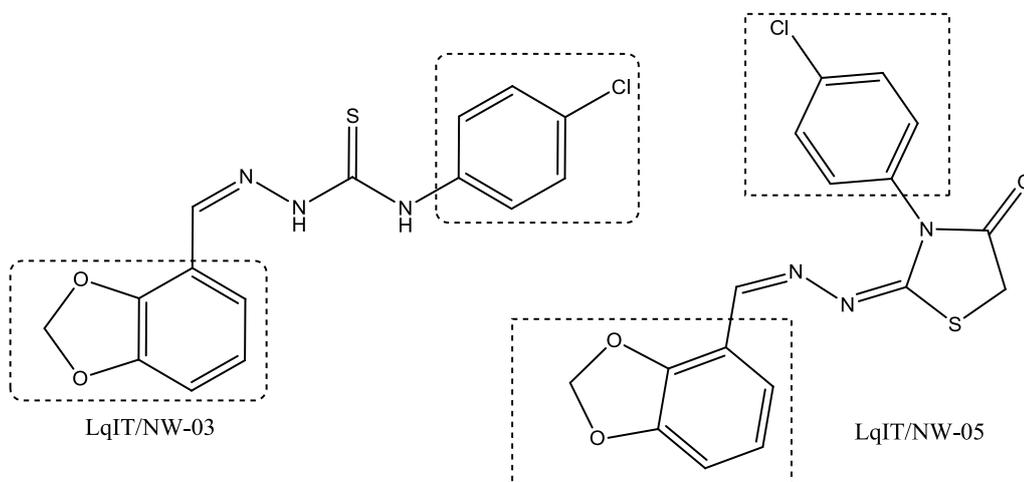


Figura 33. Similaridade dos derivados NW-03 e NW-05

No entanto, deve-se considerar que os derivados NW-05 e NW-06 revelaram melhores valores da inibição de crescimento celular, quando comparados com NW-11 e NW-17. Essas diferenças de atividades podem ser atribuídas à posição de ligação do grupamento 1,3-benzodioxol, onde NW-05 e NW-06 são ligados através da posição quatro e os demais, através da posição cinco deste grupamento. Esse dado fortalece a hipótese de que substituições realizadas a partir desta posição são responsáveis pelos melhores resultados na atividade antiproliferativa (Figura 34).

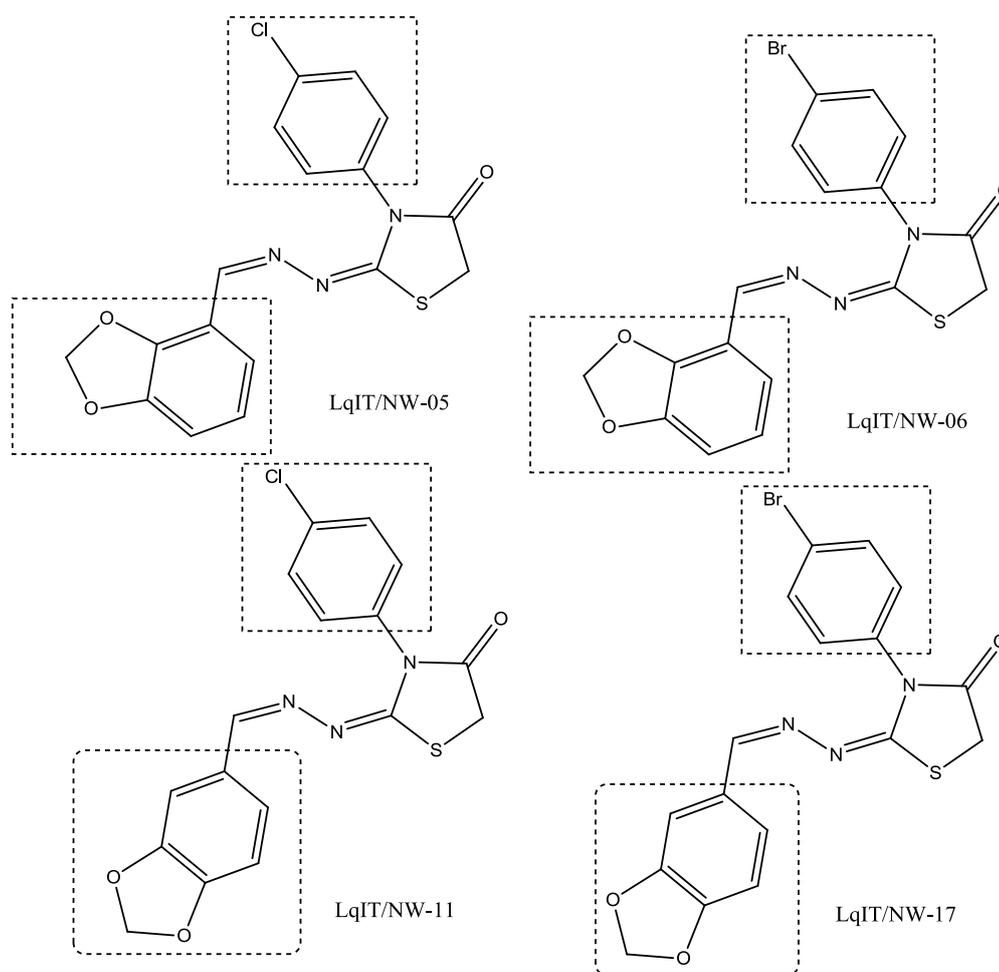


Figura 34. Similaridades dos derivados NW-05, NW-06, NW-11 e NW-03

Em uma análise comparativa foi possível observar as curvas concentração-resposta do NW-03 sobre linhagens celulares tumorais humanas, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da amostra teste utilizada. As curvas do gráfico 2 demonstraram que o extrato possui atividade antiproliferativa, concentração dependente,

efeito citostático e citocida sobre todas as linhagens celulares, quando comparado ao padrão (gráfico 1).

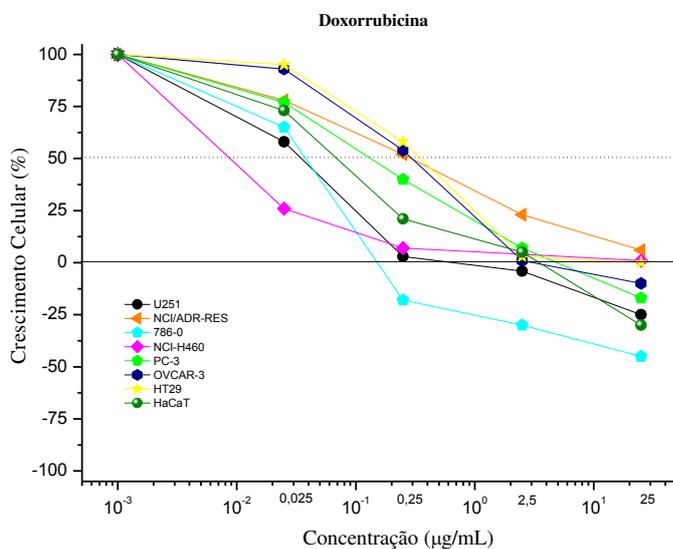


Gráfico 2. Perfil citostático da doxorrubicina.

