

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



JAMERSON FERREIRA DE OLIVEIRA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DE NOVOS DERIVADOS 2-TIOFENO-
TIOSSEMICARBAZONAS**

Recife – 2016

JAMERSON FERREIRA DE OLIVEIRA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DE NOVOS DERIVADOS 2-TIOFENO-
TIOSSEMICARBAZONAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito necessário ao grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, na área de Planejamento e Síntese de Fármacos.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientador:

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Recife – 2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

O48s Oliveira, Jamerson Ferreira de.
Síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade antitumoral e anti-inflamatória de novos derivados 2-tiofenotiossemicarbazonas / Jamerson Ferreira de Oliveira. – 2016.
168 f.: il.; tab.; 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 e apêndices.

1. Tiossemicarbazonas. 2. Tiofenos. 3. Neoplasias. 4. Inflamação. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2016-081)

JAMERSON FERREIRA DE OLIVEIRA

**"SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL E ANTI-INFLAMATÓRIA DE NOVOS DERIVADOS 2-TIOFENO-
TIOSSEMICARBAZÔNICOS"**

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: 07/03/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente e Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Anekécia Lauro da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a. Dr.^a. Ana Cristina Lima Leite (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a. Dr.^a. Sinara Mônica Vitalino de Almeida (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco

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

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a 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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me manter sempre sereno e confiante, mesmo depois das intempéries ocorridas em minha vida.

Aos meus pais, Leny Oliveira (*in memoriam*) e Ronaldo Oliveira, por todo exemplo de solidez familiar.

Ao meu irmão Deyvson, minha tia Iranir, meus avós Antonio e Olindina, primos por sempre acreditarem em mim.

À minha orientadora, Prof^a Maria do Carmo Alves de Lima, por todos os créditos em mim depositados e pela confiança recíproca que sentimos.

Ao meu co-orientador, Prof. Ricardo Olímpio de Moura, pelas ajudas e colaborações na realização deste trabalho.

Aos professores Dr. João Ernesto de Carvalho e Dr^a. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz do CPQBA/Unicamp, pela oportunidade concedida na realização dos ensaios biológicos, e também à todos que fazem parte da Divisão de Farmacologia e Toxicologia.

Aos amigos do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, Íris; Allana; Amélia; Paula; Keriolaine; Pedro; Edson; Luiz por fazerem parte no dia-a-dia de trabalho.

Aos meus amigos-irmãos que a vida coloca no nosso caminho, Anekécia, Nayara, Willams, Tiago, Cezar, Sérgio, Elizabeth e Miguel, por tudo o que foi construído nesses últimos meses.

Aos funcionários da Central Analítica do DQF-UFPE, em especial a Eliete Barros e Abene Ribeiro, pelas análises espectroscópicas.

Ao CNPq, FACEPE, pelo suporte financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações celulares que conduzem a formação das células tumorais.	24
Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma	26
Figura 3. Representação estrutural geral das tiossemicarbazonas	27
Figura 4. Estruturas das principais representantes da classe das tiossemicarbazonas cujo alvo biológico é a inibição da ribonucleotídeo redutase (RR).	34
Figura 5. Estruturas de derivados indenoindolona-tiossemicarbazonas potenciais inibidores da topoisomerase II.	35
Figura 6. Estruturas de tiossemicarbazonas com atividades anti-inflamatória e antinociceptiva.	36
Figura 7. Estrutura da tiossemicarbazona promissora na atividade anti-inflamatória.	37
Figura 8. Fármacos que possuem o núcleo tiofênico.	37
Figura 9. Estruturas químicas dos compostos OSI-930 e Raltitrexed contendo o núcleo do tiofeno.	38
Figura 10. Estruturas químicas dos anti-inflamatórios ácido tiaprofênico e suprofen.	38
Figura 11. Estratégia de hibridação molecular na obtenção de novos compostos antimicrobianos.	40
Figura 12. Estruturas da isatina (vermelho) ligada a chalcona (azul), à esquerda e do híbrido com melhor resposta biológica antitumoral, à direita.	41
Figura 13. Exemplificação das possíveis configurações de obtenção das tiossemicarbazonas evidenciando a posição do hidrogênio azometínico	55
Figura 14. Espectro de infravermelho do derivado tiossemicarbazônico JF-6.	56
Figura 15. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto JF-6	56
Figura 16. Ampliação do espectro de ressonância magnética nuclear de	57

hidrogênio do composto JF-6 evidenciando os hidrogênios do grupamento etila.

Figura 17. Ampliação do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto JF-6 evidenciando os hidrogênios do anel fenil e tiofeno.

Figura 18. Espectro de COSY e sua ampliação para o composto JF-6 mostrando as correlações entre hidrogênios.

Figura 19. Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN ^{13}C) do composto JF-6.

Figura 20. Espectro de HSQC e sua ampliação para o composto JF-6 mostrando as correlações carbono-hidrogênio ^1J .

Figura 21. Espectro de massas do composto JF-6 e o pico do íon molecular.

Figura 22. Gráfico ilustrando o perfil citostático do composto JF-3 frente às linhagens tumorais.

Figura 23. Gráfico ilustrando o perfil citocida do quimioterápico doxorrubicina frente às linhagens tumorais.

Figura 24. Atividade do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico JF-3 no ensaio de tumor de Ehrlich na pata.

Figura 25. Acompanhamento da variação do peso corporal dos grupos em tratamento durante o experimento do tumor de Ehrlich na pata

Figura 26. Efeitos do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico JF-3 no ensaio de algesia induzida pela formalina.

Figura 27. Efeitos do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico JF-3 no ensaio de edema de orelha induzido por óleo de cróton.

Figura 28. Atividade do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico JF-3 no ensaio de edema de pata induzido por carragenina.

Figura 29. Atividade do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico JF-3 no ensaio de edema de pata induzido pelo composto 48/80.

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Síntese geral de tiossemicarbazonas a partir da 28
tiossemicarbazida (comercial ou previamente preparada) e compostos
carbonilados.
- Esquema 2.** Reação de S-alquilação. 28
- Esquema 3.** Formação do núcleo da tiazolidin-4-ona a partir da 29
tiossemicarbazona e reação de adição de Michael no núcleo formado.
- Esquema 4.** Formação da tiazolidin-4-ona funcionalizada com grupo ácido 29
carboxílico.
- Esquema 5.** Obtenção da 4-tiazolidinona a partir de dietil-acetileno- 30
dicarboxilatoe tiossemicarbazonas.
- Esquema 6.** Obtenção do heterociclo tiazol a partir de 31
tiossemicarbazonas.
- Esquema 7.** Síntese de complexos metálicos (platina) a partir de 32
tiossemicarbazonas e sua estrutura molecular.
- Esquema 8.** Rota sintética para obtenção das tiossemicarbazonas (5-14). 44
- Esquema 9.** Mecanismo reacional para a formação das 53
tiossemicarbazidas substituídas.
- Esquema 10.** Mecanismo reacional para formação das 2-tiofeno- 54
tiossemicarbazonas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> (GI ₅₀ em µM) dos derivados <i>N</i> -substituídas-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazina carbotioamida (JF1-10).	75
Tabela 2. Resultados da toxicidade aguda via oral dose única.	76
Tabela 3. Efeito do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico (JF-3) na inibição do crescimento tumoral no modelo de Ehrlich de pata.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

LQIT: Laboratório de Química e Inovação Terapêutica

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze

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

ERO's: espécies reativas do oxigênio

NOX: NADPH oxidase

LOX: lipooxygenase

NF-KB: fator nuclear kappa-B

IL-1 β : interleucina-1-beta

IL-6: interleucina-6

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

COX-2: ciclooxygenases 2

NOs: óxido nítrico sintase

PGE2: prostaglandina E do tipo 2

DNA: ácido desoxirribonucleico

RR: ribonucleotídeo redutase

CRC: câncer colo-retal

5-FU: 5-fluorouracil

REA: relação estrutura-atividade

3D: estrutura tridimensional

SBDD: structure-based drug design

LBDD: ligand-based drug design

CIM: concentração inibitória mínima

GI₅₀: concentração que inibe 50% do crescimento celular

MDA-MB231: linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama (receptor de estrógeno negativo)

MDA-MB468: linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama (receptor de estrógeno negativo)

MCF7: linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama (receptor de estrógeno positivo)

DMSO: dimetilsulfóxido

CCD: cromatografia de camada delgada

IR: Infra-Vermelho

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)

SBF: Soro Bovino Fetal

TCA: ácido tricloroacético

SRB: Sulforrodamina B

T: absorbância amostra sem célula

T₁: absorbância do branco de células.

T₀: absorbância do controle de células na placa T₀

PI: iodeto de propídio

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

UNICAMP: Universidade de Campinas

CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Química Biológica e Agrícola

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

UDP: Up-and-Down-Procedure

PBS: Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salina)

Composto 48/80: Agente flogístico indutor de liberação de histamina

JF-3; composto 7 e BTTSC: derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazona para-bromo substituído

RESUMO

O câncer é um grave problema de saúde pública o qual afeta milhares de pessoas no mundo. Sabe-se que há uma estreita relação entre o câncer e a inflamação onde o microambiente inflamatório favorece a progressão tumoral. Baseado nessas evidências, foi proposto neste trabalho, a síntese de novas moléculas híbridas contendo as subunidades das tiossemicarbazonas e do tiofeno que detêm as atividades antitumoral e anti-inflamatória. Uma nova série de 2-tiofeno-tiossemicarbazonas (**5-14**) foi sintetizada, caracterizada e avaliada a atividade biológica. A síntese demonstrou ser eficiente onde foi possível encontrar rendimentos reacionais satisfatórios que variaram de 40-87%. A atividade antiproliferativa *in vitro* foi realizada através do método colorimétrico da sulforrodamina B, onde os derivados **7** (*p*-bromo-fenil) e **9** (*p*-metil-fenil) foram os que mais se destacaram. O composto **7** se destacou frente à linhagem NCI-ADR/RES com GI₅₀ 1.7 µM, já o composto **9** se destacou na linhagem K-562 com GI₅₀ <0.9 µM. O composto **7** foi eleito, dentre os demais derivados avaliados no ensaio *in vitro*, para o prosseguimento dos estudos. Através da citometria de fluxo foi possível evidenciar que o composto induz a exposição de fosfatidilserina (apoptose inicial), porém esse mecanismo de morte celular é independente do ciclo celular. Os estudos *in vivo* foram realizados utilizando o modelo de tumor de pata de Ehrlich. Das três doses utilizadas (30, 100 e 300 mg/Kg) a dose de 30 mg/Kg foi capaz de controlar o crescimento tumoral na pata dos camundongos nos dias 6 (60.6 ± 4.6), 9 (57.1 ± 5.2) e 12 (36.3 ± 6.6). Adicionalmente a atividade antitumoral, também foram realizados ensaios a fim de avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. O ensaio de nocicepção induzido pela formalina revelou que o composto **7** apresentou atividade nas duas fases da dor, ressaltando a dor inflamatória, onde o derivado foi capaz de reduzir o tempo de lambida da pata em 62.3, 84.30 e 100% nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg, respectivamente. Acerca da atividade anti-inflamatória, foi realizado o edema de orelha induzido por óleo de cróton, onde nenhuma das doses testadas foi capaz de regredir significativamente o edema produzido. O edema de pata induzido pela carragenina mostrou ação do composto, onde o edema foi reduzido em 81.9 e 83.2% nos tempos 1 e 2 horas do experimento na dose de 300 mg/Kg. Isso sugere uma ação sobre os mediadores iniciais da inflamação. O ensaio de edema de pata induzido pelo composto 48/80 confirmou essa hipótese, no qual o composto **7**, após 15 minutos do inóculo do agente flogístico, demonstrou redução significativa do edema apresentando valores de 56.53% na dose de 30 mg/Kg indicando uma ação do composto sobre a serotonina e a histamina. Os estudos iniciais, realizados acerca da investigação do potencial biológico das 2-tiofeno-tiossemicarbazonas, revelaram a importância dessa classe de compostos no câncer e na inflamação. No entanto, estudos minuciosos necessitam ser realizados a fim de contribuir na descoberta de novos fármacos.

Palavras-chave: Tiossemicarbazonas, Tiofenos, Neoplasias, Inflamação.

ABSTRACT

Cancer is a major public health issue which affects thousands of people worldwide. It is known that there is a close relationship between cancer and inflammation where the inflammatory microenvironment promotes tumor progression. Based on this evidence, it is proposed in this paper the synthesis of new hybrid molecules containing the subunits of thiosemicarbazone and thiophene holding the anti-tumor and anti-inflammatory activities. A new series of 2-thiophene-thiosemicarbazones (**5-14**) was synthesized, characterized and evaluated to the antitumor and anti-inflammatory activity. The synthesis was demonstrated efficient where it was possible to find satisfactory reaction yields ranging from 40-87%. The antiproliferative activity in vitro was performed using the colorimetric method sulforhodamine B. The derivatives **7** (*p*-bromophenyl) and **9** (*p*-methylphenyl) obtained good GI₅₀ values. The compound **7** stood out against NCI-ADR/RES lineage (multidrug resistant ovarian) with GI₅₀ 1.7 μ M, as the compound **9** stood out in the K-562 strain (leukemia) with GI₅₀ <0.9 μ M. Compound **7** was elected from among the other derivatives evaluated in vitro assay, for further studies. By flow cytometry it became clear that the compound induces phosphatidylserine exposure (early apoptosis), but this cell killing mechanism is independent of the cell cycle. In vivo studies were performed using the model Ehrlich paw tumor. Of the three doses used (30, 100 and 300 mg/Kg) dose of 30 mg/Kg was able to control tumor growth in the paw of mice on days 6 (60.6 ± 4.6), 9 (57.1 ± 5.2) and 12 (36.3 ± 6.6). In addition to antitumor activity, also forms tests performed to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities. The nociception induced by formalin test revealed that the compound **7** showed activity in both phases of pain, emphasizing the inflammatory pain, where it was able to reduce the time of paw lick 62.3, 84.30 and 100% at doses of 30, 100 and 300 mg/kg, respectively. About anti-inflammatory activity was performed ear edema induced by croton oil, where any of the doses tested was able to significantly decrease edema produced. The paw edema induced by carrageenan showed activity of the compound, where the edema was reduced 81.9 and 83.2% in the first two times of the experiment at the highest dose used (saline: 18.85 ± 2.63 , 32.86 ± 4.97 and 3 JF-300 mg/Kg: 3.41 ± 1.4 , 1.96 ± 5.53). This suggests an action on the initial mediators of inflammation. The paw edema assay induced by compound 48/80 confirmed our hypothesis, in which the compound **7** after 15 minutes from the inoculum phlogistic agent, showed a significant reduction of edema with values of 56.53% at the dose of 30 mg/kg (saline: 71.10 ± 6.6 JF-3 and 30 mg/kg: 30.9 ± 5.75), indicating an action of the compound on the serotonin and histamine. Initial studies conducted research on the biological potential of 2-thiophene-thiosemicarbazones, showed good activity of this class of compounds in cancer and inflammation. However, detailed studies to determine the mechanism of action by which act the thiosemicarbazone, need to be performed in order to contribute to the discovery of new drugs.

Keywords: Thiosemicarbazones, Thiophenes, Neoplasia, Inflammation

SUMÁRIO

1	Introdução	18
2	Objetivos	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	Fundamentação Teórica	24
3.1	Câncer: Definições, epidemiologia e tratamento	24
3.2	Tiossemicarbazonas	27
3.2.1	Reatividade	27
3.2.1.1	Reação de S-alquilação	28
3.2.1.2	Reação de ciclização	28
3.2.1.3	Reação com metais: formação de complexos metálicos	31
3.2.2	Importância biológica	32
3.2.2.1	Atividade antitumoral	32
3.2.2.2	Atividade anti-inflamatória	35
3.3	Núcleo tiofeno – Importância biológica	37
3.4	O papel da química medicinal na descoberta de novos fármacos	39
4	Metodologia	43
4.1	Metodologia química	43
4.1.1	Materiais e equipamentos	43
4.1.2	Procedimento experimental	43
4.1.2.1	Procedimento geral para a síntese das tiossemicarbazidas	43
4.1.2.2	Procedimento geral para a síntese das tiossemicarbazonas	44
4.2	Metodologia biológica	45
4.2.1	Avaliação antiproliferativa <i>in vitro</i>	45
4.2.2	Citometria de Fluxo	46
4.2.2.1	Medição de externalização de fosfatidilserina	46
4.2.2.2	Análise do ciclo celular	47
4.2.3	Animais utilizados nos experimentos	47
4.2.4	Ensaio de toxicidade aguda oral	48
4.2.5	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> através do modelo de Ehrlich de pata	48

4.2.6	Avaliação da atividade anti-nociceptiva utilizando o modelo da formalina	49
4.2.7	Avaliação da atividade anti-inflamatória	50
4.2.7.1	Edema de orelha induzido por óleo de cróton	50
4.2.7.2	Edema de pata induzido por carragenina	50
4.2.7.3	Edema de pata induzido pelo composto 48/80	50
4.2.8	Análise estatística	51
5.	Resultados e Discussão	53
5.1	Química	53
5.1.1	Mecanismos reacionais e caracterização espectroscópica	53
5.1.2	Dados espectroscópicos e espectrométricos dos derivados tiofeno-tiossemicarbazônicos	65
5.1.2.1	<i>N</i>-fenil-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-1)	65
5.1.2.2	<i>N</i>-(4-clorofenil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-2)	65
5.1.2.3	<i>N</i>-(4-bromofenil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-3)	66
5.1.2.4	<i>N</i>-(4-metóxfenil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-4)	66
5.1.2.5	<i>N</i>-(4-tolil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-5)	67
5.1.2.6	<i>N</i>-(4-etilfenil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-6)	67
5.1.2.7	<i>N</i>-fenetil-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-7)	68
5.1.2.8	<i>N</i>-(naftalen-1-il)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-8)	68
5.1.2.9	<i>N</i>-(piridin-3-il)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-9)	69
5.1.2.10	<i>N</i>-alil-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-10)	69
5.2	Avaliação Biológica	70
5.2.1	Avaliação <i>in vitro</i>	70
5.2.2	Toxicidade aguda	76
5.2.3	Atividade <i>in vivo</i> – Ehrlich de pata	77
5.2.4	Ensaio da formalina	81
5.2.5	Edema de orelha induzido por óleo de cróton	82
5.2.6	Edema de pata induzido por carragenina	83

5.2.7 Edema de pata induzido pelo composto 48/80	85
5.2.8 Resultados adicionais	86
6. Considerações Finais	88
6.1 Conclusões	88
6.2 Perspectivas	89
Referências	91
Apêndice A	101
Apêndice B	145
Apêndice C	161

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grave problema de saúde mundial por ser considerada uma das maiores causas de morte no mundo, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012. Esses números podem ser associados ao crescimento populacional, ao processo de industrialização e a mudanças nos hábitos de vida (Siegel et al., 2014; Globocan, 2013).

Existe uma estreita relação entre o câncer e processos inflamatórios, onde mais de 25% de todos os tipos de câncer são devido a infecções ou a inflamações crônicas (Hussain e Harris, 2007). Um componente inflamatório está presente no microambiente da maioria dos tecidos neoplásicos, o que justifica o uso de anti-inflamatórios não esteroidais como forma de prevenção contra vários tipos de tumores (Colotta et al., 2009).

O tratamento do câncer se baseia na quimioterapia, no entanto outras estratégias como a radioterapia, remoção cirúrgica, terapia hormonal e o tratamento com anticorpos têm contribuído para aumentar a sobrevida dos pacientes (Videira, Reis e Brito, 2014). A quimioterapia tem efeitos secundários importantes em células normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (Brandão et al., 2010).

A química medicinal tem importante papel no início do processo de descoberta de novas entidades químicas com potencial biológico. O processo de criação de novos fármacos é realizado através da descoberta, relacionada à pesquisa de base ou etapa pré-clínica, e logo em seguida, pelo desenvolvimento, composto pela etapa clínica (Guido, Andricopulo e Oliva, 2010).

O planejamento de fármacos é considerado como uma etapa crucial na descoberta de novos compostos bioativos. Para tal, diversas estratégias ganham destaque, como por exemplo, a hibridação molecular que consiste em uma estratégia de modificação molecular baseada no reconhecimento das subunidades farmacofóricas na composição estrutural de dois ou mais produtos bioativos (Lima, 2007). A fusão dessas subunidades conduz a concepção de um novo híbrido mantendo as características das moléculas originais pré-selecionadas (Addla et al., 2012).

As tiossemicarbazonas representam grande importância biológica devido ao seu amplo espectro de atividades farmacológicas atribuídas a essa classe de compostos, dentre as quais se podem destacar anti-inflamatória (Helal et al., 2013; Muthukumar, George e Vaidhyalingam, 2008) e antitumoral (Tasdemir et al., 2014; Gutierrez, Richardson e Jansson, 2014; Lukmantara et al., 2014).

Além disso, compostos contendo o anel tiofeno também tem se destacado, onde vários fármacos já utilizados na clínica possuem em sua estrutura o núcleo do tiofeno, o que implica na sua importância como constituinte estrutural de medicamentos (Gramec, Masic e Dolenc, 2014).

Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial terapêutico de novos derivados 2-tiofeno-tiossemicarbazonas sintetizados utilizando a estratégia de hibridação molecular entre o anel tiofeno e a tiossemicarbazona, através da atividade antiproliferativa *in vitro* utilizando o método da sulforrodamina B e da avaliação antitumoral *in vivo* através do modelo de Ehrlich de pata, a fim de obter compostos promissores para o tratamento do câncer e também, por meio da avaliação da atividade antinociceptiva através do ensaio da formalina, avaliação da atividade anti-inflamatória através dos ensaios de edema de orelha induzido por óleo de cróton, edema de pata induzidos por carragenina e pelo composto 48/80 a fim de obter um composto que possa atuar de maneira dual no câncer e na inflamação.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar dez derivados 2-tiofeno-tiossemicarbazonas, tendo em vista busca de novos agentes terapêuticos com potencial atividade antitumoral e anti-inflamatória.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar a síntese de 10 compostos da série 2-tiofeno-tiossemicarbazonas (5-14);
- ✓ Caracterizar estruturalmente os compostos através de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze (RMN ^{13}C), espectroscopia de absorção no infravermelho e espectrometria de massas;
- ✓ Avaliar a atividade antiproliferativa dos compostos da série 2-tiofeno-tiossemicarbazônicos frente a 9 linhagens tumorais humanas – U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente à múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT-29 (cólon), K-562 (leucemia) e 1 linhagem não-tumoral - HaCat (queratinócito humano) através do ensaio colorimétrico da sulforrodamina B;
- ✓ Avaliar o perfil de morte celular e a possível interferência do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazona no ciclo celular através da citometria de fluxo;
- ✓ Verificar a toxicidade aguda oral do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazona;
- ✓ Investigar a atividade antitumoral *in vivo* do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazona através do modelo experimental de Ehrlich de pata;

- ✓ Determinar a atividade antinociceptiva do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazona através do ensaio de nocicepção induzido pela formalina;
- ✓ Determinar a atividade anti-inflamatória do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazona através do modelo experimental de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e através do modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina e pelo composto 48/80;

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Câncer: Definições, epidemiologia e tratamento

O câncer, também conhecido como neoplasia ou tumor maligno, é um termo genérico dado ao conjunto de doenças que podem afetar qualquer parte do organismo. Uma das maiores características do câncer é a capacidade que as células dos tecidos acometidos têm de se multiplicar rapidamente, crescendo além dos seus limites habituais, podendo invadir tecidos adjacentes, se espalhando para outros órgãos, fenômeno conhecido como metástase (Floor et al, 2012; WHO, 2014).

Hanahan e Weinberg (2011) sugerem seis principais alterações celulares que fazem com que células normais se transformem em células tumorais: 1- autossuficiência na produção dos sinais de crescimento celular, 2- insensibilidade aos sinais de anticrescimento, 3- resistência a mecanismos de morte celular (evasão da apoptose), 4- ilimitado potencial de replicação, 5- angiogênese, 6- invasão tecidual, seguido de metástase (figura1).

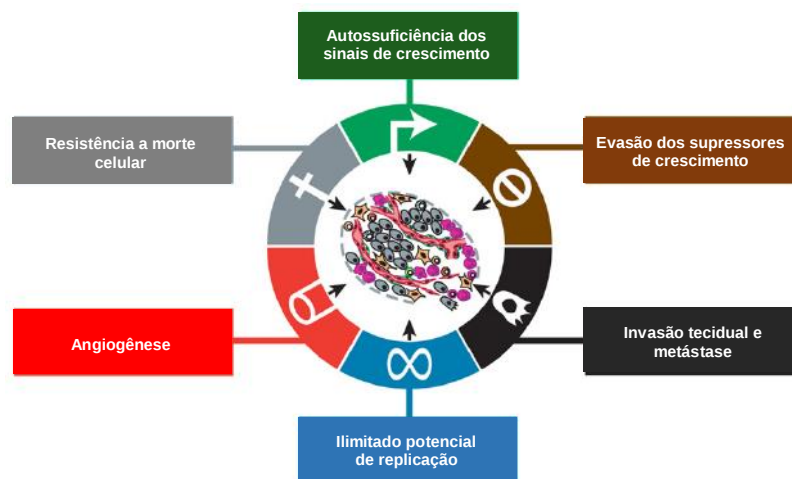


Figura 1. Alterações celulares que conduzem a formação das células tumorais

Adicionalmente aos seis eventos, o estresse oxidativo parece estar intimamente associado a progressão do tumor (Hanahan e Weinberg, 2011). Alguns estudos realizados com uma variedade de tumores, incluindo mama, próstata e

câncer de cólon, revelam uma superexpressão do estresse oxidativo e que isso afeta as etapas de iniciação e progressão do câncer (Fiaschi e Chiarugi, 2012).

No câncer, as espécies reativas do oxigênio (ERO), responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo, podem resultar do aumento da atividade metabólica basal, disfunção mitocondrial devido a hipóxia, aumento da atividade dos peroxissomos, bem como a partir da atividade de ERO's conhecidas como NADPH oxidase (NOX), ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX) (Storz, 2005).

Existe uma íntima relação entre o câncer e processos inflamatórios, onde mais de 25% de todos os tipos de câncer são devido a infecções ou inflamações crônicas (Hussain e Harris, 2007). Um componente inflamatório está presente no microambiente da maioria dos tecidos neoplásicos, o que justifica o uso de anti-inflamatórios não esteroidais como forma de prevenção contra vários tipos de tumores (Colotta et al., 2009).

Alguns componentes endógenos estão envolvidos na relação câncer-inflamação que conduzem a progressão tumoral, onde pode-se destacar fatores de transcrição como o fator nuclear kappa-B (NF- κ B) (Colotta et al., 2009) e citocinas inflamatórias primárias como IL-1 β (interleucina-1 beta), IL-6 (interleucina-6) (Voronov et al., 2003) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) (Karin, 2006). O NF- κ B induz a expressão de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, enzimas chave na via de síntese de prostaglandinas (COX-2), óxido nítrico sintase (NOs) e fatores angiogênicos (Colotta et al., 2009).

Pacientes com câncer colo-retal evidenciam uma superexpressão de COX-2 (*up-regulation*) (Greenhough et al., 2009). Além disso, a COX-2 regula o crescimento tumoral, a invasão e a metástase no câncer de mama (Jana et al., 2014). O efeito pró-tumorigênico da COX-2 é atribuído a atividade da PGE2 (prostaglandina E do tipo 2). Essa prostaglandina é capaz de promover a proliferação, sobrevivência, angiogênese, migração e invasão das células tumorais em pacientes com câncer colo-retal (Greenhough et al., 2009).

O câncer está entre as principais causas de morbimortalidade no mundo, com o surgimento de cerca de 14.1 milhões de novos casos e 8.2 milhões de mortes relacionadas ao câncer em 2012 (WHO, 2014), sendo que destes novos casos, 7.4 milhões foram em homens e 6.7 milhões, em mulheres. É esperado que o surgimento de novos casos aumente para 24 milhões em 2035 (Globocan, 2013).

Os tipos mais prevalentes de câncer em todo o mundo, em ambos os sexos, foram em 2012, o de pulmão; mama e colo-retal com 1.8, 1.7 e 1.4 milhões de novos casos diagnosticados. Considerando somente os números de casos relacionados ao sexo masculino, o câncer de pulmão se destacou com o diagnóstico de 1.3 milhões de novos casos, representando um total de 17% frente a todos os tipos de câncer. No sexo feminino, o tipo de câncer mais incidente foi o de mama, com um total de 1.7 milhões de novos casos diagnosticados, representando um total de 25.2% (Globocan, 2013).

No Brasil, foi esperado para o ano de 2014, o surgimento de 576 mil novos casos, dentre os quais os tipos mais incidentes foram os de pele do tipo não melanoma, seguido pelos tumores de próstata, mama, cólon, pulmão, estômago e colo do útero (Inca, 2014). Excluindo os casos de pele do tipo não melanoma, estimam-se 395 mil casos novos de câncer, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para sexo feminino. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide (figura 2), corroborando com as estatísticas mundiais (Inca, 2014).

Localização primária	casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.

O tratamento do câncer se baseia na quimioterapia, no entanto outras estratégias como a radioterapia, remoção cirúrgica, terapia hormonal e o tratamento com anticorpos têm contribuído para aumentar a sobrevida dos pacientes (Videira, Reis e Brito, 2014). A quimioterapia consiste da estratégia mais utilizada e tem por objetivo a destruição das células neoplásicas, as quais possuem como característica o fato de se dividirem muito mais rápido que a maioria das células normais. Por outro lado, a quimioterapia tem como efeitos secundários importantes em células

normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (Brandão et al., 2010).

Devido à relativa semelhança entre células malignas e normais do corpo de rápido crescimento, o grande desafio para o tratamento dos mais diversos tipos de cânceres é a descoberta de fármacos capazes de fazer distinção entre essas células, atuando apenas nas células tumorais (Almeida et al., 2005).

3.2 Tiossemicarbazonas

3.2.1 Reatividade

As tiossemicarbazonas são um grupo de moléculas pertencentes a classe das iminas ($-C=N$), conhecidas como base de Schiff, bastante importantes na química devido a sua versatilidade reacional frente a diversos reagentes. São consideradas ligantes orgânicos, uma vez que apresentam em sua estrutura, átomos de nitrogênio (N) e enxofre (S) caracterizados por serem doadores de elétrons. A estrutura geral dessa classe de compostos está apresentada na figura 3 (Lobana et al., 2009).

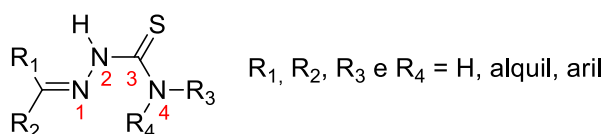
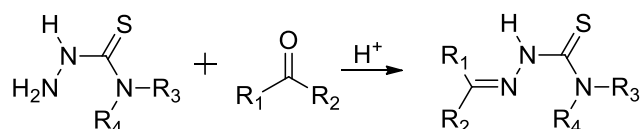


Figura 3. Representação estrutural geral das tiossemicarbazonas

A obtenção das tiossemicarbazonas (esquema 1) pode ser realizada de maneira direta, onde há a condensação da tiossemicarbazida, obtida comercialmente, com aldeídos ou cetonas; ou também de maneira indireta, onde inicialmente há a prévia preparação da tiossemicarbazida, fazendo-se reagir hidrazina (NH_2-NH_2) com reagentes como isotiocianatos, ácidos tiocabamoiitiglicólicos, ditiocarbamatos, seguida de reação com o composto carbonilado de interesse (aldeído ou cetona) (Tenório et al., 2005).



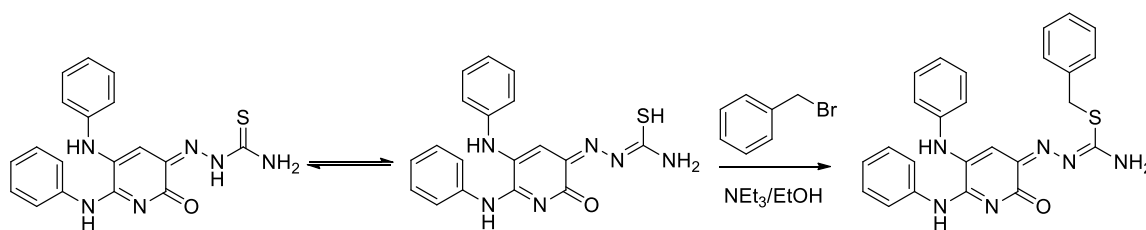
Esquema 1. Síntese geral de tiossemicarbazonas a partir da tiossemicarbazida (comercial ou previamente preparada) e compostos carbonilados.

Uma vez sintetizadas, as tiossemicarbazonas já demonstram grande interesse farmacológico. No entanto, outras reações podem ocorrer na estrutura geral dessa classe de compostos, gerando novos derivados que possuam outras funções químicas e/ou biológicas.

3.2.1.1 Reação de S-alquilação

Devido a possibilidade das tiossemicarbazonas poderem coexistir nas formas tautoméricas tiona ou tiol, a forma tiol é bastante interessante nas reações de substituição nucleofílica.

A reação de S-alquilação é observada quando da mistura de 1 equivalente da tiossemicarbazona com 1.1 equivalentes de haletos de benzila na presença de quantidades catalíticas de trietilamina (esquema 2). A confirmação do sucesso reacional é observada quando do aparecimento do sinal singlete δ 4.29 – 4.49 ppm referente aos dois hidrogênios metilênicos ($-\text{CH}_2-$) do grupamento benzil introduzido (Xie et al., 2014).



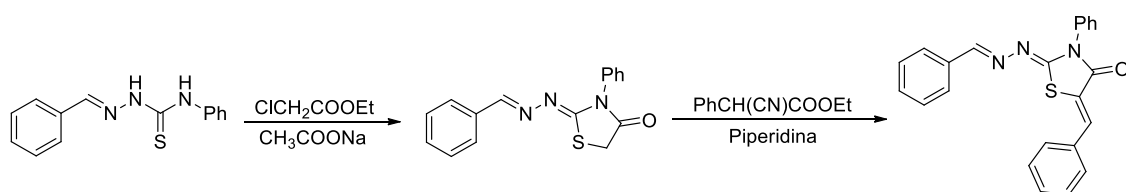
Esquema 2. Reação de S-alquilação.

3.2.1.2 Reação de ciclização

A presença do sistema NH-CS-NH- permite a formação de vários núcleos heterociclos importantes na síntese de novos protótipos a fármacos.

O núcleo da tiazolidin-4-ona pode ser obtido a partir da reação de 1 equivalente da tiossemicarbazona com 1.1 equivalentes de cloroacetato de etila, na presença de 4 equivalentes de acetato de sódio anidro (esquema 3). A formação da tiazolidin-4-ona a partir da tiossemicarbazona ainda permite a realização da reação de adição do tipo Michael na posição 5 do núcleo da tiazolidin-ona (esquema 3) (Aquino et al., 2011).

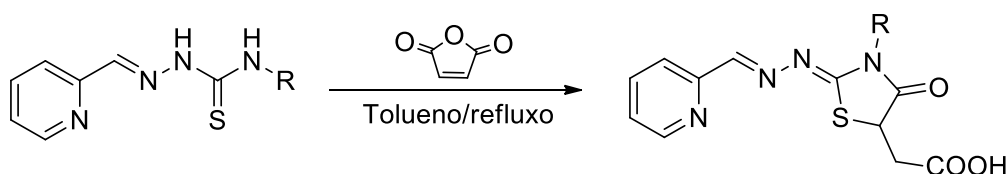
A caracterização desses compostos pode ser efetuada através da análise da espectroscopia de absorção no infravermelho, onde é possível observar um estiramento característico da carbonila ($-C=O$) na posição 4 do núcleo formado. Além disso, após a reação de adição com ésteres cianocinâmicos, a caracterização pode ser realizada utilizando a técnica do RMN 1H onde aparece um sinal singlete referente a ligação $-CH=$ formada (Aquino et al., 2011).



Esquema 3. Formação do núcleo da tiazolidin-4-ona a partir da tiossemicarbazona e reação de adição de Michael no núcleo formado.

A formação da tiazolidin-4-ona, a partir de tiossemicarbazonas, ainda pode ser realizada já funcionalizando com um grupamento ácido carboxílico. Isto é possível quando se reage tiossemicarbazonas obtidas com anidrido maleico na proporção de 1: 1.1 equivalentes, na presença de tolueno anidro, em um sistema acoplado ao Dean-Stark (esquema 4).

A reação tem um rendimento médio de 50% e pode ser caracterizada inicialmente pela espectroscopia de absorção do infravermelho através das bandas de absorção do OH da função ácido carboxílico e também do estiramento referente a carbonila (Verçoza et al., 2009).

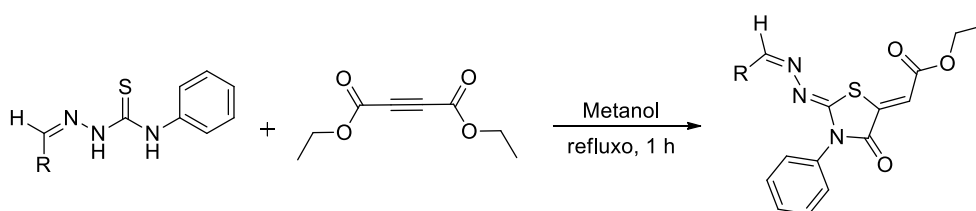


Esquema 4. Formação da tiazolidin-4-ona funcionalizada com grupo ácido carboxílico.

A funcionalização do núcleo da 4-tiazolidinona a partir de tiossemicarbazonas pode ser realizada utilizando-se dietil-acetileno-dicarboxilato, em metanol sob refluxo por 1 hora. A reação tem um rendimento médio de 70-76% (esquema 5) (Benmohammed et al., 2014).

A caracterização desses compostos é realizada através da análise de IR onde é possível observar as carbonilas da amida cíclica e do éster formados. Além disso, na espectroscopia de RMN ^1H é evidenciada a presença de um singlete referente ao hidrogênio do metino formado na posição 5 do heterociclo da tiazolidin-4-ona. Os hidrogênios do CH_2 e CH_3 da função éster formada apresentam-se com quartetos e tripletos, respectivamente no RMN ^1H (Benmohammed et al., 2014).

A dupla ligação exocíclica originada no heterociclo da 4-tiazolidinona permite a formação de dois isômeros geométricos *E* e *Z*. No entanto, no espectro de RMN ^1H só é possível observar apenas um sinal singlete referente apenas a uma forma isomérica. Os estudos de cristalografia de raio-X comprovam a preferência pela configuração *Z* desses derivados, provavelmente devido ao efeito estérico do grupamento éster (Benmohammed et al., 2014).

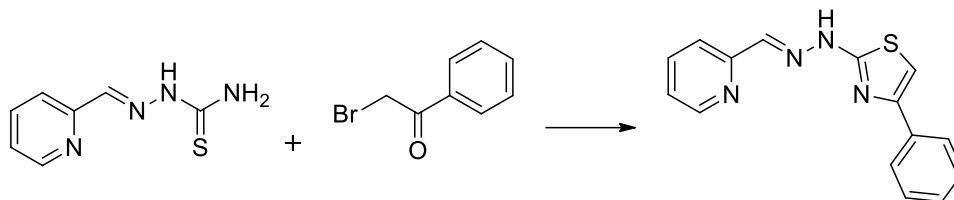


Esquema 5. Obtenção da 4-tiazolidinona a partir de dietil-acetileno-dicarboxilato e tiossemicarbazonas

Outro núcleo heterociclo possível de ser sintetizado, a partir de tiossemicarbazonas, é o tiazol. Esta reação acontece quando 1 equivalente da tiossemicarbazona reage com 1.1 equivalentes de 2-bromoacetofenonas substituídas, na presença de 1.1 equivalentes de carbonato de cálcio em álcool apropriado. A metodologia empregada na obtenção desses heterociclos a partir de tiossemicarbazonas é relatada fazendo uso do aparelho de ultrassom (esquema 6) (Cardoso et al., 2014).

A caracterização dos compostos contendo o núcleo do tiazol pode ser feita através da espectroscopia de absorção no infravermelho, onde não é possível mais observar o estiramento relativo a tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$) presente na tiossemicarbazona.

Além disso, através da análise do RMN ^{13}C pode-se evidenciar um sinal em aproximadamente δ 106 ppm relativo ao carbono ligado ao enxofre do anel tiazólico formado (Cardoso et al., 2014).



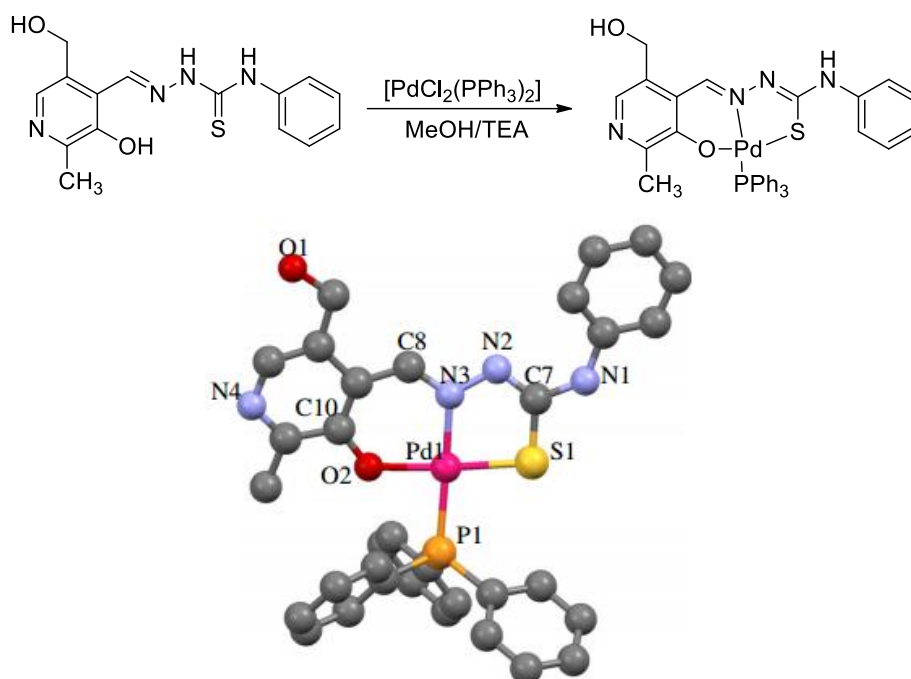
Esquema 6. Obtenção do heterociclo tiazol a partir de tiossemicarbazonas

3.2.1.3 Reação com metais: formação de complexos metálicos

A química de compostos bioorganometálicos tem grande importância na área médica e farmacêutica, despertando maior interesse na descoberta de fármacos que atuem no câncer e em doenças parasitárias, como a malária (Gasser e Metzler-Nolte, 2012).

As tiossemicarbazonas são consideradas ótimos ligantes podendo se complexar com alguns metais de transição através de vários modos (Lobana et al., 2009). Dentre os principais metais, pode-se destacar o gálio (III) (Kumar et al., 2014), cobre (II), níquel (II), paládio (II) (Jagadeesh et al., 2014), rutênio (II) (Yildirim et al., 2014), platina (II) (Matesanz, Leitão e Souza, 2013), zinco (II) (Shao et al., 2014) e cobalto (II) (Babahan et al., 2014).

Esses complexos metálicos, podem ser obtidos a partir da reação de 1 equivalente da tiossemicarbazona com 1 equivalente do sal que contém o metal, na presença do álcool de escolha sob refluxo, por um período de 3 horas (Pandiarajan et al., 2013). Abaixo está descrita a síntese de um complexo metálico com platina (esquema 7).



Esquema 7. Síntese de complexos metálicos (platina) a partir de tiossemicarbazonas e sua estrutura molecular.

3.2.2 Importância biológica

As tiossemicarbazonas representam grande importância biológica devido ao seu amplo espectro de atividades farmacológicas atribuídas a essa classe de compostos, dentre as quais se podem destacar antimalárica (Marella et al., 2014; Kumar et al., 2014), antimicrobiana (Yildirim et al., 2014; Farag, 2014), leishmanicida (Britta et al., 2014), anti-*T. cruzi* (Moreno-Rodríguez et al., 2014; Cardoso et al., 2014); anti-inflamatória (Helal et al., 2013; Muthukumar, George e Vaidhyalingam, 2008) e antitumoral (Tasdemir et al., 2014; Gutierrez, Richardson e Jansson, 2014; Lukmantara et al., 2014).

3.2.2.1 Atividade antitumoral

O envolvimento das tiossemicarbazonas com o câncer é extremamente relevante, devido ao fato que muitos compostos desta classe de moléculas detêm a atividade biológica, como apresentado anteriormente.

A atividade, frente a células tumorais, apresentada pelas tiossemicarbazonas está associada ao fato de esta classe de compostos se envolver na inibição de

alguns pontos chaves importantes na busca de novos fármacos para o tratamento do câncer, sendo eles a ribonucleotídeo redutase e a topoisomerase II (Tasdemir et al., 2014).

O ferro pode ser encontrado sob duas formas, férrica (Fe^{3+}) e ferrosa (Fe^{2+}). A capacidade de o ferro ser convertido em uma dessas duas formas de oxidação quer seja pelo recebimento ou doação de um elétron, é um importante fator que desempenha um amplo espectro de atividades biológicas (Fairweather-Tait, 2004).