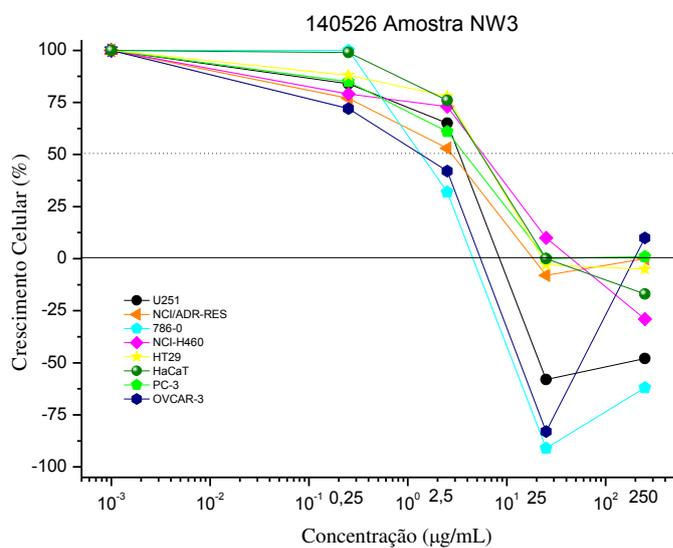


Gráfico 3. Perfil citostático da NW-03

### Atividade antiparasitária

A atividade antiparasitária e citotóxica dos compostos 1,3-benzodioxoles-tiossemicarbazonas e 1,3-benzodioxoles-tiazolidinonas estão resumidos na Tabela 22. Em geral, os compostos NW-03, NW-06 e NW-11 ( $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) foram encontrados por não ser tóxico em cultura de esplenócitos. Os outros derivados (NW-02, NW-14, NW-15, NW-16 e NW-09) provaram ser citotóxicos em células saudáveis, demonstrando baixos valores de  $CC_{50}$ . No entanto, estes dados preliminares *in vitro* de toxicidade não sugerem descartar definitivamente esses derivados, uma vez que a potência de um composto podem ser diferente de acordo com o alvo biológico em análise.

Tabela 23. Atividades tripanocida e leishmanicida de tiossemicarbazonas e tiazolidinonas derivados benzodioxol

Compostos	<i>Trypanosoma cruzi</i>		Citotoxicidade	IS	<i>Leishmania amazonensis</i>
	IC <sub>50</sub> (μM) epimastigota	IC <sub>50</sub> (μM) Trypomastigota	CC <sub>50</sub> (μM)		IC <sub>50</sub> (μM) promastigota
<b>NW-02</b>	4.67	1.57	3.35	2.13	1.09
<b>NW-03</b>	ND	17.59	>100	>5.68	ND
<b>NW-13</b>	1.48	3.89	28.62	7.35	5.35
<b>NW-14</b>	5.87	27.89	3.01	0.10	1.09
<b>NW-15</b>	4.45	2.02	3.34	1.65	1.57
<b>NW-16</b>	ND	0.79	3.05	3.86	ND
<b>NW-09</b>	ND	1.61	3.03	1.88	2.56
<b>NW-06</b>	3.4	48.99	>100	>2.04	ND
<b>NW-11</b>	ND	24.78	>100	>4.03	24.11
<b>BDZ</b>	6.6	6.2	96.1	15.5	-
<b>NFX</b>	5.7	2.7	3.5	1.29	-
<b>AMPH-B</b>	-	-	8.11	-	1.08

BDZ= benznidazol; NFX= nifurtimox. AMPH-B: amfotericina B. ND: significa não determinado, porque a falta de atividade nas concentrações testadas não permitiu calcular os valores de IC<sub>50</sub>. SI: índice de seletividade (esplenócitos  $CC_{50}$ ) / (tripomastigotas IC<sub>50</sub>).

Em relação à atividade tripanocida, o composto NW-13 (1-naftil) exibiu elevados níveis de atividade contra epimastigota e tripomastigota ( $IC_{50} = 1,48$  e  $3,89 \mu\text{M}$ , respectivamente). Os compostos NW-2 e NW-16 (fenil) também exibiram atividade antiparasitária significativa, com um valor de  $IC_{50}$  de  $4,67$  e  $4,45 \mu\text{M}$  (epimastigota) e  $1,57$  e

2,02  $\mu\text{M}$  (tripomastigota), respectivamente. A única diferença estrutural entre os dois é a forma como o tiossemicarbazona é inserido no núcleo de 1,3-benzodioxol (NW-2: posição 4 e NW-15: posição 5). Os compostos NW-16 (2-feniletil) e NW-09 (p-metoxi) exibiram atividade apenas contra a forma tripomastigota com um  $\text{IC}_{50}$  de 0,79 e 1,61  $\mu\text{M}$ , indicando a importância de um espaçador na atividade contra *T. cruzi*, tal como observado na obra de Guo (2015) (Guo et al, 2015), que inserido venilicos como o grupo espaçador é esperado uma atividade mais significativa.

Os compostos NW-03 e NW-14 (p-cloro) também diferem em relação à forma como o tiossemicarbazona é inserido no anel de benzodioxol. Os halogênios possuem a capacidade de aumentar a lipofilicidade da molécula, facilitando a interação com o alvo biológico (Hernandes et al, 2010). No entanto, a presença de um átomo de cloro na estrutura destas tiossemicarbazonas não parece ter produzido um aumento na atividade biológica. Estes compostos foram considerados inativos contra cepas de *T. cruzi*, com alta  $\text{IC}_{50}$ .

As tiazolidinas exibem uma gama ampla de atividade biológica, incluindo o antimicrobiana (Singh et al, 2012), anticonvulsivante (Nikalje et al, 2015), anticancer (Lafayette et al, 2013) e propriedades antiparasitárias (Moreira et al, 2013). O anel 4-tiazolidinona foi um outro fator determinante para os resultados obtidos, como pode ser observado uma ausência de atividade de derivados de NW-06 e NW-11 ( $\text{IC}_{50} = 48,99$  e  $24,78 \mu\text{M}$ ), respectivamente, contra a forma tripomastigota. Todos os compostos avaliados neste estudo, com a exceção do derivado NW-14, mostrou-se mais seletivo para forma tripomastigota de *T. cruzi* em comparação com os esplenócitos.

A atividade contra a *Leishmania* de derivados de 1,3-benzodioxole apresentou um resultado promissor para o composto NW-14, com um  $\text{IC}_{50}$  de 1,09  $\mu\text{M}$ . Tal como acontece com atividade tripanocida, os compostos NW-2 e NW-15 exibiu um bom valor  $\text{CI}_{50}$  contra *Leishmania* ( $\text{CI}_{50} = 1,07$  e  $1,57 \mu\text{M}$ , respectivamente), indicando a importância do núcleo não-aromático substituído em tiossemicarbazonas no aumento da atividade antiparasitária (Santiago et al, 2014). Compostos NW-09 e MW-13 exibiu uma atividade moderada contra a *Leishmania*, com uma  $\text{IC}_{50}$  de 5,35 e 2,56  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Composto NW-11 exibiu um  $\text{IC}_{50}$  de 24,1  $\mu\text{M}$  contra a forma de promastigotas de *Leishmania*. Este tiazolidinona também foi demonstrado ser inativo contra o parasita, como encontrado no caso de *T. cruzi*, indicando a importância da porção de tiossemicarbazona na atividade antiparasitários, como também foi encontrado em estudos das propriedades esquistossomicida de tiossemicarbazonas (Santiago et al, 2014).

## Docking

Os estudos de docking foram realizados a fim de elucidar o modo de ligação de moléculas NW-02 e NW-09 (os únicos com valores conhecidos  $IC_{50}$ ), como inibidores de cruzafina, corroborando os dados *in vitro* (inibição cruzafina) para estes compostos. O modo de ligação para estes ligantes foi determinado pela pontuação mais alta (mais positivo) de encaixe entre as soluções possíveis para cada ligante. Estes cálculos foram gerados de acordo com a função de pontuação Goldscore.

A fim de estabelecer as razões moleculares para os baixos valores de  $IC_{50}$  (inibição) ou alta para NW-02 (0,49  $\mu$ M) e NW-09 (0,07  $\mu$ M), uma análise pormenorizada das interações intermoleculares com o alvo cruzafina, foi realizada para as soluções de acoplamento obtidos. Estes dois compostos são bastante semelhantes entre si, diferindo apenas pela presença de um grupo p-metoxi ligados ao anel fenil para NW-09, e a posição de substituição para o sistema 1,3-benzodioxol (posição 4 por 3a e posição 5 para 3 g). Os resultados comparativos com as melhores posições de encaixe podem ser encontrados na figura 35.

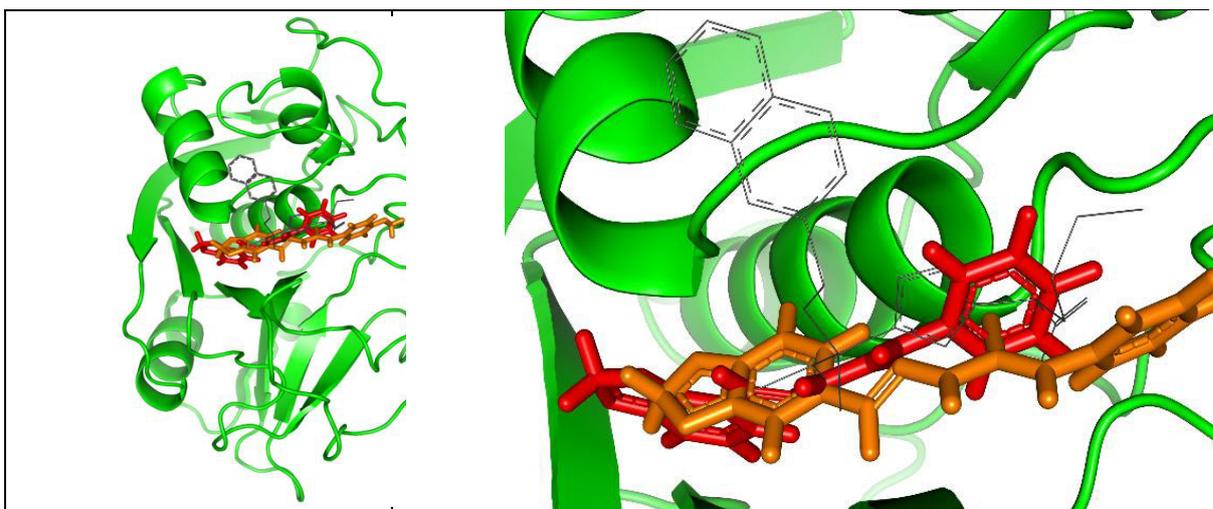


Figura 35: A superposição de docking para compostos que inibem a cruzafina NW-02 (vermelho) e NW-09 (laranja) ligado a cruzafina (verde), e a estrutura cristalográfica da "KB2" co-cristalizadas.

A diferença entre os modos de ligação destas duas moléculas é mostrado em detalhe na figura 36. Apesar do grande número de contatos hidrofóbicos encontrados para a molécula NW-02, a presença de duas ligações de hidrogênio para a molécula NW-09 parece ser a principal responsável pela maior estabilidade do complexo formado entre o composto NW-09

e o alvo cruzaina. As ligações de hidrogênio com os resíduos ASP161 (2,6 Å) e MET68 (3,0 Å) são responsáveis pela diferença entre os escores de encaixe entre os complexos com NW-2 (Pontuação: 51,27) e NW-09 (Pontuação: 53,25). Este resultado *in silico* parece corroborar bem com os valores de  $IC_{50}$  *in vitro* para a inibição cruzaina usando estes dois compostos, porque a molécula NW-09, que é sete vezes mais potentes (0,07  $\mu$ M contra 0,49 mM), em seguida, NW-2, também foi identificado com o mais alto em afinidade de silício (53,25 contra 51,27) para cruzaina, e isto está relacionado com duas ligações de hidrogênio estáveis que a molécula NW-09 estabelece com o alvo cruzaina.

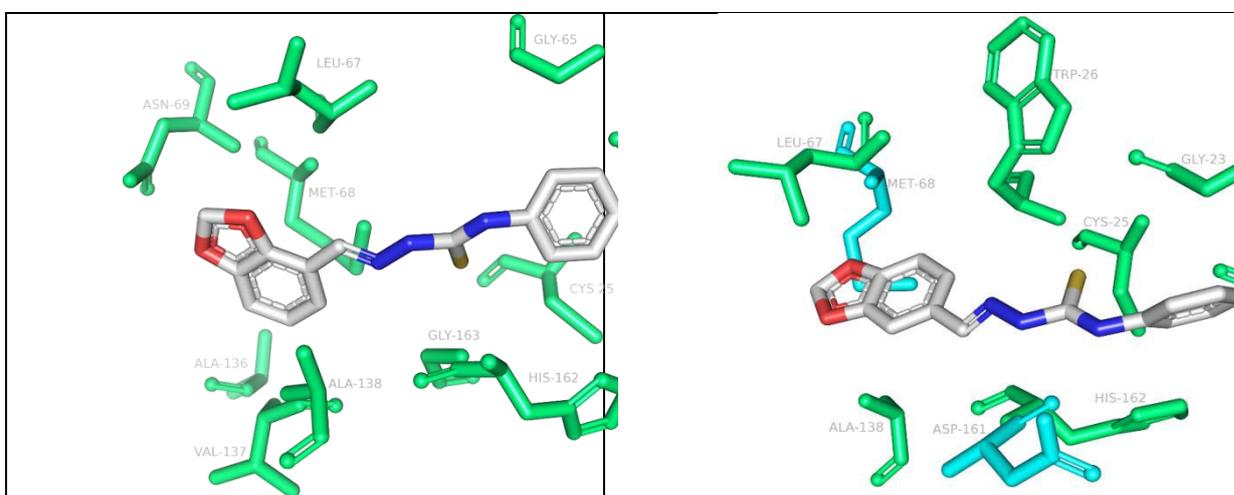


Figura 36: Vista detalhada das soluções de encaixe para o composto NW-2 (lado esquerdo) e NW-09 (lado direito). resíduos do cruzaina formando hidrofóbicas Contatos são coloridos em verde, enquanto os resíduos que formam ligações de hidrogênio são coloridos em azul.

Tabela 24: As interações intermoleculares observada após o cálculo de docking. HC significa "interações hidrofóbicas" e os números são as distâncias ligações de hidrogênio, em Angstroms.

Resíduos	Compostos	
	NW-02	NW-09
<b>GLN19</b>	-	HC
<b>GLY23</b>	HC	HC
<b>CYS25</b>	HC	HC
<b>TRP26</b>	-	HC
<b>SER61</b>	-	-
<b>GLY65</b>	HC	-
<b>GLY66</b>	-	-
<b>LEU67</b>	HC	HC
<b>MET68</b>	HC	3.0
<b>ASN69</b>	HC	-
<b>ALA138</b>	HC	HC
<b>ALA136</b>	HC	-
<b>VAL137</b>	HC	-
<b>LEU160</b>	-	-
<b>ASP161</b>	-	2.6
<b>HIS162</b>	HC	HC
<b>GLY163</b>	HC	-
<b>TRP184</b>	-	-
<b>GLU208</b>	-	-
<b>Goldscore</b>	<b>51.27</b>	<b>3.25</b>

### Titulação RMN 1H

O composto NW03 foi caracterizado e sua estrutura, juntamente com os átomos de hidrogênios, foi elucidada conforme figura 37.