O ferro é um importante mineral, sendo considerado como adjuvante na proliferação celular devido ao seu envolvimento em processos como metabolismo, respiração, síntese de DNA e eritropoiese. As lipoxigenases (LOX), as cicloxigenases (COX) e a ribonucleotídeo redutase (RR) são exemplos importantes de proteínas dependente de ferro para sua ação (Richardson et al., 2002; Fairweather-Tait, 2004).

As células neoplásicas possuem uma taxa de proliferação e síntese de DNA aumentadas quando em comparação as células normais, resultando em uma alta da atividade da ribonucleotídeo redutase dependente de ferro (Elford et al., 1970). A enzima, em mamíferos, consiste de duas subunidades chamadas de R_1 e R_2 , sendo a subunidade R_1 o sítio ativo da ribonucleotídeo redutase (Kolberg et al., 2004).

O mecanismo de funcionamento da enzima consiste inicialmente na ativação da subunidade R_1 através da geração de radicais nos resíduos de tirosina da subunidade R_2 . Estes radicais são então transferidos aos resíduos de cisteína no sítio ativo da subunidade R_1 . A importância do ferro neste processo está na geração dos radicais tirosil na subunidade R_2 através de reações com o oxigênio molecular (Kolberg et al., 2004). Uma vez estes radicais formados, o ferro também está envolvido na transferência da cadeia formada entre as subunidades R_1 e R_2 (Levy et al., 1995).

As tiossemicarbazonas são capazes de inibir a incorporação da timidina tritiada (^3H -timidina) ao DNA, provavelmente devido a ação das tiossemicarbazonas frente à ribonucleotídeo redutase (Sartorelli, Agrawal e Moore, 1971).

Algumas tiossemicarbazonas são relatadas por possuírem atividade frente à essa enzima, tais como a 1-formilisoquinolina tiossemicarbazona, 2-formilpiridina tiossemicarbazona e 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (Triapina®) (figura 4). Essa inibição pode se dar de maneira direta, através da ligação da

tiossemicarbazona com o ferro no sítio ativo, essencial ao funcionamento enzimático ou devido ao complexo tiossemicarbazona-ferro formado resultar na destruição dos radicais tirosila (Sartorelli, Agrawal e Moore, 1971; Thelander e Graslund, 1983).

Dentre as tiossemicarbazonas citadas, a Triapina se destaca por se encontrar em estudos avançados de fase clínica II e por apresentar atividade confirmada em uma grande variedade de modelos tumorais (Ocean et al., 2014).

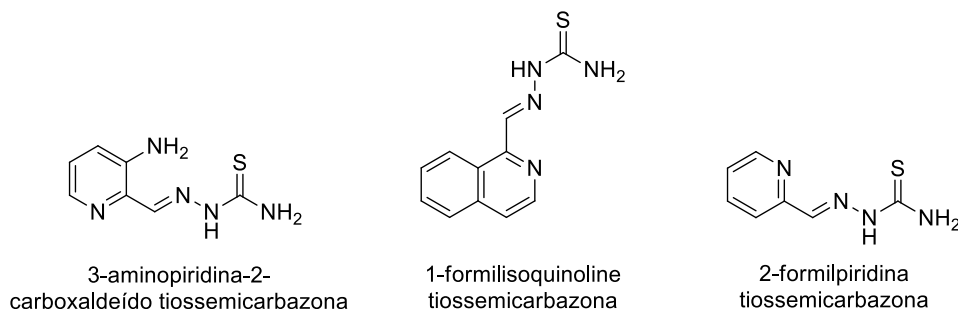


Figura 4. Estruturas das principais representantes da classe das tiossemicarbazonas cujo alvo biológico é a inibição da ribonucleotídeo redutase (RR).

As DNA topoisomerases são enzimas essenciais para as células, visto que elas modulam a topologia do DNA, durante os processos de transcrição, replicação ou recombinação (Liu e Wang, 1987).

A topoisomerase II tem sido reconhecida como um importante alvo para a descoberta de novos fármacos antitumorais que consigam causar a inibição enzimática com menos efeitos adversos (Nitiss, 2009). Alguns fármacos antitumorais, já utilizados na clínica, possuem como alvo biológico a topoisomerase II, tais como a doxorrubicina e daunorrubicina (da classe das antraciclinas), o etoposídeo e o teniposídeo (da classe das epipodofilotoxinas) e a amsacrina (da classe das acridinas) (Zunino e Capranico, 1990).

As tiossemicarbazonas também têm se destacado frente à topoisomerase II sendo capazes de causar a inibição do efeito catalítico desta enzima (Yalowich et al, 2012). A provável interferência das tiossemicarbazonas na inibição da topoisomerase II se dá pela estabilização dos complexos cliváveis formados pela ação da enzima e o DNA que leva a apoptose celular. Essa estabilização, por parte das tiossemicarbazonas, se dá devido a uma alquilação dos resíduos tiol no complexo topo II-DNA (Chen et al., 2004).

Algumas indenoindolonas-tiossemicarbazonas foram sintetizadas e avaliadas o seu potencial na inibição da topoisomerase II (figura 5). Foi verificado que dois derivados dessa série foram ativos na inibição dessa enzima, mas sem haver a intercalação com o DNA com atividade comparada a do etoposídeo. Adicionalmente, não foi verificada nenhuma atividade sobre a topoisomerase I, o que implica em uma especificidade de ação desses compostos (Kashyap et al., 2013).

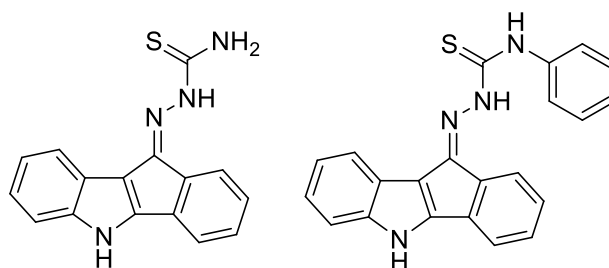


Figura 5. Estruturas de derivados indenoindolona-tiossemicarbazonas potenciais inibidores da topoisomerase II.

3.2.2.2 Atividade anti-inflamatória

Poucos estudos acerca da atividade anti-inflamatória relacionadas as tiossemicarbazonas tem sido relatado, o que desperta ainda mais o interesse na investigação do potencial biológico dessa classe de moléculas.

Uma série de novas 1-(1-metil-5-metil-2-oxoindolin-3-ilideno)-4-(piridin-2-il)-tiosemicarbazonas foram sintetizadas e avaliadas quanto ao seu potencial anti-inflamatório e analgésico (Muthukumar, George e Vaidhyalingam, 2008).

A atividade anti-inflamatória desses novos compostos se deu através do ensaio do edema de pata induzido por carragenina, onde todos os compostos testados foram administrados em dose única de 100 mg/Kg e o controle positivo utilizado no experimento foi o diclofenaco de sódio na dose de 45 mg/Kg, ambos administrados oralmente. A mensuração da inibição do volume da pata foi realizada utilizando o aparelho de hidropletismômetro. Os resultados mostraram que dos dez compostos avaliados, três demonstraram bons valores na inibição do edema da pata. O melhor composto (figura 6) apresentou 44% na inibição do edema quando comparado ao diclofenaco de sódio que foi capaz de inibir em 64% o edema (Muthukumar, George e Vaidhyalingam, 2008).

Em relação à atividade analgésica dessa série de compostos, foi utilizado o teste de contorção induzido por ácido acético. Os compostos avaliados também apresentaram resultados relevantes em relação à analgesia, onde o melhor composto (figura 6) apresentou um percentual de 53% de proteção contra dor quando comparado com o diclofenaco de sódio que apresentou 74% de proteção (Muthukumar, George e Vaidhyalingam, 2008).

A significância dos resultados apresentados por essa série de compostos pode ser justificada por uma analogia entre as estruturas dos derivados testados e a estrutura da indometacina, um anti-inflamatório não esteroidal (Muthukumar, George e Vaidhyalingam, 2008).

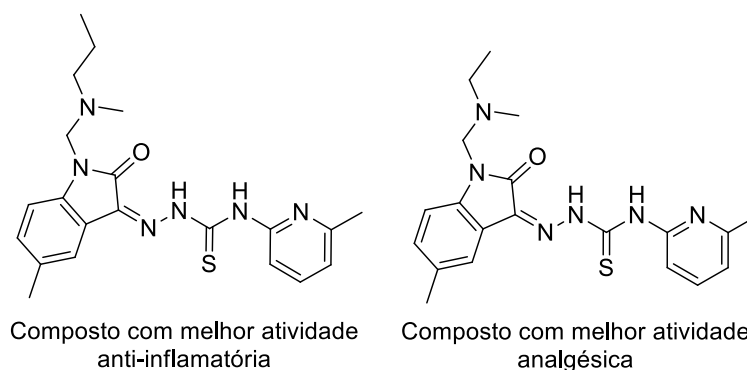


Figura 6. Estruturas de tiossemicarbazonas com atividades anti-inflamatória e antinociceptiva.

Outros compostos sintetizados a partir das tiossemicarbazonas também demonstraram um bom perfil anti-inflamatório. Uma série de novos tiazóis foi sintetizada e avaliada quanto ao seu potencial biológico anti-inflamatório utilizando o modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina. Os compostos foram testados na dose de 50 mg/Kg e o controle positivo utilizado no experimento foi a indometacina na dose de 10 mg/Kg (Helal et al., 2013).

Os resultados desse experimento revelaram que os tiazóis são promissores para esta atividade anti-inflamatória onde vários compostos apresentaram inibição do edema na pata com valores percentuais de 87 e 85%. A tiossemicarbazona (figura 7) que deu origem a esses novos derivados também foi testada e, da mesma forma, revelou 83% de inibição do edema na pata, quando comparado a indometacina que foi capaz de inibir 91% neste mesmo experimento (Helal et al., 2013).

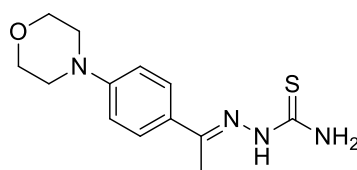


Figura 7. Estrutura da tiossemicarbazona promissora na atividade anti-inflamatória.

3.3 Núcleo Tiofeno – Importância biológica

Vários fármacos já utilizados na clínica possuem em sua estrutura o núcleo do tiofeno, o que implica na sua importância como constituinte estrutural de medicamentos. Como exemplos, podemos citar o ácido tienílico (diurético), o metapirileno (anti-histamínico), o ácido tiaprofênico e o suprofen (anti-inflamatórios não esteroidais), o zileuton (anti-asmático) (figura 8) (Gramec, Masic e Dolenc, 2014).

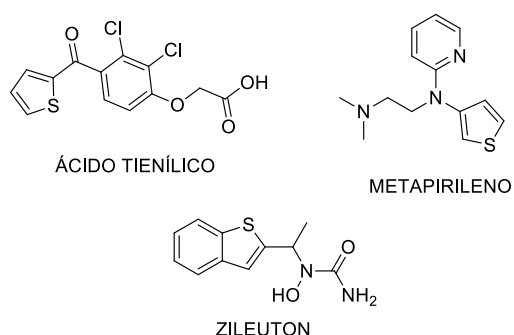


Figura 8. Fármacos que possuem o núcleo tiofênico.

Outros dois compostos, que possuem esse grupo em sua estrutura, também merecem destaque devido ao seu potencial na atividade antitumoral, o OSI-930 e o Raltitrexed (Tomudex®).

O OSI-930 (figura 9) {N-(4-trifluorometoxifenil) 3-[(quinolin-4-il-metil)-amino] tiofeno-2-carboxamida} é um análogo antranilamida inibidor de multi-quinases da mesma classe do imatinibe e sunitinibe (Garton et al., 2006; Yap et al., 2013). O OSI-930 está em testes clínicos de fase I em pacientes como tumores sólidos avançados e também é capaz de causar regressão tumoral em uma variedade de modelos de xenotransplante humanos, incluindo glioblastoma, carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, carcinoma de pulmão, leucemia de mastócitos, câncer gástrico e colo-retal (Garton et al., 2006; Yap et al., 2013).

O raltitrexed (figura 9) é um análogo folato quinazolina cujo mecanismo de ação desse fármaco é a inibição seletiva da enzima timidilato sintase que leva a fragmentação do DNA e posterior morte celular (Jackman et al., 1995).

O raltitrexed é indicado para o tratamento do câncer colo-retal (CRC) sendo também considerado uma alternativa terapêutica promissora quando associado ao tratamento com 5-fluorouracil (5-FU) e capecitabina. Isso ocorre devido a uma maior aceitabilidade pelos pacientes que apresentam menores complicações clínicas, uma vez que a utilização do 5-FU e capecitabina são capazes de causar trombose e cardiotoxicidade (capecitabina) ao paciente tratado (Young et al., 1999; Deboever et al., 2013; Kelly et al., 2013).

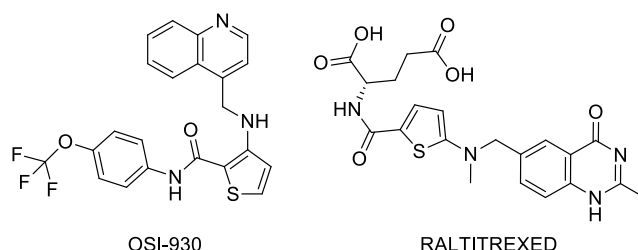


Figura 9. Estruturas químicas dos compostos OSI-930 e Raltitrexed contendo o núcleo do tiofeno.

O ácido tiaprofênico (figura 10) [(*R,S*)-2-(5-benzoil-2-tienil)ácido propanoico] e o suprofen (figura 10) [(*R,S*)-2[4-(2-tienilcarbonil)fenil] ácido propanoico] são dois fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, que contém o núcleo do tiofeno em sua estrutura. Ambos os fármacos são indicados para o tratamento da dor musculoesquelética, osteoartrite e artrite reumatoide (Crawford, Waller e Wood, 1997; Hart, Ward e Lifschitz, 1987).

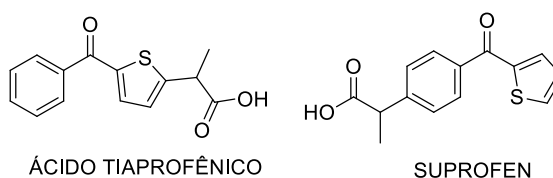


Figura 10. Estruturas químicas dos anti-inflamatórios ácido tiaprofênico e suprofen.

3.4 O papel da química medicinal da descoberta de novos fármacos

A química medicinal é uma ciência multidisciplinar que dentre suas inúmeras atribuições, engloba o planejamento de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação molecular de substâncias; a identificação/elucidação da estrutura; a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos, farmacológicos, toxicológicos, farmacocinéticos, a proposição e validação de modelos matemáticos através dos estudos de relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (REA) e/ou toxicológica, permitindo então a proposição de novas entidades de interesse (Amaral e Montanari, 2002; Barreiro, 2009).

O processo de criação de novos fármacos compreende duas fases distintas: descoberta, relacionado à pesquisa de base ou etapa pré-clínica e desenvolvimento, etapa clínica. A química medicinal tem importante papel no início do processo de descoberta de novas entidades químicas com potencial biológico (Guido, Andricopulo e Oliva, 2010).

Para que uma nova molécula seja proposta com um determinado fim biológico, a estrutura tridimensional (3D) do alvo molecular não necessariamente precisa ser conhecida. No entanto, este fato determinará a priorização das estratégias de planejamento (Andricopulo, Salum e Abraham, 2009), pois o conhecimento da estrutura do ligante, bem como do provável receptor no qual este se ligará é de fundamental importância para se obter sucesso no planejamento de novos fármacos (Montanari, 2011).

A associação de métodos experimentais e computacionais tem representado uma grande importância na identificação e no desenvolvimento de novas moléculas potencialmente bioativas. Nesse contexto, as estratégias de SBDD (*structure-based drug design*) e LBDD (*ligand-based drug design*) ganham destaque. Os métodos de SBDD se baseiam no conhecimento do arranjo topológico de alvos biológicos, logo utilizam como pré-requisito dados 3D detalhados. Por outro lado, quando a estrutura do alvo biológico não é conhecida, podem ser utilizados métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD), levando em consideração propriedades e características de séries de ligantes bioativos da macromolécula em estudo (Andricopulo, Salum e Abraham, 2009).

O planejamento de fármacos é considerado como uma etapa crucial na descoberta de novos compostos bioativos, uma vez que é nessa fase onde será desenhada uma nova entidade química, baseada em estudos preliminares, as quais poderão originar um fármaco com menor toxicidade, menores efeitos colaterais e maior potência. Para tal, diversas estratégias ganham destaque, como por exemplo, a hibridação molecular (Lima, 2007).

A hibridação molecular consiste em uma estratégia de modificação molecular baseada no reconhecimento das subunidades farmacofóricas na composição estrutural de dois ou mais produtos bioativos. A fusão dessas subunidades conduz a concepção de um novo híbrido mantendo as características das moléculas originais pré-selecionadas (Addla et al., 2012).

Samala e col. (2014) avaliaram em seu estudo, a atividade antimicrobiana de novos tetrahidrotieno[2,3-*c*]-piridina-3-carboxamida. O planejamento dessas novas moléculas se baseou na estrutura de outras duas moléculas que exibiram bons valores de concentração inibitória mínima (CIM), o composto A, CIM: 26.7 μ M; e o composto SID 92097880, CIM: 9.15 μ M. Os melhores compostos híbridos apresentaram valores de CIM que variaram entre 9.28 – 11.72 μ M evidenciando o sucesso da estratégia de modificação molecular (figura 11).

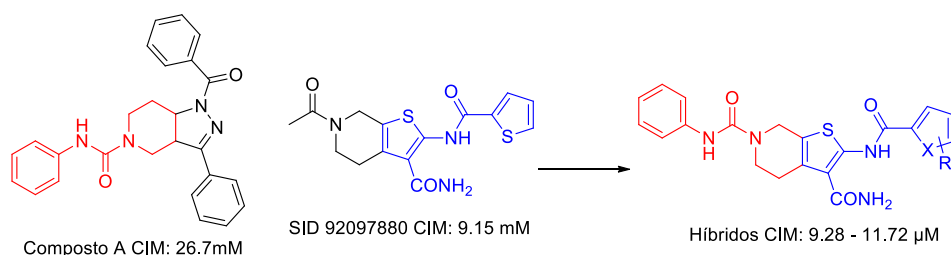


Figura 11. Estratégia de hibridação molecular na obtenção de novos compostos antimicrobianos.

A isatina (1*H*-indol-2,3-diona) é um núcleo privilegiado que possui diversas atividades biológicas. O sunitinibe (Sutent®), fármaco que possui o núcleo da isatina, é indicado para o tratamento do carcinoma renal e tumor gastrointestinal (Medvedev et al., 2007). Adicionalmente, as chalconas têm notória significância biológica, se destacando na atividade antitumoral e mais especificamente contra células cancerígenas da linhagem de mama (Juvale et al., 2012).

Karthikeyan e col. (2013) realizaram a síntese de híbridos da isatina e chalconas com o objetivo de avaliar o perfil de inibição do crescimento celular frente

a linhagens tumorais de mama. Foi verificado que o composto que obteve melhores valores de GI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento celular) foi aquele que possuía como substituinte a metoxila (3,4- OCH_3) (figura 12). Ele apresentou GI_{50} de 8.54, 4.76 e 3.59 μM para as linhagens MDA-MB231, MDA-MB468 e MCF7, respectivamente, confirmando o êxito da estratégia empregada.

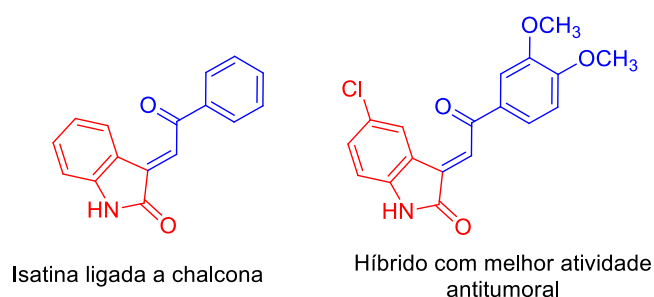


Figura 12. Estruturas da isatina (vermelho) ligada a chalcona (azul), à esquerda e do híbrido com melhor resposta biológica antitumoral, à direita.

Diante das evidências que apontam a versatilidade química e biológica das tiossemicarbazonas e do anel tiofeno e tendo como base a hibridação molecular como princípio no planejamento de fármacos, propomos neste trabalho, a síntese de novos híbridos químicos bem como a sua avaliação biológica frente à modelos experimentais de câncer e inflamação, com a finalidade de obtenção de moléculas promissoras para o tratamento dessas doenças.

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Metodologia química

4.1.1 Materiais e Equipamentos

Os reagentes e solventes comuns utilizados para a síntese e análise foram hidrazina 80%, 2-tiofeno-carboxaldeído, fenil-isotiocianato, 4-bromo-fenil-isotiocianato, 4-cloro-fenil-isotiocianato, 4-metóxi-fenil-isotiocianato, 4-metil-fenil-isotiocianato, 4-etil-fenil-isotiocianato, 2-fenil-etil-isotiocianato, 3-piridil-isotiocianato, 1-naftil-isotiocianato, alil-isotiocianato, etanol absoluto, diclorometano, dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etila, *n*-hexano e ácido acético. Todos fornecidos pela Sigma, Aldrich, Fluka e Merck.

Na cromatografia de camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de sílica gel F₂₅₄ da Merck, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 nm). Na determinação dos pontos de fusão foi utilizado aparelho em tubo capilar Modelo Quimis 340 (Quimis, Brasil). Para caracterização estrutural dos compostos químicos foi utilizado: Espectroscopia de Infra-Vermelho (IR), registrados num espectrometro Bruker IFS66 (Bruker, Alemanha), utilizando pastilha de KBr; Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono (RMN ¹³C) realizados em aparelhos Varian UnityPlus 400 MHz (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C) ou Bruker AMX-300 MHz (300 MHz para ¹H e 75.5 MHz para ¹³C); Espectrometria de massas realizada no aparelho MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

4.1.2 Procedimento Experimental

4.1.2.1 Procedimento geral para a síntese das tiossemicarbazidas

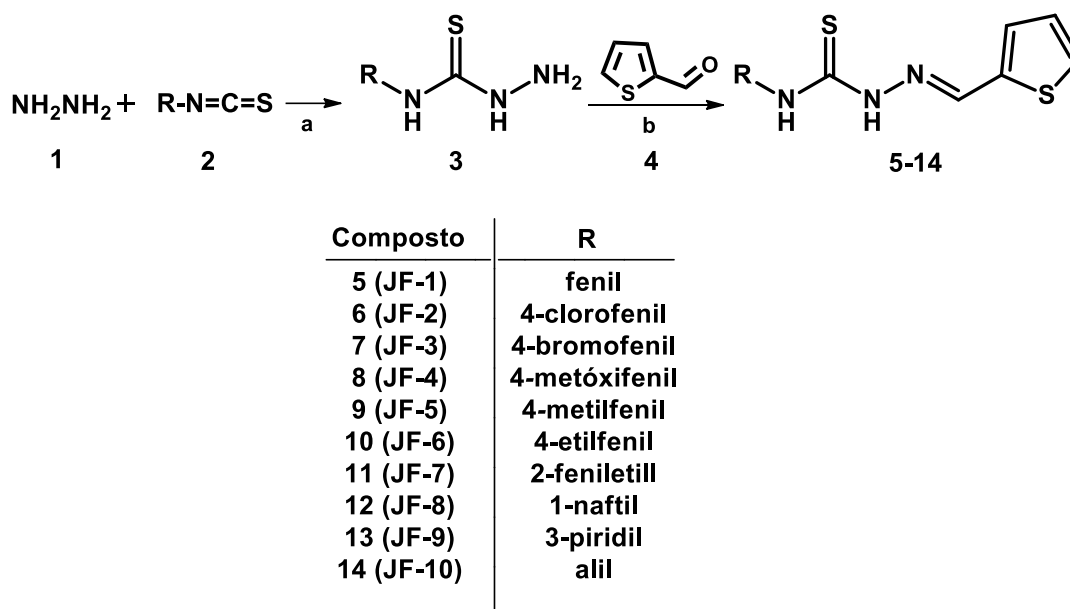
A uma solução de diferentes isotiocianatos (2) (0,5 mmol), em diclorometano como solvente (10 mL), foi adicionado lentamente a hidrazina (1) (1 mmol). A reação permaneceu sob agitação magnética, à temperatura ambiente por 2 horas. A maioria das tiossemicarbazidas (produto de interesse) precipitaram durante a reação. As

reações que não precipitaram, este procedimento foi realizado após adição de *n*-hexano. O precipitado foi então filtrado, lavado com diclorometano e seco em dessecador para utilização na etapa posterior (esquema 8).

4.1.2.2 Procedimento geral para a síntese das tiossemicarbazonas

Por estratégia de hibridação molecular, objetivou-se a união de núcleos moleculares já estudados em atividades biológicas diversas, para obtenção de novos derivados orgânicos com as porções tiofeno e tiossemicarbazonas, cujas modificações moleculares são oriundas dos isotiocianato utilizados nesta síntese.

A uma solução de 2-tiofeno-carboxaldeído (4) (0,1 mmol) em etanol absoluto (10 mL) foram adicionadas as tiossemicarbazidas substituídas (3), previamente sintetizadas (0,1 mmol), e 5-10 gotas de ácido acético glacial. A reação permaneceu sob agitação magnética, à temperatura ambiente por 2 horas. O precipitado (tiossemicarbazona) foi então filtrado, lavado com etanol e seco em dessecador para posterior caracterização estrutural e avaliação biológica (esquema 8).



Esquema 8. Rota sintética para obtenção das tiossemicarbazonas (5-14). Reagentes e condições: (a) hidrazina, isotiocianatos substituídos, diclorometano, temperatura ambiente, 120 minutos; (b) tiossemicarbazidas substituídas, 2-tiofeno-carboxaldeído, etanol, ácido acético glacial (5-10 gotas), temperatura ambiente, 120 minutos.

4.2 Metodologia Biológica

4.2.1 Avaliação antiproliferativa *in vitro*

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 cm³ (Costar/Corning), com 5 mL 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 CO₂. Foram inoculados 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc®), de cada suspensão celular, na densidade de inoculação adequada (4 - 7x10⁴ células/poço), em meio RPMI/5% SFB, acrescido de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, 1%).

Após 24 horas de incubação, a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, foram adicionados 100 µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL). Para preparação das amostras, uma alíquota de 5 mg de cada amostra foi dissolvida em 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 25 µL dessa solução-mãe foram dispersos em 475 µL de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta será então diluída sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/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 µg/mL. No momento da adição das amostras, foi realizada a fixação com ácido tricloroacético (TCA) a 50% da placa controle chamada T₀, o que permite determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48 horas de incubação, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1 hora 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

μL /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®), 10 μM 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_1 = absorbância do branco de células.

T_0 = absorbância do controle de células na placa T_0 .

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada, para cada uma das linhagens testadas. A concentração efetiva denominada GI_{50} (do inglês *growth inhibition*, concentração necessária para interromper em 50% o crescimento celular), foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 8.0.

4.2.2 Citometria de Fluxo

4.2.2.1 Medição de externalização de fosfatidilserina

A externalização de fosfatidilserina foi analisada por citometria de fluxo utilizando Guava® Nexin Assay Kit (Guava Technologies, Hayward, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Células da linhagem 786-0 foram inoculadas em placa de 12 poços (3×10^4 células/poço) e incubou-se durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO_2 . Em seguida, as células foram tratadas com o composto 7 (50 μM) em DMSO/meio RPMI durante 18 e 24 horas, colhidas e ressuspensas a uma densidade de 1×10^5 células em 100 μL de meio suplementado. Cem microlitros de tampão de

ligação contendo anexina-V e 7-AAD foram adicionados às células e incubadas no escuro durante 20 minutos à temperatura ambiente. Depois, as células foram analisadas por citometria de fluxo (Guava EasyCyte Mini - Guava Technologies, Hayward, CA). Foram coletados 5.000 eventos, como sugerido pelos protocolos de kits Guava EasyCyte. O experimento foi realizado em triplicata. Foram realizadas análises estatísticas para todos os experimentos e todas as significâncias foram mostradas como asteriscos, de acordo com o valor p.

4.2.2.2 Análise do ciclo celular

As análises do ciclo celular foram realizadas com o reagente Guava®Cell Cycle (Guava Technologies, Hayward, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Células da linhagem 786-0 foram inoculadas em placa de 12 poços (3×10^4 células/poço) e incubou-se durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram privadas de soro durante 24 horas para a sincronização do ciclo celular e, em seguida, tratado com o composto 7 (25 µM) e colchicina (Sigma-Aldrich, 1,25 nM) em DMSO/meio RPMI, durante 24 horas. Após o tratamento, as células foram colhidas e ressuspensas a uma densidade de 1×10^5 células em 100 µL de PBS. O tampão de ligação contendo iodeto de propídio (PI) foi adicionada às células (100 µL) e a suspensão foi incubada no escuro durante 20 minutos à temperatura ambiente. Depois, as células foram analisadas por citometria de fluxo (Guava EasyCyte Mini - Guava Technologies, Hayward, CA). Foram coletados 5.000 eventos, como sugerido pelos protocolos de kits Guava EasyCyte. O experimento foi realizado em triplicata. Foram realizadas análises estatísticas para todos os experimentos e todas as significâncias foram mostradas como asteriscos, de acordo com o valor p.

4.2.3 Animais utilizados nos experimentos

Todos os animais foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica-UNICAMP (CEMIB) e mantidos no biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia – CPQBA – UNICAMP em salas com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ$ C em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso livre à água e ração. Os cuidados

dos animais bem como os protocolos de pesquisa estão de acordo com os princípios e diretrizes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal do Instituto de Biologia – UNICAMP.

4.2.4 Ensaio de toxicidade aguda oral

O teste de toxicidade aguda oral foi baseado na OECD/OCDE - 425/2008 - OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP), com modificações. Grupos de três camundongos Swiss *Mus musculus* fêmeas pesando entre 25-30 gramas (g) foram deixados de jejum por 4 horas e tratados via oral (v.o.) com o composto 7 nas doses de 600, 400, 200 mg/Kg e salina 10 mL/Kg. Os animais foram observados continuamente nas primeiras 4 horas de avaliação a fim de verificar sinais clínicos de toxicidade e diariamente por 14 dias. Além disso, também foi acompanhado o peso dos animais nos tempos 0, 7 e 14 dias.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: efeitos na locomoção, comportamento (agitação, atividade reduzida, sonolência), respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades, straub, ptosis e mortalidade. Ao final do experimento os animais foram pesados, posteriormente submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e necropsiados permitindo observar macroscopicamente algum efeito tóxico nos órgãos dos animais.

4.2.5 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* através do modelo de Ehrlich de pata

As células de tumor de Ehrlich foram mantidas na sua forma ascítica, no peritônio dos camundongos (doadores), por passagens semanais de 5×10^5 células/animal. Para o experimento, animais doadores foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical e o líquido ascítico coletado e submetido à processamento (centrifugação por 5 minutos a 2500 rpm e ressuspensão do pellet em PBS) para preparo da suspensão celular.

Camundongos Balb/c fêmeas pesando entre 25-30 g foram divididos aleatoriamente em seis grupos de 8 animais cada e as células foram preparadas na densidade $2,5 \times 10^6$ células/30 μ L/animal. O volume basal da pata traseira direita dos animais foi mensurado em aparelho plestismômetro 7140 Ugo Basile e em seguida 30 μ L da suspensão celular preparada foi inoculada no subcutâneo da mesma pata. Após três dias do inóculo das células, deu-se início ao tratamento dos animais com os seguintes grupos experimentais: salina 10 mL/Kg; composto 7 30, 100, 300 mg/Kg, doxorrubicina (Eurofarma®) 3 mg/Kg e piroxicam 40 mg/Kg. O grupo experimental doxorrubicina foi tratado por via intraperitoneal a cada três dias. Os demais grupos foram tratados por via oral a cada dois dias. Para acompanhar o crescimento tumoral, as patas em que foram inoculadas as células foram analisadas através do plestismômetro a cada três dias. Adicionalmente, neste mesmo intervalo de tempo, o acompanhamento do peso dos animais também foi realizado.

Decorrido o tempo experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e necropsiados permitindo observar macroscopicamente algum efeito tóxico nos órgãos.

4.2.6 Avaliação da atividade anti-nociceptiva utilizando o modelo da formalina

Camundongos Swiss *Mus musculus* machos pesando entre 25-30 g foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 6 animais cada. Os animais foram deixados de jejum por 4 horas e pré-tratados com as amostras de interesse uma hora, salina 10 mL/Kg; composto 7 30, 100, 300 mg/Kg, e meia hora, morfina 5 mg/Kg, antes do início do experimento, administrados por via oral e intraperitoneal, respectivamente. Decorrido esse tempo, uma solução de formalina (formol: solução de tampão-fosfato) na concentração de 2,5% foi injetada no espaço subcutâneo da pata traseira direita dos camundongos.

A avaliação da nocicepção foi determinada por um período de 30 minutos, sendo divididas em duas fases: uma inicial (5 primeiros minutos) e uma tardia (15-30 minutos finais) onde foi observado o tempo de lambedura na pata onde foi aplicado o estímulo. Ao final do experimento os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e posteriormente descartados.

4.2.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.2.7.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Camundongos Swiss *Mus musculus* machos pesando entre 25-30 g foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 6 animais cada. Os animais foram deixados de jejum por 4 horas e pré-tratados com as amostras de interesse: salina 10 mL/Kg, dexametasona (Sigma®) 25 mg/Kg, composto 7 30, 100 e 300 mg/Kg administrados por via oral. Uma hora após o tratamento, 20 µL de óleo de cróton 5% diluídos em acetona 70% foram aplicados topicamente na orelha direita dos animais. Após 4 horas, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, fragmentos das orelhas esquerda e direita foram retirados, os resultados avaliados pela diferença de peso entre os fragmentos e em seguida descartados.

4.2.7.2 Edema de pata induzido por carragenina

Camundongos Balb/c machos pesando entre 25-30 g foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 8 animais cada. Os animais foram deixados de jejum por 4 horas e pré-tratados com as amostras de interesse: salina 10 mL/Kg, dexametasona (Sigma®) 25 mg/Kg, composto 7 30, 100 e 300 mg/Kg administrados por via oral. Uma hora após o tratamento, 30 µL de uma solução de carragenina 3% (Sigma-Aldrich®) diluídos em solução de tampão-fosfato foi injetada no subcutâneo da pata traseira direita dos animais.

A medida do edema da pata foi mensurada utilizando o aparelho de plestismômetro 7140 Ugo Basile após 1, 2, 4, 6 e 24 horas da administração da carragenina. Os resultados foram expressos como a variação do volume da pata comparados com o volume basal (%).

4.2.7.3 Edema de pata induzido pelo composto 48/80

Camundongos Balb/c machos pesando entre 25-30 g foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 6 animais cada. Os animais foram deixados de jejum por 4 horas e pré-tratados com as amostras de interesse uma hora, salina 10

mL/Kg; composto 7 30, 100, 300 mg/Kg, e meia hora, ciproheptadina (Periactin®) 4 mg/Kg, administrados por via oral e intraperitoneal, respectivamente. Decorrido esse tempo, 30 µL de composto 48/80 (Sigma®) em solução de tampão-fosfato, 10 µg/animal foram administrados no subcutâneo da pata traseira direita dos animais.

A medida do edema da pata foi mensurada utilizando o aparelho de plestismômetro 7140 Ugo Basile após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da administração do composto 48/80. Os resultados foram expressos como a variação do volume da pata comparados com o volume basal (%).

4.2.8 Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos como a média $\pm$ erro padrão (S.E.) sendo pela análise de variância (ANOVA) *one-way* e *two-way*, seguida do teste de comparação de média, Turkey e Bonferroni. Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância e representados por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico *GraphPad Prism* versão 5.0, San Diego Califórnia, EUA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

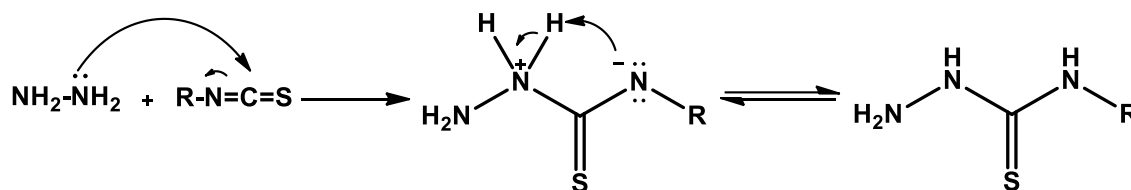
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Química

5.1.1 Mecanismos reacionais e caracterização espectroscópica

A síntese dos compostos de interesse nesse estudo se deu em duas etapas. Inicialmente foram obtidas as tiossemicarbazidas em uma reação entre a hidrazina e isotiocianatos substituídos. No total, 10 tiossemicarbazidas foram sintetizadas e as substituições encontradas são oriundas do isotiocianato de escolha.

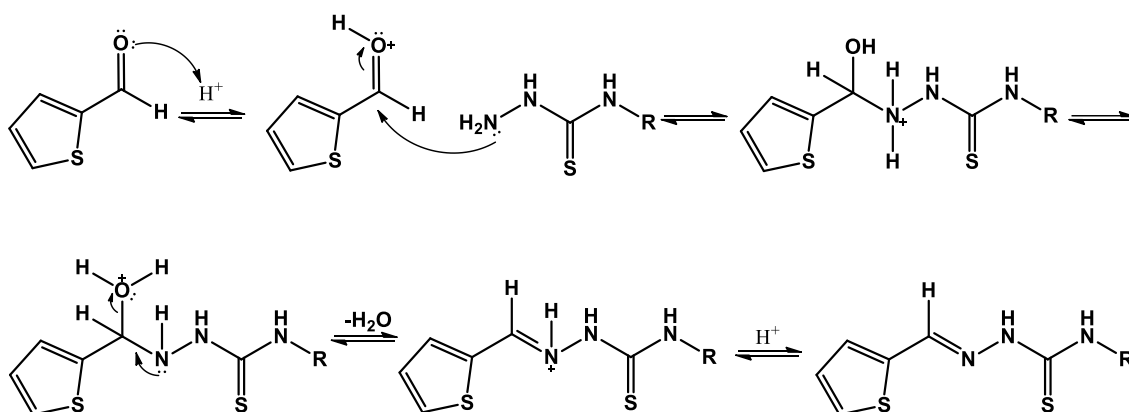
A reação entre a hidrazina e isotiocianatos é possível visto que o par de elétrons livres presente no nitrogênio da hidrazina tem um caráter nucleofílico e ataca facilmente o carbono parcialmente positivo do isotiocianato (sistema $-N=C=S$) que atua como o eletrófilo na reação. Posteriormente ao ataque nucleofílico, ocorre a quebra da ligação *pi* e os elétrons migram para o nitrogênio devido a sua alta eletronegatividade. Em seguida, ocorre um equilíbrio e balanço de cargas, onde o nitrogênio com excesso de elétrons desprotona o nitrogênio carregado positivamente, reestabelecendo a carga formal zero, a fim de gerar a tiossemicarbazida de interesse (Tenório et al., 2005) (esquema 9).



Esquema 9. Mecanismo reacional para a formação das tiossemicarbazidas substituídas

As tiossemicarbazidas previamente sintetizadas, serviram como intermediárias na obtenção das tiossemicarbazonas de interesse nesse trabalho. Para tal, também foi utilizado o 2-tiofeno-carboxaldeído que gerou as 10 tiossemicarbazonas finais. O mecanismo reacional envolvido nesta etapa compreendeu inicialmente a protonação do oxigênio do aldeído através do uso do ácido acético glacial gerando o íon oxônio. Em seguida, ocorreu o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio N¹ da tiossemicarbazida ao carbono do

aldeído protonado, com posterior quebra da ligação *pi* e formação da função álcool. Posteriormente, ocorre um prototropismo, onde há a transferência do próton do nitrogênio para o oxigênio. Isso ocorre com a finalidade de facilitar a desidratação seguinte, com a deslocalização do par de elétrons do nitrogênio, e formação final da tiossemicarbazona gerando a função imina (Aquino, 2007) (esquema 10).



Esquema 10. Mecanismo reacional para formação das 2-tiofeno-tiossemicarbazonas.

Uma vez sintetizadas, as tiossemicarbazonas podem assumir duas configurações: *Z* ou *E* (figura 13). O hidrogênio da ligação azometínica é o que determina a preferência por um desses dois diastereoisômeros ou da obtenção da mistura dos dois isômeros. Nos nossos compostos obtidos, só foi observada uma mancha na cromatografia em camada delgada (CCD), sugerindo a formação de somente um isômero. Adicionalmente, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) revelou apenas um sinal referente ao hidrogênio da ligação azometínica, evidenciando também a preferência pela formação de apenas um dos diastereoisômeros. Alguns estudos de cristalografia de raio-X confirmam a preferência da configuração *E* para as tiossemicarbazonas (Cardoso et al., 2014), a partir dos quais podemos sugerir que nossos compostos também foram obtidos nessa configuração.

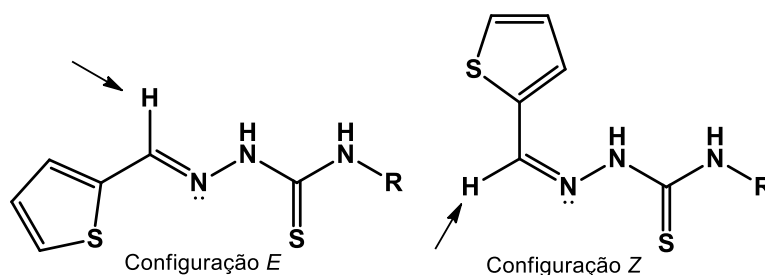


Figura 13. Exemplificação das possíveis configurações de obtenção das tiosemicarbazonas evidenciando a posição do hidrogênio azometínico.

Em relação à caracterização estrutural dos novos compostos obtidos, esta se deu através de análises espectroscópicas e espectrométricas. A espectroscopia de absorção do infravermelho revelou bandas e estiramentos característicos relativos às tiosemicarbazonas. Já a espectroscopia de ressonância magnética nuclear elucidou todos os hidrogênios e carbonos da estrutura dos nossos compostos. A espectrometria de massas serviu como ferramenta na caracterização da massa molecular dos compostos obtidos. Para uma melhor análise, escolhemos o composto JF-6 para comentar sobre a sua caracterização.

Na análise do infravermelho do derivado JF-6 foi possível observar a banda de absorção em 3143 e 3296 cm^{-1} atribuídas aos grupos NH presentes na estrutura dos nossos compostos. Além disso, um estiramento bastante intenso em 1547 cm^{-1} foi evidenciado e atribuído à ligação C=N. Por fim, outro estiramento característico nas tiosemicarbazonas é o referente a ligação C=S, que no derivado JF-6 apareceu em 1521 cm^{-1} . Em todos os espectros de infravermelho analisados foi verificada a ausência de bandas na faixa de $2500\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$, o que evidencia que nossos compostos foram obtidos na forma tautomérica tiona (Sarma e Bailar, 1955). Na figura 14 podemos observar a ilustração do espectro de infravermelho para o composto JF-6 e as principais bandas e estiramentos característicos descritos.

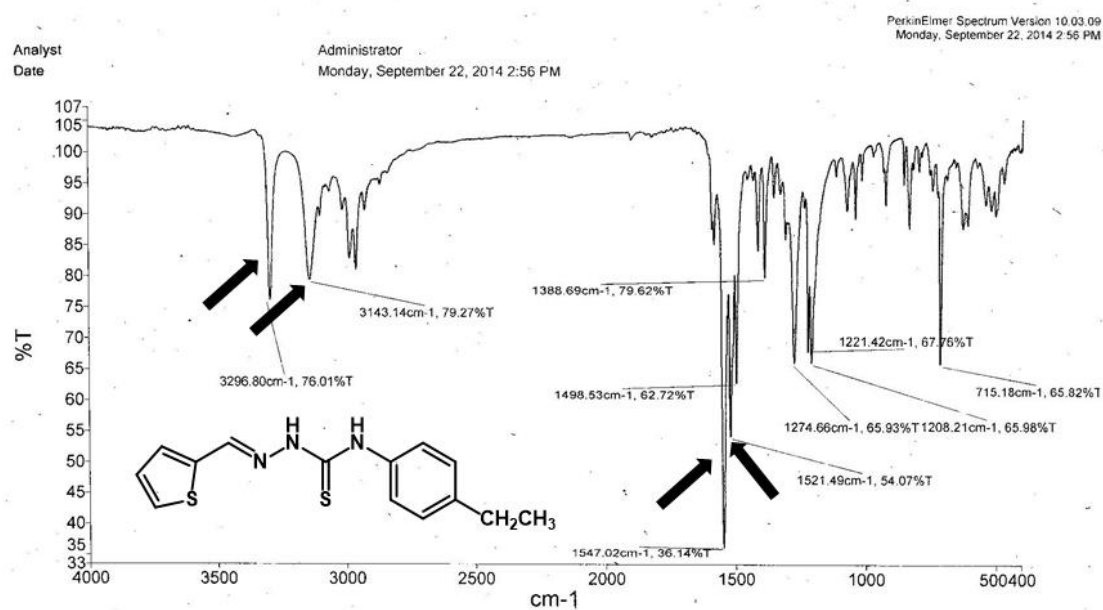


Figura 14. Espectro de infravermelho do derivado tiossemicarbazônico JF-6.