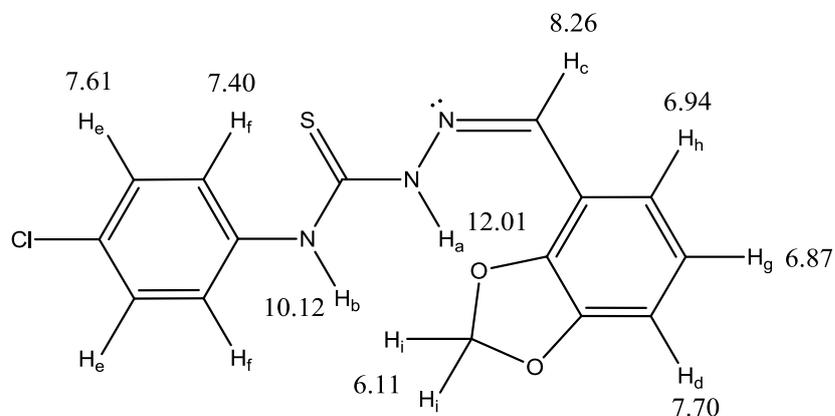


Figura 37. Estrutura química do composto 2-(benzo[d][1,3]dioxol-4-ylmethylene)-N-(4-chlorophenyl)-thiosemicarbazone (NW03) e seus deslocamentos químicos (ppm) para os átomos de H.

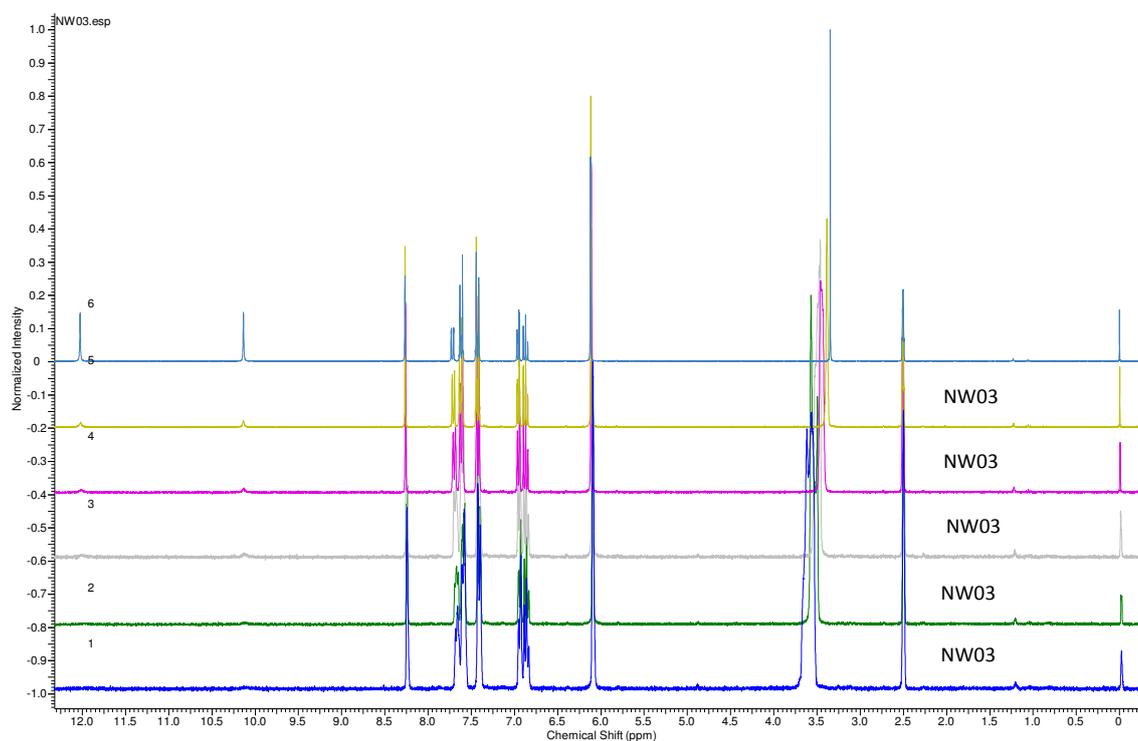


Figura 38 – Espectros sobrepostos do composto NW-03 na ausência e na presença da tirosinase em diferentes volumes.

A interação entre o composto NW03 e a tirosinase foi observada através de titulação de RMN 1H em DMSO-d<sub>6</sub>, conforme figura.39. Com adição de 10 µL da tirosinase (Tyr) ao composto, verificou-se a redução brusca de intensidade dos sinais de 10.14 e 12.03 ppm correspondentes aos hidrogênios Ha e Hb respectivamente. Com adição de 20 µL da enzima, os sinais anteriormente mencionados praticamente desaparecem. Os sinais relativos aos hidrogênios de aromáticos Hd, He e Hf sofreram deslocamento com o aumento da concentração de tirosinase e também evidenciam forte tendência a sobreposição de sinais (Tabela 23).

Quanto ao desaparecimento de sinais de NH há indícios de formação de um complexo com Cu<sup>+2</sup>, com formação de um tautômero pela transferência de um hidrogênio para enxofre.

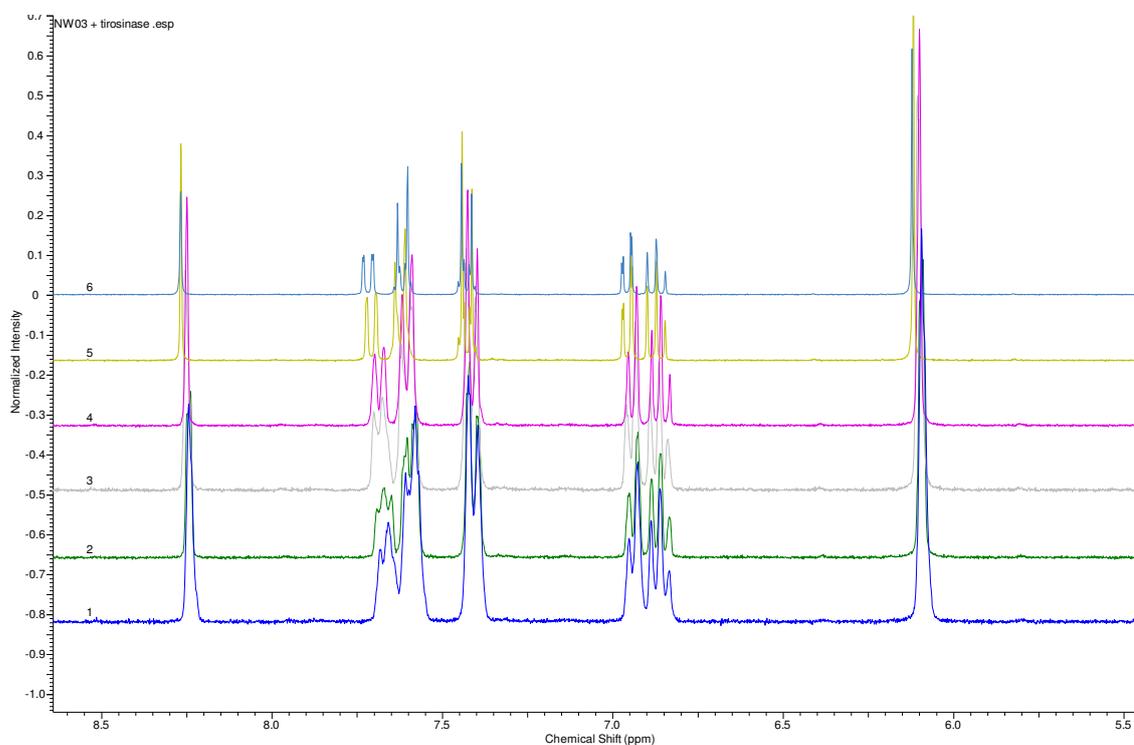


Figura 39 – Espectros sobrepostos do composto NW-03 (região de Cromáticos) na ausência e na presença da tirosinase em diferentes volumes.

<b>Molariade</b>	<b>H<sub>b</sub>, H<sub>a</sub> (NH-)</b>	<b>H<sub>c</sub>-HC=(s)</b>	<b>H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub> (Ph)</b>	<b>H<sub>g</sub>, H<sub>h</sub> e H<sub>d</sub> (Ar)</b>	<b>H<sub>i</sub> (OCH<sub>2</sub>O)</b>
<b>Tyrosinas</b>					
NW-03	1 H (s) 12.01 1 H (s) 10.12	1 H (s) 8.26	2 H (d) 7.60 2 H (d) 7.41	2 H(d) 7.70 1 H (t) 6.86	2 H (s) 6.12
NW-03 +Tyr 10 μL	1 H (s) 12.03 Δ= + 0,02 1 H (s) 10.14 Δ= + 0,02	1 H (s) 8.25 Δ= - 0,01	2 H (d) 7.60 2 H (d) 7.41	2 H(d) 7.70 1 H (t) 6.87 Δ= - 0,01	2 H (s) 6.12
NW-03 +Tyr 20 μL	-	1 H (s) 8.26	2 H (d) 7.62 Δ= + 0,02 2 H (d) 7.40 Δ= - 0,01	2 H(d) 7.70 1 H (t) 6.83 Δ= - 0,03	2 H (s) 6.10 Δ= - 0,02
NW-03 +Tyr 30 μL	-	1 H (s) 8.24 Δ= - 0,02	2 H (d) 7.62 Δ= + 0,02 2 H (d) 7.40 Δ= - 0,01	2 H(d) 7.70 1 H (t) 6.84 Δ= - 0,02	2 H (s) 6.11 Δ= - 0,01
NW-03 +Tyr 40 μL	-	1 H (s) 8.24 Δ= - 0,02	2 H (d) 7.60 2 H (d) 7.40 Δ= - 0,01	2 H(d) 7.69 Δ= - 0,01 1 H (t) 6.83 Δ= - 0,03	2 H (s) 6.09 Δ= - 0,03
NW-03 +Tyr 50	-	1 H (s) 8.24 Δ= - 0,02	2 H (d) 7.61 2 H (d) 7.40	2 H(d) 7.68 1 H (t) 6.84	2 H (s) 6.09 Δ= - 0,03

$\mu\text{L}$   
deslocamentos químicos do derivado NW-3 na presença de tirosinase.

Tabela 25. Variação de

## **Espectroscopia de fluorescência e absorção**

Para explorar o mecanismo de as interações diretas entre os inibidores e os íons de cobre foram avaliadas espectrofotometria de UV em PBS. O efeito do aumento da fração molar de  $\text{CuSO}_4$  sobre as características espectrais do composto NW-03 é medido em termos de desvio para o vermelho / azul, como resultado da formação de complexos entre os íons de cobre e o composto testado.

Como mostrado na gráfico 4 (a), o comprimento de onda máximo a 338 nm do composto foi deslocado após a adição de 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . A absorbância a 280 nm foi então gravados em diferentes frações molares do composto NW-03 na Fig. 5 (B). Como é possível visualizar no gráfico com o aumento da fração molar de íons cobre há redução da intensidade de absorção do derivado NW-03, o dado obtido reforça a hipótese de formação de complexo de coordenação entre o derivado e os íons. O cobre é essencial para a atividade catalítica de tirosinases. A estrutura cristalizada destas enzimas demonstrou a presença de dois íons de cobre na núcleo catalítico, essenciais para a atividade, uma vez formado o complexo na região do sítio ativo haverá uma redução de atividade ou inativação da proteína (Greta Faccio 2012).

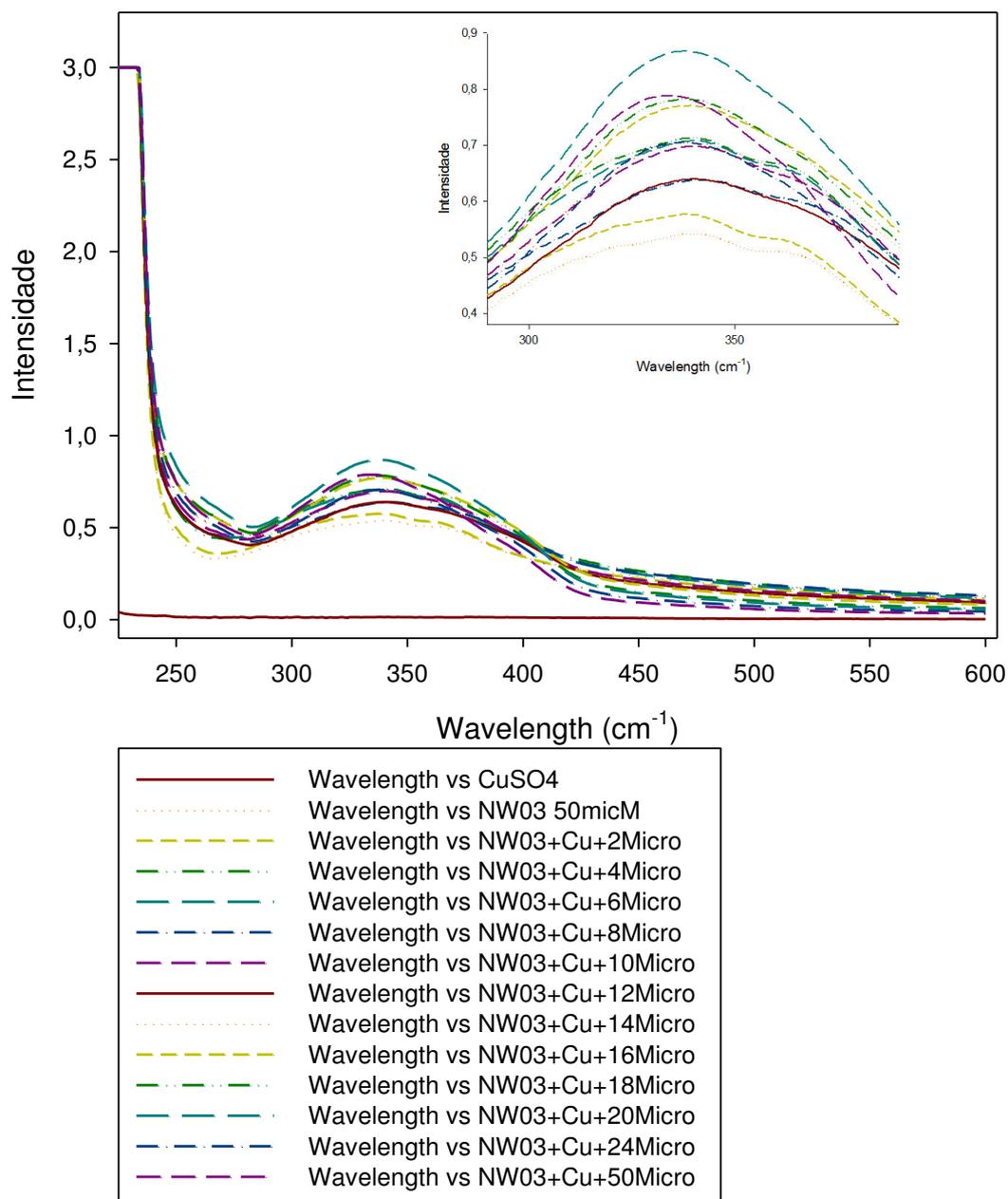


Gráfico 3: Espectro de absorção composto NW-03 interagindo com Cu<sup>+2</sup>

Os dados obtidos pelo espectro de absorção corroboram com os dados obtidos através do RMN <sup>1</sup>H, confirmando a interação entre o derivado NW-03 e tirosinase. Com adição gradual do ligante houve diminuição da banda de absorção e deslocamento do pico de absorção da tirosinase.