A caracterização dos hidrogênios da molécula se deu através da análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H). Foi possível observar diversos sinais relativos aos diferentes tipos de hidrogênios presentes no composto JF-6 (figura 15).

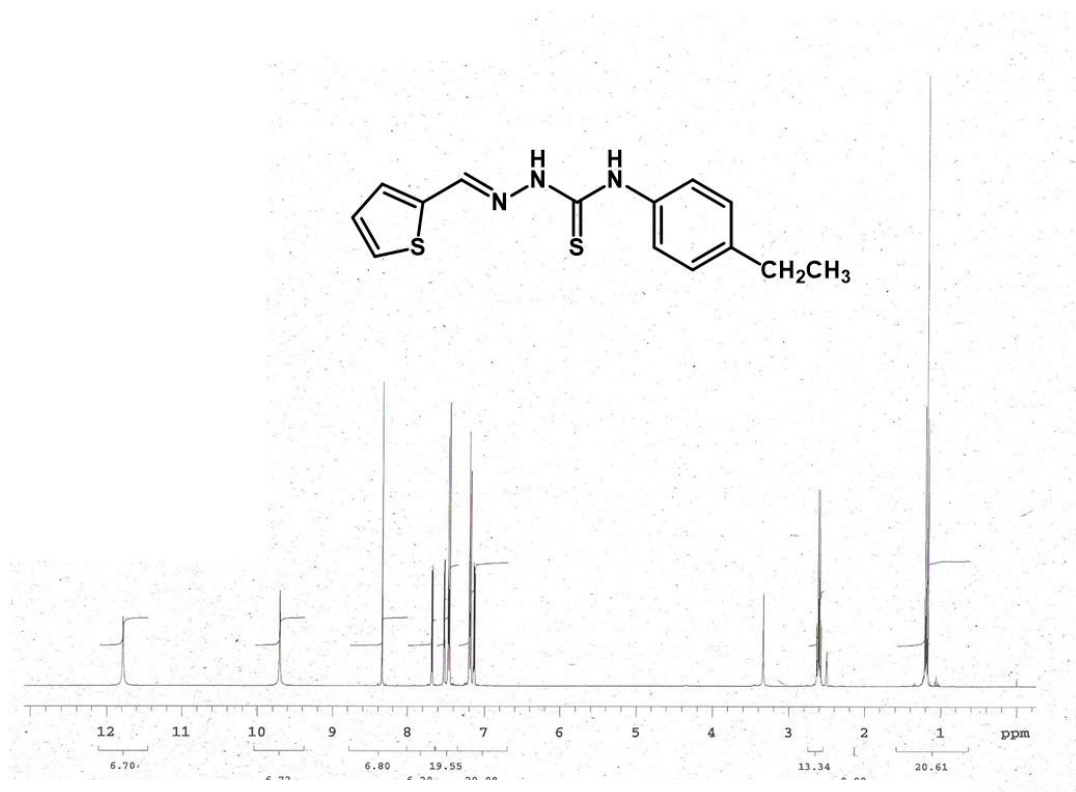


Figura 15. Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto JF-6

Na região de campo baixo (hidrogênios blindados), identificamos dois sinais referentes aos hidrogênios CH₂ e CH₃ do grupamento etila que se encontra *para* substituído no anel fenil. Eles se apresentaram com tripleto (CH₃) δ 1.19 ppm e quarteto (CH₂) δ 2.60 ppm (figura 16). Na região de campo alto (hidrogênios desblindados) foi possível caracterizar os demais hidrogênios presentes no nosso composto. Os simpletos encontrados em δ 8.33, 9.70 e 11.76 ppm correspondem aos hidrogênios: CH azometínicos, NH aromático e NH hidrazínico, respectivamente (Aquino, 2007).

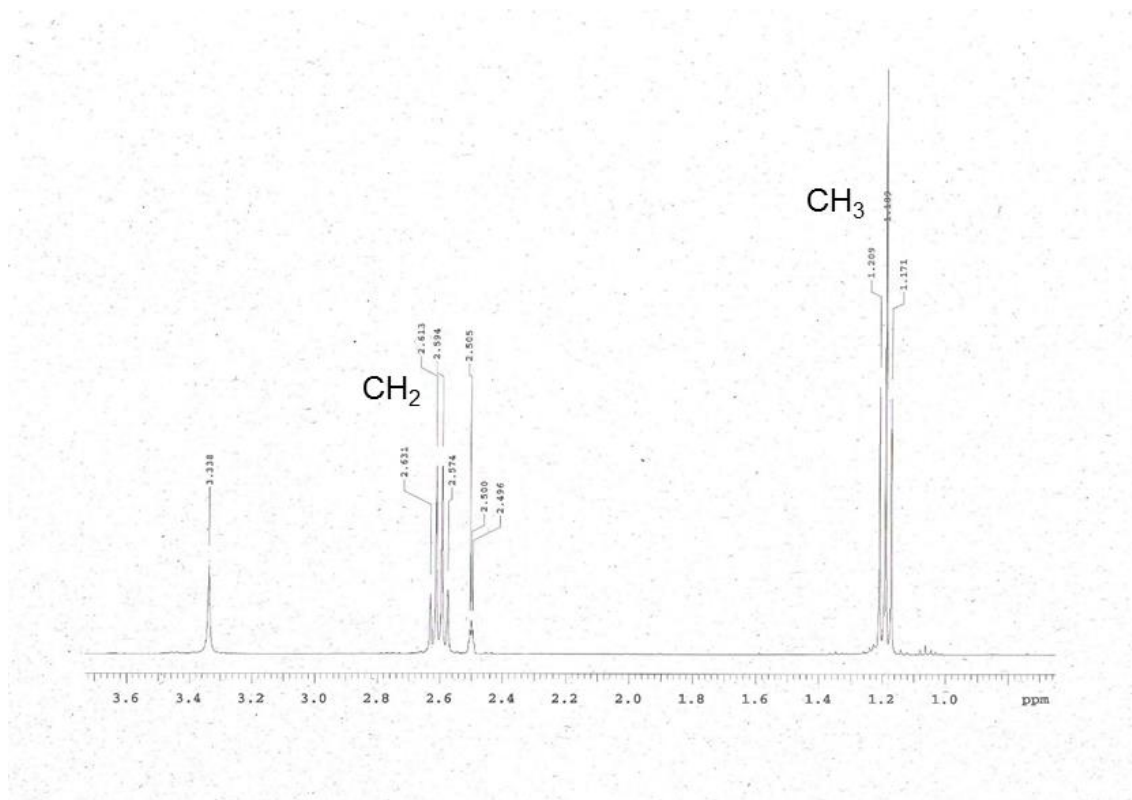


Figura 16. Ampliação do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto JF-6 evidenciando os hidrogênios do grupamento etila.

Além disso, também foi possível identificar os hidrogênios do anel fenil. Todos eles se apresentaram no espectro como dois dupletos cada um integrando para dois hidrogênios, devido à uma substituição em *para* no anel fenil, que garante uma simetria entre os hidrogênios presentes nesse anel. Os deslocamentos químicos encontrados foram δ 7.18 ppm referente aos dois hidrogênios mais próximos do nitrogênio, e δ 7.45 ppm referente aos dois hidrogênios mais próximos do grupo etila (figura 17).

Os três hidrogênios presentes no anel tiofeno também foram identificados. Eles se apresentaram como dois dupletos e um duplo duplete. O hidrogênio central mostrou dois acoplamentos (duplo duplete) sendo este com deslocamento em δ 7.13 ppm. Os demais hidrogênios (dupletos) foram identificados em δ 7.53 e 7.68 ppm, sendo este último o hidrogênio mais próximo do átomo de enxofre (figura 17).

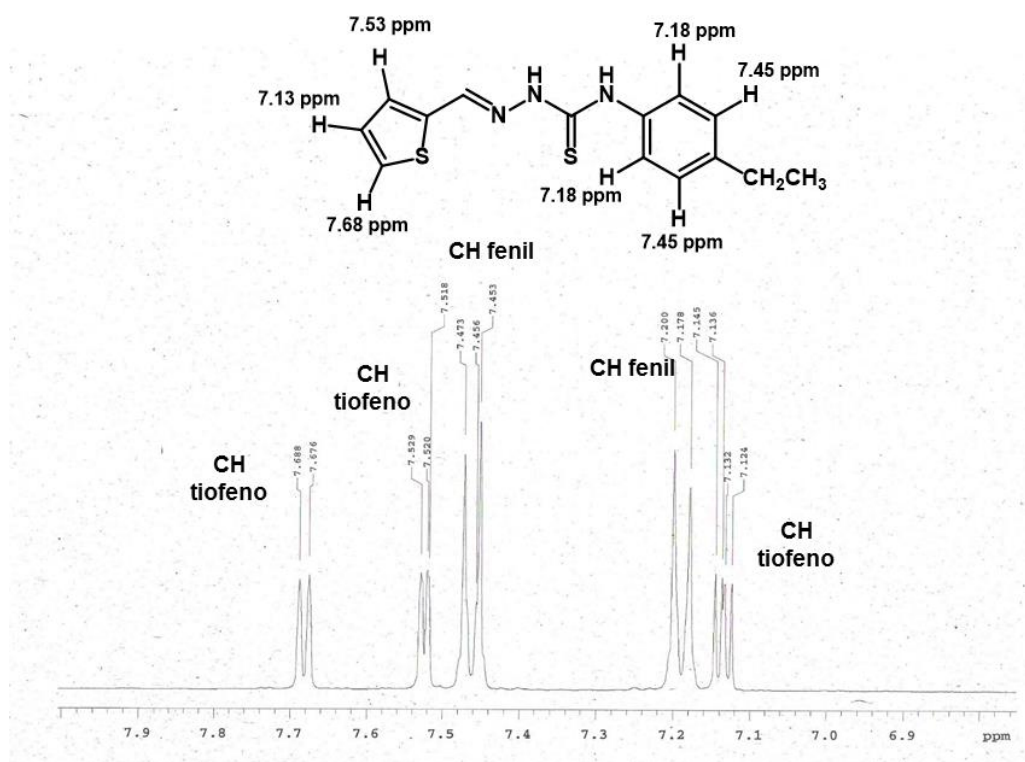


Figura 17. Ampliação do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do composto JF-6 evidenciando os hidrogênios do anel fenil e tiofeno.

Com o intuito de confirmar os acoplamentos entre os hidrogênios presentes nesta estrutura, foi utilizada a técnica de COSY (*homonuclear CORrelation Spectroscopy*) onde é possível estabelecer as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por $^2\text{-}^3J_{\text{H,H}}$ (Kaiser, 2000).

Dessa maneira, foi verificado que os hidrogênios da etila (CH_2 e CH_3) de fato estavam acoplando entre si, devido a presença de uma correlação mútua entre os sinais referentes à esses hidrogênios (figura 18). Com relação aos hidrogênios do anel tiofeno, foi possível verificar que o sinal em δ 7.13 ppm possuía duas correlações com os hidrogênios em δ 7.53 e 7.68 ppm. Da mesma forma, os

hidrogênios em δ 7.53 e 7.68 ppm possuía cada um uma correlação com o hidrogênio em δ 7.13 ppm, confirmando o acoplamento entre esses hidrogênios do anel tiofeno (figura 18). Para os hidrogênios do anel fenil, também foi visto que havia uma correlação mútua entre os hidrogênios em δ 7.18 e 7.45 ppm, corroborando com o que foi verificado do espectro de RMN ^1H (figura 18).

Os demais hidrogênios, por se apresentarem como simpletos, eles não possuem acoplamento nem correlações no COSY, por isso não foram evidenciados nesta análise.

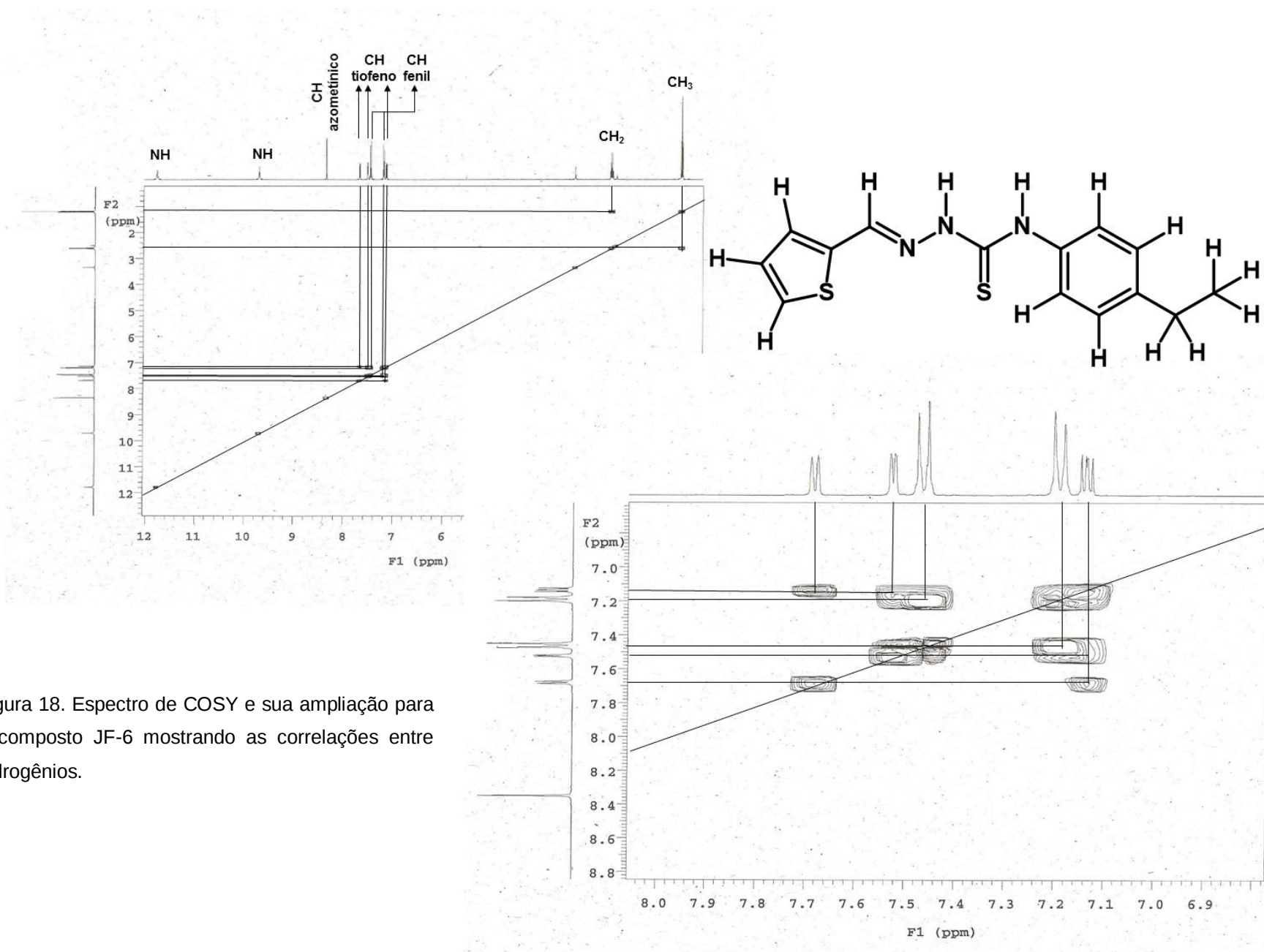


Figura 18. Espectro de COSY e sua ampliação para o composto JF-6 mostrando as correlações entre hidrogênios.

A análise para confirmação da quantidade e tipos de carbonos presentes na estrutura do composto JF-6 foi realizada utilizando a análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN ^{13}C) e DEPT.

O espectro de RMN ^{13}C revelou doze diferentes tipos de carbonos presentes no derivado tiossemicarbazônico, sendo que destes, dois foram encontrados abaixo da escala de 100 ppm e os demais, acima desta mesma escala. Os sinais em δ 15.66 e 27.70 ppm, correspondem aos carbonos CH_3 e CH_2 , respectivamente, encontrados na etila que está substituída no anel fenil. Estes dois sinais também foram confirmados através do DEPT.

Dos dez sinais restantes, quatro são pertencentes à carbonos quaternários (δ 136.56, 138.39, 140.76 e 175.53 ppm) e seis à carbonos da ligação CH (δ 125.39, 127.35, 127.94, 129.14, 130.83 e 137.88 ppm), todos também confirmados através do DEPT (figura 19).

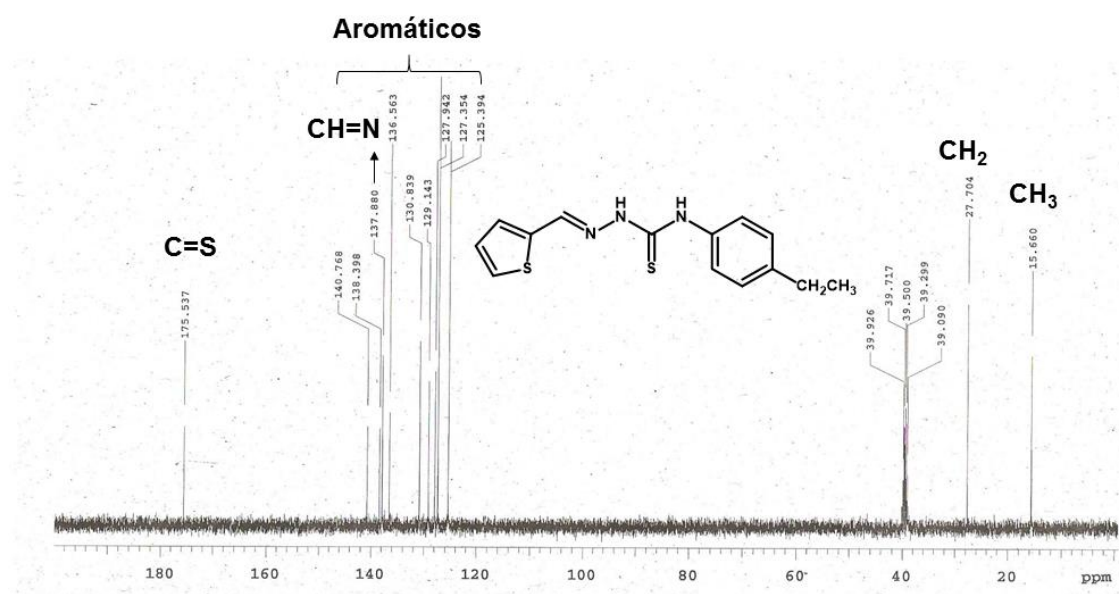


Figura 19. Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN ^{13}C) do composto JF-6.

Além disso, também foi possível evidenciar sinais químicos referentes ao carbono da tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$) δ 175.53 ppm e ao carbono azometínico ($\text{CH}=\text{N}$) δ 137.88 ppm, característicos da formação da tiossemicarbazona.

Para uma melhor elucidação da estrutura da molécula, também foi utilizada a técnica espectroscópica de HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*

Spectroscopy). Com este experimento foi possível identificar qual carbono está ligado ao seu respectivo hidrogênio, caso já tenham sido identificados todos os hidrogênios do espectro de RMN ^1H , ou vice e versa, pois a técnica depende dos acoplamentos $^1J_{\text{C,H}}$ (Kaiser, 2000).

Como já havia sido elucidado em análises anteriores como RMN ^1H e ^{13}C , os carbonos e hidrogênios da etila confirmaram as ligações dos seus hidrogênios aos seus respectivos carbonos. Sendo assim, o carbono δ 15.66 ppm está ligado ao hidrogênio em δ 1.19 ppm, da mesma forma que o carbono δ 27.70 ppm está ligado ao hidrogênio δ 2.60 ppm (figura 20).

Com relação ao anel fenil, também foi possível identificar qual carbono se encontrava ligado ao hidrogênio caracterizado pelo RMN ^1H . Dessa maneira, o carbono encontrado em δ 125.39 ppm se encontra ligado ao hidrogênio em δ 7.45 ppm (hidrogênio que está mais próximo do nitrogênio N^4), já o carbono que exibiu um sinal em δ 127.35 ppm se encontra ligado ao hidrogênio em δ 7.18 ppm (hidrogênio mais próximo ao grupo etila) (figura 20).

O anel tiofeno também teve os seus carbonos da ligação CH elucidados. Os carbonos em δ 127.94, 129.14 e 130.83 ppm se encontram diretamente ligados aos hidrogênios em δ 7.13, 7.68 e 7.53 ppm, respectivamente. A confirmação do carbono azometínico se deu através desta técnica espectroscópica, onde foi possível verificar a correlação existente entre o carbono em δ 137.88 ppm e o hidrogênio em δ 8.33 ppm, concluindo as ligações entre carbonos e hidrogênios (figura 20).

Como a análise descrita anteriormente fornece dados relativos ao acoplamento $^1J_{\text{C,H}}$, não foi possível evidenciar os carbonos quaternários restantes em δ 136.56, 138.39 e 140.76 ppm, os quais são dois do anel fenil e um do anel tiofeno. Da mesma forma em que os hidrogênios ligados aos nitrogênios (NH) também não apareceram na análise do HSQC. No entanto, tais hidrogênios encontram-se devidamente elucidados através da análise de RMN ^1H .

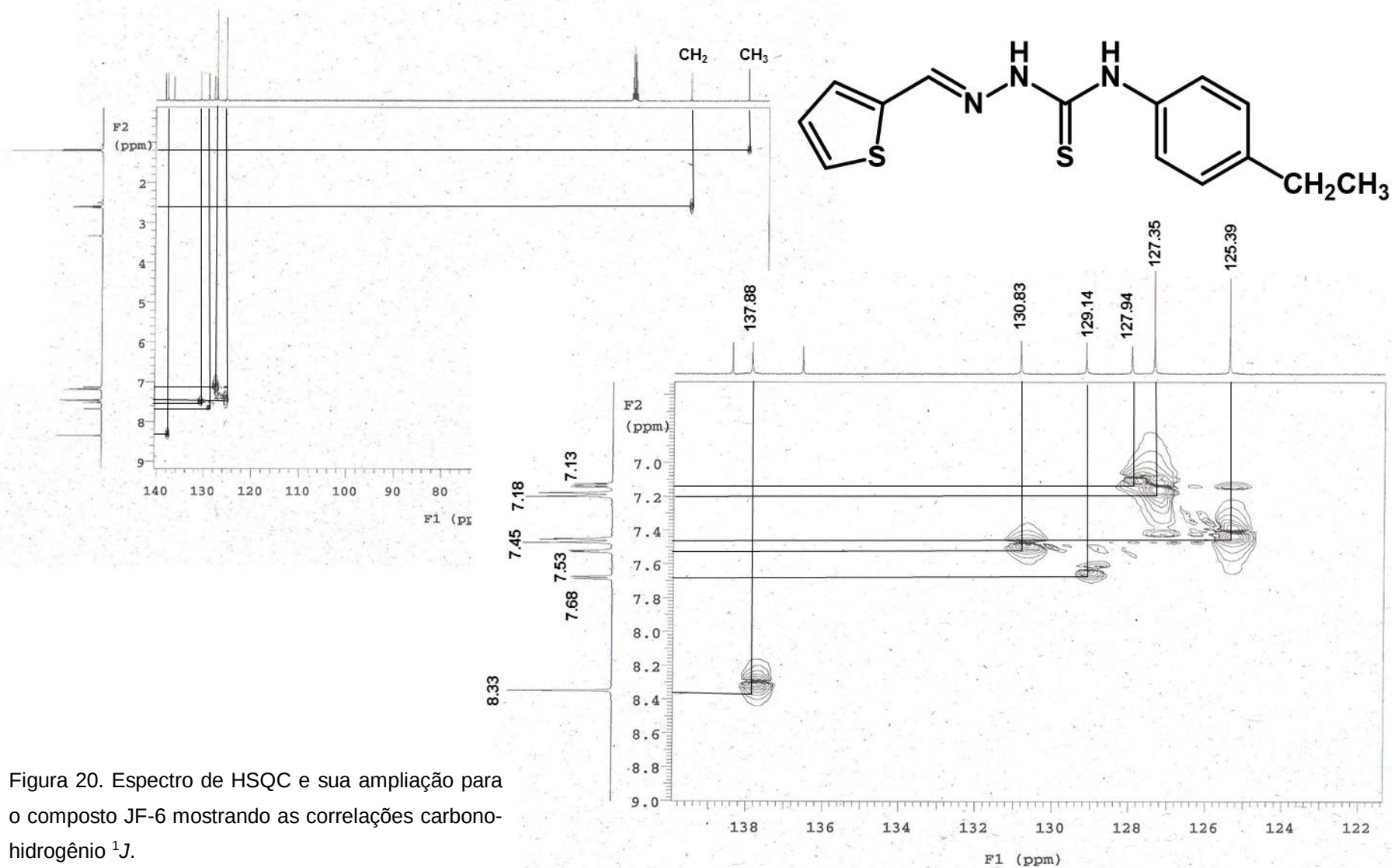


Figura 20. Espectro de HSQC e sua ampliação para o composto JF-6 mostrando as correlações carbono-hidrogênio ^1J .

A espectrometria de massas foi utilizada como ferramenta auxiliar para a caracterização dos compostos desta série e para isso foi utilizada a técnica de TOF (*time of flight*), onde as amostras são ionizadas e um detector capta um quantitativo desses íons a depender da massa gerada (Silverstein, Webster e Kiemle, 2005).

O composto JF-6 teve sua massa molecular teórica calculada no software ChemBioDraw Ultra 12.0, onde foi encontrado o valor de 289.070 g/mol. Após submeter o derivado JF-6 a esta análise foi encontrado o valor de 290.083 como principal pico do espectro de massas, evidenciando a ionização da molécula e confirmando a massa molecular do composto (figura 21).

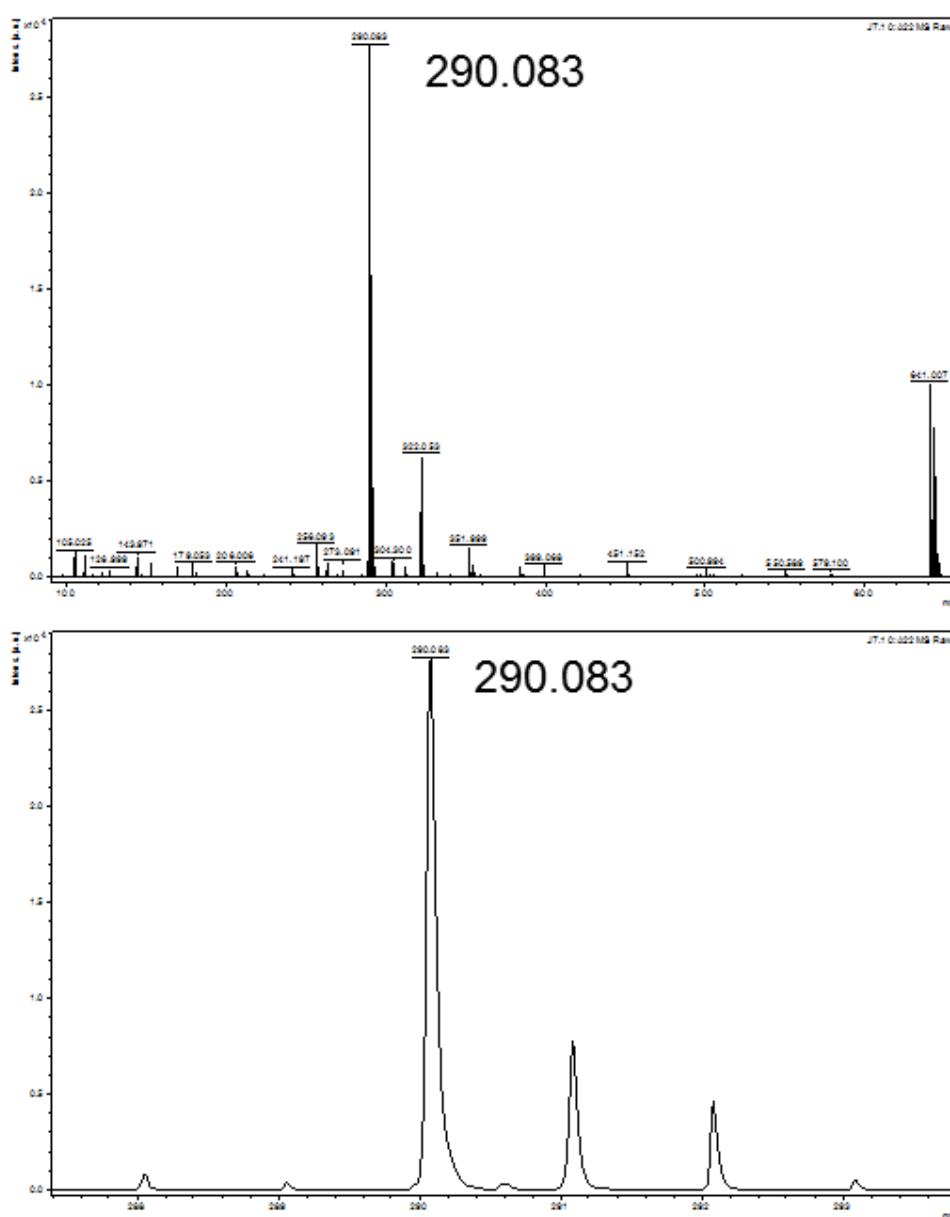
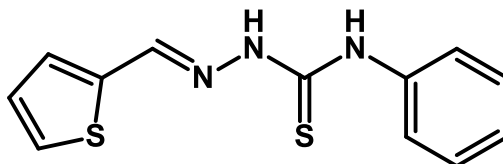


Figura 21. Espectro de massas do composto JF-6 e o pico do íon molecular.

5.1.2 Dados espectroscópicos e espectrométricos dos derivados tiofeno-tiossemicarbazônicos

5.1.2.1 *N*-fenil-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotioamida (JF-1)



$C_{12}H_{11}N_3S_2$. Rendimento: 65%. Faixa de fusão: 158° C. Rf 0,40 (*n*- hexano/acetato de etila, 9:1).

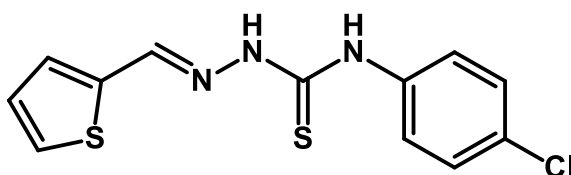
IR (KBr, cm^{-1}): 1556 (C=S), 1591 (C=N), 3101 (NH), 3285 (NH).

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7.14 (t, 1H, $J=4$ Hz, CH tiofeno), 7.19 (t, 1H, $J=7,6$ Hz, CH fenil), 7.35 (d, 2H, $J=7,6$ Hz, CH fenil), 7.54 (d, 1H, $J=3,2$ Hz, CH tiofeno), 7.57 (d, 2H, $J=8$ Hz, CH fenil), 7.69 (d, 1H, $J=4,8$ Hz, CH tiofeno), 8.35 (s, 1H, HC=N), 9.80 (s, 1H, NH), 11.82 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 125.20, 125.39, 127.95, 128.07, 129.22, 130.94, 138.02, 138.35, 138.94, 175.51.

MS [M-H] $^+$: calculado= 261.039; encontrado= 262.056.

5.1.2.2 *N*-(4-clorofenil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotioamida (JF-2)



$C_{12}H_{10}ClN_3S_2$. Rendimento: 57%. Faixa de fusão: 180° C. Rf 0,40 (*n*- hexano/acetato de etila, 9:1).

IR (KBr, cm^{-1}): 1556 (C=S), 1591 (C=N), 3100 (NH), 3287 (NH).

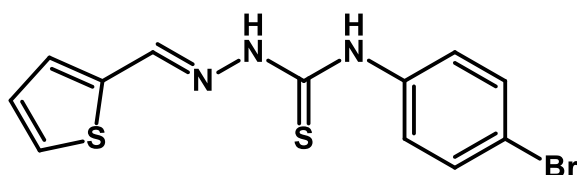
RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7.13 (t, 1H, $J=4,4$ Hz, CH tiofeno), 7.40 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, CH fenil), 7.53 (d, 1H, $J=3,6$ Hz, CH tiofeno), 7.61 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, CH

fenil), 7.69 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz, CH tiofeno), 8.36 (s, 1H, HC=N), 9.88 (s, 1H, NH), 11.91 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 127.17, 127.94, 127.97, 129.20, 129.37, 131.11, 138.01, 138.26, 138.38, 175.54.

MS $[\text{M-H}]^+$: calculado= 295.000; encontrado= 296.024.

5.1.2.3 *N*-(4-bromofenil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoioamida (JF-3)



$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{S}_2$. Rendimento: 69%. Faixa de fusão: 192°C . Rf 0,40 (*n*- hexano/acetato de etila, 9:1).

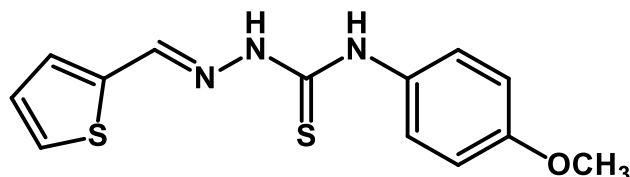
IR (KBr, cm^{-1}): 1552 (C=S), 1589 (C=N), 3288 (NH).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7.13 (t, 1H, $J = 4$ Hz, CH tiofeno), 7.52 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, CH fenil), 7.53 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz, CH tiofeno), 7.57 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, CH fenil), 7.67 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, CH tiofeno), 8.37 (s, 1H, HC=N), 9.86 (s, 1H, NH), 11.92 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 117.48, 127.46, 127.98, 129.36, 130.88, 131.12, 138.26, 138.42, 175.45.

MS $[\text{M-H}]^+$: calculado= 338.950; encontrado= 339.978.

5.1.2.4 *N*-(4-metóxfenil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoioamida (JF-4)



$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{OS}_2$. Rendimento: 87%. Faixa de fusão: 180°C . Rf 0,68 (*n*- hexano/acetato de etila, 7:3).

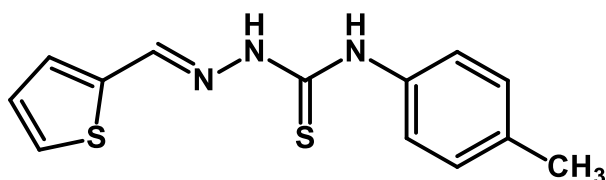
IR (KBr, cm^{-1}): 1521 (C=S), 1547 (C=N), 3129 (NH), 3332 (NH).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 3.72 (s, 3H, OCH₃), 6.91 (d, 2H, J = 9,2 Hz, CH fenil), 7.13 (dd, 1H, J_1 = 4.8 Hz, J_2 = 5.2 Hz CH tiofeno), 7.39 (d, 2H, J = 9,2 Hz, CH fenil), 7.51 (d, 1H, J = 3,2 Hz, CH tiofeno), 7.68 (d, 1H, J = 4,8 Hz, CH tiofeno), 8.32 (s, 1H, HC=N), 9.67 (s, 1H, NH), 11.72 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 55.23, 113.28, 127.27, 127.95, 129.13, 130.80, 131.86, 137.81, 138.43, 156.90, 175.93.

MS [M-H]⁺: calculado= 291.050; encontrado= 292.070.

5.1.2.5 *N*-(4-tolil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-5)



C₁₃H₁₃N₃S₂. Rendimento: 40%. Faixa de fusão: 140° C. Rf 0,45 (*n*- hexano/acetato de etila, 8:2).

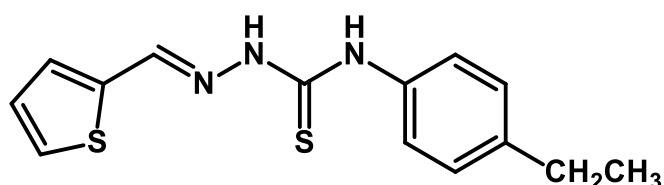
IR (KBr, cm⁻¹): 1557 (C=S), 1593 (C=N), 3133 (NH), 3297 (NH).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 2.50 (s, 3H, CH₃), 7.13 (dd, 1H, J_1 = 4.4 Hz, J_2 = 4.8, CH tiofeno), 7.15 (d, 2H, J = 8 Hz, CH fenil), 7.42 (d, 2H, J = 8.4 Hz, CH fenil), 7.52 (d, 1H, J = 3,6 Hz, CH tiofeno), 7.69 (d, 1H, J = 4.8 Hz, CH tiofeno), 8.33 (s, 1H, HC=N), 9.70 (s, 1H, NH), 11.76 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 20.54, 125.36, 127.93, 128.52, 129.13, 130.82, 134.35, 136.38, 137.87, 138.39, 175.57.

MS [M-H]⁺: calculado= 275.055; encontrado= 276.089.

5.1.2.6 *N*-(4-etilfenil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-6)



C₁₄H₁₅N₃S₂. Rendimento: 55%. Faixa de fusão: 180° C. Rf 0,46 (*n*- hexano/acetato de etila, 7:3).

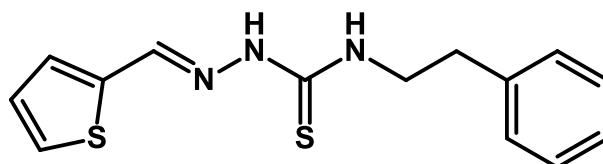
IR (KBr, cm^{-1}): 1521 (C=S), 1547 (C=N), 3143 (NH), 3296 (NH).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 1.19 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz, CH_3), 2.60 (q, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 7.13 (dd, 1H, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 5.2$, CH tiofeno), 7.18 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, CH fenil), 7.45 (d, 2H, $J = 8$ Hz, CH fenil), 7.53 (d, 1H, $J = 4$ Hz, CH tiofeno), 7.68 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, CH tiofeno), 8.33 (s, 1H, HC=N), 9.70 (s, 1H, NH), 11.76 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 15.64, 27.67, 125.40, 127.33, 127.93, 129.15, 130.83, 136.57, 137.88, 138.39, 140.74, 175.52.

MS $[\text{M}-\text{H}]^+$: calculado= 289.070; encontrado= 290.083.

5.1.2.7 *N*-fenetil-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-7)



$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{S}_2$. Rendimento: 81%. Faixa de fusão: 146° C. Rf 0,56 (*n*- hexano/acetato de etila, 7:3).

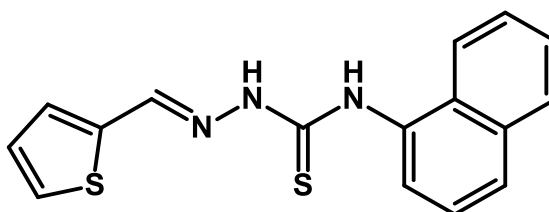
IR (KBr, cm^{-1}): 1523 (C=S), 1546 (C=N), 3353 (NH).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 2.90 (t, 2H, $J = 8$ Hz, CH_2), 3.75 (q, 2H, $J = 6$ Hz, CH_2), 7.11 (dd, 1H, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz CH tiofeno), 7.20-7.34 (m, 5H, CH fenil), 7.43 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, CH tiofeno), 7.66 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, CH tiofeno), 8.12 (t, 1H, $J = 6$ Hz, NH), 8.24 (s, 1H, HC=N), 11.50 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 34.72, 45.03, 126.20, 127.91, 128.47, 128.58, 128.76, 130.59, 137.33, 138.60, 139.20, 176.55.

MS $[\text{M}-\text{H}]^+$: calculado= 289.070; encontrado= 290.098.

5.1.2.8 *N*-(naftalen-1-il)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotoamida (JF-8)



$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{S}_2$. Rendimento: 80%. Faixa de fusão: 203° C. Rf 0,59 (*n*- hexano/acetato de etila, 8:2).

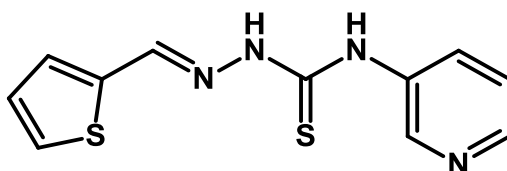
IR (KBr, cm^{-1}): 1519 (C=S), 1543 (C=N), 3139 (NH), 3328 (NH).

RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 7.14 (dd, 1H, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, CH tiofeno), 7.51-7.55 (m, 4H, naftalen-1-il), 7.57 (d, 1H $J = 5.4$ Hz, CH tiofeno), 7.79 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, CH tiofeno), 7.83-7.99 (m, 3H, naftalen-1-il), 8.40 (s, 1H, HC=N), 10.10 (s, 1H, NH), 11.92 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 123.54, 125.86, 126.46, 127.25, 128.49, 129.66, 131.28, 132.56, 135.93, 138.40, 151.59, 167.65, 177.79.

MS $[\text{M}-\text{H}]^+$: calculado= 311.055; encontrado= 312.071.

5.1.2.9 *N*-(piridin-3-il)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotioamida (JF-9)



$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S}_2$. Rendimento: 79%. Faixa de fusão: 176° C. Rf 0,40 (*n*- hexano/acetato de etila, 7:3).

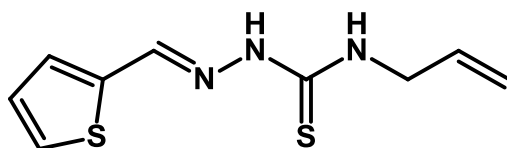
IR (KBr, cm^{-1}): 1519 (C=S), 1543 (C=N), 3133 (NH), 3295 (NH).

RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 7.14 (dd, 1H, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, CH tiofeno), 7.39 (m, 1H, piridin-3-il), 7.54 (d, 1H $J = 3.6$ Hz, CH tiofeno), 7.71 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, CH tiofeno), 7.97 (m, 1H, piridin-3-il), 8.36 (s, 1H, HC=N), 8.38 (m, 1H, piridin-3-il), 8.66 (s, 1H, piridin-3-il), 9.97 (s, 1H, NH), 11.97 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 122.84, 127.95, 129.48, 131.21, 133.33, 135.86, 138.18, 138.64, 145.99, 147.18, 176.18.

MS $[\text{M}-\text{H}]^+$: calculado= 262.034; encontrado= 263.061.

5.1.2.10 *N*-alil-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazinacarbotioamida (JF-10)



$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}_2$. Rendimento: 65%. Faixa de fusão: 143° C. Rf 0,50 (*n*- hexano/acetato de etila, 8:2).

IR (KBr, cm^{-1}): 1533 (C=S), 1553 (C=N), 3358 (NH).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 4.20 (t, 2H, $J= 5,6$ Hz, alil), 5.09 (d, 1H, $J= 10,4$ Hz, alil), 5.14 (d, 1H, $J= 17,2$ Hz, alil), 5.95-5.86 (m, 1H, alil), 7.11 (m, 1H, CH tiofeno), 7.44 (d, 1H, $J= 3,6$ Hz, CH tiofeno), 7.64 (d, 1H, $J= 5,2$ Hz, CH tiofeno), 8.23 (m, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, HC=N), 11.51 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 45.69, 115.55, 127.89, 128.74, 130.55, 134.98, 137.42, 138.54, 176.80.

MS $[\text{M-H}]^+$: calculado= 225.039; encontrado= 226.070.

5.2 Avaliação biológica

5.2.1 Avaliação *in vitro*

Neste ensaio biológico, 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 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) (Shoemaker, 2006; Skehan et al, 1990).

A Tabela 1 resume os efeitos antiproliferativos dos novos derivados 2-tiofenotiossemicarbazônicos frente a nove linhagens tumorais e a uma linhagem não tumoral, utilizando a doxorrubicina como padrão. Dos dez derivados analisados, cinco demonstraram maior potência sobre a inibição do crescimento desses tipos celulares representados pelo GI_{50} (μM). Todos os derivados avaliados apresentam em sua estrutura o núcleo tiofênico, sendo as modificações visualizadas na porção distal dos compostos.

O JF-1 representa o esqueleto base dessa série de derivados, onde na porção fenílica não há nenhum tipo de substituição. Esse composto não exerceu atividade sobre a maioria das linhagens tumorais. A linhagem de leucemia (K-562) foi a única que se mostrou sensível a este derivado apresentando valor de GI_{50} de 16.7 μ M. Inicialmente, observamos que o derivado JF-3 (figura 22) se destacou dentre os demais compostos. Este apresenta como substituição a porção *p*-bromo-fenil. Ele se mostrou ativo contra nove das dez linhagens avaliadas, apresentando valores de GI_{50} variando entre 0.74 e 79.4 μ M e paralelamente se mostrou inativo contra a linhagem K-562 (leucemia) com um valor de GI_{50} maior que 100 μ M (maior concentração utilizada na avaliação). Já o seu análogo halogenado, JF-2 (*p*-cloro-fenil) se destacou frente às linhagens de glioma (U251), ovário (NCI-ADR/RES), rim (786-0) e leucemia (K-562).