Foi analisado também através de espectroscopia de emissão de tirosinase  $7,054901 \times 10^{-5}$  M, na ausência e na presença do composto NW-03 em diferentes frações molares do composto. Obteve-se o comprimento de onda de emissão de fluorescência de tirosinase a 280 nm, devido à presença de fluoróforo de resíduo de aminoácido, tais como triptofano, onde foi observado diminuição significativa da intensidade de fluorescência da tirosinase com aumento de frações molares do composto NW-03 com redução mais significativa com adição de 80  $\mu\text{L}$  da solução de NW-03 de concentração  $4,5040 \times 10^{-5}$ .

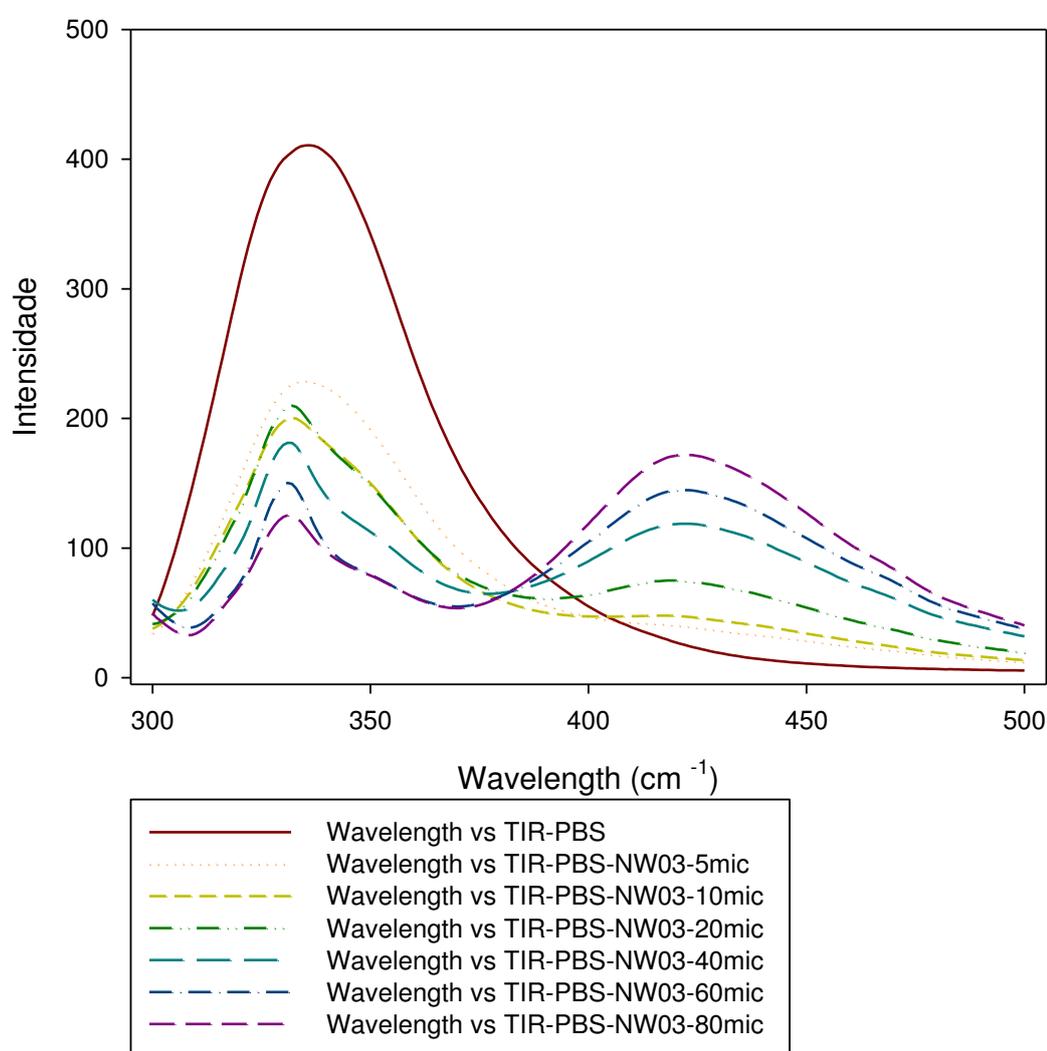


Gráfico 4: Espectro de emissão de tirosinase na presença de diferentes frações.

Com análise de RMN  $^1\text{H}$  foi possível observar variações significativas na formação do complexo entre o composto NW-03 a 1 mM e  $\text{CuSO}_4$  a 50  $\mu\text{M}$  em DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$ . Como esperado o desaparecimento de bandas de NH e alterações de deslocamentos químicos nos respectivos hidrogênios da molécula, como se pode visualizar na figura 40. A análise espectroscópica de RMN  $^1\text{H}$  corrobora para os dados espectrofotométricos já obtidos.

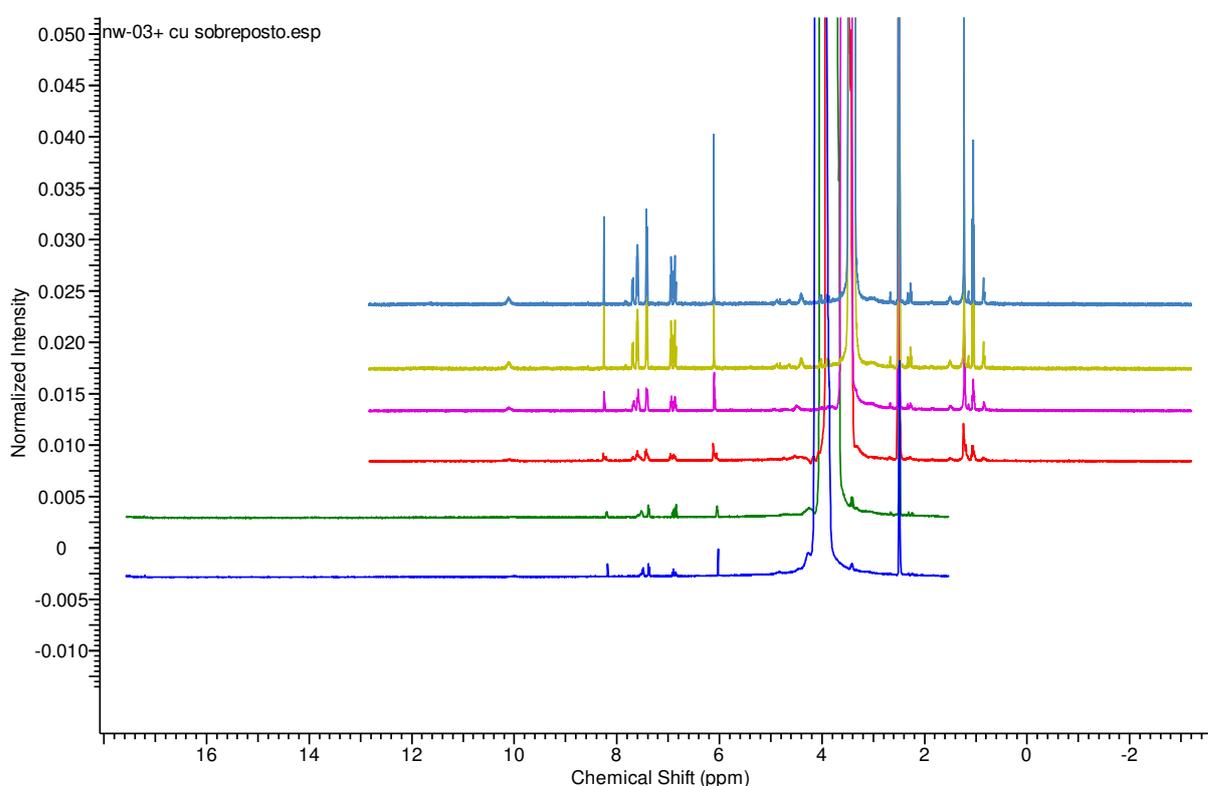


Figura 40. Sobreposição de espectros de NW-03 1mM, NW-03 com adição de 10  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Cu}^{+2}$ , NW-03 com adição de 20  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Cu}^{+2}$ , NW-03 com adição de 30  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Cu}^{+2}$ , NW-03 com adição de 40  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Cu}^{+2}$ , NW-03 com adição de 50  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Cu}^{+2}$



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

- ✓ Neste trabalho, foram sintetizadas dezessete substâncias pertencentes à classe das tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas, todas apresentando como substituintes em comum o anel benzoindoxólico;
- ✓ Entre as diferenças estruturais foi possível observar que a síntese do anel 4-tiazolidinona não foi determinante da ação antiproliferativa e antiparasitária. A formação do anel tiazolidinico não ocasionou aumento da atividade dos compostos testados, sendo a mudança nos grupos substituintes da posição N(4) mais efetiva no aumento da atividade.
- ✓ Os compostos foram sintetizados através de eficientes metodologias de síntese e purificação, apresentando rendimentos entre 35-75 %. Todos foram caracterizados através de suas propriedades físico-químicas, bem como por métodos espectroscópicos convencionais (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ). Os espectros de RMN apresentaram-se todos os pré-requisitos com as para as caracterizações estruturais.
- ✓ Os compostos foram caracterizados por pirólise acoplado ao espectrômetro de massa. As análises corroboraram para a caracterização dos compostos, uma vez que todos os compostos apresentaram fragmentos característicos com as respectivas massas.
- ✓ A partir dos resultados obtidos através da avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa foi possível concluir que dentre todos derivados benzoindoxólicos testados, o NW-03 pode ser apontado como promissor no estudo para atividade antitumoral.
- ✓ Com os resultados antiparasitários foi possível eleger os derivados NW-02 e NW-09 como potenciais tripanocidas.

- ✓ Foi realizado a análise térmica do derivado NW-11 por meio de TG, DSC e a obtenção da cinética de degradação do derivado;



## 7. Referências Bibliográficas

Abbadly, M. A.; Hafez, S. H. A.; Kandeel, M. M.; Monem, M. I. A. Syntheses of New Unsymmetrical and Symmetrical Diaryl-sulphides and Diarylsulphones Containing Thiazoliny and Thiazolidinonyl Moieties Using 4,4'-Diacetyldiphenylsulphide. *Molecules*, v. 8, p. 622-641, 2003.

ALTINTAS, H. et al. Synthesis of Mannich bases of some 2,5-disubstituted 4-thiazolidinones and evaluation of their antimicrobial activities. *Turkish Journal of Chemistry*, v. 29, n. 4, p. 425-435, 2005

Alves, A. J.; Leite, A. C. L.; Santana, D. P.; Beltrão, T. M.; Coelho, M. R. D. Synthesis of 2-Thiazolinone as Potential Antiprotozoal Activity. *II FÁRMACO*, v. 48, p. 1167, 1993.

ANDRES, C. J. et al. 4-thiazolidinones: Novel inhibitors of the bacterial enzyme MurB. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 10, n. 8, p. 715-717, 2000.

AQUINO, T. M. et al. Synthesis, anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones and 2-[(phenylmethylene)hydrazono]-4-oxo-3-phenyl-5-thiazolidineacetic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 1, p. 446-56, 2008.

Araújo J. D.; Polarização epidemiológica no Brasil; *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 21(4):533-538, 2012.

Azam F, Mehta S., Harris L. A.; Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER*; v. 46; p. 1323-1332; 2010.

Balzarini, J. et al. Synthesis and anti-HIV studies of 2-adamantyl-substituted thiazolidin-4-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, n. 7, p. 993-1003, 2007.

Barreca, M. L. et al. Discovery of 2,3-diaryl-1,3-thiazolidin-4-ones as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, n. 13, p. 1793-1796, 2001.

Behr, T. M. *et al.* High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of  $^{213}\text{Bi}$ -versus  $^{90}\text{Y}$ -labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. *Cancer Res.* **59**, 2635–2643 1999.

Beraldo H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 3, 461-471, 2004

Berseneva, V. S. et al. Synthesis of novel thiazolidin-4-ones by reaction of malonothioamide derivatives with dimethyl acetylenedicarboxylate. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, n.1, v.14, p. 2133-2136, 1998.

Bombardieri, C. C.; Taurins, A. The mannich condensation of compounds containing acidic imino groups. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, v. 33, n. 5, p. 923-928, 1955.

Bozdag-duendar, O. et al. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine-2,4-dione derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 18, p. 6012-6017, 2007.

CAMPAIGNE, E. et al. Benzo(b)thiophene derivatives. mannich bases with antimicrobial activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 136-7, 1965.

Carey, F. A.; Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms*. 5a ed. New York, ed. Springer, 1199 p., 2007.

Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* 6, 1521–1533.

Costa leite, L. F. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, n. 10, p. 1263-71, 2007

Costa, P.; Pili, R.; Pinheiro, S.; Vasconcellos, M. *Substâncias Carboniladas e seus Derivados*. 1a ed. Porto Alegre, ed. Bookman, 411, 2003.

Cunha S., et al. Tiossemicarbazonas: Aspectos Estruturais, Farmacológicos e Sintéticos. *Revista Processos Químicos* Jan / Jun de 2011 p. 50-55.

DANDIA, A. et al. Efficient microwave enhanced regioselective synthesis of a series of benzimidazolyl/triazolyl spiro indole-thiazohdinones as potent antifungal agents and crystal structure of spiro 3H-indole-3,2'-thiazolidine-3'-(1,2,4-triazol-3-yl)-2,4'-(1H)-dione. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 7, p. 2409-2417, 2006.

Debdab M., Renault S., Lozach O., Meijer L., L. Paquin L., Carreaux F., Bazureau J. Synthesis and preliminary biological evaluation of new derivatives of the marine alkaloid leucettamine B as kinase inhibitors; *European Journal of Medicinal Chemistry*; v. 45; p. 805–810; 2010.

Ding Y., Wang Y., Zhou J., Gu X., Wang W., Liu C., Bao X., Wang C., Li Y., Zhang Q.; Direct cytosolic siRNA delivery by reconstituted high density lipoprotein for target-specific therapy of tumor angiogenesis. *Biomaterials*; v. 35; p. 7214 a 7227; 2014;

Estecha, A., Sanchez-Martín, L., Puig-Kroger, A., Bartolomé, R.A., Teixido, J., Samaniego, R., and Sánchez-Mateos, P. Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion. *J. Cell Sci.* 122, 3492–3501. 2009.