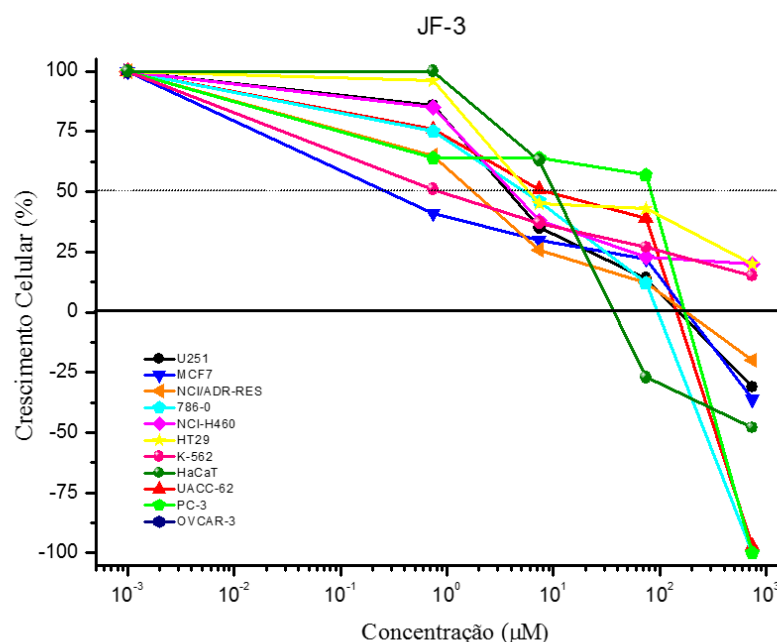


Figura 22. Gráfico ilustrando o perfil citostático do composto JF-3 frente às linhagens tumorais.

Os derivados JF-5 e JF-6 possuem grupamentos alquila na substituição aromática. No entanto, os resultados apresentados por esses dois compostos não podem ser correlacionados. O JF-6 (*p*-etil-fenil) não demonstrou atividade contra a maioria dos tipos celulares, só se destacando frente à linhagem de leucemia (K-562). Já o JF-5 (*p*-metil-fenil) se mostrou ativo contra todas as linhagens celulares apresentando melhor resultado para a mesma linhagem do seu análogo alquila com

valor de GI_{50} menor que $0,9 \mu M$. Dessa maneira, foi possível notar que o aumento da cadeia carbônica linear nesta classe de compostos não é favorável para o incremento da atividade biológica.

A presença de um grupamento espaçador como encontrado no derivado JF-7 (2-fenil-etil) também não surtiu efeitos positivos na substituição das tiossemicarbazonas. Esse derivado apresenta isomeria com o JF-6 (*p*-etil-fenil) e do mesmo modo que este último, também não demonstrou atividade antiproliferativa. Todas as linhagens celulares se demonstraram insensíveis frente a esse derivado tiossemicarbazônico ($GI_{50} > 100 \mu M$). A substituição encontrada no composto JF-4 (*p*-metóxi-fenil) por um lado pode ser considerada desfavorável, uma vez que não apresentou atividade contra a maioria das linhagens tumorais. No entanto, pode-se levar em consideração a seletividade deste composto frente a linhagem de leucemia (K-562) o qual apresentou valor de GI_{50} de $1.7 \mu M$.

A modificação estrutural apresentada pelo composto JF-10 (alil), certamente não favoreceu no aumento da atividade antiproliferativa. A retirada no núcleo fenílico e a inserção de uma cadeia alifática insaturada no N^4 dessa classe de compostos reduziu significativamente a atividade frente às linhagens tumorais utilizadas neste experimento. A substituição encontrada no JF-9 melhorou a atividade sobre o painel de células tumorais apresentando atividade sobre a inibição do crescimento celular. Este possui como diferença estrutural a presença do radical 3-piridinil destacando bons resultados sobre as linhagens tumorais 786-0, K-562 (rim e leucemia), GI_{50} 5.6 e $16.4 \mu M$, respectivamente. A inserção de um substituinte volumoso no esqueleto da tiossemicarbazona não favoreceu no aumento da atividade quando comparada com o esqueleto base. Este fato pode ser evidenciado com o composto JF-8, que possui a substituição 1-naftil, o qual não demonstrou atividade contra a maioria das linhagens tumorais sólidas. Por outro lado, similarmente ao JF-4, este apresentou seletividade contra a linhagem K-562.

O único tipo celular não tumoral apresentando no painel de avaliação da atividade antiproliferativa foi a HaCaT (queratinócito humano). Esta linhagem foi inserida no painel com o objetivo de simular células normais humanas que têm um perfil de mitose acelerado característico das células tumorais. Diante disso, podemos observar que os compostos JF-1, JF-4, JF-7 e JF-10 apresentaram valores de GI_{50} maiores que a máxima concentração utilizada nesta avaliação. Já os

melhores derivados 2-tiofeno-tiossemicarbazônicos, JF-3 e JF-5, revelaram baixos valores de GI_{50} para esta linhagem não tumoral.

O quimioterápico doxorrubicina foi empregado como controle positivo. Mais do que um padrão de comparação, o objetivo principal do uso desse controle foi o 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. Na figura 23 está evidenciado o gráfico mostrando o perfil citocida da doxorrubicina frente às linhagens tumorais.

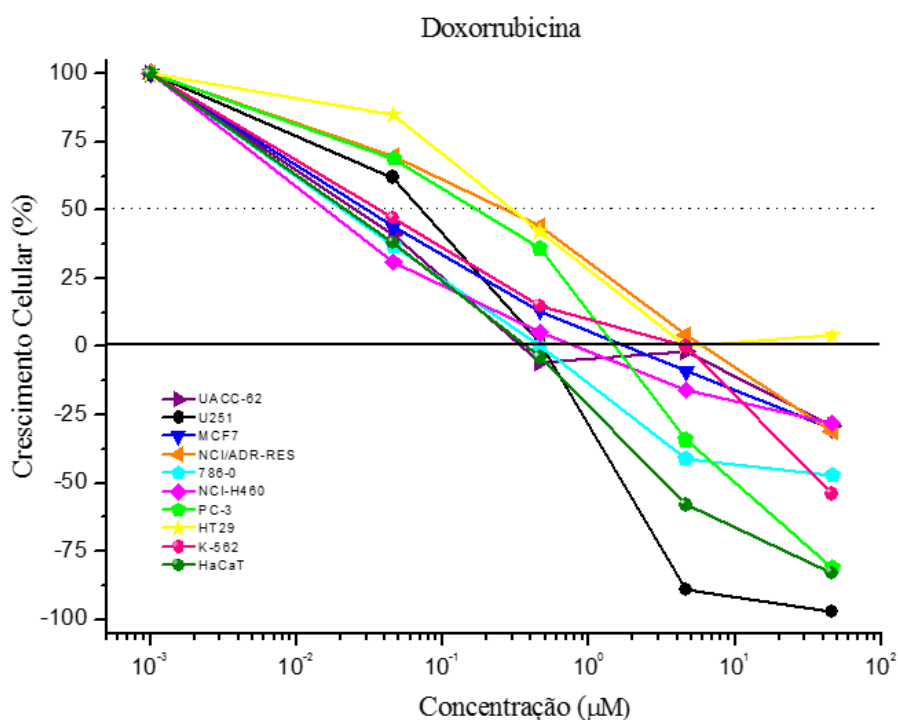


Figura 23. Gráfico ilustrando o perfil citocida do quimioterápico doxorrubicina frente às linhagens tumorais.

As tiossemicarbazonas são conhecidas pela sua atividade antiproliferativa, onde estudos revelam um perfil citostático frente a linhagem K-562 (leukemia) corroborando com os nossos resultados, onde os nossos derivados 2-tiofeno-tiossemicarbazonas apresentaram baixos valores de GI_{50} para esta linhagem tumoral (Silva et al., 2010).

As *N*-acilhidrazonas são compostos análogos das tiossemicarbazonas. Um dos pontos comuns entre essas duas classes de compostos é a presença da ligação C=N. Estudos recentes evidenciam a importância das *N*-acilhidrazonas na atividade antiproliferativa onde foi observado bons resultados de IC₅₀ para os compostos que possuíam a substituição *p*-metilfenil e *p*-bromofenil assim como observado com os resultados apresentados neste estudo (Amaral et al., 2014).

Tabela 1. Atividade antiproliferativa *in vitro* (GI₅₀ em μ M) dos derivados *N*-substituídas-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazina carbotoioamida (JF1-10).

Composto	U251	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT-29	K-562	HaCat
JF-1 	74.7	>100	94.6	>100	50.4	>100	>100	>100	16.7	>100
JF-2 	8.3	15.8	>100	2.8	7.4	>100	>100	>100	2.0	14.7
JF-3 	4.2	71.1	<0.74	1.7	4.5	4.7	79.4	17.7	>100	0.8
JF-4 	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	1.7	>100
JF-5 	12.6	16.8	38.6	4.8	19.5	80.6	29.7	>100	<0.9	17.6
JF-6 	>100	>100	>100	>100	82.6	>100	>100	>100	1.6	17.6
JF-7 	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
JF-8 	12.7	>100	>100	6.6	15.2	>100	>100	>100	1.8	82.4
JF-9 	26.0	>100	>100	>100	5.6	45.9	>100	>100	16.4	45.4
JF-10 	>100	>100	>100	>100	21.2	>100	>100	>100	6.0	>100

O derivado JF-3, *N*-(4-bromofenil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-hidrazina-carbotioamida, demonstrou melhor perfil citostático frente às linhagens tumorais avaliadas neste estudo. Desta forma, ele foi conduzido para os estudos *in vivo* a fim de verificar sua atividade em modelos animais. Para tal, é necessária a realização prévia da toxicidade aguda para evidenciar uma dose que não seja tóxica para o animal.

5.2.2 Toxicidade aguda

No ensaio de toxicidade aguda realizado com o derivado 2-tiofenotiossemicarbazônico (JF-3), foi verificada ausência de sinais de toxicidade em todas as doses testadas durante as quatro primeiras horas de avaliação, onde também não foi verificada morte de nenhum dos animais. Após 14 dias de experimento, os animais foram pesados onde foi observado que nenhum dos grupos experimentais exibiu perda de $\pm 20\%$ do peso corporal. Posteriormente, foi realizada a eutanásia dos animais onde foi verificada mudança na coloração dos órgãos no grupo JF-3 600 mg/Kg adicionado à aderência de órgãos, o que indica toxicidade do composto nesta dose (tabela 2).

Desta maneira, a máxima dose testada foi descartada para o prosseguimento dos estudos. As demais doses avaliadas (200 e 400 mg/Kg) demonstraram ausência de sinais de toxicidade. Assim, ficou-se estabelecido que a dose segura para a realização dos ensaios *in vivo* foi a de 300 mg/Kg, sendo utilizados valores que variaram entre 30 e 300 mg/Kg, sendo os animais tratados por via oral.

Tabela 2. Resultados da toxicidade aguda via oral dose única

Dose (mg/Kg)	Resultados encontrados no estudo
200	100% taxa de sobrevivência, nenhum efeito tóxico severo*
400	100% taxa de sobrevivência, nenhum efeito tóxico severo*
600	100% taxa de sobrevivência, adesão de órgãos

Os sinais clínicos e as condições associadas com dor, sofrimento e morte iminente, são descritos detalhadamente num documento de orientação da OECD.

5.2.3 Atividade *in vivo* – Ehrlich de pata

A avaliação antitumoral *in vivo* foi realizada utilizando o modelo experimental de Ehrlich na pata. A tabela 3 e a figura 24 abaixo representam os dados obtidos após 15 dias de experimento.

O 3º dia de experimento, dia correspondente ao início do tratamento, refere-se a primeira medição da pata após o inóculo das células de Ehrlich. A partir do 6º dia, o grupo JF-3 (30 mg/Kg) já demonstrou diferença significativa frente ao controle negativo apresentando uma redução do volume da pata referente ao crescimento tumoral de 30% (salina: 86.61 ± 5.77 ; JF-3 30 mg/Kg: 60.64 ± 4.57), ao passo que os controles positivos doxorrubicina e piroxicam apresentaram uma redução de 35.8 e 34%, respectivamente.

No 9º dia, todos os grupos experimentais, à exceção do JF-3 100 mg/Kg, apresentaram redução significativa do volume da pata, sendo observadas reduções mais pronunciadas do volume tumoral para os grupos experimentais JF-3 30 mg/Kg e piroxicam de 40.2 e 45.3%, respectivamente (salina: 95.51 ± 5.25 ; JF-3 30 mg/Kg: 57.13 ± 5.21 ; piroxicam: 52.28 ± 3.62).

A partir do 12º dia de experimento, o controle do crescimento tumoral foi observado mais pronunciadamente nos grupos doxorrubicina, piroxicam e JF-3 30 mg/kg. No entanto, todos os grupos apresentaram reduções significativas do volume da pata. Os percentuais de redução para todos os grupos experimentais (doxorrubicina, piroxicam, JF-3 30, 100 e 300 mg/Kg) foram 68.4; 72.20; 71.1; 39.6 e 49%, respectivamente.

Entre 12º ao 15º dia de experimento houve um crescimento da massa tumoral em todos em todos os grupos experimentais. Somente o grupo tratado com piroxicam na dose de 40 mg/Kg conseguiu controlar esse crescimento apresentando uma variação de volume de 36,5% quando comparado ao 12º dia (12º dia: 34.88 ± 3.13 ; 15º dia: 47.63 ± 2.97).

Tabela 3. Efeito do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico (JF-3) na inibição do crescimento tumoral no modelo de Ehrlich de pata.

Dia	Variação do volume da pata (%)					
	Controle	Dox 3 mg/Kg	PIRO 40 mg/Kg	JF-3 30 mg/Kg	JF-3 100 mg/Kg	JF-3 300 mg/Kg
3	40.2 ± 7.0	43.7 ± 4.5	42.2 ± 3.6	26.8 ± 1.8	33.4 ± 2.4	39.4 ± 3.0
6	86.1 ± 5.7	55.6 ± 4.3**	57.2 ± 5.0**	60.6 ± 4.6**	78.1 ± 3.1	75.1 ± 5.4
9	95.5 ± 5.2	69.8 ± 4.9*	52.3 ± 3.6***	57.1 ± 5.2***	73.7 ± 4.2	72.8 ± 5.5*
12	125.5 ± 7.5	39.6 ± 3.6***	34.9 ± 3.1***	36.3 ± 6.6***	75.8 ± 4.3***	64.0 ± 7.9***
15	166.5 ± 6.0	97.9 ± 12.5***	47.3 ± 3.0***	82.0 ± 11.6***	118.6 ± 9.4***	106.0 ± 17.5***

Os dados foram expressos como média ± SE de 6 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando *p <0.05; **p <0.01 e ***p <0.001, determinados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

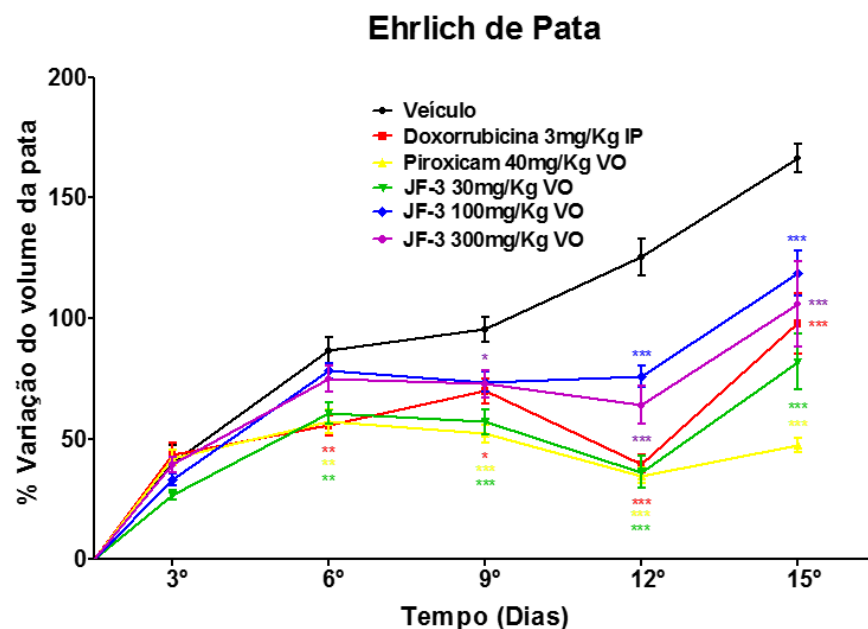


Figura 24. Atividade do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico JF-3 no ensaio de tumor de Ehrlich na pata. Os dados foram expressos como a média $\pm$ SE de 6 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$, determinados pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni.

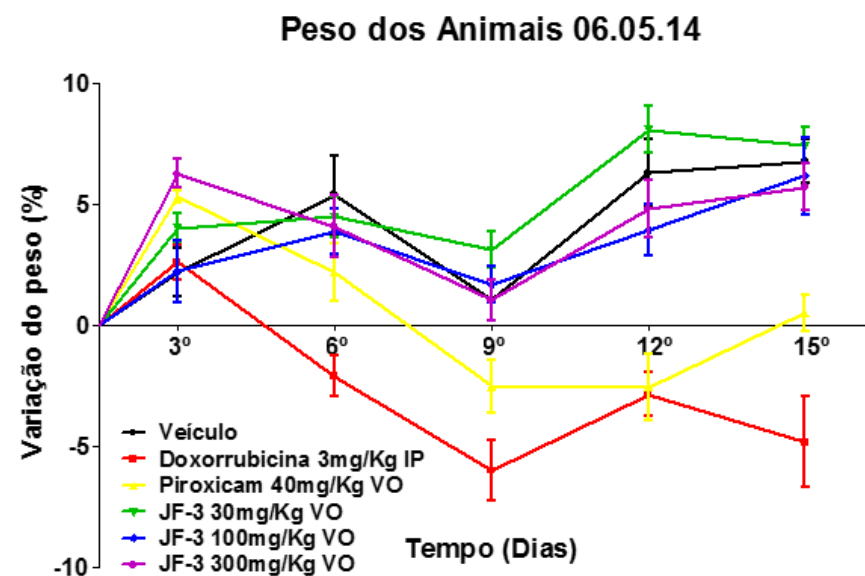


Figura 25. Acompanhamento da variação do peso corporal dos grupos em tratamento durante o experimento do tumor de Ehrlich na pata.

Nesse experimento foram utilizados tratamentos em doses repetidas, então foi feito um acompanhamento do peso dos animais a fim de identificar uma possível toxicidade do derivado JF-3. Além disso, também foi avaliado sinais de toxicidade nos órgãos dos animais sendo estes verificados através de uma análise macroscópica e do peso relativo.

Como pode ser observado na figura 25 acima, os animais tratados sucessivamente com o composto JF-3, realizados com todas as doses, acompanharam o ganho de peso normal quando comparados com o controle negativo. Já os grupos doxorrubicina e piroxicam exibiram perda de peso corporal a partir do 6º dia (doxorrubicina) e 9º dia (piroxicam) sendo evidenciados até o término do experimento.

Durante a eutanásia dos animais, foi observado que os grupos tratados com os dois controles positivos apresentaram descoloração da mucosa gástrica, o que pode justificar em parte a perda de peso desses animais. Além disso, o grupo piroxicam apresentou sinais de hepatomegalia e esplenomegalia.

Os grupos tratados com o composto JF-3 não apresentaram sinais macroscópicos de toxicidade nos órgãos dos animais. Dessa maneira, o tratamento com doses repetidas utilizando este composto se mostrou seguro durante este experimento.

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário e possui como principais características um rápido crescimento e comportamento agressivo (Segura, Barbero e Marquez, 2000). Trata-se de um modelo xenográfico, onde, após seu implante ocorre uma resposta inflamatória local e consequente aumento da permeabilidade vascular com formação de edema e migração celular (Fecchio et al., 1990). Até o 3º dia após a inoculação das células do tumor de Ehrlich, ocorre um rápido aumento do volume da pata, decorrente dessa migração celular inicial. De fato, todos os grupos experimentais avaliados nesse estudo, apresentaram aumento significativo do volume da pata, com crescimento entre 25-40%.

É relatado que no tumor de Ehrlich ocorre um *up-regulation* de COX-2 em células tumorais seguido por um aumento da expressão de NF-κB (Charalambous et al., 2003). Dessa maneira, o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE) em terapias combinadas para o câncer, promovem a supressão da expressão de NF-κB a qual controla a expressão de COX-2, inibindo a proliferação de células tumorais

(Takada et al., 2004). Isso corrobora os nossos resultados, onde o piroxicam (AINE) exibiu uma melhor resposta na inibição do crescimento tumoral quando comparado com o quimioterápico de escolha, a doxorubicina.

Moléculas contendo o núcleo tiofeno são detentoras da atividade antitumoral e anti-inflamatória. A respeito desta última, derivados 3-[4-(metilsulfonil)fenil]tiofeno-2-carbadeído-oximas exibiram uma atividade na inibição da COX-2 (Balsamo et al., 2003). Este núcleo se encontra no composto JF-3 avaliado neste estudo e pode ser considerado como essencial no desenvolvimento da atividade antitumoral e também com propriedades anti-inflamatórias.

O modelo do tumor de Ehrlich, possui características duais inflamatórias e tumorais. Os dados preliminares obtidos através deste estudo comprovam a eficácia do JF-3 em modelos experimentais de câncer, sugerindo que além disso, exista uma ação anti-inflamatória

5.2.4 Ensaio da formalina

O ensaio da formalina foi realizado com o objetivo de verificar se o derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico possui a capacidade de aumentar o limiar de nocicepção, ou seja, avaliar analgesia. Do ensaio, podem-se extrair duas informações: uma se o composto é capaz de agir na primeira fase da dor, a neurogênica, uma dor mais inicial (0-5 minutos) ou se o composto pode agir atuando na segunda fase, a dor inflamatória, mais tardia (5-30 minutos) (Fezai et al., 2013). A nocicepção induzida pela formalina prediz se um composto é analgésico ou anti-inflamatório, onde a dor neurogênica, evidenciada na primeira fase do teste, é devido uma ação direta nos nociceptores provocada pela liberação de bradicinina e substância P. Já a dor inflamatória, a mais tardia, é provocada pela liberação de histamina e prostaglandinas (Pinheiro et al., 2011; Nakamoto et al., 2010).

Como podemos observar na figura 26, o JF-3 foi capaz de atuar nas duas fases da dor. Na primeira fase, a maior dose se mostrou eficaz diminuindo significativamente o tempo de lambida em 73,7% (salina: 103.6 ± 11.87 ; JF-3 300 mg/Kg: 27.25 ± 10.77) na maior dose testada frente ao veículo. Já na segunda fase, o composto demonstrou atividade em todas as doses avaliadas, 30; 100 e 300 mg/Kg, sendo capaz de reduzir o tempo de lambida em 62.3; 84.30 e 100%,

respectivamente, evidenciando um efeito dose-dependente deste composto no processo de inibição da algesia inflamatória (salina: 173.5 ± 23.18 ; JF-3 30 mg/Kg: 64.25 ± 24.93 ; JF-3 100 mg/Kg: 27.25 ± 17).

Esses resultados podem sugerir a ação do derivado tiossemicarbazônico JF-3 na analgesia e também no controle da dor durante a inflamação aguda.

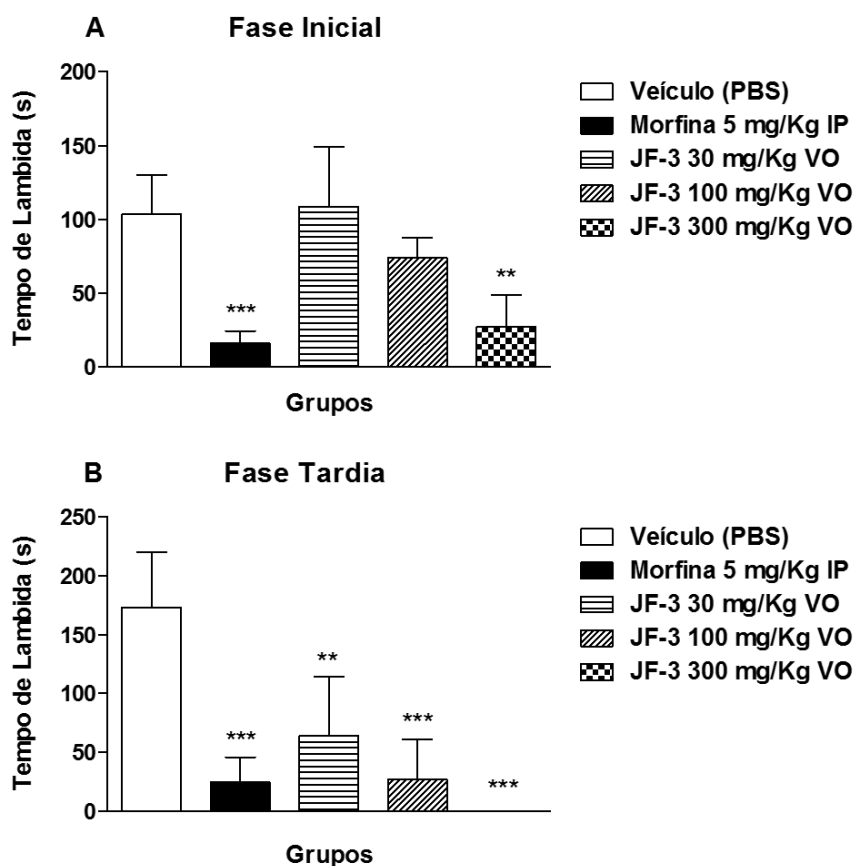


Figura 26. Efeitos do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico JF-3 no ensaio de algesia induzida pela formalina. As figuras (A) e (B) representam os efeitos do JF-3 nas fases inicial e tardia da nocicepção induzida pela formalina. Os dados foram expressos como a média $\pm$ SE de 5 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$, determinados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

5.2.5 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Como o derivado JF-3 apresentou atividade na fase inflamatória do ensaio da formalina, decidiu-se investigar o potencial anti-inflamatório dessa nova classe de compostos. Dessa maneira, foi utilizado inicialmente o modelo experimental do edema de orelha induzido por óleo de cróton. A figura 27 abaixo revela os resultados

do ensaio utilizado o qual é um ensaio preliminar aos estudos posteriores acerca da atividade anti-inflamatória.

Nenhuma das doses testadas (30, 100 e 300 mg/Kg) foram capazes de regredir significativamente o edema causado na orelha do camundongo induzido por tal agente flogístico. No entanto, não se pode concluir que o derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico não possui atividade anti-inflamatória, visto que o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton conduz a ativação da fosfolipase A₂ (Kondoh, Sato e Kanoh, 1995), podendo este composto atuar na inibição de outros mediadores da inflamação.

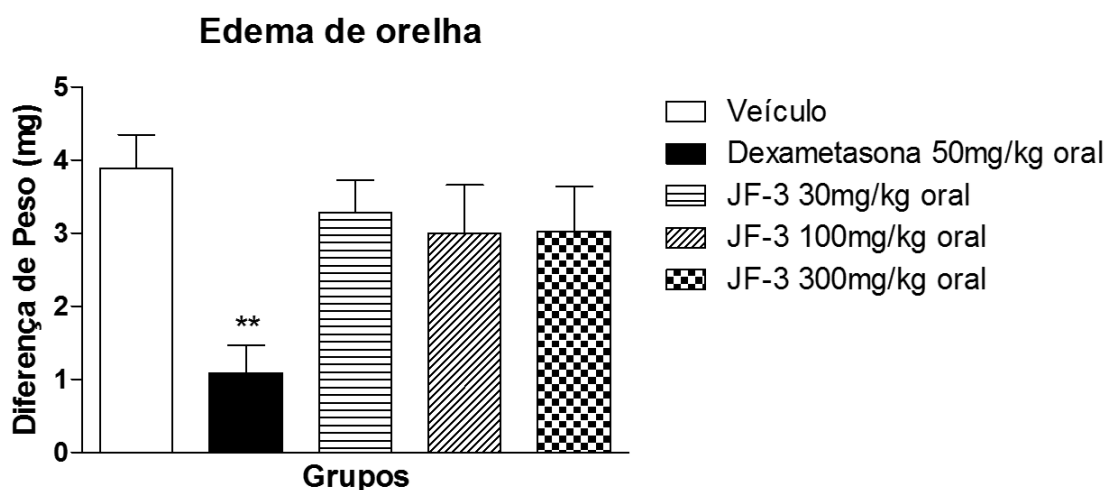


Figura 27. Efeitos do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico JF-3 no ensaio de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Os dados foram expressos como a média $\pm$ SE de 5 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando $**p < 0,01$ e determinados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

5.2.6 Edema de pata induzido por carragenina

O modelo murino de edema de pata induzido por carragenina, é um ensaio que revela a atividade anti-inflamatória de compostos submetidos a triagem farmacológica sendo útil para avaliar a contribuição de mediadores envolvidos nas alterações celulares durante o processo inflamatório (Mazzon et al., 2011). Ele também foi utilizado na avaliação da atividade biológica do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico JF-3.

A figura 28 abaixo apresenta os dados obtidos a partir do ensaio empregado, onde se podem extrair duas informações: se o composto agiu na primeira fase da inflamação 1-6 h, a qual é mediada por bradicinina, serotonina, histamina, fosfolipase A₂ ou se agiu na segunda fase (pico entre 48-72 h), a qual é mediada por citocinas e quimiocinas oriundas do recrutamento das células polimorfonucleadas (Posadas et al., 2004; Nunes et al., 2007).

Foi possível observar no gráfico que o derivado JF-3 regrediu significativamente o edema da pata nas primeiras 4 horas de avaliação quando comparadas ao controle negativo. O edema foi reduzido em 81.9 e 83.2% nos dois primeiros tempos do experimento na maior dose utilizada (salina: 18.85 ± 2.63 ; 32.86 ± 4.97 e JF-3 300 mg/Kg: 3.41 ± 1.4 ; 5.53 ± 1.96).

Adicionalmente, após 4 horas do inóculo da carragenina o derivado foi capaz de conter o primeiro pico inflamatório apresentado pelo controle negativo (tampão salina 10 mL/Kg), regredindo o edema na pata do camundongo em 60,33% (salina: 49.99 ± 5.84 ; JF-3 300 mg/Kg: 19.83 ± 4.4). O controle positivo demonstrou, no mesmo tempo, regressão do edema semelhante ao derivado apresentando 50,15% de diminuição do processo inflamatório (24.92 ± 4.11).

Estes resultados iniciais sugerem uma ação inibidora do derivado sintético a mediadores iniciais da inflamação. O segundo pico inflamatório (48-72 h) não foi evidenciado nesse experimento (grupos controle e grupo teste). No entanto, a possibilidade do composto atuar inibindo a migração celular não pode ser descartada uma vez que todos os grupos experimentais não exibiram a formação do segundo pico.

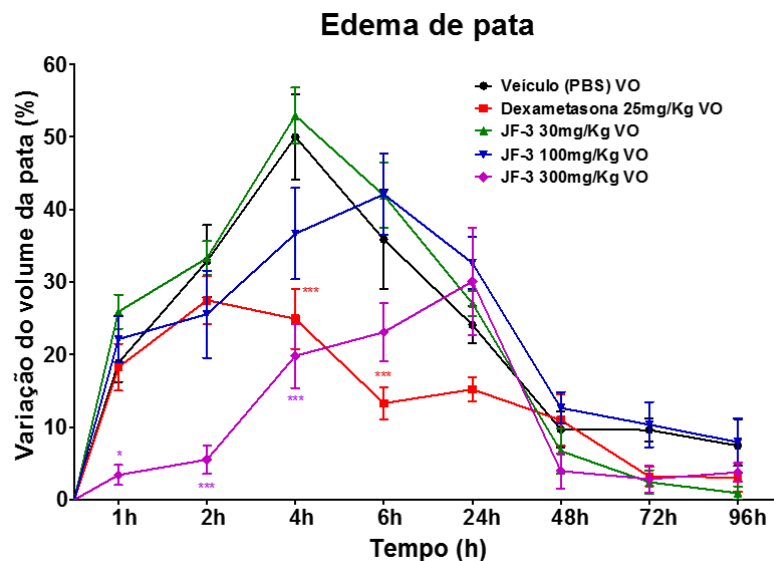


Figura 28. Atividade do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico JF-3 no ensaio de edema de pata induzido por carragenina. Os dados foram expressos como a média $\pm$ SE de 5 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$, determinados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni.

5.2.7 Edema de pata induzido pelo composto 48/80

Devido o derivado JF-3 apresentar resultados significativos nas primeiras horas de avaliação no experimento de edema de pata induzido por carragenina, decidiu-se investigar se o modo de atuação do composto na inibição da formação do edema seria via serotonina/histamina. Para isso, foi-se utilizado o modelo de edema de pata induzido pelo composto 48/80.

O composto 48/80 é um polímero polibásico produzido pela condensação da N-metil-p-metoxifenetilamina com formaldeído. Ela age por induzir a liberação rápida de serotonina e principalmente histamina, através da degranulação dos mastócitos (Rothschild, 1970; Penissi et al., 2009).

Foi comprovado, através deste ensaio, uma ação do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico no modelo utilizado (figura 29). O composto JF-3, após 15 minutos do inóculo do agente flogístico, demonstrou redução significativa do edema apresentando valores de 56,53% na dose de 30 mg/Kg (salina: 71.10 ± 6.6 e JF-3 30 mg/Kg: 30.9 ± 5.75). A redução do edema continuou nos tempos 30, 60 e 90 minutos, onde a máxima redução foi observada no tempo 90 minutos, 84,21% (salina: 20.97 ± 4.15 ; JF-3 30 mg/Kg: 3.31 ± 1.6). As demais doses do derivado 2-

tiofeno-tiossemicarbazônico também demonstraram resultados significativos, onde nos 15 primeiros minutos de avaliação a dose de 100 mg/Kg apresentou uma redução de 48,56% no edema (36.57 ± 5.82), já a dose de 300 mg/Kg, após 60 minutos, apresentou uma redução de 47,65% (salina: 39.2 ± 4.88 ; JF-3 300 mg/Kg: 20.52 ± 2.31), comprovando a eficácia do composto no modelo experimental empregado.

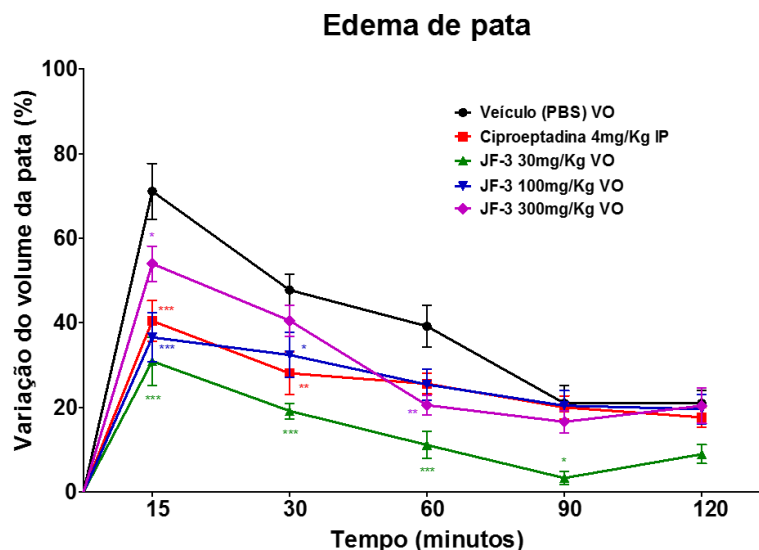


Figura 29. Atividade do derivado 2-tiofeno-tiossemicarbazônico JF-3 no ensaio de edema de pata induzido pelo composto 48/80. Os dados foram expressos como a média $\pm$ SE de 5 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, determinados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni.

5.2.8 Resultados adicionais

Os dados obtidos da avaliação da atividade antitumoral foram compilados em um artigo intitulado “Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities” o qual já se encontra publicado. Os resultados dessa pesquisa encontram-se apresentados em forma de artigo, os quais estão dispostos no Apêndice A. Os dados obtidos da avaliação da atividade anti-inflamatória foram compilados em um artigo intitulado “Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (*E*)-*N*-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone” o qual se encontra em processo de submissão. Os resultados dessa pesquisa encontram-se apresentados em forma de artigo, os quais estão dispostos no Apêndice B.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 Considerações Finais

6.1 Conclusões

Os compostos da série *N*-substituídas-2-(tiofen-2-ilmetileno)-tiosemicarbazonas (5-14) foram sintetizados com êxito através de uma rota sintética que se mostrou adequada e de rápida obtenção dos derivados os quais apresentaram rendimentos reacionais satisfatórios. Adicionalmente, todos os compostos sintetizados tiveram suas estruturas comprovadas através de técnicas de espectroscopia (RMN ^1H , RMN ^{13}C , IV, massas) que se mostraram eficientes. Além disso, a diastereoisomeria dos derivados da série foi elucidada.

A avaliação da atividade antiproliferativa revelou a importância de substituintes como o *p*-bromo e *p*-tolil nesta atividade biológica para as tiosemicarbazonas, onde os compostos 7 e 9 foram os que apresentaram menores valores de GI_{50} frente às linhagens tumorais. Além disso, o composto 7 provocou exposição de fosfatidilserina na linhagem 786-0, demonstrando um mecanismo de morte celular de apoptose, porém sem haver interferência no ciclo celular. A avaliação antitumoral *in vivo* através do modelo de Ehrlich de pata mostrou que o composto 7 foi capaz de diminuir o volume da pata causado pelo inóculo das células tumorais.

A atividade antinociceptiva mostrou que o composto 7 atua nas duas fases da dor, ressaltando a dor inflamatória. O ensaio de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton não mostrou resultados significativos, no entanto não foi possível descartar que o composto possui a atividade anti-inflamatória pois o modelo induzido por esse agente flogístico atua através da via das lipooxigenases.

No ensaio de edema de pata induzido por carragenina, foi possível observar que o composto 7 causou uma diminuição significativa no volume da pata nas duas primeiras horas de avaliação do estudo, indicando uma ação sobre os mediadores iniciais da inflamação. O ensaio de edema de pata induzido pelo composto 48/80 confirmou a hipótese, evidenciada no estudo anterior, onde o derivado suprimiu o edema na pata dos camundongos sugerindo uma ação sobre a histamina e a serotonina durante o processo inflamatório.

6.2 Perspectivas

- ✓ Realizar o estudo da capacidade do composto 7 em inibir a enzima topoisomerase I e II;
- ✓ Investigar, através da citometria de fluxo, outras vias de morte celular induzida pelo composto 7;
- ✓ Realizar o ensaio da peritonite induzida por carragenina em camundongos e avaliar os níveis de IL-1 β , TNF- α , NO;
- ✓ Verificar o potencial inibitório *in vitro* do composto 7 em inibir a isoforma COX-2.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Addla, D; Bhima; Sridhar, B; Devi, A; Kantevari, S. Design, synthesis and antimicrobial evaluation of novel 1-benzyl-2-butyl-4-chloroimidazole embodied 4-azafluorenones via molecular hybridization approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.22, p.7475-7480, 2012.
- Almeida, VL; Leitão, A; Reina, LCB; Montanari, CA; Donnici, CL; Lopes, MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v. 28, p. 118-129, 2005.
- Amaral, AT; Montanari, CA. Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. *Química Nova*, v. 25, Supl. 1, p. 39-44, 2002.
- Amaral, DN; Cavalcanti, BC; Bezerra, DP; Ferreira, PMP; Castro, RP; Sabino, JR; Machado, CML; Chammas, R; Pessoa, C; Sant'Anna, CMR; Barreiro, EJ; Lima, LM. Docking, Synthesis and Antiproliferative Activity of *N*-Acylhydrazone Derivatives Designed as Combretastatin A4 Analogues. *PLoS One*, v. 10. doi: 10.1371/journal.pone.0085380. 2014.
- Andricopulo, AD; Salum, LB; Abraham, DJ. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.9, n.9, p.771-90, 2009.
- Aquino, TM. Síntese e Avaliação das Atividades Anti-*Toxoplasma gondii* e Antimicrobiana de Benzaldeído 4-Fenil-3-tiossemicarbazonas e Derivados 2[(Fenilmetileno)hidrazono]-3-fenil-4-tiazolidinona-5-substituídos. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, 2007.
- Aquino, TM; Nascimento, AAPL; Spacov, ICG; Carvalho, CS; Lima, VT; Alves, AQ; Faria, AR; Araújo, JM; Lima, JG; Alves, AJ; Melo, EJT; Góes, AJS. Synthesis, Anti-*Toxoplasma gondii* and Antimicrobial Activities of 2-hydrazolyl-3-phenyl-5-(4-nitrobenzylidene)-4-thiazolidinone Substituted Derivatives. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 30, n. 8, p. 1567-73, 2011.
- Babahan, I; Eydurán, F; Coban, EP; Orhan, N; Kazar, D; Biyik, H. Spectroscopic and biological approach of Ni(II), Cu(II) and Co(II) complexes of 4-methoxy/ethoxybenzaldehydethiosemicarbazone glyoxime. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 121, p. 205-215, 2014.
- Balsamo, A; Coletta, I; Guglielmotti, A; Landolfi, C; Mancini, F; Martinelli, A; Milanese, C; Minutolo, F; Nencetti, S; Orlandini, E; Pinza, M; Rapposelli, S; Rossello, A. Synthesis of heteroaromatic analogues of (2-aryl-1-cyclopentenyl-1-alkylidene)-(arylmethoxy)amine COX-2 inhibitors: effects on the inhibitory activity of the replacement of the cyclopentene central core with pyrazole, thiophene or isoxazole ring. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 38, p. 157-168, 2003.
- Barreiro, EJ. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. *Revista Virtual de Química*, v. 1, p. 26-34, 2009.

Benmohammed, A; Khoumeri, O; Djafri, A; Terme, T; Vanelle, P. Synthesis of Novel Highly Functionalized 4-Thiazolidinone Derivatives from 4-Phenyl-3-thiosemicarbazones. *Molecules*, v. 19, p. 3068-3083, 2014.

Brandão, HN; David, JP; Couto, RD; Nascimento, JAP; David, JM. Química e farmacologia de quimioterápicos anti-neoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

Britta, EA; Scariot, DB; Falziroli, H; Ueda-Nakamura, T; Silva, CC; Filho, BP; Borsali, R; Nakamura, CV. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. *BMC Microbiology*, v. 14. doi: 10.1186/s12866-014-0236-0. 2014.

Charalambous, MP; Maihofner, C; Bhambra, U; Lightfoot, T; Gooderham, NJ. Upregulation of cyclooxygenase-2 is accompanied by increased expression of nuclear factor- κ B and I κ B kinase- α in human colorectal cancer epithelial cells. *British Journal of Cancer*, v. 88, p. 1598-1604, 2003.

Cardoso, MVO; Siqueira, LRP; Silva, EB; Costa, LB; Hernandez, MZ; Rabello, MM; Ferreira, RS; Cruz, LR; Moreira, DRM; Pereira, VRA; Castro, MCAB; Bernhardt, PV; Leite, ACL. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 86, p. 48-59, 2014.

Chen, J; Huang, J; Liu, G; Afrasiabi, Z; Sinn, E; Padhye, S; Ma, Y. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 197, p. 40-48, 2004.

Colotta, F; Allavena, P; Sica, A; Garlanda, C; Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, v. 30, n. 7, p. 1073-1081, 2009.

Crawford, ML; Waller, PC; Wood, SM. Severe cystitis associated with tiaprofenic acid. *British Journal of Urology*, v. 79, p. 578-584, 1997.

Deboever, G; Hiltrop, N; Cool, M; Lambrecht, G. Alternative Treatment Options in Colorectal Cancer Patients With 5-Fluorouracil- or Capecitabine-Induced Cardiotoxicity. *Clinical Colorectal Cancer*, v. 12, n. 1, p. 8-14, 2013.

Elford, HL; Freese, M; Passamani, E; Morris, HP. Ribonucleotide reductase and cell proliferation. I. Variations of ribonucleotide reductase activity with tumor growth rate in a series of rat hepatomas. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 245, p. 5228-5233, 1970.

Fairweather-Tait, SJ. Iron nutrition in the UK: getting the balance right. *Proceedings Of The Nutrition Society*, v. 63, p. 519-28, 2004.

Farag, AA. Synthesis and Antimicrobial Activity of 5-(morpholinosulfonyl)isatin Derivatives Incorporating a Thiazole Moiety. *Drug Research (Stuttg)*. 2014.

Fecchio, D; Sirois, P; Russo, M; Jancar, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation*, v. 14, p. 125-32, 1990.

Fezai, M; Senovilla, L; Jemaà, M; Ben-Attia, M. Analgesic, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of Extra Virgin Olive Oil. *Journal of Lipids*. doi: 10.1155/2013/129736. 2013.

Fiaschi, T; Chiarugi, P. Oxidative Stress, Tumor Microenvironment and Metabolic Reprogramming: A Diabolic Liaison. *International Journal of Cell Biology*, p 1-8, 2012.

Floor, S; Dumont, JE; Maenhaut, C; Raspe, E. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends in Molecular Medicine*, v. 18, n. 9, p. 509-515, 2012.

Garton, AJ; Crew, APA; Franklin, M; Cooke, AR; Wynne, GM; Castaldo, L; Kahler, J; Winski, SL; Franks, A; Brown, EM; Bittner, MA; Keily, JF; Briner, P; Hidden, C; Srebernak, MC; Pirrit, C; O'Connor, M; Chan, A; Vulevic, B; Henninger, D; Sennello, KR; Li, AH; Zhang, T; Richardson, F; Emerson, DL; Castelhana, AL; Arnold, LD; Gibson, NW. OSI-930: A Novel Selective Inhibitor of Kit and Kinase Insert Domain Receptor Tyrosine Kinases with Antitumor Activity in Mouse Xenograft Models. *Cancer Research*, v. 66, p. 1015-1024, 2006.

Gasser, G; Metzler-Nolte, N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 16, p. 84-91, 2012.

Globocan. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. <<http://globocan.iarc.fr>>. Acessado em: 05/12/2014.

Gramec, D; Masic, LP; Dolenc, MS. Bioactivation Potential of Thiophene-Containing Drugs. *Chemical Research in Toxicology*, v. 27, p. 1344-1358, 2014.

Greenhough, A; Smartt, HJM; Moore, AE; Roberts, HR; Williams, AC; Paraskeva, C; Kaidi, A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, v. 30, n. 3, p. 377-386, 2009.

Guido, RVC; Andricopulo, AD; Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos avançados*, v. 24, p. 81-98, 2010.

Gutierrez, E; Richardson, DR; Jansson, PJ. The Anti-Cancer Agent, Dp44mT, Overcomes Pro-Survival Autophagy by Two Mechanisms: Persistent Induction of Autophagosome Synthesis and Impairment of Lysosomal Integrity. *The Journal of Biological Chemistry*. pii: jbc.M114.599480. [Epub ahead of print]. 2014

Hanahan, D; Weinberg, RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, p. 646-674, 2011.

Hart, D; Ward, M; Lifschitz, MD. Suprofen related nephrotoxicity. A distinct clinical syndrome. *Annals of Internal Medicine*, v. 106, p. 235-238, 1987.

Helal, MHM; Salem, MA, El-Gaby, MAS; Aljahdali, M. Synthesis and biological evaluation of some novel thiazole compounds as potential anti-inflammatory agentes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 65, p. 517-526, 2013.

Hussain, SP, Harris, CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *International Journal of Cancer*, v. 121, p. 2373-80, 2007.

Inca. Instituto Nacional de Câncer: Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

Jackman, AL; Farrugia, DC; Gibson, W; Kimbell, R; Harrap, KR; Stephens, TC. ZD1694 (Tomudex): a new thymidylate synthase inhibitor with activity in colorectal câncer. *European Journal of Cancer*, v. 31A, p. 1277-1282, 1995.

Jagadeesh, M; Lavanya, M; Kalangi, SK; Sarala, Y; Ramachandraiah, C; Reddy, AV. Spectroscopic characterization, antioxidant and antitumour studies of novel bromo substituted thiosemicarbazone and its copper(II), nickel(II) and palladium(II) complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 135, p. 180-184, 2014.

Jana, D; Sarkar, DK; Ganguly, S; Saha, S; Sa, G; Manna, AK; Banerjee, A; Mandal, S. Role of Cyclooxygenase 2 (COX-2) in Prognosis of Breast Cancer. *Indian Journal of Surgical Oncology*, v. 5, p. 59-65, 2014.

Juvalé, K; Pape, VF; Wiese, M. Investigation of chalcones and benzochalcones as inhibitors of breast cancer resistance protein. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 346-55, 2012.

Kaiser, CR. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*, v. 23, 2000.

Karin, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, v. 441, p. 431-436, 2006.

Karthikeyan, C; Solomon, VR; Lee, H; Trivedi, P. Design, synthesis and biological evaluation of some isatin-linked chalcones as novel anti-breast cancer agents: A molecular hybridization approach. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, v. 3, p. 325-330, 2013.

Kashyap, M; Kandekar, S; Baviskar, AT; Das, D; Preet, R; Mohapatra, P; Satapathy, SR; Siddharth, S; Guchhait, SK; Kundu, CN; Banerjee, UC. Indenoindolone derivatives as topoisomerase II-inhibiting anticancer agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, p. 934-938, 2013.

Kelly, C; Bhuva, N; Harrison, M; Buckley, A; Saunders, M. Use of raltitrexed as an alternative to 5-fluorouracil and capecitabine in cancer patients with cardiac history. *European Journal of Cancer*, v. 49, p. 2303-2310, 2013.

Kolberg, M; Strand, KR; Graff, P; Andersson, KK. Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1699, p. 1-34, 2004.

Kondoh, H; Sato, Y.; Kanoh, H. Arachidonic acid metabolism in cultured mouse keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, v.85, p.64-9, 1995.

Kumar, K; Schniper, S; Gonzalez-Sarrías, A; Holder, AA; Sanders, N; Sullivan, D; Jarrett, WL; Davis, K; Bai, F; Seeram, NP; Kumar, V. Highly potent anti-proliferative effects of a gallium(III) complex with 7-chloroquinoline thiosemicarbazone as a ligand: Synthesis, cytotoxic and antimalarial evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 86, p. 81-86, 2014.

Levy, AP; Levy, NS; Wegner, S; Goldberg, MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 13333-13340, 1995.

Lima, LM. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. *Química Nova*, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

Liu, LF; Wang, JC. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 84, p. 7024-7027, 1987.

Lobana, TS; Sharma, R; Bawa, G; Khanna, S. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals - An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 253, p. 977-1055, 2009.

Lukmantara, AY; Kalinowski, DS; Kumar, N; Richardson, DR. Synthesis and biological evaluation of 2-benzoylpyridine thiosemicarbazones in a dimeric system: Structure-activity relationship studies on their anti-proliferative and iron chelation efficacy. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 141, p. 43-54, 2014.

Marella, A; Shaquiquzzaman, M; Akhter, M; Verma, G; Alam, MM. Novel pyrazole-pyrazoline hybrids endowed with thioamide as antimalarial agents: their synthesis and 3D-QSAR studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 1-10, 2014.

Matesanz, AI; Leitaó, I; Souza, P. Palladium (II) and platinum (II) bis (thiosemicarbazone) complexes of the 2,6-diacetylpyridine series with high cytotoxic activity in cisplatin resistant A2780cisR tumor cells and reduced toxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 125, p. 26-31, 2013.

Mazzon, E; Esposito, E; Di Paola, R; Muià, C; Crisafulli, C; Genovese, T; Caminiti, R; Meli, R; Bramanti, P; Cuzzocrea, R. Effect of tumour necrosis factor- α receptor-1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 153, p. 136-149, 2008.

Medvedev, A; Buneeva, O; Glover, V. Biological targets for isatin and its analogues: implications for therapy. *Biologics: Targets & Therapy*, v. 1, p. 151-62, 2007.

Montanari, CA. *Química Medicinal. Métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2011.

Moreno-Rodríguez, A; Salazar-Schettino, PM; Bautista, JL; Hernández-Luis, F; Torrens, H; Guevara-Gómez, Y; Pina-Canseco, S; Torres, MB; Cabrera-Bravo, M; Martinez, CM; Pérez-Campos, E. In vitro antiparasitic activity of new thiosemicarbazones in strains of *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 87, p. 23-29, 2014.

Muthukumar, VA; George, S; Vaidhyalingam, V. Synthesis and Pharmacological Evaluation of 1-(1-((Substituted)methyl)-5-methyl-2-oxoindolin-3-ylidene)-4-(substituted pyridin-2-yl)thiosemicarbazide. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, p. 1461-1464, 2008.

Nakamoto, K; Nishinaka, T; Mankura, M; Fujita-Hamabe, W; Tokuyama, S. Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid against various pain stimuli in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 33, n. 6, p. 1070-1072, 2010.

Nitiss, JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, p. 338-50, 2009.

Nunes, FP; Sampaio, SC; Santoro, ML; Sousa-e-Silva, MC. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon*, v. 49, p. 1090-1098, 2007.

Ocean, AJ; Christos, P; Sparano, JA; Matulich, D; Kaubish, A; Siegel, A; Sung, M; Ward, MM; Hamel, N; Espinoza-Delgado, I; Yen, Y; Lane, ME. Phase II trial of the ribonucleotide reductase inhibitor 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone plus gemcitabine in patients with advanced biliary tract cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 68, p. 379-388, 2011.

Pandiarajan, D; Ramesh, R; Liu, Y; Suresh, R. Palladium(II) thiosemicarbazone-catalyzed Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions of aryl halides. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 33, p. 33-37, 2013.

Penissi, AB; Vera, ME; Mariani, ML; Rudolph, MI; Cenal, JP; de Rosas, JC; Fogal, TH; Tonn, CE; Favier, LS; Giordano, OS. Novel anti-ulcer α,β -unsaturated lactones inhibit compound 48/80-induced mast cell degranulation. *European Journal of Pharmacology*, v. 612, p. 122-130, 2009.

Pinheiro, BG; Silva, AS; Souza, GE; Figueiredo, JG; Cunha, FQ; Lahlou, S; da Silva, JK; Maia, JG; Sousa, PJ. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 138, n. 2, p. 479-486, 2011.

Posadas, I; Bucci, M; Roviezzo, F; Rossi, A; Parente, L; Sautebin, L; Cirino, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and

displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, v. 142, p. 331-338, 2004.

Richardson, DR. Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 42, p. 267-281, 2002.

Rothschild, AM. Mechanisms of histamine release by compound 48/80. *British Journal of Pharmacology*, v. 38, p. 253-262, 1970.

Samala, G; Devi, PB; Nallangi, R; Sridevi, JP; Saxena, S; Yogeeswari, P; Sriram, D. Development of novel tetrahydrothieno[2,3-c]pyridine-3-carboxamide based Mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase inhibitors: Molecular hybridization from known antimycobacterial leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 1938-1947, 2014.

Sarma, B.D.; Bailar-Jr., J.C. The Stereochemistry of Metal Chelates with Polydentate Ligands. *Journal of the American Chemical Society*, v. 77, p. 5476, 1955.

Sartorelli, AC; Agrawal, KC; Moore, EC. Mechanism of inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by (N)-heterocyclic aldehyde thiosemicarbazones. *Biochemical Pharmacology*, v. 20, p. 3119-23, 1971.

Segura, JA; Barbero, LG; Marquez, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduced responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunology Letters*, v. 74, p. 111-115, 2000.

Shao, J; Ma, ZY; Li, A; Liu, YH; Xie, CZ; Qiang, ZY; Xu, JY. Thiosemicarbazone Cu(II) and Zn(II) complexes as potential anticancer agents: Syntheses, crystal structure, DNA cleavage, cytotoxicity and apoptosis induction activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 136, p. 13-23, 2014.

Shoemaker, RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, p. 813-823, 2006.

Siegel, R; Ma, J; Zou, Z; Jemal, A. Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 64, p. 9-29, 2014.

Silva, AP; Martini, MV; de Oliveira, CMA; Cunha, S; de Carvalho, JE; Ruiz, ALTG; da Silva, CC. Antitumor activity of (-)- α -bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 2987-2993, 2010.

Silverstein, RM; Webster, FX; Kiemle, DJ. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 7^a ed., John Wiley and Sons, Inc. 2005.

Storz, P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience*, v. 10, n. 2, p. 1881-1896, 2005.

Takada, Y; Bhardwaj, A; Potdar, P; Aggarwal, BB. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF- κ B activation, inhibition of expression of

cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene*, v. 23, p. 9247-9258, 2004.

Tasdemir, D; Karakucuk-Iyidogan, A; Ulasli, M; Taskin-Tok, T; Oruc-Emre, EE; Bayram, H. Synthesis, Molecular Modeling, and Biological Evaluation of Novel Chiral Thiosemicarbazone Derivatives as Potent Anticancer Agents. *Chirality*. doi: 10.1002/chir.22408. 2014.

Tenório, RP; Góes, AJS; Lima, JG; Faria, AR; Alves, AJ; Aquino, TM. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

Thelander, L; Graslund, A. Mechanism of inhibition of mammalian ribonucleotide reductase by the iron chelate of 1-formylisoquinoline thiosemicarbazone. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 258, p. 4063-6, 1983.

Verçoza, GL; Feitoza, DD; Alves, AJ; Aquino, TM; Lima, JG; Araújo, JM; Cunha, IGB; Góes, AJS. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novas 4-tiazolidinonas obtidas a partir de formilpiridina tiossemicarbazonas. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1405-1410, 2009.

Videira, M; Reis, RL; Brito, MA. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1846, p. 312-325, 2014.

Voronov, E; Shouval, DS; Krelin, Y; Cagnano, E; Benharroch, D; Iwakura, Y; Dinarello, CA; Apte, RN. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, p. 2645-2650, 2003.

WHO, World Health Organization. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acessado em: 04/12/14.

Xie, W; Xie, S; Zhou, Y; Tang, X; Liu, J; Yang, W; Qiu, M. Design and synthesis of novel 5,6-disubstituted pyridine-2,3-dione-3-thiosemicarbazone derivatives as potential anticancer agentes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 81, p. 22-27, 2014.

Yalowich, JC; Wuc, X; Zhang, R; Kanagasabai, R; Hornbaker, M; Hasinoff, BB. The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase IIa. *Biochemical Pharmacology*, v. 84, p. 52-58, 2012.

Yap, TA; Arkenau, HT; Camidge, DR; George, S; Serkova, NJ; Gwyther, SJ; Spratlin, JL; Lal, R; Spicer, J; Desouza, NM; Leach, MO; Chick, J; Poondru, S; Boinpally, R; Gedrich, R; Brock, K; Stephens, A; Eckhardt, SG; Kaye, SB; Demetri, G; Scurr, M. First-in-human phase I trial of two schedules of OSI-930, a novel multikinase inhibitor, incorporating translational proof-of-mechanism studies. *Clinical Cancer Research*, v. 19, p. 909-19, 2013.

Yildirim, H; Guler, E; Yavuz, M; Ozturk, N; Yaman, PK; Subasi, E; Sahin, E; Timur, S. Ruthenium (II) complexes of thiosemicarbazone: Synthesis, biosensor applications and evaluation as antimicrobial agentes. *Materials Science and Engineering: C*, v. 44, p. 1-8, 2014.

Young, A; Topham, C; Moore, J; Turner, J; Wardle, J; Downes, M. A patient preference study comparing raltitrexed ("Tomudex") and bolus or infusional 5-fluorouracil regimens in advanced colorectal cancer: influence of side effects and administration atributes. *European Journal of Cancer Care*, v. 8, p. 154-161, 1999.

Zunino, F; Capranico, G. DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anti-Cancer Drug Design*, v. 5, p. 307-17, 1990.

APÉNDICE A

**Artigo publicado na *European Journal of Medicinal Chemistry*:
*Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of
their in vitro and in vivo antitumor activities***

O objetivo deste artigo foi realizar a síntese, a caracterização estrutural e avaliação da atividade antiproliferativa e antitumoral de derivados 2-tiofenotiossemicarbazonas. Na etapa do planejamento estrutural, foram idealizadas substâncias híbridas com porções distintas do tiofeno e da tiossemicarbazida, onde as diferenças foram oriundas das substituições dos isotiocianatos empregados na síntese. A elucidação das estruturas dos compostos obtidos foi realizada utilizando técnicas espectroscópicas e espectrométricas convencionais, necessárias para a confirmação dos compostos de interesse. Além disso, a espectroscopia de NOESY foi empregada para a confirmação do distereoisômero obtido na síntese. Inicialmente, nos ensaios biológicos, foi empregado o ensaio da sulforrodamina B como método de triagem *in vitro* e a partir dele, selecionar o composto mais promissor da série estudada. De posse dos resultados, foi possível prosseguir os ensaios através da utilização da citometria de fluxo com o objetivo de identificar o mecanismo de morte celular provocado pelo composto utilizado (apoptose ou necrose) e também se a morte celular da linhagem escolhida tinha interferência no ciclo celular. Posteriormente, prosseguindo para os ensaios *in vivo*, foi realizado o ensaio de toxicidade aguda para atestar a dose segura na execução dos testes utilizando animais. O modelo de Ehrlich de pata foi escolhido como forma de analisar a atividade antitumoral do composto escolhido e confirmar a atividade demonstrada nos ensaios anteriores. Os resultados deste estudo, confirmam as tiossemicarbazonas como uma classe de compostos potencialmente bioativas na atividade antitumoral, ressaltando a sua importância na Química Medicinal para o desenvolvimento de novos fármacos.

Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities

Jamerson Ferreira de Oliveira^a, Anekécia Lauro da Silva^a, Débora Barbosa Vendramini-Costa^b, Cezar Augusto da Cruz Amorim^a, Júlia Furtado Campos^c, Amélia Galdino Ribeiro^a, Ricardo Olímpio de Moura^d, Jorge Luiz Neves^e, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz^b, João Ernesto de Carvalho^b, Maria do Carmo Alves de Lima^{a,*}

^a*Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Antibióticos, 50670-901, Recife, PE (Brazil)*

^b*Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Divisão de Farmacologia e Toxicologia - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) 13083-970, Campinas, SP (Brazil)*

^c*Instituto Nacional de Tecnologia Nordeste/MCT, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, 50740-540 - Recife, PE (Brazil)*

^d*Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Departamento de Farmácia, 58429-500, Paraíba, PB (Brazil)*

^e*Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Química Fundamental, 50670-901, Recife, PE (Brazil)*

To whom correspondence should be addressed: Maria do Carmo Alves de Lima

*Email: nenalima.mariadocarmo@gmail.com

Phone number: +558121268347

Fax: +558121268346

Keywords: antitumor, cytotoxicity, medicinal chemistry, thiosemicarbazone, thiophene.

Abstract

A series of thiophene-2-thiosemicarbazones derivatives (5-14) was synthesized, characterized and evaluated for their antitumor activity. They were tested *in vitro* against human tumor cell lines through the colorimetric method. The results revealed that compounds 7 and 9 were the most effective in inhibiting 50% of the cell growth after 48 hours of treatment. As compound 7 showed a potent antiproliferative profile, it has been chosen for further studies in 786-0 cell line by flow cytometry. Treatments with compound 7 (50 μ M) induced early phosphatidylserine exposure after 18 hours of exposure and this process progressed phosphatidylserine exposure with loss of cell membrane integrity after 24 hours of treatment, suggesting a time-dependent cell death process. Regarding the cell cycle profile, no changes were observed after treatment with compound 7 (25 μ M), suggesting a mechanism of cell death independent on the cell cycle. The *in vivo* studies show that compound 7 possess low acute toxicity, being the doses of 30-300 mgKg⁻¹ chosen for studies in Ehrlich solid tumor model in mice. All doses were able to inhibit tumor development being the lowest one the most effective. Our findings highlight thiophene-2-thiosemicarbazones as a promising class of compounds for further studies concerning new anticancer therapies.

1 Introduction

Cancer is a leading cause of death worldwide, responsible for 8.2 million deaths in 2012. These numbers can be linked to population growth, the process of industrialization and changes in habit life [1-2]. In general, cancer treatment is based on radiotherapy, surgical removal, hormone therapy, immunotherapy and chemotherapy, alone or combined, aiming to increase the patients survival [3].

The design of new compounds prototypes based on medicinal chemistry followed by the biological approach has been a good strategy for the discovery of new therapies [4]. Molecular hybridization is a strategy for drug design widely used in medicinal chemistry and aims at the junction of two chemical moieties into a single compound, targeting an increase in biological activity [5]. The presence of heterocyclic systems prototype molecules is of great interest in design of the new drugs. Features as small molecular weight, presence of heteroatoms and aromatic structures can mimic endogenous substrates, which may lead to the development of a biological activity [6].

Raltitrexed (Tomudex[®]) (Figure 1) is a quinazoline folate analogue that has in its structure the thiophene heterocycle, which is also found in many promising antitumor compounds [6-9]. The mechanism of action of this drug is the selective inhibition of the enzyme thymidylate synthase, which leads to DNA fragmentation and subsequent cell death [10]. Raltitrexed is indicated for the treatment of colorectal cancer (CRC) been considered a promising alternative therapy when combined with 5-fluorouracil (5-FU) and capecitabine (Figure 1). This treatment schedule is better acceptance by patients since it results in lower clinical complications, such as thrombosis and cardiotoxicity, than the use of 5-FU and capecitabine alone [11-13].

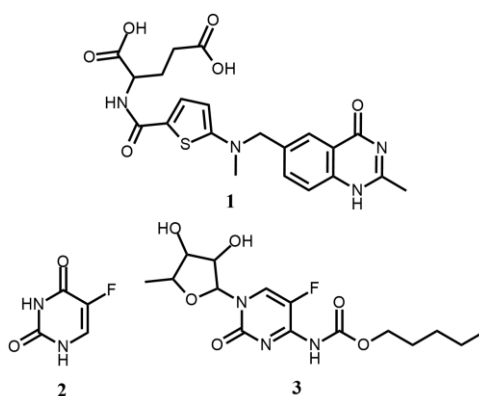


Figure 1. Structure of Raltitrexed (1); 5-FU (2) and Capecitabine (3)

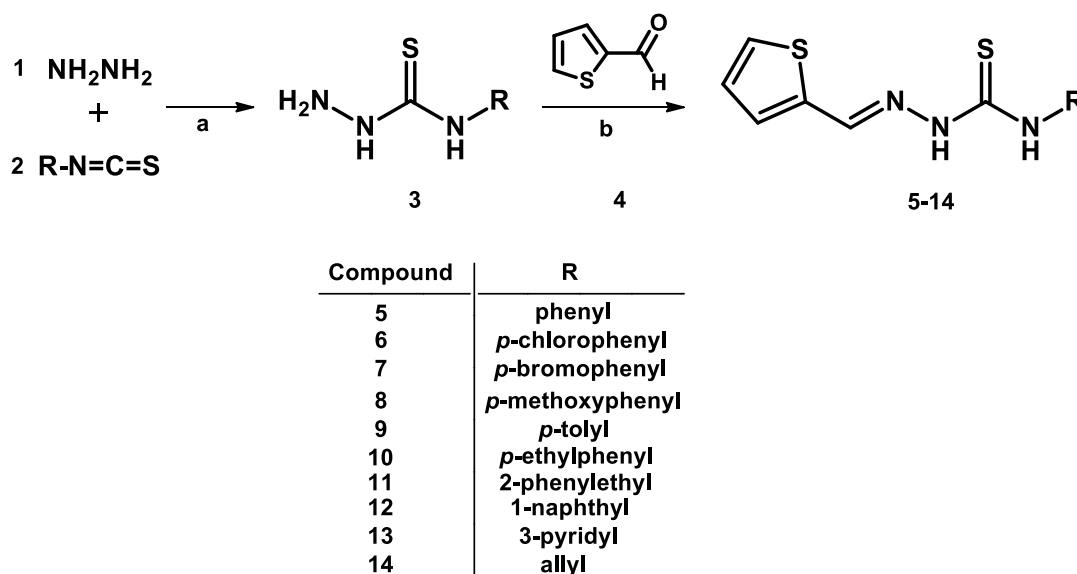
Recent studies have been aimed to the discovery of new drugs for cancer treatment. The thiosemicarbazones comprise a class of molecules known for their diverse biological activities such as antimicrobial [14], antitumor [15-17], antileishmanial [18] and antiplasmodic [19] properties. Among the thiosemicarbazones, triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, 3-AP) is the most promising molecule undergoing clinical phase II studies [20]. The probable mechanism of action of this drug is the inhibition of the enzyme ribonucleotide reductase [21], but there is also evidence of topoisomerase II inhibition [22].

Thus, this study aimed to describe the production of novel thiophene-2-thiosemicarbazones through molecular hybridization strategy between the thiophene core of raltitrexed and the thiosemicarbazone of triapine properly synthesized and characterized. The derivatives were evaluated for their antiproliferative activity in a panel of human tumor cell lines. The most promising molecule (compound 7) was chosen for further studies concerning cell death and cell cycle profile by flow cytometry, focusing on the human renal adenocarcinoma cell line 786-0. Finally, we also describe the *in vivo* antitumor activity of 7 in the murine model of Ehrlich solid tumor in mice.

2 Results and Discussion

2.1 Chemistry

2-thiophene-thiosemicarbazone derivatives (**5-14**) were prepared in two steps. Thiosemicarbazide was obtained via nucleophilic addition reaction between hydrazine and substituted isothiocyanates. The synthesized thiosemicarbazides reacted with 2-thiophene-carboxaldehyde, in presence of a catalytic amount of AcOH, via condensation reaction, leading to the formation of compounds of interest [23]. Good reaction yields were observed using this methodology (40-87%) (Scheme 1). Some compounds evaluated in this study were previously synthesized (compounds **5-8**) [24]. However, such compounds have not been investigated against its antitumor potential. Thus, both compounds previously synthesized (**5-8**) as the novel compounds (**9-14**) were assessed for their pharmacological potential.



Scheme 1. Synthetic procedures for thiosemicarbazones (**5-14**).

Reagents and conditions: (a) hydrazine, substituted isothiocyanates, dichloromethane, r.t., 120 min; (b) substituted thiosemicarbazides, 2-thiophene-carboxaldehyde, ethanol, acetic acid (3 drops), r.t., 120 min.

The structures were determined by ^1H and ^{13}C NMR, DEPT, IR and high-resolution mass. Analyzes of these data were compatible with the proposed compounds. The IR spectra showed characteristic stretches of connections $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{N}$ and NH . Additionally, the absence of bands between 2700 cm^{-1} and 2500 cm^{-1} excluded the possibility of a thione-thiol tautomerism (e.g., $\text{H}-\text{N}-\text{C}=\text{S}$, $-\text{N}=\text{C}-\text{SH}$) [25].

As exemplified with the ^1H NMR analysis of *N*-(*p*-tolyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone (**9**), the singlet peak δ 2.50 corresponded to the *para* methyl group at phenyl ring. The phenyl protons occurred as doublets peak at 7.15 and 7.42 ppm. The protons of thiophene group occurred at δ 7.13, 7.52 and 7.69. Singlet peak at δ 8.33 confirms the success of the reaction between *N*-(*p*-tolyl)-thiosemicarbazone and 2-thiophene-carboxaldehyde, relative to iminic proton ($\text{H}-\text{C}=\text{N}$). In addition, signals related to N-H the presented chemical shifts δ 9.70 and 11.76 ppm. The IR spectrum showed stretches on the $\text{C}=\text{N}$ and $\text{C}=\text{S}$ at 1593 and 1557 cm^{-1} , respectively, and the absorption band of N-H at 3297 cm^{-1} . The predominance of the thione form of the synthesized thiosemicarbazones may be observed in the chemical shift of carbon of the thiocarbonyl ^{13}C NMR at δ 175.5. Quaternary carbon peaks were confirmed by DEPT experiments to appear at δ 134.3, 136.3, 138.3 and 175.5. In a manner complementary, HRMS confirmed the identity of all the synthesized compounds.

All target compounds **5-14** could exist in either the *E* or *Z* isomeric form due to the imino bond ($-\text{CH}=\text{N}-$). However, in ^1H NMR spectra, the $-\text{N}=\text{CH}-$ signal was seen as a single peak for each compound indicating that only one isomer was generated. The hydrogen attached to carbon of imine presented chemical shift in ^1H NMR spectra δ 8.24-8.40 for all target compounds. X-ray crystallography and NOESY studies confirm the preference of the *E* diastereoisomer [26,27].

Compound **10** was chosen for elucidation of isomerism of the derivatives obtained in this study. Many NOESY signals were observed for this compound. By one side, NOESY signals of the studied molecule were employed to assign and corroborate the obtained structure. By the other side, portion of the NOESY spectra reveals the interactions between $\text{H}-\text{C}=\text{N}$ (at 8.33 ppm), N-H (at 9.70 ppm) and $\text{H}-\text{C}=\text{C}$ (at 7.53 ppm) moieties. The close proximity between this group of protons suggests (*E*)-isomer as main product. Additionally, no signal relative to (*Z*)-isomer of the analyzed structure was detected in the NOESY spectrum (See supplementary material).

As reported in the literature, chemical shift values around 11 ppm (9-12 ppm) were correlated to the *E* isomers, whereas higher ppm values were reported for the *Z* forms (over 12 ppm) [28]. The most important signal in the process of describing the correct stereoisomer is that connected with NH group (CS)NH-proton [29]. The ^1H NMR of all synthesized compounds shows a singular peak around 11.50-11.97 ppm relative to the NH signal which indicates *E* isomer was generated.

2.2 Biological activities

2.2.1 *In vitro* studies

The antiproliferative effects of the thiophene-2-thiosemicarbazones derivatives on nine human tumor cell lines and one non-tumor cell line are summarized in Table 1, using doxorubicin as an positive control. The results were expressed as concentration required to inhibit in 50% the cell growth, named as GI_{50} in μM (Table 1). Moreover, the average activity was expressed as mean GI_{50} that was the arithmetical average of all GI_{50} values obtained for the human tumor cell lines. All ten derivatives evaluated have the thiophene core in their structure, with modifications present in the distal portion of the compounds.

Considering the average activity (mean GI_{50}), three compounds (**6**, **7** and **9**) exhibited values lower than 50 μM , while six compounds (**5**, **8**, **10**, **12**, **13** and **14**) showed mean GI_{50} between 50 - 100 μM , been **11** inactive (mean $GI_{50} > 100 \mu M$).

Compound **5** represents the basic skeleton of this series of derivatives, with no replacements in the phenyl portion. This compound did not exert antiproliferative effect in most tumor cell lines evaluated been effective against K562 (leukemia cell line, $GI_{50} = 16.7 \mu M$) (Table 1).

The introduction of a halogen into phenyl group (**6** and **7**, mean $GI_{50} < 50 \mu M$) resulted in an important increase in cytostatic activity. The derivative with a *p*-bromo-phenyl moiety (**7**) stood out among the other compounds, being active against all cell lines excepting leukemia (K-562), with GI_{50} values ranging from 0.74 to 79.4 μM . Besides, the *p*-chlorophenyl analogue (**6**) was active against K-562, NCI-ADR/RES (multiresistant ovarian cells), 786-0 (renal cell adenocarcinoma) and U251 (glioma) with GI_{50} values of 2.0, 2.8, 7.4 and 8.3 μM , respectively (Table 1).

Moreover, the results observed for **9** and **10** seems to suggest that the size of the alkyl group introduced in the aromatic group affect greatly the cytostatic effective of a thiophene-2-thiosemicarbazones derivatives. This way, when a C2 chain (*p*-ethylphenyl, **10**) was attached to the base molecule, this resulted in lower inhibitory effect than that observed for **5** for almost cell lines, while a *p*-methylphenyl derivative (**9**) afforded an increment in cytostatic activity (Table 1). Also, it was interesting to notice that both **9** (*p*-methylphenyl) and **10** (*p*-ethylphenyl) showed a high selectivity to K-562 (leukemia, $GI_{50} < 0.9$ and 1.6. μM , respectively), suggesting that the presence of an alkyl group introduced in the aromatic group affect increase the cytostatic effective against leukemia (Table 1).

Besides, when an ethyl group was introduced as a spacer group (compound **11**, 2-phenyl-ethyl derivative, a structural isomer of **10** (*p*-phenyl-ethyl) even the cytostatic activity against leukemia was not observed resulting in an inactive thiosemicarbazone derivative (mean $GI_{50} > 100 \mu M$). These results suggest that large aliphatic carbon chains do not favor the antiproliferative activity. Also, the introduction of a hydroxyalkyl chain in the aromatic group (**8**, *p*-methoxyphenyl) might be considered unfavorable, since **8** was inactive for most of cell lines (mean $GI_{50} < 89 \mu M$) except for leukemia ($GI_{50} = 1.7 \mu M$, Table 1).

The substitution of phenyl ring for a 1-naphthyl ring (**12**) or for a 3-pyridyl group (**13**) resulted in an increased antiproliferative effect (mean $GI_{50} > 59.5$ and $> 65.9 \mu M$, respectively) compared to **6** (mean $GI_{50} > 81.8 \mu M$) mainly due the increment on activity against U251 (glioma), 786-0 (renal adenocarcinoma) for both **12** and **13** besides against NCI-ADR/RES (multidrug resistant ovarian adenocarcinoma) and K562 (leukemia) for **12** and NCI-H460 (no-small lung adenocarcinoma) for **13**. Finally, the structural modification presented by compound **14** (allyl), certainly did not favor an increase in the antiproliferative activity. Removing the phenyl ring and the insertion of an unsaturated aliphatic chain in this class of compounds significantly reduced their activity in the tumor cell lines used in this experiment (Table 1).

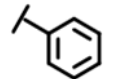
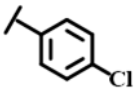
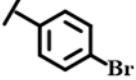
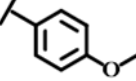
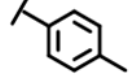
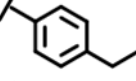
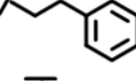
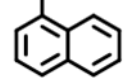
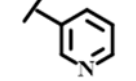
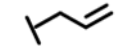
The non-tumor cell line HaCaT (immortalized human keratinocyte) was inserted into the panel in order to simulate normal human cells since immortalized cells share with tumor cells the characteristic of rapid mitosis of tumor cells without the presence of oncogenes. Considering the obtained results, the most potent derivatives 2-thiophene-thiosemicarbazones **6**, **7** and **9**, also showed cytostatic effect against non-tumor cell line (Table 1).

The thiosemicarbazones are known for their antiproliferative activity, and our results corroborate with previous studies that show a cytostatic profile for the cell line K-562 (leukemia) [30]. The *N*-acylhydrazones are analogous of thiosemicarbazone compounds. One of the common points between these two classes of compounds is the presence of the C=N bond. Recent studies show the importance of *N*-acylhydrazones for the antiproliferative activity against cell lines, as we can observe in our study for the compounds that possess the substitution *p*-methylphenyl and *p*-bromophenyl [31].

In summary, it can be suggested that the inclusion of aromatic rings in the structure of thiosemicarbazones improves the antiproliferative activity of this class of compounds. Furthermore, the presence of halogens directly connected to this core also has a large contribution to the increase in this activity. However, the presence of alkyl groups either

directly connected to the thiosemicarbazone or attached to an aromatic ring skeleton does not appear to increase the effect on cell growth, unless the alkyl moiety is a short chain. With these preliminary results, it was possible to assume that these thiosemicarbazones derivatives show a remarkable antiproliferative activity.

Table 1. *In vitro* antiproliferative activity (GI₅₀^a in μ M) of *N*-substituted-2-(thiophene-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone derivatives 5-14.

Compound		U251	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT-29	K-562	Mean GI ₅₀	HaCat
5		74.7	>100	94.6	>100	50.4	>100	>100	>100	16.7	>81.8	>100
6		8.3	15.8	>100	2.8	7.4	>100	>100	>100	2.0	>48.4	14.7
7		4.2	71.1	<0.74	1.7	4.5	4.7	79.4	17.7	>100	>31.5	0.8
8		>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	1.7	>89.0	>100
9		12.6	16.8	38.6	4.8	19.5	80.6	29.7	>100	<0.9	>33.7	17.6
10		>100	>100	>100	>100	82.6	>100	>100	>100	1.6	>87.1	17.6
11		>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
12		12.7	>100	>100	6.6	15.2	>100	>100	>100	1.8	>59.5	82.4
13		26	>100	>100	>100	5.6	45.9	>100	>100	16.4	>65.9	45.4
14		>100	>100	>100	>100	21.2	>100	>100	>100	6.0	>80.8	>100
Dox	-	<0,046	0,05	<0,046	0,21	<0,046	<0,046	0,13	0,30	<0,046	<0.102	<0,046

^aConcentration that promotes 50% of growth inhibition after 48 hours of treatment. GI₅₀ was determined from nonlinear regression analyses by using ORIGIN 8.0 software (OriginLab Corporation). Experiments were conducted in triplicate. Dox: doxorubicine, positive control.

In view of the potency of compound **7** towards almost all cell lines (Table 1), this compound was selected for further studies against the human kidney tumor cell line 786-0, which is an epithelial adenocarcinoma that produces the parathyroid hormone (PTH) like peptide as breast and lung tumors [32]. First, the proliferation of 786-0 cells were determined after short time exposition (24 h) and a narrow concentration range (25, 50, 100 and 200 μ M) of compound **7** in order to establish better experimental condition for flow cytometric evaluations (phosphatidylserine exposition and cell cycle). This way, after 24h, the necessary concentration to promote total growth inhibition and 50% of cell death were 28 and 91.8 μ M, respectively, thus an intermediary concentration (50 μ M) was selected for further experiments.

One feature of some cell death subroutines, like apoptosis, parthanotos and netosis [33], is the early exposure of phosphatidylserine (PS) on external cell membrane surface. This PS externalization signals for recognition and engulfment of dying cells, as viable cell membranes exhibits substantial phospholipid asymmetry, with most of the PS residing on the inner leaflet of the plasma membrane [34]. For assessment of PS exposure, we used the double staining with Annexin V and 7-amino-actinomycin D (7-AAD). Annexin V binds to PS translocated to the outer face of the cell membrane during the initial process of cell death while 7-AAD binds to the DNA only after loss of cell membrane integrity. This way, cells stained only with annexin-V-PE could be considered as in early stage of cell death subroutine.

After 24h of treatment, compound **7** (50 μ M) increased 786-0 cell population with PS externalization (21.9 ± 2.4 %) and with PS externalization and loss of cell membrane integrity (35.7 ± 2.4 %) in comparison to vehicle-treated cells (3.8 ± 0.5 % and 3.6 ± 0.8 %, respectively; $p < 0.001$) (Figure 2). These results are in accordance with the antiproliferative activity assay, where after 24 hours of treatment, lethal concentration for 50% of the cells was 91.8 μ M, thus cell death rate of around 35% of the cells was expected after a treatment with 50 μ M of the compound. Moreover, the PS externalization induced by compound **7** (50 μ M) seemed to be a dynamic, time-dependent process such as 18 hours of exposition resulted 15.5 ± 3.5 % of 786-0 cells with PS externalization without damage to cell membrane in comparison to 7.2 ± 1.4 % of vehicle-treated 786-0 cells with the same markup ($p < 0.05$) (Figure 2).

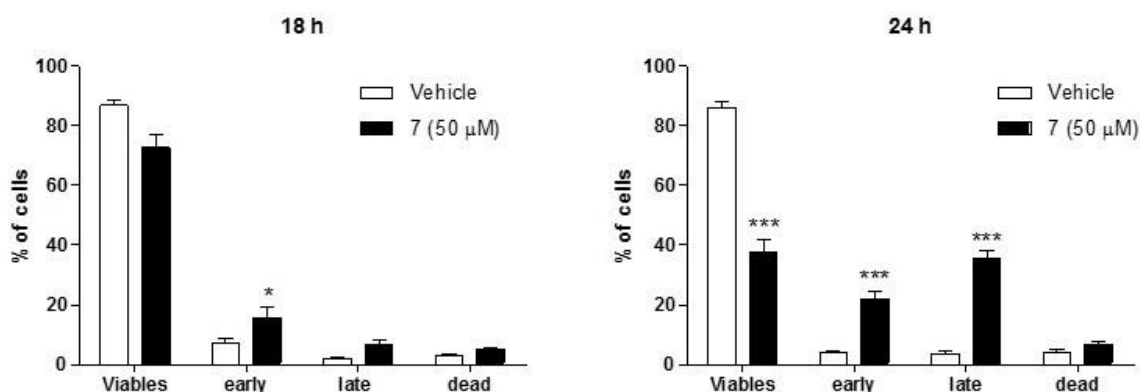


Figure 2. Percentage of 786-0 cells stained with annexin V-PE/7-AAD after 18 and 24h of treatment.

Viable (unstained cells - viable cells), early (annexin V-PE +/7-AAD - stain), dead (annexin V-PE -/7-AAD + stain) and late (annexin V-PE +/7-AAD + stain). Cells treated for 18 and 24 hours with vehicle (culture medium plus DMSO 0.25%) and compound 7 (50 µM). Results represented by mean $\pm$ standard error, in percentage of cells, from three different experiments. A total of 5000 events were collected per experiment. ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, * statistically different from vehicle.

For flow cytometer cell cycle evaluation, 786-0 cells were treated for 24 hours with a lower concentration of 7 (25 µM) in order to minimize a sub-G1 phase arrest. Colchicine (1.25 nM) was employed a positive control, as it promotes a cell cycle arrest on G2/M phase. The cell cycle distribution of treated 780-6 cells is presented in Table 2.

As expected, colchicine (1.25 nM) increased the population of 786-0 cells in G2/M phase ($57.5 \pm 3.3\%$) followed by a decreasing on G1 phase cell population ($21.5 \pm 2.2\%$) in comparison to vehicle-treated cells (Table 2). At these experimental conditions, no interference on cell cycle profile was observed for compound 7 at 25 µM (Table 2).

Table 2. Cell cycle profile of 786-0 cells treated with vehicle (DMSO), colchicine (1.25 nM) and compound 7 (25 µM) for 24 hours.

Treatments	Sub-G1	G1	S	G2/M
Vehicle	3.0 ± 0.7	46.7 ± 0.8	14.6 ± 1.3	35.7 ± 0.9
Colchicine	8.9 ± 0.8	$21.5 \pm 2.2^{***}$	12.6 ± 1.2	$57.5 \pm 3.3^{***}$
Compound 7	5.4 ± 0.9	44.9 ± 1.8	13.9 ± 0.7	35.9 ± 0.6

Cell population, expressed in percentage, for each phase of cell cycle, after 24h-treatment with vehicle, colchicine or compound 7. Results represented by mean $\pm$ standard error, in percentage of cells, from three different experiments. A total of 5000 events were collected per experiment. ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test. *** $p < 0.001$, statistically different from vehicle.

Several studies have been conducted in order to understand the mechanism by which thiosemicarbazones act on tumor cells [35,36]. For example, a copper complex of thiosemicarbazone was evaluated for antitumor activity and it was able to induce PS exposition without loss of cell membrane integrity in a concentration-dependent way in the HepG2 (human hepatocellular carcinoma) cell line [37]. Another study showed that anthraquinone-thiosemicarbazone derivatives (AQ-thiosemicarbazone) were able to induce apoptosis in HeLa cell line (human cervix adenocarcinoma) in a caspase-dependent pathway, mainly through the mitochondrial pathway activation of caspase 8 [38]. These data are consistent with our findings, as compound **7** also led to PS exposition without loss of cell membrane integrity in a time-dependent way.

The complex network of cell death subroutines and cell cycle are closely linked, as many of cancer cells treatment with anticancer agents usually result in cell cycle arrest, which subsequently leads the cells to initiate a cell death subroutine [39]. The cell cycle analysis by flow cytometry enables to quantify the amount of cells in the different cell cycle phases and thereby infer a possible interference of the compounds evaluated on DNA replication [40]. Although compound **7** promotes cell death in 786-0 as evidenced by PS exposition, no interference on cell cycle was observed in our study.

There are several studies showing molecules that are also cytotoxic for non-tumor cells, by inducing cell death through a mechanism other than inhibition of DNA duplication, synthesis, cell cycle check points or inhibition of mitosis, as would be observed in the cell cycle experiment by flow cytometry. An example is Goniothalamine, a styryl lactone with well-known antitumor activity *in vitro* and *in vivo* that also does not promote cell cycle arrest [41].

2.2.2 *In vivo* studies

Owing to the promising *in vitro* antiproliferative activity of **7**, we evaluated its *in vivo* antitumor activity in the Ehrlich solid tumor model in mice. In order to choose the properly doses to perform the antitumor studies in mice, the acute toxicity of compound **7** was evaluated.

2.2.2.1 Oral Acute Toxicity

Animals orally treated with **7** (200 and 400 mgKg⁻¹) showed no severe clinical side effects with no mortality (Table 3). Moreover, the single treatment with 600 mgKg⁻¹ of

compound 7 promoted adhesion of organs. Based on these results, the *in vivo* anticancer assay was conducted with 30, 100 and 300 mgKg⁻¹ of compound 7.

Table 3. Effects of compound 7 on acute oral toxicity assay–fixed dose procedure.

Dose (mgKg ⁻¹)	Survival rate and side effects
200	100% survival rate, no severe toxic effect*
400	100% survival rate, no severe toxic effect*
600	100% survival rate, adhesions of organs

* Clinical signs and conditions associated with pain, suffering, and impending death, are described in detail in a separate OECD Guidance Document [42].

2.2.2.2 *In vivo* antitumor activity

In this experiment, Ehrlich tumor cells were injected in the paw subcutaneous of the mice and treatments began 3 days after the cells inoculation. The tumor development was accompanied by measures of paw volume using a pletismometer at time 0 (basal volume) and each three days until the end of the experiment (Table 4) [43], Treatment with compound 7, at 30 mgKg⁻¹, was effective since the 6th day of experiment, when inhibited tumor development in 30% in comparison to negative control group. At the same day, positive controls doxorubicin (3 mgKg⁻¹) and piroxicam (40 mgKg⁻¹) showed an inhibition of 35.8 and 34% respectively (Table 4). At the 9th day, all treatments presented smaller tumor volumes than negative control group being compound 7 (30 mgKg⁻¹) and piroxicam (40 mgKg⁻¹) the most potent treatments. From the 12th day until the 15th day (end of experiment), all treatments presented statistical differences with negative control, being treatments with 30 mgKg⁻¹ of compound 7 the most effective, inhibiting in 71.1%, in comparison to negative control group, in the 12th day, the tumor development (Table 4). However, the compound 7 at doses of 100 and 300 mg.Kg⁻¹ showed reductions of paw volume 39.6 and 49%, respectively, showing good activity of the compound in the model adopted. The measurement of variation in paw volume on Ehrlich tumor is a good indication of antitumor activity being well correlated with the antiinflammatory effect of compound 7.

Table 4. Effect of 2-thiophene-thiosemicarbazone (compound 7) on Ehrlich solid tumor development in mice.