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. & Adjei, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin.* 55, 178–194 (2005).

GHOOGARE, J. G. et al. Design, synthesis and pharmacological screening of potential anticonvulsant agents using hybrid approach. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 3, p. 857-863, 2010.

GHOOGARE, J. G. et al. Design, synthesis and pharmacological screening of potential anticonvulsant agents using hybrid approach. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 3, p. 857-863, 2010.

Godbole A. A., Ahmed W., Bhat S. R., Bradley K. E., Ekins S., Nagaraja V.; Inhibition of Mycobacterium tuberculosis topoisomerase I by m-AMSA, a eukaryotic type II topoisomerase poison. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 446. p 916–920. 2014.

Gonzaga C. M.R.; Disparities in female breast cancer mortality rates between urban centers and rural areas of Brazil: Ecological time-series study. *The Breast* 23 180e187. 2014.

Gouveia, F. L. et al. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 5, p. 2038-2043, 2009.

Gürsoy, A.; Terzioglu, N.; Ötük, G. Synthesis of Some New Hydrazidehydrazones, Thiosemicarbazides and Thiazolidinones as Possible

Antimicrobials. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 32, p. 753-757, 1997.

Hanahan D.; Weinberg R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, March 4, 2011. 646-674.

INCA 2014, Instituto Nacional de Câncer, Estimativa; <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>; 21/08/ 2014.

Ishiguro K., Lin P. Z., Penketh G. P., Shyam K., Zhu R., Baumann P. R., Zhu Y., Sartorelli C. A., Rutherford J. T., Ratner S. E., Distinct mechanisms of cell-kill by triapine and its terminally dimethylated derivative Dp44mT due to a loss or gain of activity of their copper(II) complexes; *Biochemical Pharmacology*. v. 91312–322; 2014

Johnson, M. R. et al. Synthesis of beta-lactams by the photochemical extrusion of sulfur-dioxide from 1,1-dioxo-4-thiazolidinones. *Journal of Organic Chemistry*, v. 48, n. 4, p. 494-499, 1983.

Jolly, V. S.; Sharma, K. P. Studies on Aryl Thiosemicarbazones and 2-Oxothiazolin-2-yl Hydrazones. *Journal of Indian Chemical Society*, v. 67, p. 412-413, 1990.

Jubb, A. M., Buffa, F. M. & Harris, A. L. Assessment of tumour hypoxia for prediction of response to therapy and cancer prognosis. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 18–29 (2010).

Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W.E., Goldbrunner, R., Herms, J., and Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat. Med.* 16, 116–122.

Kumar, A.; Rajput, C. S. Synthesis and anti-inflammatory activity of newer quinazolin-4-one derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 1, p. 83-90, 2009.

Krzyzak E, Szkatuła D, Szczęśniak-Sięga B, Malinka W. Synthesis and DSC study a new pyridinedicarboximide diones derivatives, obtained under various conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2015; 120: 847–53.

Krzyzak E, Szkatuła D, Szczęśniak-Sięga B, Malinka W. Synthesis and DSC study a new pyridinedicarboximide diones derivatives, obtained under various conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2015; 120: 847–853.

Oppegard L. M., Ougolkov A. V., D.N. Luchini, et al., Novel acridine-based compounds that exhibit an anti-pancreatic cancer activity are catalytic inhibitors of humantopoisomerase II, *Eur. J. Pharmacol.* 602 (2–3) (2009) 223–229.

Levinson W., Faras A., Woodson B., Jackson J., Bishop . J. Inhibition of RNA-Dependent DNA Polymerase of Rous Sarcoma Virus by Thiosemicarbazones and Several Cations (RNA tumor viruses/DNA synthesis/viral inactivation/chelation) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; v. 70, p. 164-168, 1973

M. de Campos-Nebel, I. Larripa, M. Gonzalez-Cid, Topoisomerase II-mediated DNA damage is differently repaired during the cell cycle by non-homologous end joining and homologous recombination, *PLoS One* 5 (9) (2010) (pii:e12541).

Macêdo RO, Nascimento TG. Quality control of thiabendazole pre-formulation and tablets by TG and DSC coupled to the photovisual system. *Thermochimica Acta*. 2002; 392–393:85–92.

Maia C. R., Silva L L., Mazzeu F E., Fumian M. M., Rezende de C. M., Doriguetto C. A., Corrêa R. S., Miranda A. P L.; Barreiro E. J., Fraga C.A. M.; Synthesis and analgesic profile of conformationally constrained N-acylhydrazone analogues: Discovery of novel N-arylideneamino quinazolin-4(3H)-one compounds derived from natural safrole; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. V. 17; p. 6517–6525; 2009.

OMAR, K. et al. Novel 4-thiazolidinone derivatives as potential antifungal and antibacterial drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 1, p. 426-432, 2010.

OTTANA, R. et al. 5-Arylidene-2-phenylimino-4-thiazolidinones as PTP1B and LMW-PTP inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 5, p. 1928-1937, 2009.

Poincloux, R., Collin, O., Liza´ rraga, F., Romao, M., Debray, M., Piel, M., and Chavrier, P. (2011). Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 1943–1948.

Pommier Y., Drugging topoisomerases: lessons and challenges, *ACS Chem. Biol.* 8 (1) 82–95. 2013.

RAGAB, F. A.-F. et al. Synthesis and Anticonvulsant Activity of Certain Substituted Furochromone, Benzofuran and Flavone Derivatives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 58, n. 9, p. 1148-1156, 2010.

Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135, 510–523.

Singh, S. P. et al. Chemistry and biological-activity of thiazolidinones. *Chemical Reviews*, v. 81, n. 2, p. 175-203, 198.

Smith, M. B.; March, J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*. 5a ed., New York, ed. Wiley Inter-Science, p. 2083,2001.

Smolewski, P. Recent developments in targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase pathway. *Anticancer Drugs* **17**, 487–494 (2006).

Thelander, L.; Graslund, A. *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry*; J. Biol. Chem.v. 286; p. 4063; 1983

Torre, A.D. “Óleo essencial de baccharis trimera (less.) Dc.: Estudo fitoquímico e avaliação in vitro das Atividades antiproliferativa e mutagênica”. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2013

Tita B, Fulas A, Bandur G, Marian E, Tita D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011; 56: 221–7.

Wang S., Zhao Y., Zhang G., Lv Y., Zhang N., Gong P.; Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-thiazolidinones containing indolin-2-one moiety as potential antitumor agent; *European Journal of Medicinal Chemistry*; v. 46; p. 3509-3518; 2011.

Wang X., Li S.; Protein mislocalization: Mechanisms, functions and clinical applications in câncer; *Biochimica et Biophysica Acta*; v. 1846; p. 13–25; 2014.

Wang, X., Zhang, J., Fan, M., Zhou, Q., Deng, H., Aisharif, M.J., and Chen, X. (2009). The expression of E-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 107, 547–554.

Who; <http://www.who.int/topics/cancer/en/>; 21/08/2014;

William R. Wilson; Hay P. M. Targeting hypoxia in cancer therapy; v. 11; p. 393 a 410; 2011;

Zhao K., Song. X. Huang Y., Yao J., Zhou M., Li Z., You Q., Guo Q., Lu N.; WogonininhibitsLPS-inducedtumorangiogenesisviasuppressing PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling. *European JournalofPharmacology*; v. 737; p. 57–69; 2014;