Day	Paw volume variation (%) as compared to day-0 (mean $\pm$ SD)					
	Control	Doxorubicin 3 mgKg ⁻¹	Piroxicam 40 mgKg ⁻¹	Compound 7 30 mgKg ⁻¹	Compound 7 100 mgKg ⁻¹	Compound 7 300 mgKg ⁻¹
3	40.2 $\pm$ 7.0	43.7 $\pm$ 4.5	42.2 $\pm$ 3.6	26.8 $\pm$ 1.8	33.4 $\pm$ 2.4	39.4 $\pm$ 3.0
6	86.1 $\pm$ 5.7	55.6 $\pm$ 4.3**	57.2 $\pm$ 5.0**	60.6 $\pm$ 4.6**	78.1 $\pm$ 3.1	75.1 $\pm$ 5.4
9	95.5 $\pm$ 5.2	69.8 $\pm$ 4.9*	52.3 $\pm$ 3.6***	57.1 $\pm$ 5.2***	73.7 $\pm$ 4.2	72.8 $\pm$ 5.5*
12	125.5 $\pm$ 7.5	39.6 $\pm$ 3.6***	34.9 $\pm$ 3.1***	36.3 $\pm$ 6.6***	75.8 $\pm$ 4.3***	64.0 $\pm$ 7.9***
15	166.5 $\pm$ 6.0	97.9 $\pm$ 12.5***	47.3 $\pm$ 3.0***	82.0 $\pm$ 11.6***	118.6 $\pm$ 9.4***	106.0 $\pm$ 17.5***

Data were expressed as the mean $\pm$ SE of 6 animals per group. Results were considered significant when *p < 0.05; **p < 0.01 and ***p < 0.001 (in comparison to negative control group), determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni posttests.

The Ehrlich tumor is a murine breast adenocarcinoma, which presents an aggressive fast-growing behavior [44]. Ehrlich tumor cells generate an inflammatory response that leads to increase in vascular permeability, edema formation and cell migration [45]. In fact, the paw volume increased in the range of 25 to 40% (in comparison basal volume) in all experimental groups. Studies show that in the Ehrlich tumor occurs upregulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B), a transcription factor that regulates the expression of many pro-inflammatory and pro-proliferative genes [46]. Thus, the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) as adjuvants on cancer therapy is a good approach, as they target COX-2 and downregulate NF- κ B pathway, leading to inhibition of tumor proliferation [47]. Our results obtained for Piroxicam (NSAID) corroborate with these facts as this NSAID was inhibited effectively the Ehrlich tumor development (Table 4).

It is well-known that inflammation promotes all steps of carcinogenesis [48]. The inflammatory process establishes a microenvironment which is favorable to tumor growth and maintenance [49,50]. In fact, epidemiological data confirm the close relationship between cancer and inflammation, up to 20% of all cancer types are preceded by chronic inflammation [51].

Molecules presenting the thiophene moiety have antiinflammatory and antitumoral properties. 3-[4-(methylsulfonyl)phenyl]thiophene-2-carbaldehyde O-arylmethyl oximes

derivatives are able to inhibit COX-2 activity [52] and as this moiety is present on compound 7, it could be involved on the antiproliferative activity of this molecule, suggesting also an anti-inflammatory activity.

In our study, treatments with compound 7 were conducted by oral route and cell inoculation and tumor development were in the paw subcutaneous. The treatments conducted every two days (7 treatments in total) did not promote clinical side effects. All these results highlight compound 7 as a promising molecule for further studies for cancer chemotherapy, as the toxicity promoted by most of the drugs used on chemotherapy is still a challenge to overcome.

3 Conclusions

The novel thiophene-2-thiosemicarbazone derivatives have been prepared and shown cytostatic activity against several cancer cell lines. It can be suggested that the inclusion of aromatic rings in the structure of thiosemicarbazones improves the antiproliferative activity of this class of compounds and that the presence of halogens directly connected to this core also has a large contribution to the increase in this activity.

Compound 7 promotes PS externalization as a cell death signaling mechanism on the human renal adenocarcinoma cell line 786-0 without changes on cell cycle profile. Moreover, compound 7 possesses low acute toxicity, being able to inhibit Ehrlich solid tumor development in low doses (30 mgKg^{-1}) through orally administration without evidence of toxic effects. Our findings highlight thiophene-2-thiosemicarbazones as a promising class of compounds for further studies concerning new anticancer therapies.

4 Experimental Section

4.1 Chemistry

All reagents used in this study are commercially available (Sigma-Aldrich, Acros Organics, Vetec). Progress of the reactions was followed by thin-layer chromatography (TLC) analysis (Merck, silica gel 60 F₂₅₄ in aluminium foil). Melting points were determined on a Quimis 340 (Quimis, Brazil) capillary melting point apparatus and were uncorrected. IR spectra were recorded with a Bruker model IFS66 FT-IR spectrophotometer (Bruker, Germany) using KBr pellets. NMR spectra were measured on either a Varian UnityPlus 400 MHz (400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C) or a Bruker AMX-300 MHz (300 MHz for ^1H

and 75.5 MHz for ^{13}C) instruments. DMSO- d_6 was purchased from Sigma-Aldrich. Chemical shifts are reported in ppm and multiplicities are given as s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (double doublet), and coupling constants (J) in hertz. Mass spectrometry experiments were performed on a MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

4.1.1 General procedure for the synthesis of thiosemicarbazides (3)

80% hydrazine hydrate (**1**) (311 μL , 10 mmol) was added slowly to a solution of different isothiocyanates (**2**) (5 mmol) in dichloromethane (10 mL). The reaction was processed under magnetic stirring for 2 h at room temperature. The precipitate was filtered off, washed with dichloromethane and dried in desiccator under vacuum. Additional amount of desired compound could be recovered from the filtrate after cooling. After drying, the product was recrystallized from *n*-hexane.

4.1.2 General procedure for the synthesis of thiosemicarbazones (5-14)

Substituted thiosemicarbazide (**3**) (1 mmol) and few drops of acetic acid were added to a solution of 2-thiophene-carboxaldehyde (**4**) (93 μL , 1 mmol) in ethanol (10 mL). The reaction was processed under magnetic stirring for 2 h at room temperature. The precipitate was filtered off, washed with ethanol then dried in desiccator under vacuum. Additional amount of desired compound could be recovered from the filtrate after cooling. After drying, the product was recrystallized from toluene.

4.1.2.1 (*E*)-*N*-(*p*-tolyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone (**9**)

Compound **9** was obtained as white powder (119 mg, 40%): R_f = 0.45 (*n*-Hex/AcOEt 8:2); mp: 193-194°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.50 (s, 3H), 7.13 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 11.76 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 20.5 (CH_3), 125.3 (CH Ar), 127.9 (CH Ar), 128.5 (CH Ar), 129.1 (CH Ar), 130.8 (CH Ar), 134.3 (Cq Ar), 136.3 (Cq Ar), 137.8 (C=N), 138.3 (Cq Ar), 175.5 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1557 (C=S), 1593 (C=N), 3297 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z [$M+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{S}_2$: 276.058; found: 276.089.

4.1.2.2 (*E*)-*N*-(4-ethylphenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone (**10**)

Compound **10** was obtained as white powder (162 mg, 55%): R_f = 0.46 (*n*-Hex/AcOEt 7:3); mp: 186-188°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.19 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 2.60 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 7.13 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 4 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 11.76 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 15.6 (CH₃), 27.6 (CH₂), 125.4 (CH Ar), 127.3 (CH Ar), 127.9 (CH Ar), 129.1 (CH Ar), 130.8 (CH Ar), 136.5 (Cq Ar), 137.8 (C=N), 138.3 (Cq Ar), 140.7 (Cq Ar), 175.5 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1521 (C=S), 1547 (C=N), 3296 (N-H) cm⁻¹; HRMS m/z [$M+H$]⁺ calcd for C₁₄H₁₅N₃S₂: 290.074; found: 290.098.

4.1.2.3 (*E*)-*N*-phenethyl-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone (**11**)

Compound **11** was obtained as white powder (240 mg, 81%): R_f = 0.56 (*n*-Hex/AcOEt 7:3); mp: 169-170°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.90 (t, J = 8 Hz, 2H), 3.75 (q, J = 6 Hz, 2H), 7.11 (dd, J_1 = 3.6 Hz, J_2 = 4 Hz, 1H), 7.20-7.34 (m, 5H), 7.43 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.12 (t, J = 6 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 11.50 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 34.7 (CH₂), 45.0 (CH₂), 126.2, 127.9 (CH Ar), 128.4 (CH Ar), 128.5 (CH Ar), 128.7 (CH Ar), 130.5 (CH Ar), 137.3 (C=N), 138.6 (Cq Ar), 139.2 (Cq Ar), 176.5 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1523 (C=S), 1546 (C=N), 3353 (N-H) cm⁻¹; HRMS m/z [$M+H$]⁺ calcd for C₁₄H₁₅N₃S₂: 290.074; found: 290.083.

4.1.2.4 (*E*)-*N*-(naphthalen-1-yl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone (**12**)

Compound **12** was obtained as white powder (411 mg, 80%): R_f = 0.59 (*n*-Hex/AcOEt 8:2); mp: 212-214°C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.14 (dd, J_1 = 5.4 Hz, J_2 = 5.1 Hz, 1H), 7.51-7.55 (m, 4H), 7.57 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 7.83-7.99 (m, 3H), 8.40 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 11.92 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 123.5 (CH Ar), 125.8 (CH Ar), 126.4 (CH Ar), 127.2 (CH Ar), 128.4, 129.6, 131.2, 132.5, 135.9, 138.4 (C=N), 151.5 (Cq Ar), 167.6 (Cq Ar), 177.7 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1519 (C=S), 1543 (C=N), 3328 (N-H) cm⁻¹; HRMS m/z [$M+H$]⁺ calcd for C₁₆H₁₃N₃S₂: 312.058; found: 312.071.

4.1.2.5 (*E*)-*N*-(pyridin-3-yl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone (**13**)

Compound **13** was obtained as white powder (233 mg, 79%): R_f = 0.40 (*n*-Hex/AcOEt 7:3); mp: 186-187°C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.14 (t, J = 3.6 Hz, 1H), 7.39 (m, 1H),

7.54 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.97 (m, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.38 (m, 1H), 8.66 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 11.97 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 122.8 (CH Ar), 127.9 (CH Ar), 129.4 (CH Ar), 131.2 (CH Ar), 133.3 (CH Ar), 135.8 (CH Ar), 138.1 (CH Ar), 138.6 (C=N), 145.9 (Cq Ar), 147.1 Cq Ar), 176.1 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1519 (C=S), 1543 (C=N), 3295 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S}_2$: 263.038; found: 263.061.

4.1.2.6 (*E*)-*N*-allyl-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone (**14**)

Compound **14** was obtained as white powder (223 mg, 65%): R_f = 0.50 (*n*-Hex/AcOEt 8:2); mp: 159-160°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 4.20 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 5.09 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 5.14 (d, J = 17.2 Hz, 1H), 5.95-5.86 (m, 1H), 7.11 (m, 1H), 7.44 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.23 (m, 1H), 8.26 (s, 1H), 11.51 ppm (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 45.6 (CH_2), 115.5 (CH_2), 127.8 (CH allyl), 128.7 (CH Ar), 130.5 (CH Ar), 134.9 (CH Ar), 137.4 (C=N), 138.5 (Cq Ar), 176.8 (C=S) ppm; IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1533 (C=S), 1553 (C=N), 3358 (N-H) cm^{-1} ; HRMS m/z $[M+H]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}_2$: 226.043; found: 226.070.

4.2 Biological activities

4.2.1 *In vitro* assays

Considering that different cell lines display different sensitivities toward the same cytotoxic compound, the antiproliferative activity of all the 2-thiophene-thiosemicarbazone were evaluated *in vitro* against nine different human cancer cell lines [U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (multidrug resistant ovary carcinoma), 786-0 (renal), NCI-H460 (non-small cell lung cancer), PC-3 (prostate), HT-29 (colon), and K-562 (leukemia)]. The antiproliferative activity of each compound was also evaluated *in vitro* against spontaneously transformed keratinocytes from histologically normal skin (HaCat cells). Doxorubicin was employed as the positive control [53].

Cells in 96-well plates (100 μL cells/well) were exposed to 2-thiophene-thiosemicarbazone derivatives in concentrations 0.25, 2.5, 25 and 250 $\mu\text{g/mL}$ in DMSO/RPMI at 37°C, 5% of CO_2 in air for 48 hours. Doxorubicin was used as standard (0.025, 0.25, 2.5 and 25 $\mu\text{g/mL}$). Final DMSO concentration did not affect cell viability (0.1%). Before (T_0 plate) and after (T_1 plates) sample addition, cells were fixed with 50% trichloroacetic acid and

cell proliferation determined by spectrophotometric quantification (540 nm) of cellular protein content using sulforhodamine B assay. The GI_{50} (concentration expressed in μM inhibiting 50% of cell growth or cytostatic effect) were determined through non-linear regression analysis using the concentration-response curve for each cell line in software ORIGIN 8.0[®] (OriginLab Corporation) [54-56]. To choose concentrations for flow cytometry analyses, 786-0 cells were treated for 24 hours with 25, 50, 100 and 200 μM of compound 7. Cell growth was determined through sulforhodamine B assay and concentration that promote total growth inhibition (TGI) and lethal concentration 50 - LC_{50} (concentration that promote 50% of cell death) were calculated in software ORIGIN 8.0[®] (OriginLab Corporation).

4.2.2 Measurement of phosphatidylserine externalization

Phosphatidylserine externalization was analysed by flow cytometry using Guava[®] Nexin Assay Kit (Guava Technologies, Hayward, CA) in accordance with manufacturer's instructions. 786-0 cells were inoculated in 12 wells plate (3×10^4 cells/well) and incubated for 24 hours at 37 °C, 5% of CO_2 in air. Then, cells were treated with compound 7 (50 μM) in DMSO/RPMI for 18 and 24 hours, harvested and resuspended at a density of 1×10^5 cells in 100 μL of supplemented medium. One hundred microliter of binding buffer containing annexin-V and 7-AAD were added on the cells and incubated in the dark for 20 minutes at room temperature. After, cells were analysed by flow cytometer (Guava Easycyte Mini - Guava Technologies, Hayward, CA). We collected 5.000 events, as suggested by the protocols of Guava Easycyte kits. To make it clear we added the following statement in the methods and figures legends: "A total of 5.000 events were collected". We performed three experiments in triplicate, as showed in the legends of figures and methodology. We performed statistical analyses for all experiments and all the significance was showed as asterisks, according with p value.

4.2.3 Cell cycle analyses

Cells cycle analyses were performed with the Guava[®]Cell Cycle reagent (Guava Technologies, Hayward, CA) in accordance with manufacturer's instructions. 780-0 cells were inoculated in 12 wells plate (3×10^4 cells/well) and incubated for 24 hours at 37 °C, 5% of CO_2 in air. Afterwards, cells were deprived of serum for 24 hours for cell cycle synchronization and then treated with compound 7 (25 μM) and colchicine (Sigma-Aldrich, 1.25 nM) in DMSO/RPMI, for 24 hours. After treatment, cells were harvested and

resuspended at a density of 1×10^5 cells in 100 μL of PBS. The binding buffer containing propidium iodide (PI) was added to the cells (100 μL) and suspension was incubated in the dark for 20 minutes at room temperature. After, cells were analysed by flow cytometer (Guava Easycyte Mini - Guava Technologies, Hayward, CA). We collected 5.000 events, as suggested by the protocols of Guava Easycyte kits. To make it clear we added the following statement in the methods and figures legends: "A total of 5.000 events were collected". We performed three experiments in triplicate, as showed in the legends of figures and methodology. We performed statistical analyses for all experiments and all the significance was showed as asterisks, according with p value.

4.2.4 *In vivo* assays

4.2.4.1 Animals

Experiments were conducted with Balb/C mice (20 - 35 g) obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animals Sciences (CEMIB-UNICAMP). Animals were maintained at the Animal facilities of Pharmacology and Toxicology Division, CPQBA, University of Campinas (Campinas, Brazil), under controlled conditions ($22 \pm 3^\circ\text{C}$ for 12 h light/dark cycle, free access to food and water). All mice were fasted for 16 hours prior to each experiment because treatments were administered orally. Euthanasia was performed by cervical dislocation.

Animal care, research and animal sacrifice protocols were in accordance with the principles and guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Institute of Biology/ UNICAMP - Ethical Committee for Animal Research (number 3329-1).

4.2.4.2 Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure

A fixed dose procedure was adopted to evaluate the acute oral toxicity of compound 7 according to Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals [42]. Groups of 5 mice were dosed in a stepwise procedure using the fixed doses of 600, 400 and 200 mgKg^{-1} . Clinical signs and conditions associated with pain, suffering and impending death are described in detail in a separate OECD Guidance Document [57].

4.2.4.3 Ehrlich solid tumor in mice

The most active compound **7** was evaluated for its *in vivo* antiproliferative activity in the Ehrlich solid carcinoma model in mice. The procedures were developed according to Vendramini-Costa et al. (2010) [43] with few modifications on data analysis.

Cell maintenance and preparations: The Ehrlich ascitic tumor (EAT), derived from a spontaneous murine mammary adenocarcinoma, was maintained in the ascitic form by weekly intraperitoneal transplantations of 5×10^5 tumor cells/animal, in order to prepare cells for the following test. The ascitic fluid was removed by opening the belly and carefully collecting all the fluid using a sterile 3 mL syringe. Ascitic tumor cell counts were performed in a Neubauer hemocytometer, and the total number was determined by the Trypan blue dye exclusion method, with tumor cell viability always higher than 90%. The cells were then diluted in 0.9% phosphate buffer saline (PBS) into final inoculation density (2.5×10^6 cells/30 μ L).

Ehrlich solid tumor: After cells inoculation, basal volumes of the right hind paw were measured in a plethysmometer apparatus (7140 Ugo Basile). For the solid form implantation, 2.5×10^6 viable tumor cells in a volume of 30 μ L were injected in subplantar site of the right hind paw of *Balb-C* mice (n= 8 per group) [58]. The compound **7** was emulsified with 1% Tween 80 (SIGMA®) and dissolved in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0. The test compound was administered on the 3th day after tumor inoculation, at doses of 30, 100 and 300 mgKg⁻¹ orally. Doxorubicin (3 mgKg⁻¹, i.p.) and piroxicam (40 mgKg⁻¹, orally) were used as the standard drugs. After tumor cell inoculation, the paw volume was measured every three days using the plethysmometer apparatus till the 15th day, when the animals were sacrificed. The tumor growth was measured considering the following formula:

$$\text{Variation of the tumor growth (\%)} = \frac{(\text{Volume measured} - \text{Basal volume}) \times 100}{\text{Basal volume}}$$

4.3 Statistical Analysis

The experimental results were expressed as the mean $\pm$ standard error (SE) and by analysis of variance (ANOVA), one-way and two-way, followed by Tukey or Bonferroni tests. P values lower than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as indicative of significance and represented by: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. The calculations were performed using the statistical software GraphPad Prism version 5.0, San Diego California, USA.

Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian agencies Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of Interest

The authors have declared that no competing interests exist.

References

- [1] R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, A. Jemal, *Ca-Cancer J. Clin.* 64 (2014) 9-29.
- [2] Globocan. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013: <http://globocan.iarc.fr>. (accessed: December 2014).
- [3] M. Videira, R.L. Reis, M.A. Brito, *Biochim. Biophys. Acta* 1846 (2014) 312-325.
- [4] E.J. Barreiro, *Rev. Virtual Quim.* 1 (2009) 26-34.
- [5] C. Viegas-Junior, A. Danuello, V.S. Bolzani, E.J. Barreiro, C.M. Fraga, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 1829-1852.
- [6] A. Lauria, A. Alfio, R. Bonsignore, C. Gentile, A. Martorana, G. Gennaro, G. Barone, A. Terenzi, A. M. Almerico, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 3291-3297.
- [7] J. Hu, L. Ding, Q. Song, Y. Gao, S. Qing, *J. Chromatogr.* 853 (2007) 147-153.
- [8] R. Romagnoli, P.G. Baraldi, C.L. Cara, E. Hamel, G. Basso, R. Bortolozzi, G. Viola, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5781-5791.
- [9] N.S. Ilyinsky, A.K. Shchyolkina, O.F. Borisova, O.K. Mamaeva, M.I. Zvereva, D.M. Azhibek, M.A. Livshits, V.A. Mitkevich, J. Balzarini, Y.B. Sinkevich, Y.N. Luzikov, L.G. Dezhenkova, E.S. Kolotova, A.A. Shtil, A.E. Shchekotikhin, D.N. Kaluzhny, *Eur. J. Med. Chem.* 85 (2014) 605-614.
- [10] A.L. Jackman, D.C. Farrugia, W. Gibson, R. Kimbell, K.R. Harrap, T.C. Stephens, M. Azab, F.T. Boyle, *Eur. J. Cancer*, 31 (1995) 1277-1282.
- [11] A. Young, C. Topham, J. Moore, J. Turner, J. Wardle, M. Downes, V. Evans, S. Kay, *Eur. J. Cancer Care (Engl)*, 8 (1999) 154-161.
- [12] G. Deboever, N. Hiltrop, M. Cool, G. Lambrecht, *Clin. Colorectal Cancer*, 12 (2013) 8-14.
- [13] C. Kelly, N. Bhuvu, M. Harrison, A. Buckley, M. Saunders, *Eur. J. Cancer*, 49 (2013) 2303-2310.

- [14] M.A. Souza, S. Johann, L.A.R.S. Lima, F.F. Campos, I.C. Mendes, H. Beraldo, E. M. Souza-Fagundes, P.S. Cisalpino, C.A. Rosa, T.M.A. Alves, N.P. Sá, C.L. Zani, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108 (2013) 342-351.
- [15] K. Hu, Z. Yang, S. Pan, H. Xu, J. Ren. *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 3453-3458.
- [16] P.M. Costa, M.P. Costa, A.A. Carvalho, S.M. Cavalcanti, M.V. Cardoso, G.B. Filho, D.A. Viana, F.V. Fachine-Jamacaru, A.C. Leite, M.O. Moraes, C. Pessoa, P.M. Ferreira. *Chem Biol Interact.* (2015), doi: 10.1016/j.cbi.2015.06.037.
- [17] S.M. Almeida, E.A. Lafayette, L.P. Silva, C.A. Amorim, T.B. Oliveira, A.L. Ruiz, J.E. Carvalho, R.O. Moura, E.I. Beltrão, M.C. Lima, L.B. Júnior. *Int J Mol Sci.* (2015), doi: 10.3390/ijms160613023.
- [18] E.A. Britta, D.B. Scariot, H. Falziroli, T. Ueda-Nakamura, C.C. Silva, B.P. Filho, R. Borsali, C.V. Nakamura. *BMC Microbiol.* 14 (2014) 236-248.
- [19] A. Walcourt, J. Kurantsin-Mills, J. Kwagyan, B. B. Adenuga, D. S. Kalinowski, D. B. Lovejoy, D. J. R. Lane, D. S. Richardson, *J. Inorg. Biochem.* 129 (2013) 43-51.
- [20] A.J. Ocean, P. Christos, J.A. Sparano, D. Matulich, A. Kaubish, A. Siegel, M. Sung, M.M. Ward, N. Hamel, I. Espinoza-Delgado, Y. Yen, M.E. Lane, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68 (2011) 379-388.
- [21] R.A. Finch, M.C. Liu, A.H. Cory, J.G. Cory, A.C. Sartorelli, *Adv. Enzyme. Regul.* 39 (1999) 3-12.
- [22] K. Ishiguro, Z.P. Lin, P.G. Penketh, K. Shyam, R. Zhu, R.P. Baumann, Y.L. Zhu, A.C. Sartorelli, T.J. Rutherford, E.S. Ratner, *Biochem. Pharmacol.* 91 (2014) 312-322.
- [23] S. Cunha, T.L. Silva, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 2090-2093.
- [24] S. Naskar, S. Naskar, M.G.B. Drew, S.I. Gorelsky, B. Lassalle-Kaiser, A. Aukauloo, D. Mishra, S.K. Chattopadhyay, *Polyhedron.* 28 (2009) 4101-4109.
- [25] B.D. Sarma, J.C. Bailar-Jr., *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 5476-5480.
- [26] D.R.M. Moreira, A.D. Oliveira, P.A.T.M. Gomes, C.A. de Simone, F.S. Villela, R.S. Ferreira, A.C. da Silva, T.A. dos Santos, M.C.B. de Castro, V.R. Pereira, A.C. Leite, *Eur. J. Med. Chem.* 75 (2014) 467-478.
- [27] Z. Liu, S. Wu, Y. Wang, R. Li, J. Wang, L. Wang, Y. Zhao, P. Gong, *Eur. J. Med. Chem.* 87 (2014) 782-793.
- [28] M. Serda, J.G. Malecki, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musiol, J. Polanski. *J Mol Struct.* 1037 (2013) 63-72.
- [29] V. Markovic, M.D. Joksovic, S. Markovic, I. Jakovljevic. *J Mol Struct.* 1058 (2014) 291-297.

- [30] A.P. Silva, M.V. Martini, C.M. Oliveira, S. Cunha, J.E. Carvalho, A.L.T.G. Ruiz, C.C. Silva, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 2987-2993.
- [31] D.N. Amaral, B.C. Cavalcanti, D.P. Bezerra, P.M.P. Ferreira, R.P. Castro, J.R. Sabino, C.M.L. Machado, R. Chammas, C. Pessoa, C.M.R. Sant'Anna, E.J. Barreiro, L.M. Lima, *PLoS One*, (2014), doi: 10.1371/journal.pone.0085380.
- [32] ATCC The Global Bioresource Center: www.atcc.org (accessed: November 2014).
- [33] L. Galluzzi, I. Vitale, J. M. Abrams, S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagoskonny, T.M. Dawson, V.L. Dawson, W.S. El-Deiri, S. Fulda, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nuñez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, G. Kroemer, *Cell Death Differ.* 19 (2012) 107-120.
- [34] T.V. Berghe, S. Grootjans, V. Goossens, Y. Dondelinger, D.V. Krysko, N. Takahashi, P. Vandenabeele, *Methods*, 61 (2013) 117-129.
- [35] C.P. Wu, S. Shukla, A.M. Calcagno, M.D. Hall, M.M. Gottesman, S.V. Ambudkar, *Mol. Cancer. Ther.* 6 (2007) 3287-3296.
- [36] M. Kashyap, S. Kandekar, A.T. Baviskar, D. Das, R. Preet, P. Mohapatra, S.R. Satapathy, S. Siddharth, S.K. Guchhai, C.N. Kundu, U.C. Banerjee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 934-938.
- [37] J. Shao, Z.Y. Ma, A. Li, Y.H. Liu, C.Z. Xie, Z.Y. Qiang, J.Y. Xu, *J. Inorg. Biochem.* 136 (2014) 13-23.
- [38] V. Markovic, A. Janicijevic, T. Stanojkovic, B. Kolundzija, D. Sladic, M. Vujcic, B. Janovic, L. Joksovic, P. T. Djurdjevic, N. Todorovic, S. Trifunovic, M. D. Joksovic, *Eur. J. Med. Chem.* 64 (2013) 228-238.
- [39] K.Y. Kim, Y.K. Seo, S.N. Yu, S.H. Kim, P.G. Suh, J.H. Ji, Y.M. Park, S.C. Ahn, *J. Canc. Sci. Ther.* 5 (2013) 23-30.
- [40] A.A. Ibrahim, H. Khaledi, P. Hassandarvish, A.H. Mohd, H. Karimian, *Dalton Trans.* 43 (2014) 3850-3860.
- [41] R.C. Barcelos, J.C. Pastre, D.B. Vendramini-Costa, V. Caixeta, G.B. Longato, P.A. Monteiro, J.E. Carvalho, R.A. Pilli, *ChemMedChem* 9 (2014) 2725-2743.
- [42] OECD Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation: 2000.
- [43] D.B. Vendramini-Costa, I.B.D. Castro, A.L.T.G. Ruiz, C. Marquissolo, R.A. Pilli, J.E. Carvalho, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 6742-6747.
- [44] J.A. Segura, L.G. Barbero, J. Marquez, *Immunol. Lett.* 74 (2000) 111-115.

- [45] D. Fecchio, P. Sirois, M. Russo, S. Jancar, *Inflammation*, 14 (1990) 125-32.
- [46] M.P. Charalambous, C. Maihofner, U. Bhambra, T. Lightfoot, N.J. Gooderham, *Br. J. Cancer*, 88 (2003) 1598-1604.
- [47] Y. Takada, A. Bhardwaj, P. Potdar, B.B. Aggarwal, *Oncogene*, 23 (2004) 9247-9258.
- [48] D.B. Vendramini-Costa, J.E Carvalho, *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012) 3831-3852.
- [49] D. Hanahan, R.A. Weinberg, *Cell*, 144 (2011) 646-674.
- [50] C.I. Diakos, K.A. Charles, D.C. McMillan, S.J. Clarke, *Lancet Oncol.* 15 (2014) 493-503.
- [51] R. Francescone, V. Hou, S.I. Grivennikov, *Cancer J.* 20 (2014) 181-189.
- [52] A. Balsamo, I. Coletta, A. Guglielmotti, C. Landolfi, F. Mancini, A. Martinelli, C. Milanese, F. Minutolo, S. Nencetti, E. Orlandini, M. Pinza, S. Rapposelli, A. Rossello. *Eur. J. Med. Chem.* 38 (2003) 157-168.
- [53] S.R. Kleeb, J.G. Xavier, R. Frussa-Filho, M.L.Z. Dagli, *Life Sci.* 60 (1997) 69-74.
- [54] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, M.R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990) 1107-1112.
- [55] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* 83 (1991) 757.
- [56] R. Shoemaker, *Nat. Rev. Cancer.* 6 (2006) 813.
- [57] OECD Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing: 2002.
- [58] F. Arcamone, *Cancer Res.* 45 (1985) 5995-5999.

Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities

Jamerson Ferreira de Oliveira^a, Anekécia Lauro da Silva^a, Débora Barbosa Vendramini-Costa^b, Cezar Augusto da Cruz Amorim^a, Júlia Furtado Campos^c, Amélia Galdino Ribeiro^a, Ricardo Olímpio de Moura^d, Jorge Luiz Neves^e, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz^b, João Ernesto de Carvalho^b, Maria do Carmo Alves de Lima^{a,*}

^a*Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Antibióticos, 50670-901, Recife, PE (Brazil)*

^b*Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Divisão de Farmacologia e Toxicologia - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) 13083-970, Campinas, SP (Brazil)*

^c*Instituto Nacional de Tecnologia Nordeste/MCT, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, 50740-540 - Recife, PE (Brazil)*

^d*Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Departamento de Farmácia, 58429-500, Paraíba, PB (Brazil)*

^e*Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Química Fundamental, 50670-901, Recife, PE (Brazil)*

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Lax
Amc
Sol
27.06.2014 OFF

Figure S1. ^1H -NMR spectrum (DMSO) of compound 8



Sample Name:

Data Collected on:
varian400-vnmrs400
Archive directory:

Sample directory:

FidFile: M0616_3.1h

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Jun 27 2014

Temp. 26.0 C / 299.1 K
Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.556 sec
Width 6410.3 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 399.7414584 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 57 sec

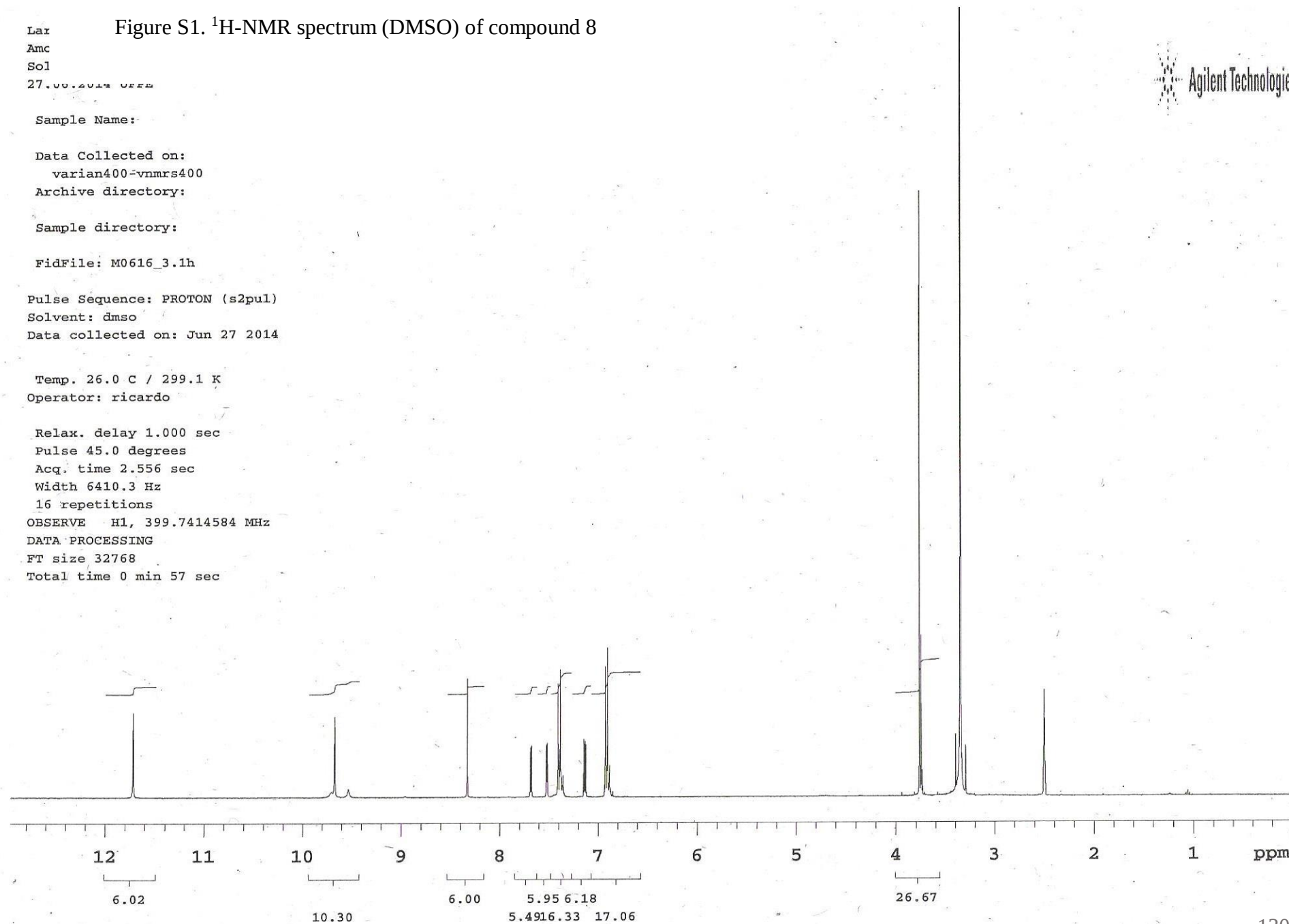
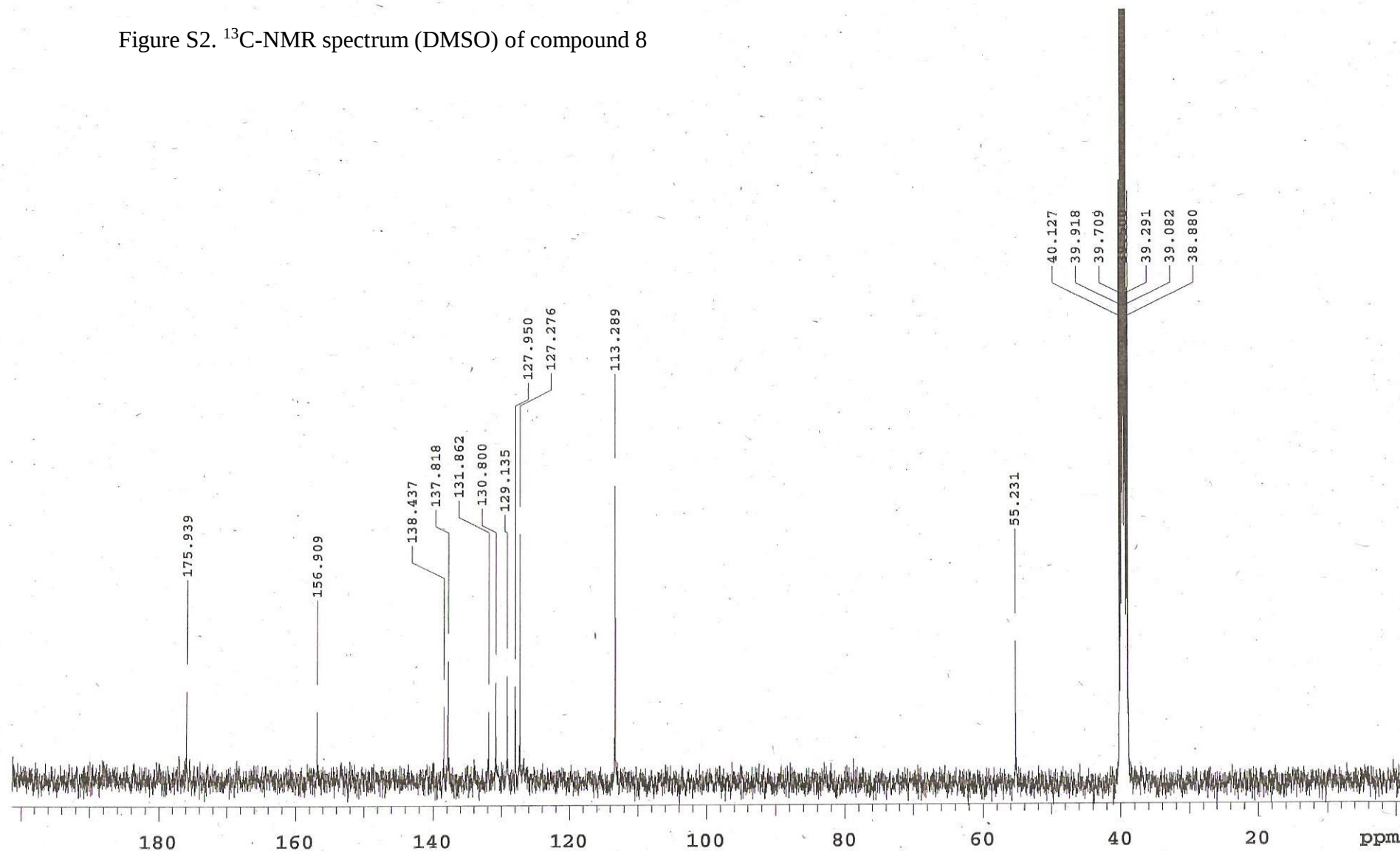


Figure S2. ^{13}C -NMR spectrum (DMSO) of compound 8



PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.285 sec
Width 25510.2 Hz
1024 repetitions

OBSERVE C13, 100.5151172
DECOUPLE H1, 399.7434654
Power 33 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING
Line broadening 2.0 Hz
FT size 65536
Total time 38 minutes

Larissa Souza
Amostra Lt-38
Solicitacao M0616-3
27.06.2014 UFPE

Solvent: dmso
Temp. 26.0 C / 299.1 K
Operator: ricardo

Figure S3. ^1H -NMR spectrum (DMSO) of compound 9

Lar
Amc
Sol
27.06.2014 09:11



Sample Name:

Data Collected on:
varian400-vnmrs400
Archive directory:

Sample directory:

FidFile: M0616_2.1h

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Jun 27 2014

Temp. 26.0 C / 299.1 K
Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.556 sec
Width 6410.3 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 399.7414588 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 57 sec

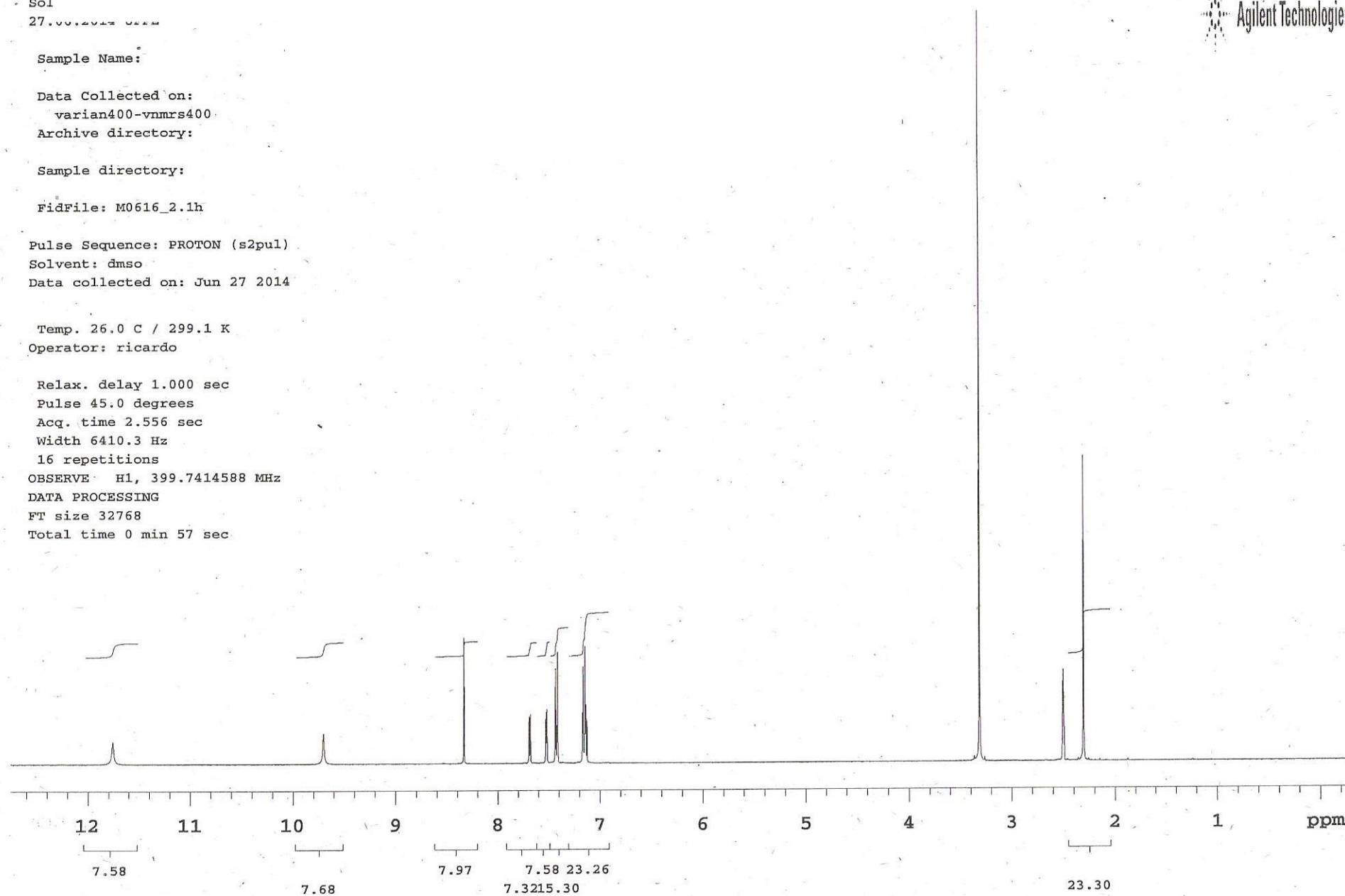
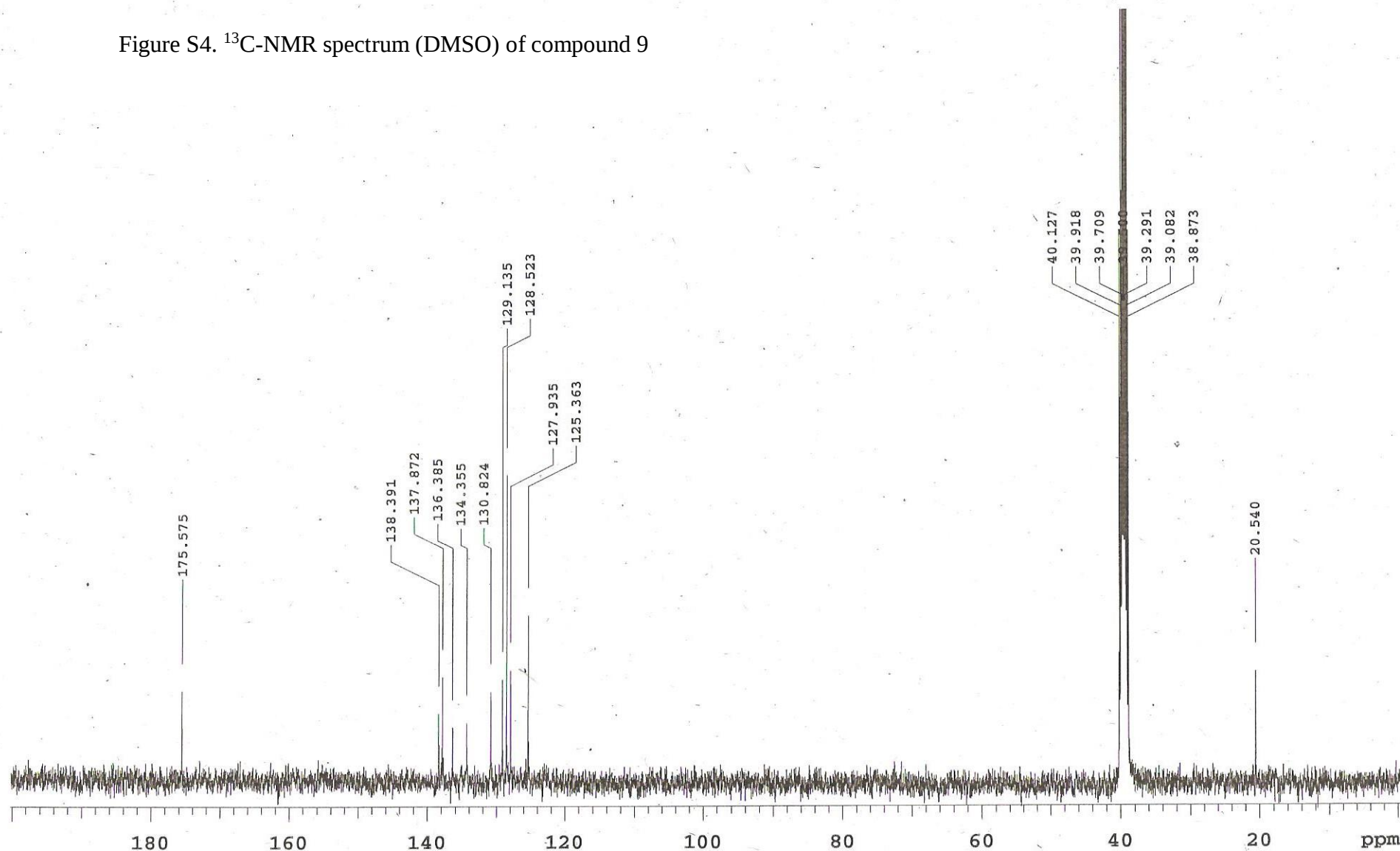


Figure S4. ^{13}C -NMR spectrum (DMSO) of compound 9



PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.285 sec
Width 25510.2 Hz
1024 repetitions

OBSERVE C13, 100.5151203
DECOUPLE H1, 399.7434654
Power 33 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated

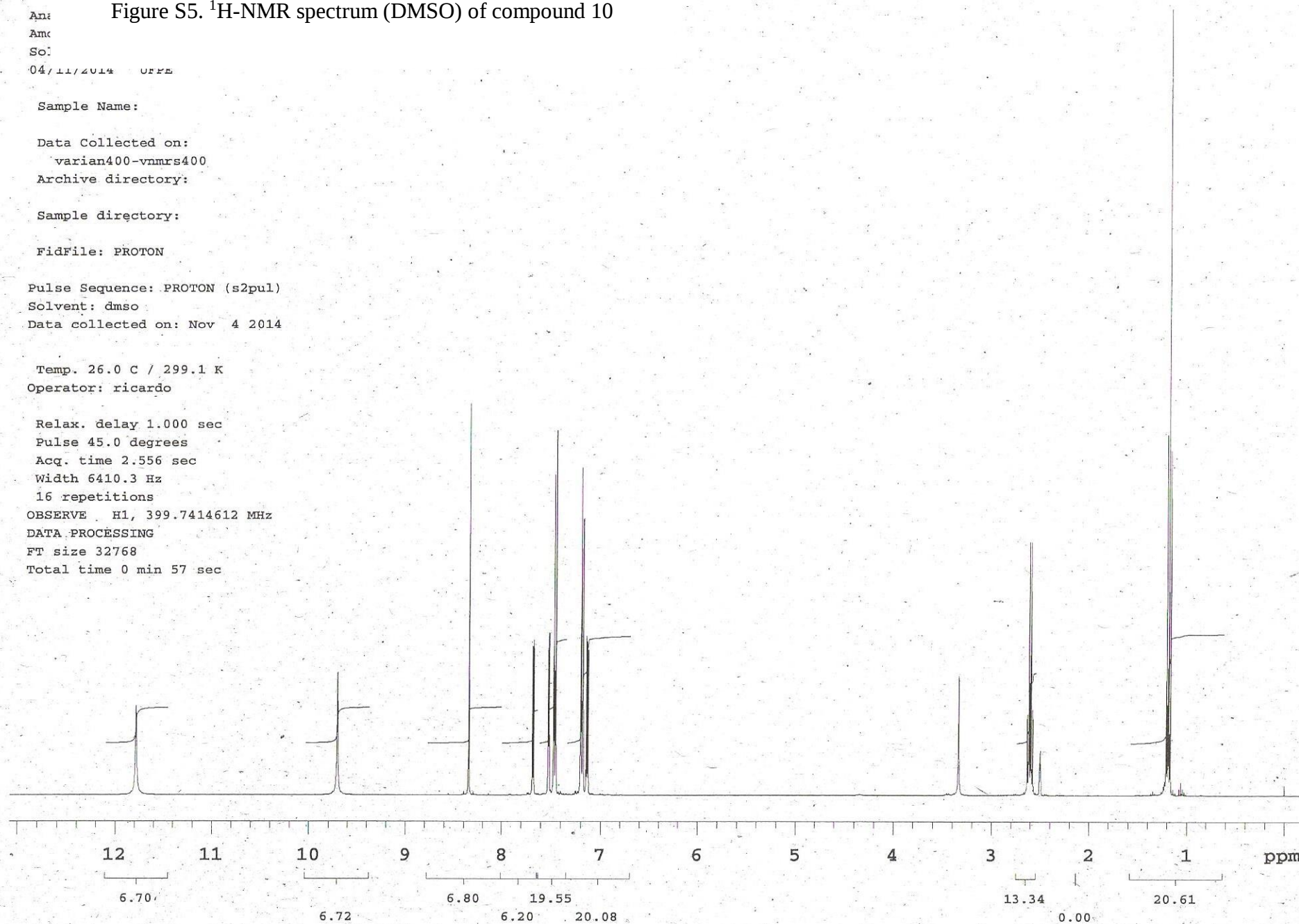
DATA PROCESSING
Line broadening 2.0 Hz
FT size 65536
Total time 38 minutes

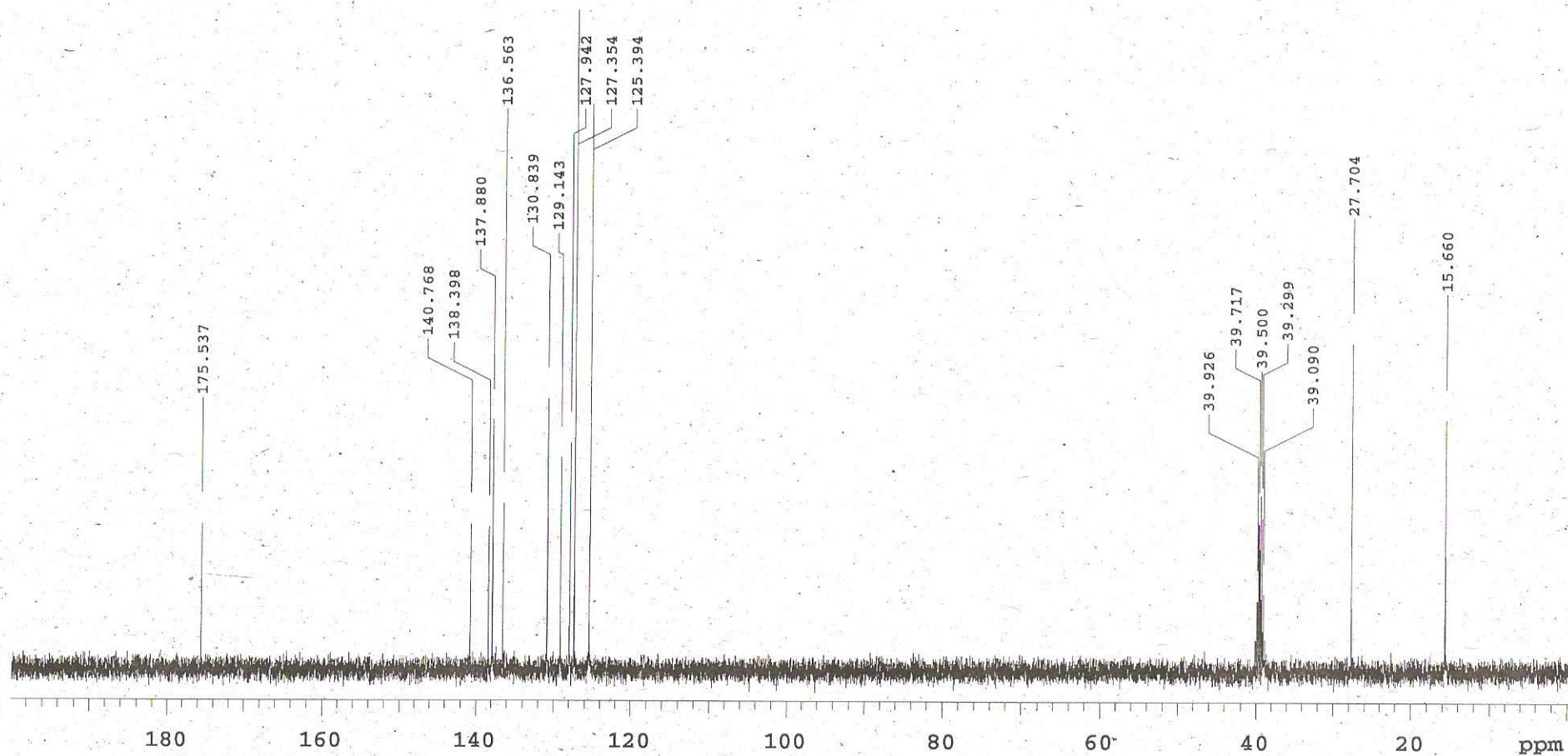
Larissa Souza
Amostra Lt-45
Solicitacao M0616-2
27.06.2014 UFPE

Solvent: dmso
Temp. 26.0 C / 299.1
Operator: ricardo

Figure S5. ^1H -NMR spectrum (DMSO) of compound 10

Ans
Amc
Sol
04/11/2014 OFFE
Sample Name:
Data Collected on:
varian400-vnmrs400
Archive directory:
Sample directory:
FidFile: PROTON
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Nov 4 2014
Temp. 26.0 C / 299.1 K
Operator: ricardo
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.556 sec
Width 6410.3 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 399.7414612 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 57 sec





PULSE SEQUENCE: DEPT
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.285 sec
 Width 25510.2 Hz
 32 repetitions

OBSERVE C13, 100.5151203
 DECOUPLE H1, 399.7434654
 Power 33 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING
 Line broadening 0.5 Hz
 FT size 65536
 Total time 10 minutes

Ana Daurá
 Amostra JF-06
 Solicitação N. M1021-11
 04/11/2014 UFPE

Solvent: dmsd
 Temp. 26.0 C / 299.1 K
 Operator: ricardo

Figure S7. ¹H-NMR spectrum (DMSO) of compound 11

U:
A:
S:

29.07.2014 UFPE

Sample Name:

Data Collected on:
varian400-vnmrs400
Archive directory:

Sample directory:

FidFile: M0722_16.1h

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Jul 29 2014

Temp. 26.0 C / 299.1 K
Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.556 sec
Width 6410.3 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 399.7414678 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min 57 sec

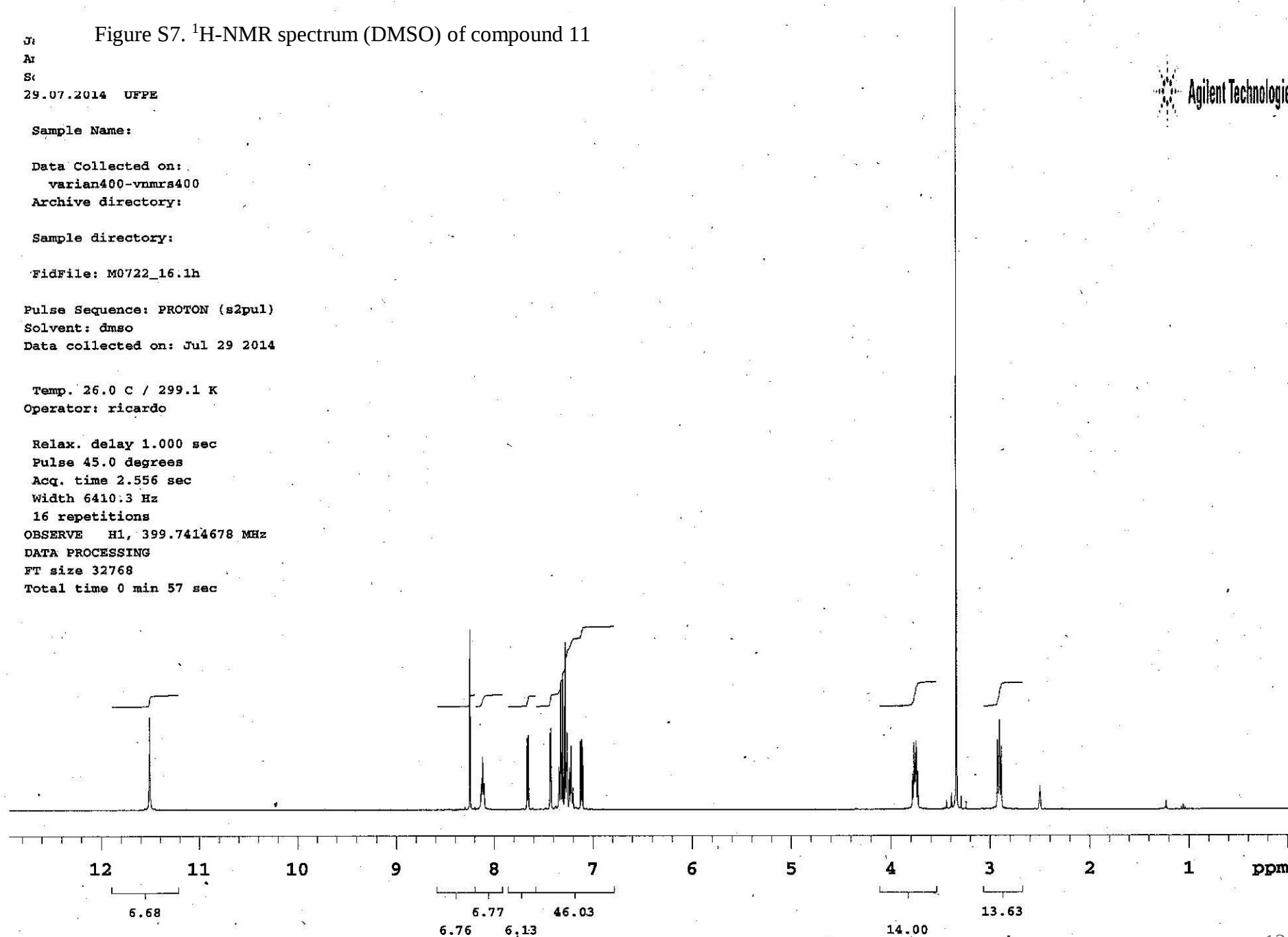
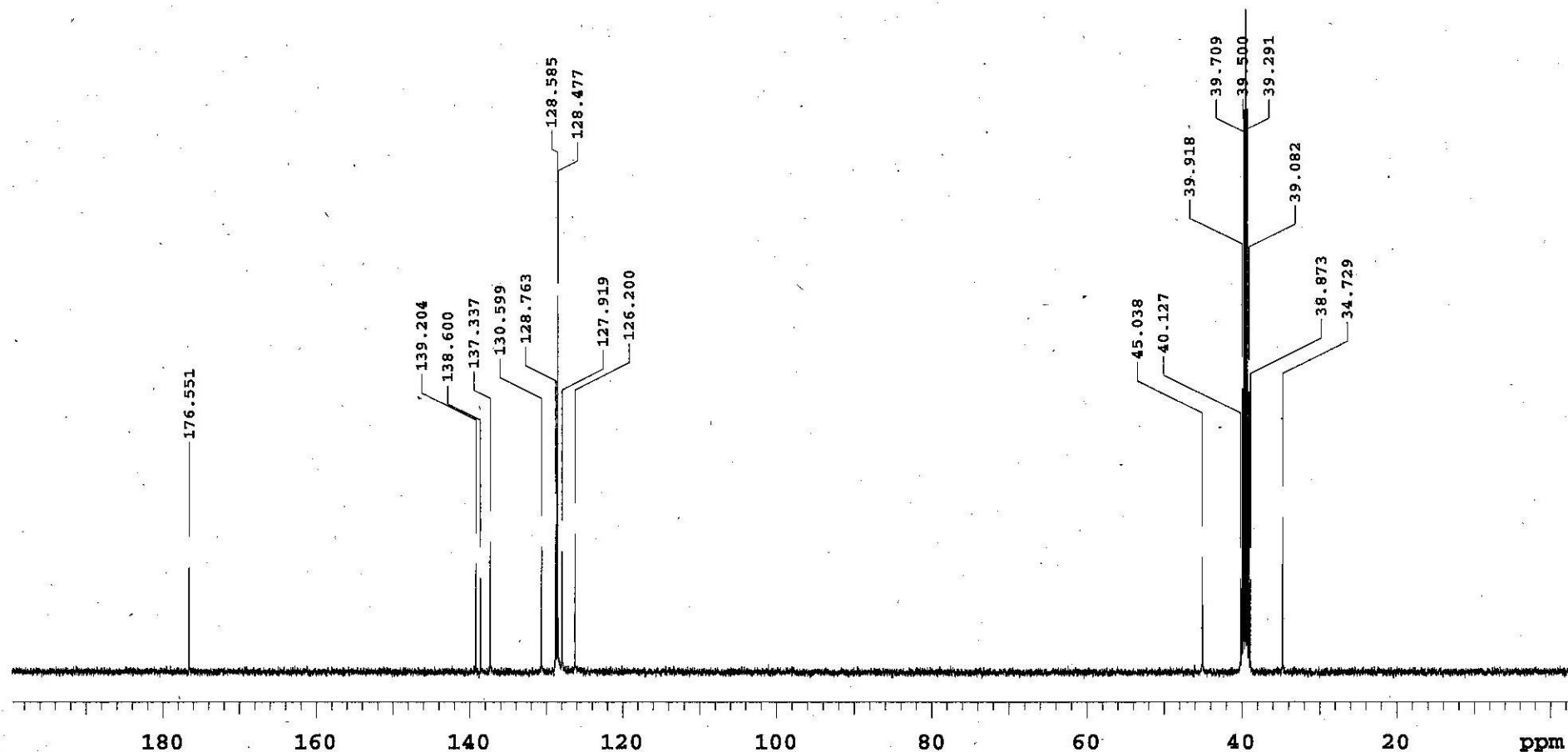


Figure S8. ^{13}C -NMR spectrum (DMSO) of compound 11



PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.285 sec
Width 25510.2 Hz
480 repetitions

OBSERVE C13, 100.5151211
DECOUPLE H1, 399.7434654
Power 33 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 18 minutes

Jamerson/Antibioticos
Amostra LT-41
Solicitacao N. M0722-16
29.07.2014 UFPE

Solvent: dmsO
Temp. 26.0 C / 299.1 K
Operator: ricardo

LARISSA_s
Amostra 1
Solicitaç
Data 27.0

Figure S9. ^1H -NMR spectrum (DMSO) of compound 12

Sample Name:
M0310-10
Data Collected on:
Agilent300-vnmrs300
Archive directory:

Sample directory:

FidFile: PRESAT

Pulse Sequence: PRESAT
Solvent: dmso
Data collected on: Mar 27 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 2.000 sec
Pulse 90.0 degrees
Acq. time 1.704 sec
Width 4807.7 Hz
64 repetitions
OBSERVE H1, 299.9456631 MHz
DATA PROCESSING
FT size 16384
Total time 4 min 6 sec

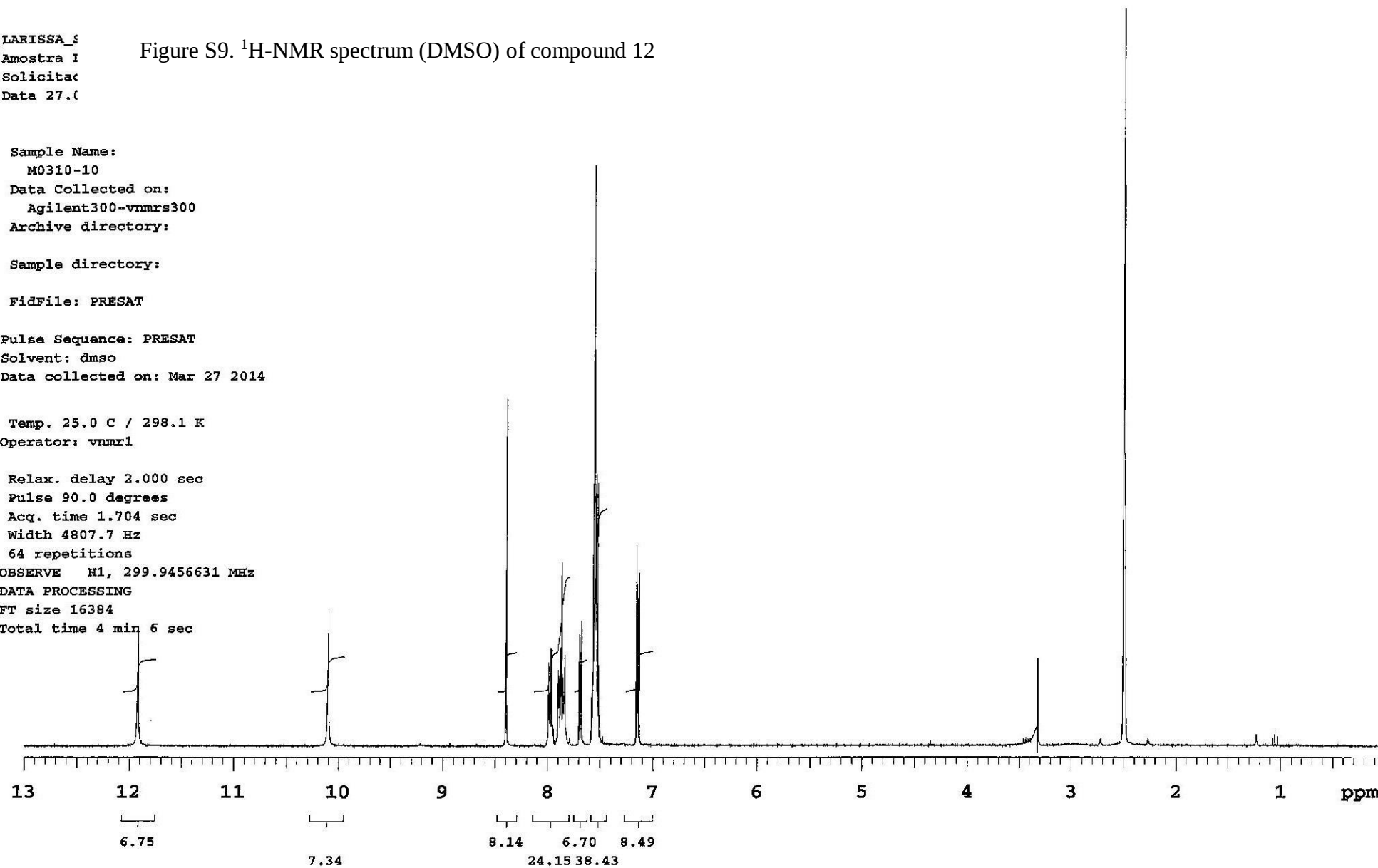
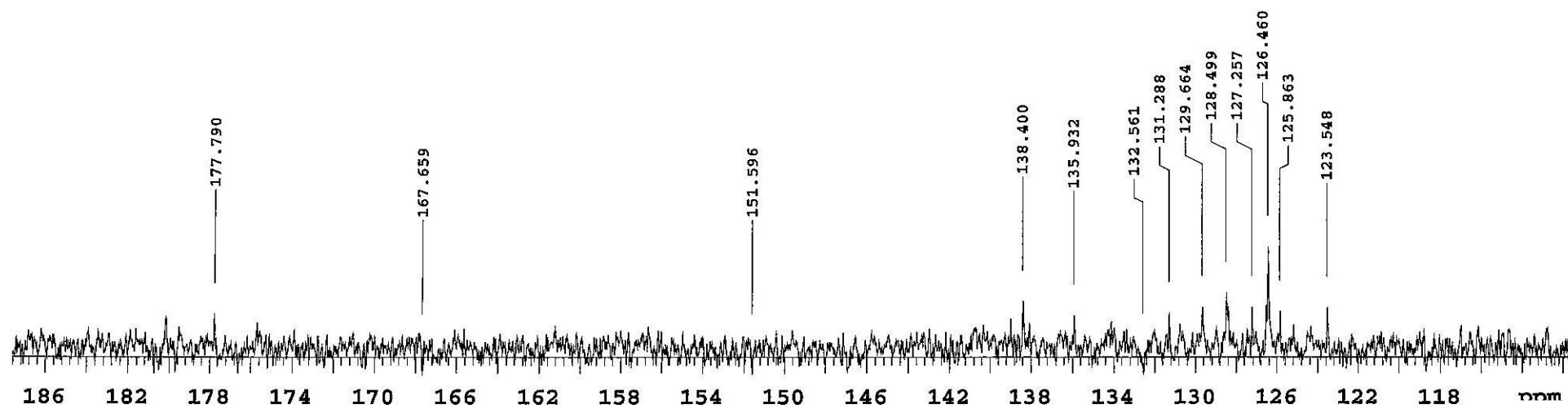


Figure S10. ^{13}C -NMR spectrum (DMSO) of compound 12



Larissa S
Amostra I
Solicitac
26.03.201

Figure S11. ^1H -NMR spectrum (DMSO) of compound 13

Sample Name:

V10

Data Collected on:

Agilent300-vnmrs300

Archive directory:

Sample directory:

FidFile: M0310_9.1h

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)

Solvent: dms0

Data collected on: Mar 26 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.704 sec

Width 6009.6 Hz

16 repetitions

OBSERVE H1, 299.9456631 MHz

DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 0 min 43 sec

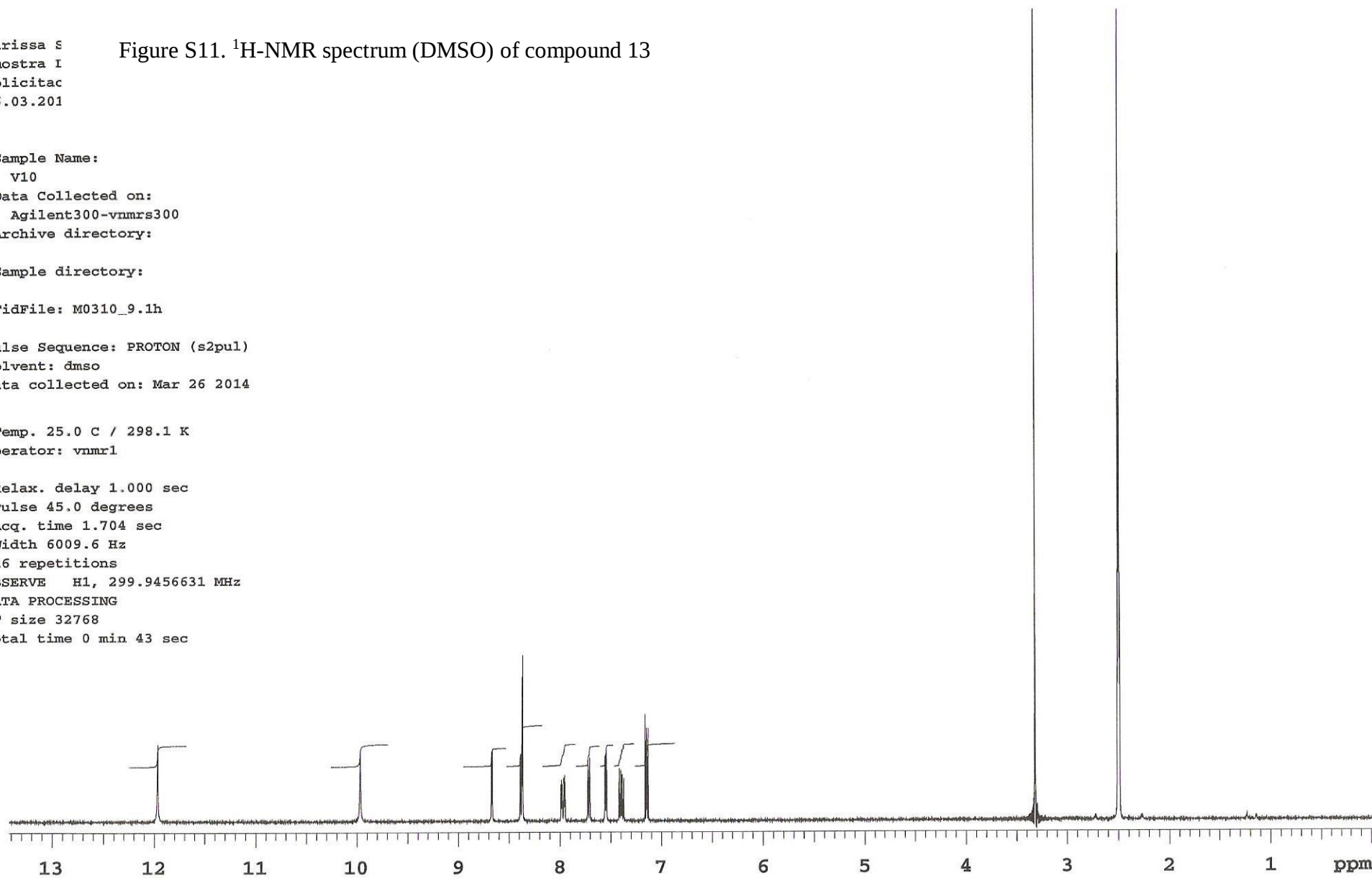
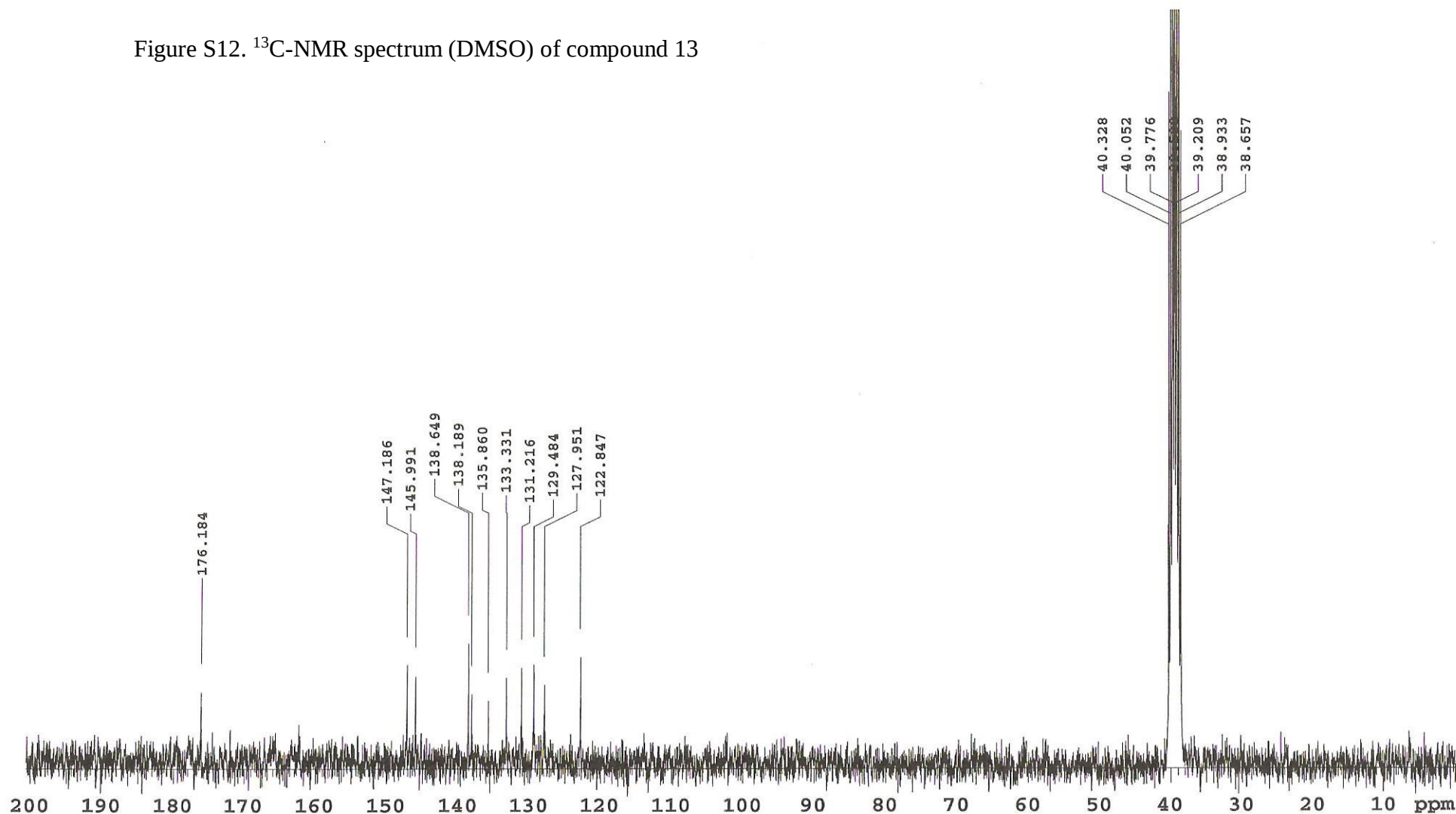


Figure S12. ^{13}C -NMR spectrum (DMSO) of compound 13



PULSE SEQUENCE Relax. delay 1.000 sec Pulse 45.0 degrees Acq. time 0.865 sec Width 18939.4 Hz 2048 repetitions	OBSERVE C13, 75.4214344 DECOUPLE H1, 299.9471704 Power 35 dB continuously on WALTZ-16 modulated	DATA PROCESSING Line broadening 2.0 Hz FT size 32768 Total time 63 minutes	Larissa Souza Amostra LT-35 Solicitacao N. M0310-9 26.03.2014 UFPE Solvent: dmso Temp. 25.0 C / 298.1 K
--	---	--	--

Figure S13. ^1H -NMR spectrum (DMSO) of compound 14

Ex
At
St

25.09.2014 UFPE

Sample Name:

Data Collected on:
varian400-vnmrs400

Archive directory:

Sample directory:

FidFile: M0918_84.1h

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)

Solvent: dmsd

Data collected on: Sep 25 2014

Temp. 26.0 C / 299.1 K

Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.556 sec

Width 6410.3 Hz

16 repetitions

OBSERVE H1, 399.7414569 MHz,

DATA PROCESSING

Line broadening 0.5 Hz

FT size 32768

Total time 0 min 57 sec

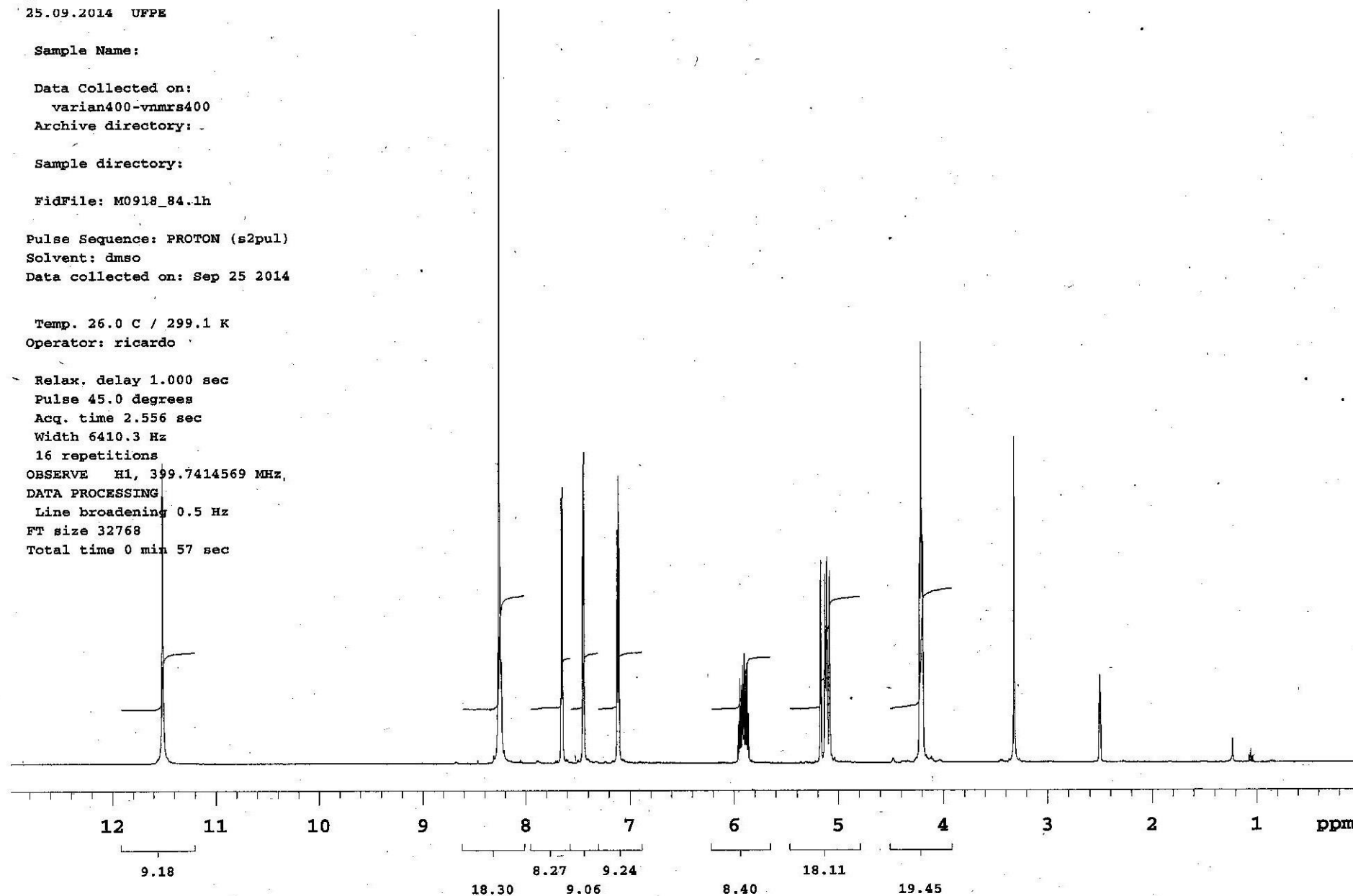
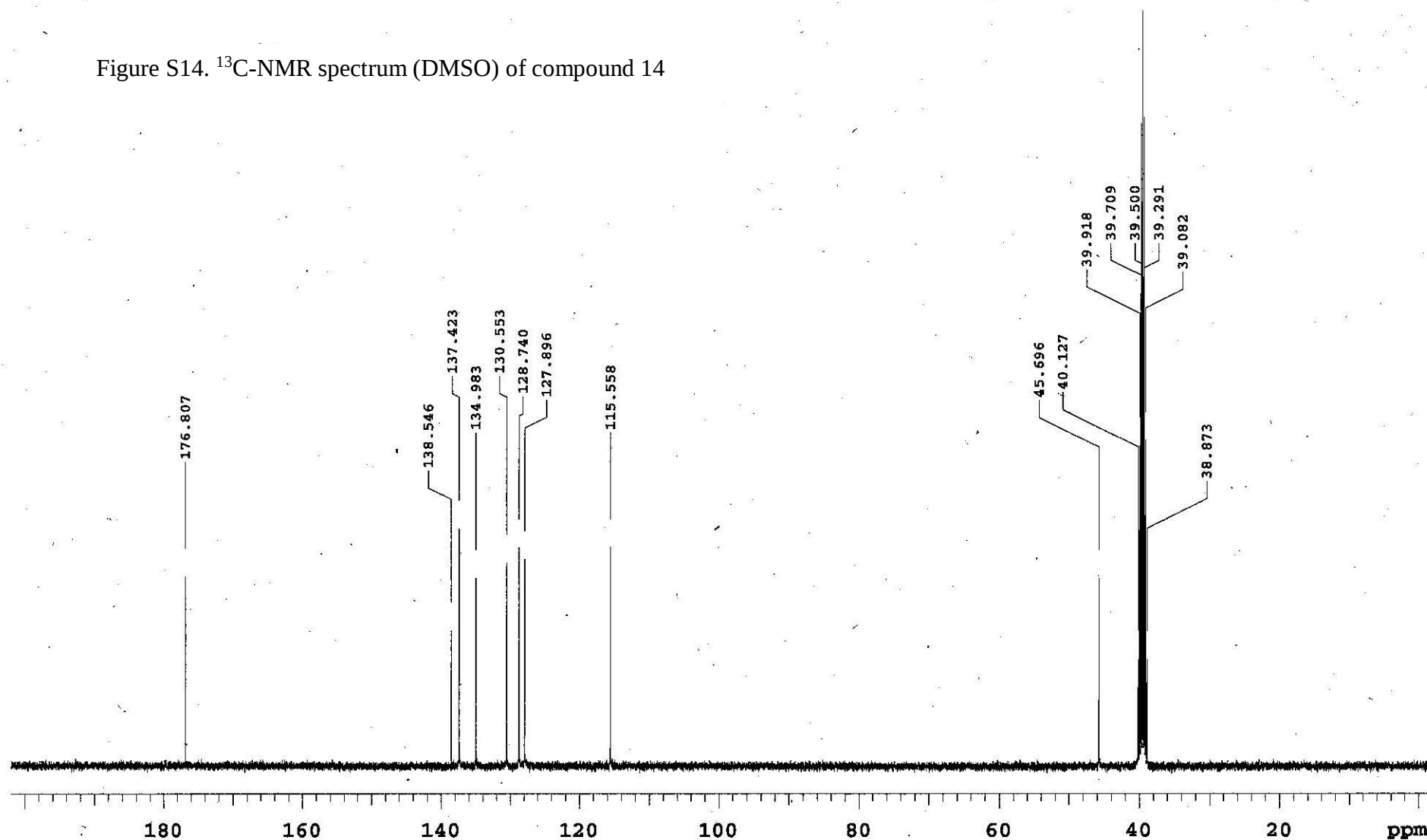


Figure S14. ^{13}C -NMR spectrum (DMSO) of compound 14



PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.285 sec
Width 25510.2 Hz
800 repetitions

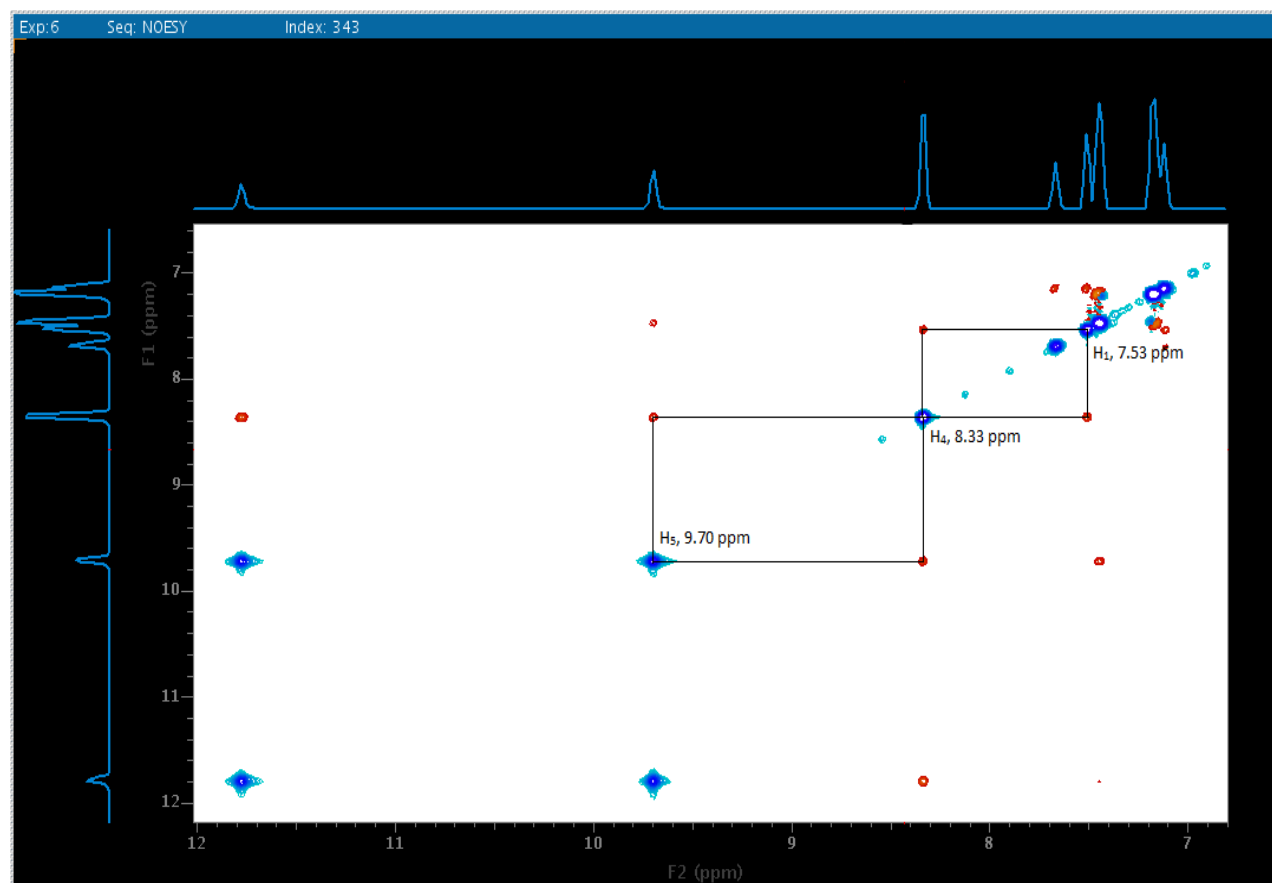
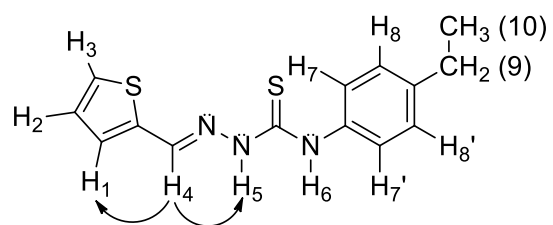
OBSERVE C13, 100.5151203
DECOUPLE H1, 399.7434654
Power 33 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 30 minutes

Edson Rubhens/Antibioticos
Amostra JF-10
Solicitacao N. M0918-84
25.09.2014 UFPE

Solvent: dmso
Temp. 26.0 C / 299.1 K
Operator: ricardo

Figure S15. NOESY spectrum (DMSO) of compound 10.



APÉNDICE B

Artigo a ser submetido a *Archiv der Pharmazie*
Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (E)-N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone

Este artigo tem por objetivo avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do derivado (E)-N-(4-bromofenil)-2-(tiofen-2-ilmetileno)-tiosemicarbazona, aqui relacionado como BTTSC. Este composto demonstrou, em estudos anteriores, possuir atividade antitumoral *in vivo*, através do modelo experimental de Ehrlich de pata. Neste modelo, é sabido que o adenocarcinoma mamário progride em um ambiente inflamatório, onde estudos mostram que ocorre uma superexpressão de COX-2. Dessa maneira, pode-se inferir que a ação antitumoral do BTTSC possa ter ocorrido também através de uma modulação dos mediadores da inflamação. A fim de investigar a potencialidade biológica do derivado, inicialmente procedeu o ensaio da formalina. Trata-se de um ensaio de nocicepção o qual é dividido em duas fases: a dor neurogênica e a dor inflamatória. O BTTSC apresentou atividade em ambas as fases sugerindo interferência do derivado no processo de algisia inflamatória. Posteriormente, prosseguiu-se as análises através do emprego do edema de orelha induzido por óleo de cróton. Este ensaio revela potenciais compostos que atuam através da via das lipooxigenases. O BTTSC não apresentou resultados significativos, mas não descartamos a possibilidade do potencial farmacológico. O edema de pata induzido por carragenina foi outra metodologia empregada e também pode ser dividida em duas fases: até as 2 primeiras horas de avaliação, mediada por histamina e serotonina; e até as 6 horas, mediada por prostanoídes. O BTTSC apresentou atividade em ambas as fases o que nos impulsionou a buscar a confirmação desta atividade através do emprego do modelo de edema de pata induzido pelo composto 48/80. De fato, essa via esclareceu o modo pelo qual o derivado BTTSC está envolvido no processo inflamatório, sendo eficaz em diminuir a degranulação de mastócitos e conseqüentemente diminuindo o processo inflamatório instalado. Sendo assim, fica confirmado uma atividade dual do derivado BTTSC, com atuação por regredir o volume tumoral associado a uma diminuição do componente inflamatório existente.

Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (E)-N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone

Jamerson Ferreira de Oliveira^a, Anekécia Lauro da Silva^a, Nayara Maria Siqueira Leite^a, Rafael Rosolen Teixeira Zafred^b, Fabiana Regina Nonato^b, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz^b, João Ernesto de Carvalho^b, Maria do Carmo Alves de Lima^{a*}

^a*Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Antibióticos, 50670-901, Recife, PE (Brazil)*

^b*Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Divisão de Farmacologia e Toxicologia - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) 13083-970, Campinas, SP (Brazil)*

To whom correspondence should be addressed: Maria do Carmo Alves de Lima

*Email: nenalima.mariadocarmo@gmail.com

Phone number: +558121268347

Fax: +558121268346

Keywords: antinociceptive, anti-inflammatory, histamine, thiosemicarbazone.

Abstract

Inflammation is a physiological response to injury and infectious agents, such as viruses and microbes. Although several anti-inflammatory drugs are available, many of them can cause side effects after long-term use. Therefore, the search for new therapeutic alternatives is required. In this study, it was presented the antinociceptive and anti-inflammatory activity of BTTSC, an thiosemicarbazone. The nociception test induced by formalin revealed that the BTTSC showed activity in both phases of the pain, highlighting inflammatory pain, where it was able to reduce the time to paw lick 62.3, 84.30 and 100% at doses of 30, 100 and 300 mg.Kg⁻¹, respectively, suggesting this compound exerts its antinociception effects connected with peripheral mechanisms. About anti-inflammatory activity was performed ear edema induced by croton oil, where any of the doses tested was capable of significantly regress produced edema. However, cyclooxygenase (COX) inhibitors or antihistamines have little or no effect in this model of evaluation, suggesting an action by this route. The paw edema induced by carrageenin showed activity compound, where the edema was reduced by 81.9 and 83.2% in the first two times of the experiment at the highest dose used. This suggests an action on the early mediators of inflammation. The paw edema assay induced by compound 48/80 confirmed our hypothesis, in which BTTSC after 15 minutes of the inoculum phlogistic agent showed significant reduction of edema with values of 56.53% at a dose of 30 mg.Kg⁻¹ indicating action of the compound via histamine. The BTTSC demonstrated anti-inflammatory activity highlighting the action on the modulation of early inflammatory mediators such as histamine. The dual action, now demonstrated, opens the possibility to deepen the investigation of pharmacological activity BTTSC.

1 Introduction

Inflammation is a physiological response to injury and infectious agents, such as viruses and microbes [1]. The central role of the inflammatory response is played by mast cells that are responsible for conducting a series of intracellular signaling, activation of arachidonic acid (AA) and its subsequent metabolism of prostaglandins and leukotrienes, by way of cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX), respectively. These responses contribute to the inflammatory response [2].

The cardinal signs of inflammation, redness (rubor), swelling (tumor), heat (calor) and hyperalgesia (dolor), develop as an acute response to a local inflammatory insult [3]. These symptoms result from the action of inflammatory agents such as bradykinin, serotonin, histamine, prostaglandins, leukotrienes and nitric oxide, which can originate locally or from cells that infiltrate in the site of insult [4, 5].

Although several anti-inflammatory drugs are available, many of them can cause side effects after long-term use [6]. Thus, studies aiming at the discovery of new anti-inflammatory therapeutic agents has been the focus. In this context, the thiosemicarbazones appear as perspective since this group of molecules are associated with diverse biological activities such as antituberculosis [7], anti-*T.cruzi* [8], antibacterial and antifungal [9], antitumor [10] and anti-inflammatory [11, 12].

We previously demonstrated antitumor activity thiosemicarbazone derivatives, where the compound 7 (BTTSC as reported herein) (Figure 01) is highlighted and presented to the activity against Ehrlich's paw model, a breast adenocarcinoma [13]. Ehrlich tumor cells generate an inflammatory response that leads to increase in vascular permeability, edema formation and cell migration [14]. In this study, treatment with 30 mg.Kg⁻¹ of BTTSC inhibited tumor development inhibited from the 6th day to the 15th day of treatment, inhibiting in 71.1% (15th day), in comparison to negative control group [13]. Thus, it can be inferred that the anti-tumor action of BTTSC may have also occurred through modulation of inflammation mediators.

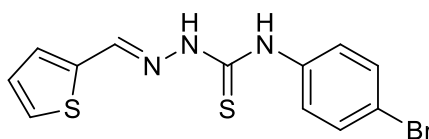


Figure 01. Structure of derivative (*E*)-*N*-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone (BTTSC).

Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of BTTSC in models of inflammation induced by different mediators. As inflammation and nociception are closely related, the antinociceptive activity of BTTSC was also evaluated, for thus collaborate with the various therapeutic inflammatory processes.

2 Results and Discussion

The formalin test is the most widely used for screening new compounds with antinociceptive activity because it is what most resembles clinical pain when compared to other tests. This test of nociception is biphasic that involve different mechanisms. The first phase of pain is attributed to direct activation of nociceptors and primary afferent C fibers by formalin, causing release of bradykinin and substance P [15, 16]. The second phase of nociception is believed to be due to an inflammatory reaction that release prostaglandins, serotonin, histamine and bradykinin [17].

In this model, the thiophene-thiosemicarbazone derivative (BTTSC) inhibited the licking response of mice in both phases. In the first phase, the highest dose was effective in significantly decreasing the licking time 73.7% (saline: 103.6 ± 11.87 , BTTSC 300 mg.Kg⁻¹: 27.25 ± 10.77). In the second phase, the BTTSC has demonstrated activity in all evaluated doses, 30; 100 and 300 mg.Kg⁻¹, being able to reduce the licking time 62.3; 84.3 and 100%, respectively, showing a dose-dependent effect of this compound on an inflammatory process algnesia (saline: 173.5 ± 23.18 , BTTSC 30 mg.Kg⁻¹: 64.25 ± 24.93 , BTTSC 100 mg.Kg⁻¹: 27.25 ± 17), suggesting this compound exerts its antinociception effects connected with peripheral mechanisms (Figure 02).

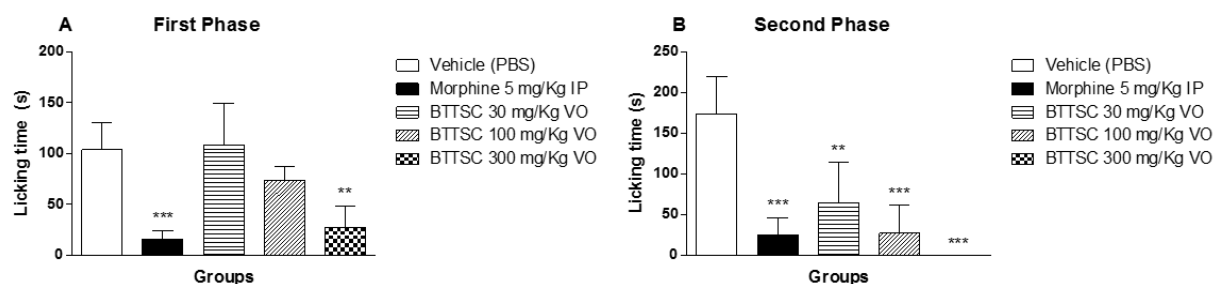


Figure 02. Effects of BTTSC on test algnesia induced by formalina, indicating the first and second phases of nociception. Data were expressed as the mean $\pm$ SE of 5 animals per group. Results were considered significant when ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test.

As the BTTSC was active in the inflammatory phase of the formalin test, we decided to investigate the anti-inflammatory potential of this new class of compounds. Thus, it was initially used the experimental model of ear edema induced by croton oil. The figure 03 shows the results obtained by the assay used.

None of the doses tested (30, 100 and 300 mg.Kg⁻¹) were able to significantly regress caused edema in ear of mice induced by such phlogistic agent. However, it can not be concluded that the 2-thiophene-thiosemicarbazone derivative has no anti-inflammatory activity, since the ear edema model induced by croton oil leads to activation of phospholipase A₂ [18] this compound can act in the inhibition of other mediators of inflammation.

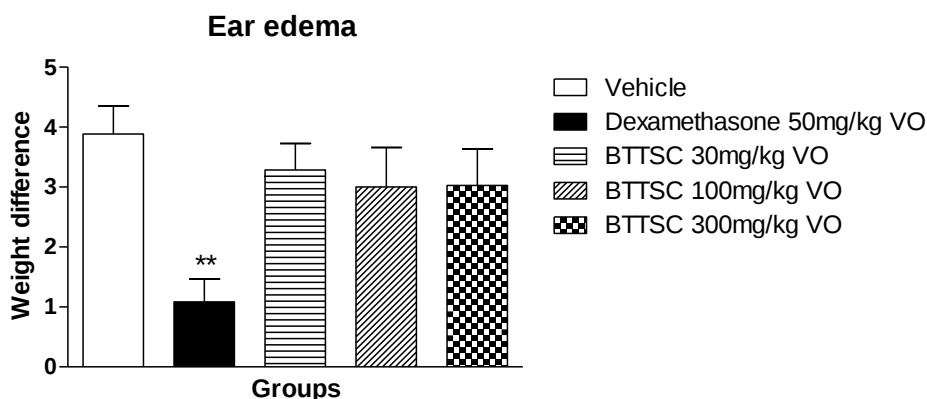


Figure 03. Effects of BTTSC on test ear edema induced by croton oil. Data were expressed as the mean $\pm$ SE of 5 animals per group. Results were considered significant when ** $p < 0.01$ determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test.

The 12-*o*-tetraacanoylphorbol esters, substance that causes irritation resulting from the application of croton oil causes intense vasodilation as a result of increased vascular permeability and blood flow induced by arachidonic acid metabolites [19, 20]. At inflammation caused by croton oil, PLA₂ inhibitors (corticosteroids) and lipooxygenases (LOX) demonstrated better activity in reducing edema in the ear. Compounds having such mechanism of action the inhibition of the enzyme cyclooxygenase (COX) or antihistamines have little or no effect in this model of evaluation [21]. Thus, one may suggest an action of BTTSC against cyclooxygenase enzyme or by histamine as an antagonist of this receptor or inhibiting mast cell degranulation.

In order to deepen the studies of anti-inflammatory activity of the BTTSC, we decided to evaluate it against the experimental model of paw edema induced by carrageenan. It can be observed in graph that BTTSC dropped significantly paw edema in the first 4 hours of evaluation when compared to the negative control. The edema was reduced by 81.9 and

83.2% in the first two hours of the experiment at the highest dose used (control: 18.85 ± 2.63 , 32.86 ± 4.97 and BTTSC 300 mg.Kg^{-1} : 3.41 ± 1.4 ; 5.53 ± 1.96) (Figure 04).

In addition, after 4 hours of inoculum carrageenan the derivative was able to contain the inflammatory peak shown by the negative control, regressing edema in rat paw at 60.33% (control: 49.99 ± 5.84 ; BTTSC 300 mg.Kg^{-1} : 19.83 ± 4.4). The positive control demonstrated at the same time, regression of edema similar to derivative presenting 50.15% decrease of the inflammatory process (24.92 ± 4.11). The remaining doses used in this experimente not produced significant reductions in paw edema in mice (Figure 04).

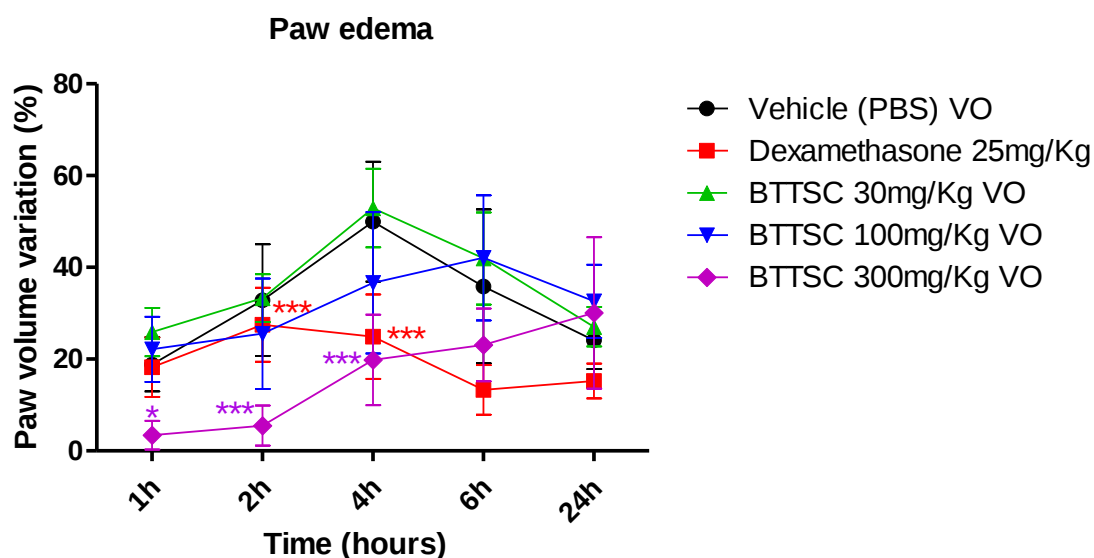


Figure 04. Activity of BTTSC in paw edema assay induced by carrageenan. Data were expressed as the mean $\pm$ SE of 5 animals per group. Results were considered significant when * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test.

The carrageenan-induced inflammation is a biphasic process. In the initial phase, up to 2 hours after injection of the phlogistic agent, it is determined by an initial vasodilation mediated by the release of mediators such as histamine and serotonin. The later stage, up to 6 hours after the injection of carrageenan, is mediated primarily by kinins, nitric oxide, prostaglandins, derived from the neutrophil recruitment [4, 5]. The results of this experiment revealed a BTTSC activity in both phases of inflammation induced by carrageenan, or a derivative acting in the early mediators of inflammation or through inhibition of pro-inflammatory cytokines.

Because the BTTSC present significant results in the first hours of evaluation in the experiment paw edema induced by carrageenan, it was decided to investigate whether the mode of action of the compound in inhibiting the formation of edema would be via serotonin/histamine. Therefore, it has been used the paw edema model induced by compound 48/80.

It was confirmed by this test, an action of the derivative 2-thiophene thiosemicarbazone in the model used. The BTTSC after 15 minutes of inoculum phlogistic agent, showed a significant reduction of edema with values of 56.53% at a dose of 30 mg.Kg⁻¹ (control: 71.10 ± 6.6 and BTTSC 30 mg.Kg⁻¹: 30.9 ± 5.75). The reduction of edema continued at 30, 60 and 90 minutes where the maximum reduction was observed in time 90 minutes 84.21% (control: 20.97 ± 4.15; BTTSC 30 mg.Kg⁻¹: 31.3 ± 1.6). The other doses of 2-thiophene derivative thiosemicarbazone also demonstrated significant results, where the first 15 minutes of the evaluation, the dose of 100 mg/Kg showed 48.56% of reduction in edema (36.57 ± 5.82), since the dose of 300 mg/Kg after 60 minutes, decreased by 47.65% (control: 39.2 ± 4.88; BTTSC 300 mg/Kg: 20.52 ± 2.31), proving the efficacy of the compound in the experimental model used (Figure 05).

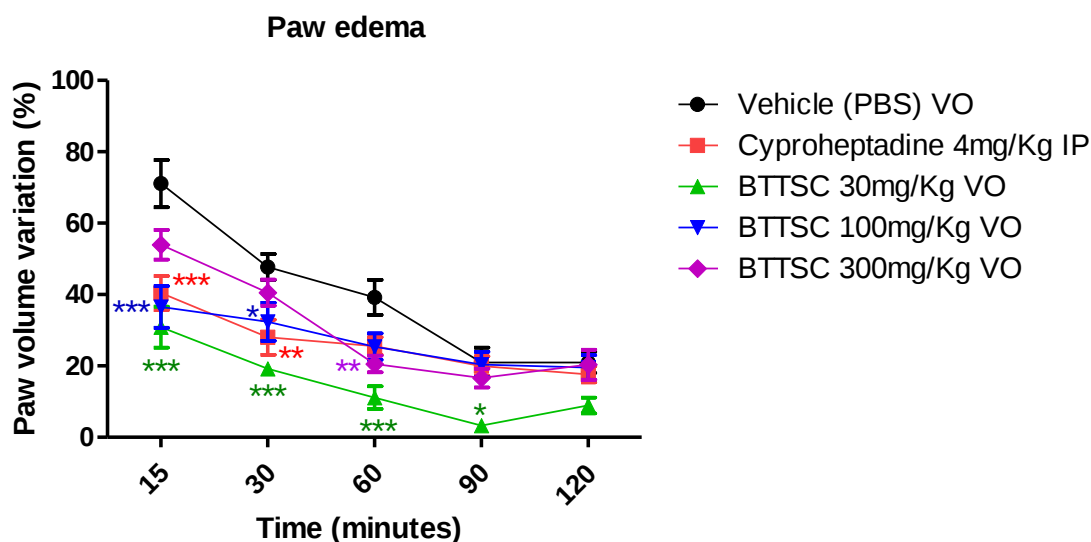


Figure 05. Activity of BTTSC in paw edema assay induced by compound 48/80. Data were expressed as the mean ± SE of 5 animals per group. Results were considered significant when *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001, determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test.

Compound 48/80 is a synthetic polyamine, which when administered promotes a rapid edema from the release of histamine by mast cell degranulation [22]. The activation of mast cells leads, not only the release of histamine, but also neutrophil recruitment which is directly connected to the pain mechanism [23]. The results obtained in this assay, demonstrate the activity of the thiosemicarbazone derivative, indicating that the compound acts by interfering with the release of histamine.

The evaluation of thiosemicarbazones front of anti-inflammatory activity has been little investigated. However, some studies indicate this class of molecules as promising for this activity. In the study of Aleagon et al. (2014) [24] it became clear that derivatives thiosemicarbazone possessed notable activity in inhibiting the activity of COX-2. The compound that is most emphasized, showed values $IC_{50} = 62.33 \mu M$ for COX-1 and $IC_{50} = 2.5 \mu M$ for COX-2 which demonstrates a high selectivity for inhibiting secondary inductive isoform ($SI = 24$). Moreover, molecular docking studies confirmed the greater selectivity of thiosemicarbazone for COX-2 isoform. The working Dawood et al. (2015) [25], evaluated the anti-inflammatory activity of various compounds including thiosemicarbazone. The results obtained by testing the carrageenan-induced paw edema showed a percent inhibition of paw volume of 96% (at a dose of $10 \mu M.Kg^{-1}$) compared to indomethacin (74% inhibition). Further, the compound was able to selectively inhibit in vitro COX-2 enzyme ($IC_{50} = 0.31 \mu M$) result compared to a positive control used in the experiment (celecoxib; $IC_{50} = 0.30 \mu M$), demonstrating the activity of the cell phase of the thiosemicarbazone inflammation.

Preliminary studies of anti-inflammatory activity of thiosemicarbazone show good results for this class of compounds in paw edema test induced by carrageenan. The compound of the best series of new 1-(1-methyl)-5-methyl-2-oxindolin-3-ylidene)-4- (pyridin-2-yl)-thiosemicarbazones presented at a dose of $100 mg.Kg^{-1}$ 44% inhibition of edema when compared to diclofenac sodium which was capable of inhibiting on 64% edema in the paw [11]. Using the same experimental model, 2-(1-(4-morpholinophenyl)-ethylidene)-thiosemicarbazone revealed 83% inhibition of paw edema ($50 mg.Kg^{-1}$) compared to indomethacin was able to inhibit 91% in the same experiment [12], highlighting the important role that thiosemicarbazones play against models of inflammation.

Some synthetic compounds stand out in the literature due to its anti-inflammatory and antinociceptive action. As an example, it has been the goniotalamin a styryl-lactone which shows promising biological effects in several experimental models of inflammation and paw edema induced by various phlogistic agents and also in models of nociception [6, 26].

Likewise, the BTTSC proved promising activity in the present assay of nociception induced by formalin paw edema induced by carrageenan, emphasizing the biological importance of this derivative.

3 Conclusions

Here in this article it was reported the antinociceptive and anti-inflammatory activity of the derivative thiosemicarbazone. The BTTSC demonstrated antinociceptive and anti-inflammatory activity, highlighting the action on the modulation of early inflammatory mediators such as histamine. The dual action, now demonstrated, opens the possibility to deepen the investigation of pharmacological activity BTTSC.

4 Experimental Section

4.1 Animals and drug administration

Experiments were conducted with Balb/C mice (20-35 g) or Swiss mice (20-35 g) obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animals Sciences (CEMIB-UNICAMP). Animals were maintained at the Animal facilities of Pharmacology and Toxicology Division, CPQBA, University of Campinas (Campinas, Brazil), under controlled conditions ($22 \pm 3^\circ \text{C}$ for 12 h light/dark cycle, free access to food and water). All mice were fasted for 16 hours prior to each experiment because treatments were administered orally. Euthanasia was performed by cervical dislocation. Animal care, research and animal sacrifice protocols were in accordance with the principles and guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Institute of Biology/ UNICAMP - Ethical Committee for Animal Research (numbers 3330-1; 3331-1; 3332-1).

The BTTSC (30, 100 and 300 mg.Kg^{-1}) was emulsified with 1% Tween 80 (SIGMA[®]) and dissolved in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0. The standards drugs morphine (5 mg.Kg^{-1}), dexamethasone (25 mg.Kg^{-1}), cyproheptadin (4 mg.Kg^{-1}) was used as a positive control and dissolved in phosphate buffered saline (PBS).

4.2 Formalin test

This test was based on the method of Dubuisson and Dennis [27]. A formalin solution (2,5% in PBS; 20 $\mu\text{L/paw}$) was injected into the hind paw plantar surface (i.pl. injection). The

time spent licking the affected paw was rated during two intervals: 0-5 min (first phase or neurogenic pain) and 15-30 min (second phase or inflammatory pain). Treatment with vehicle (PBS 10 mL/kg; negative control) or BTTSC (30, 100 and 300 mg.Kg⁻¹) was administered orally 60 min prior to the formalin injection. Morphine (5 mg.Kg⁻¹; positive control) was administered intraperitoneally 30 min prior to the formalin injection.

4.3 Ear edema assay in mice

Croton oil-induced ear edema test in mice was determined as the method described in the previous report [28]. Five groups of mice (n= 8) were treated with 1% Tween 80 in PBS, BTTSC (30-300 mg.Kg⁻¹) or dexamethasone (25 mg.Kg⁻¹). Briefly, the BTTSC (30-300 mg.Kg⁻¹) or dexamethasone (50 mg.Kg⁻¹) was administered 1 h before each croton oil topical application to the right ear (20 µL of 5% croton oil dissolved in acetone 70%). Four hours after croton oil application, the animals were sacrificed by cervical dislocation and the ear edema was determined by subtracting the weight of the left ear from that of the right.

4.4 Carrageenan-induced paw edema test in mice

Carrageenan-induced paw edema test in mice was used to evaluate the anti-inflammatory activity of BTTSC. This experiment was performed on male mice as the previous report (Winter et al., 1962). Five groups of mice (n= 8) were treated with 1% Tween 80 in PBS, BTTSC (30-300 mg.Kg⁻¹) or dexamethasone (25 mg.Kg⁻¹) orally before 1 h of carrageenan injection. And 3% (w/v) carrageenan (30 µL) was administered by sub-plantar injection in the right hind paws of mice. After carrageenan injection, the paw volume was measured at 1, 2, 3, 4 and 6 h using the plethysmometer apparatus (7140 Ugo Basile, Italy). The mean increase of paw volume was measured and the edema rate of mice was calculated as the previous method [29].

4.5 Paw edema induced by compound 48/80

Balb/C mice were divided into five groups (n= 8) and treated with 1% Tween 80 in PBS, ciproheptadin - 4 mg.Kg⁻¹, i.p. (positive control) or BTTSC (30-300 mg.Kg⁻¹). Thirty minutes later, edema was induced by intraplantar injection (right hind paw, 10 µg/paw) of the compound 48/80 and the volume of the paws was measured before and 15, 30, 60, 90 and 120 min after inflammation induction using the plethysmometer apparatus (7140 Ugo Basile,

Italy) [30]. The mean increase of paw volume was measured and the edema rate of mices was calculated as the previous method [6].

4.6 Statistical Analysis

The experimental results were expressed as the mean $\pm$ standard error (SE) and by analysis of variance (ANOVA), one-way and two-way, followed by Tukey or Bonferroni tests. P values lower than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as indicative of significance and represented by: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. The calculations were performed using the statistical software GraphPad Prism version 5.0, San Diego California, USA.

Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian agencies Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of Interest

The authors have declared that no competing interests exist.

References

- [1] S. Krishnamoorthy, K. Honn. *Cancer Metastasis Rev.* 25 (2006) 481-491.
- [2] W. Mequanint, E. Makonnen, K. Urga. *Ethnopharmacol.* 134 (2011) 32-36.
- [3] C. Banasik. Inflammation and immunity. In: Banasic, J.L. (Ed.), *Pathophysiology: Biological and Behavioral perspectives*. W.B. Saunders Company, Pennsylvania, 2000. 197-201.
- [4] X. Niu, Y. Li, W. Li, H. Hu, H. Yao, H. Li. *J Ethnopharmacol.* 152 (2014) 99-105.
- [5] I.O. Ishola, E.O. Agbaje, O.O. Adeyemi, R. Shukla. *Pharm Biol.* 52 (2014) 1208-1216.
- [6] D.B. Vendramini-Costa, H.M. Spindola, G.C. de Mello, E. Antunes, R.A. Pilli, J.E. de Carvalho. *Life Sci.* 139 (2015) 83-90.
- [7] V. Velezheva, P. Brennan, P. Ivanov, A. Kornienko, S. Lyubimov, K. Kazarian, B. Nikonenko, K. Majorov, A. Apt. *Bioorg Med Chem Lett.* 26 (2016) 978-985.
- [8] G.B. Oliveira-Filho, M.V.O. Cardoso, J.W. Espíndola, L.F. Ferreira, C.A. de Simone, R.S. Ferreira, P.L. Coelho, C.S. Meira, D.R.M. Moreira, M.B. Soares, A.C.L. Leite. *Bioorg Med Chem.* 23 (2015) 7478-7486.

- [9] N.D. Thanh, H.T. Duc, V.T. Duyen, P.M. Tuong, N.V. Quoc. *Chem Cent J.* 19 (2015). DOI: 10.1186/s13065-015-0138-8.
- [10] M. Cabrera, N. Gomez, F.R. Lenicov, E. Echeverría, C. Shayo, A. Moglioni, N. Fernández, C. Davio. *PLoS One.* 11 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0136878.
- [11] V.A. Muthukumar, S. George, V. Vaidhyalingam. *Biol Pharm Bull.* 31 (2008) 1461-1464.
- [12] M.H.M. Helal, M.A. Salem, M.A.S. El-Gaby, M. Aljahdali. *Eur J Med Chem.* 65 (2013) 517-526.
- [13] J.F. Oliveira, A.L. Silva, D.B. Vendramini-Costa, C.A.C Amorim, J.F. Campos, A.G. Ribeiro, R.O. Moura, J.L. Neves, A.L.T.G Ruiz, J.E. Carvalho, M.C.A. Lima. *Eur J Med Chem.* 104 (2015) 148-156.
- [14] D. Fecchio, P. Sirois, M. Russo, S. Jancar, *Inflammation*, 14 (1990) 125-32.
- [15] J.F. Amaral, M.I.G. Silva, M.R. Aquino Neto, P.F. Teixeira Neto, B.A. Moura, C.T.V. de Melo, F.L.O. de Araújo, D.P. de Sousa, P.F. de Vasconcelos, S.M. de Vasconcelos, F.C. de Sousa. *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007), 1217-1220.
- [16] J.C.R Gonçalves, F.S. Oliveira, R.B. Benedito, D.P. Sousa, R.N. Almeida, D.A.M.A.D. Araújo. *Biol. Pharm. Bull.* 31 (2008) 1017-1020.
- [17] Y. Wang, P. Chen, C. Tang, Y. Wang, Y. Li, H. Zhang. *J. Ethnopharmacol.* 151 (2014) 944-950.
- [18] H. Kondoh, Y. Sato, H. Kanoh. *J Invest Dermatol.* 85 (1995) 64-69.
- [19] A. Tubaro, P. Dri, M. Melato, G. Mulas, P. Bianchi, P.D. Negro, R. Agents Actions. 19 (1986) 371-373.
- [20] J.M. Young, B.M. Wagner, D.A. Spires. *J Invest Dermatol.* 80 (1983) 48-52.
- [21] C.A. Green, S. Shuster. *Brit J Clin Pharmacol.* 24 (1987) 381-384.
- [22] H. Martin. *Vet. Dermatol.* 9 (1998) 145-166.
- [23] D. Chatterjea, A. Wetzel, M. Mack, C. Engblom, J. Allen, C. Mora-Solano, L. Paredes, E. Balsells, T. Martinov. *Biochem Biophys Res Commun.* 425 (2012) 237-243.
- [24] S.G. Alegaon, M.B. Hirpara, K.R. Alagawadi, K.K. Hullatti, K. Kashniyal. *Bioorg Med Chem Lett.* 24 (2014) 5324-5329.
- [25] D.H. Dawood, R.Z. Batran, T.A. Farghaly, M.A. Khedr, M.M. Abdulla. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 348 (2015) 1-14.
- [26] D.B. Vendramini-Costa, I.B.D. de Castro, A.L.T.G. Ruiz, C. Marquissolo, R.A. Pilli, J.E. de Carvalho. *Bioorg Med Chem.* 18 (2010) 6742-6747.

- [27] D. Dubuisson, S.G. Dennis. *Pain*. 4 (1977) 161-174.
- [28] E.O. Agbaje, M.S. Fageyinbo. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 4 (2012) 7-14.
- [29] C.A. Winter, E.A. Risley, G.W. Nuss. *Proc Soc Exp Biol Med.* 111 (1962) 544-547.
- [30] G. Cirino, S.H. Peers, R.J. Flower, J.L. Browning, R.B. Pepinsky. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 3428–3432.

APÉNDICE C

Sample Name:

Data Collected on:
 varian400-vnmrs400
 Archive directory:

Sample directory:

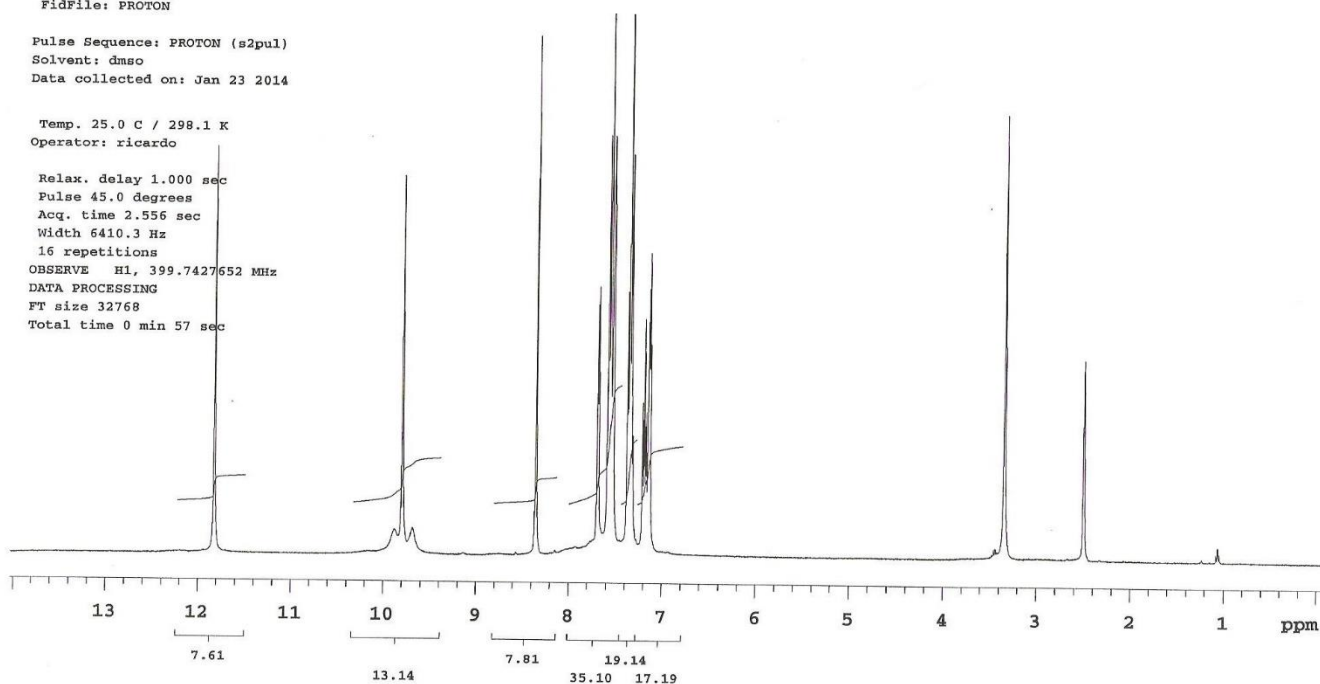
FidFile: PROTON

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: dmsc
 Data collected on: Jan 23 2014

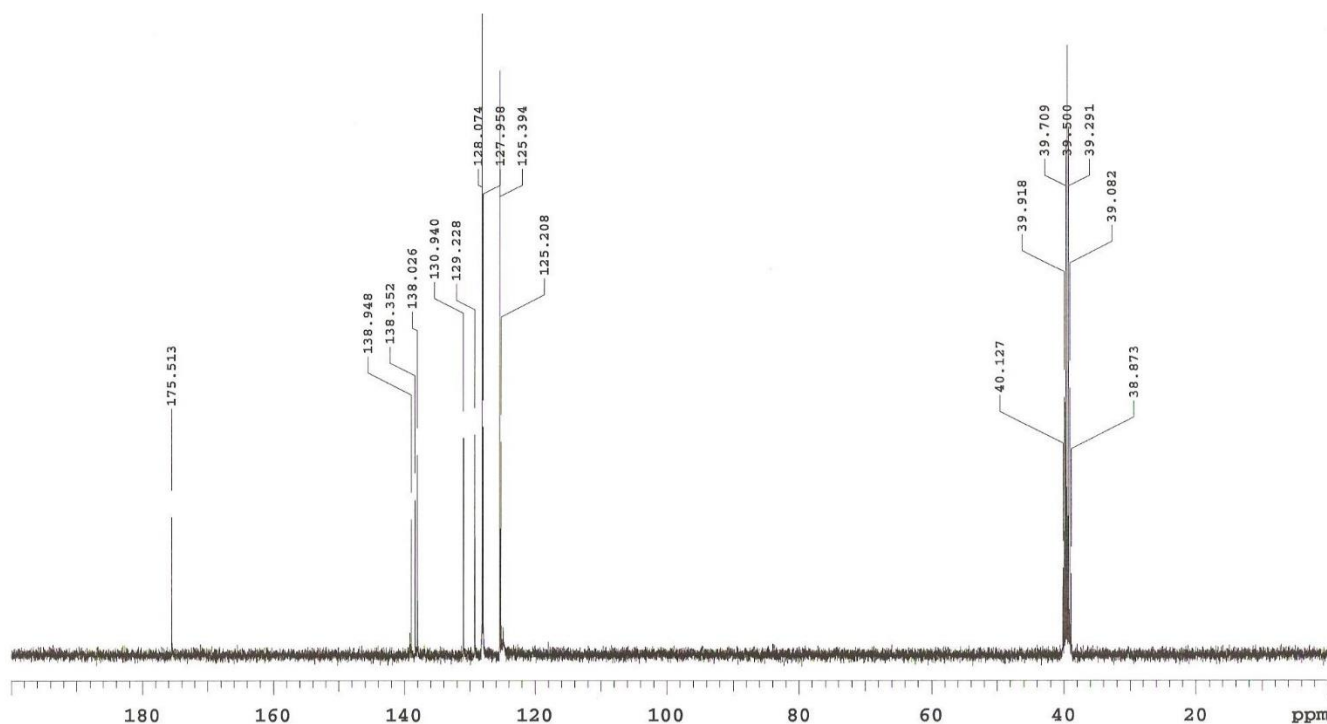
Temp. 25.0 C / 298.1 K
 Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 2.556 sec
 Width 6410.3 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE H1, 399.7427652 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min 57 sec

Espectro de RMN ^1H do composto 5



Espectro de RMN ^{13}C do composto 5



PULSE SEQUENCE Relax. delay 1.000 sec Pulse 45.0 degrees Acq. time 1.285 sec Width 25510.2 Hz 512 repetitions	OBSERVE C13, 100.5154487 DECOUPLE H1, 399.7447683 Power 41 dB continuously on WALTZ-16 modulated	DATA PROCESSING Line broadening 0.5 Hz FT size 65536 Total time 19 minutes	Elizabeth Almeida Amostra LT-1 Solicitacao N. M0116-29 22.01.2014 UFPE Solvent: dmsc Temp. 25.0 C / 298.1 K Operator: ricardo
---	--	--	---

Elizabeth Almeida
 Amostra LT-1
 Solicitacao N. M0116-29
 22.01.2014 UFPE



Sample Name:

Espectro de DEPT do composto 5

Data Collected on:
 varian400-vnmrs400
 Archive directory:

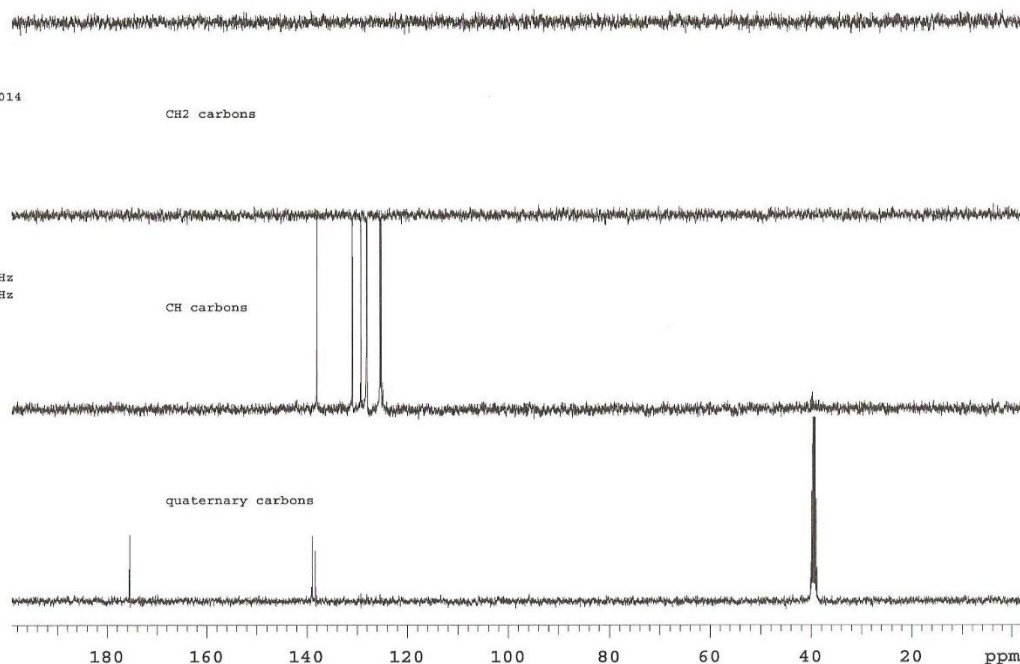
Sample directory:

FidFile: DEPT

Pulse Sequence: DEPT
 Solvent: dmsd
 Data collected on: Jan 23 2014

Temp. 25.0 C / 298.1 K
 Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.285 sec
 Width 25510.2 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE C13, 100.5154488 MHz
 DECOUPLE H1, 399.7447683 MHz
 Power 41 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 3.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 28 min

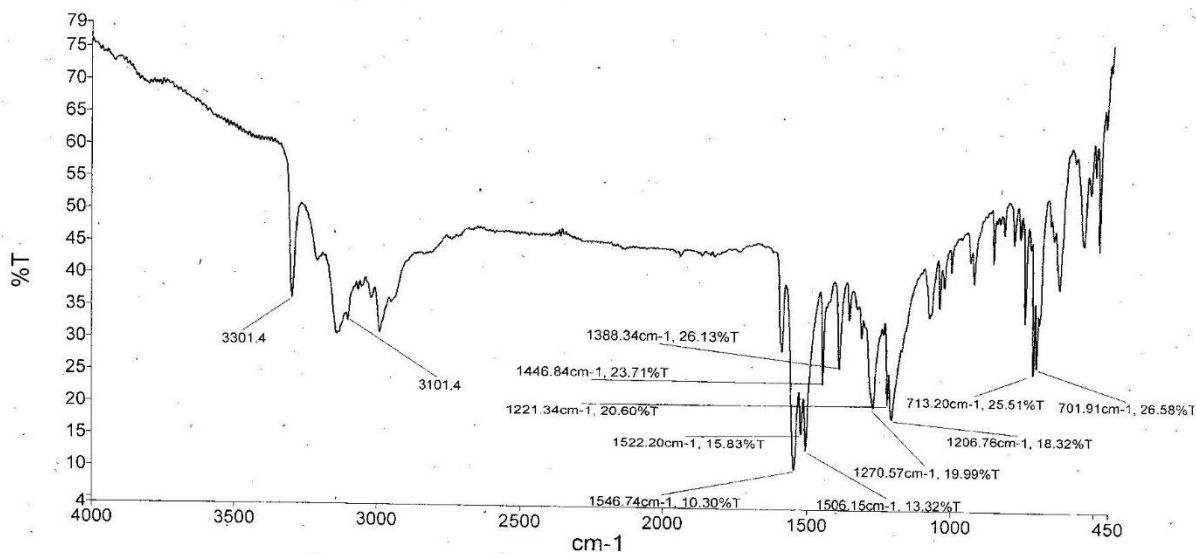


Espectro de Infravermelho do composto 5

Analyst
 Date

Administrator
 Thursday, July 24, 2014 2:32 PM

PerkinElmer Spectrum Version 10.03.09
 Thursday, July 24, 2014 2:32 PM



M0722-17_1 LT-1//Jamerson/Maria do Carmo/Antib Thursday, July 24 2014

Elizabeth Almeida
 Amostra LT-2
 Solicitacao N. M0116-28
 22.01.2014 UFPE

Sample Name:

Espectro de RMN ^1H do composto 6

Data Collected on:
 varian400-vnmrs400
 Archive directory:

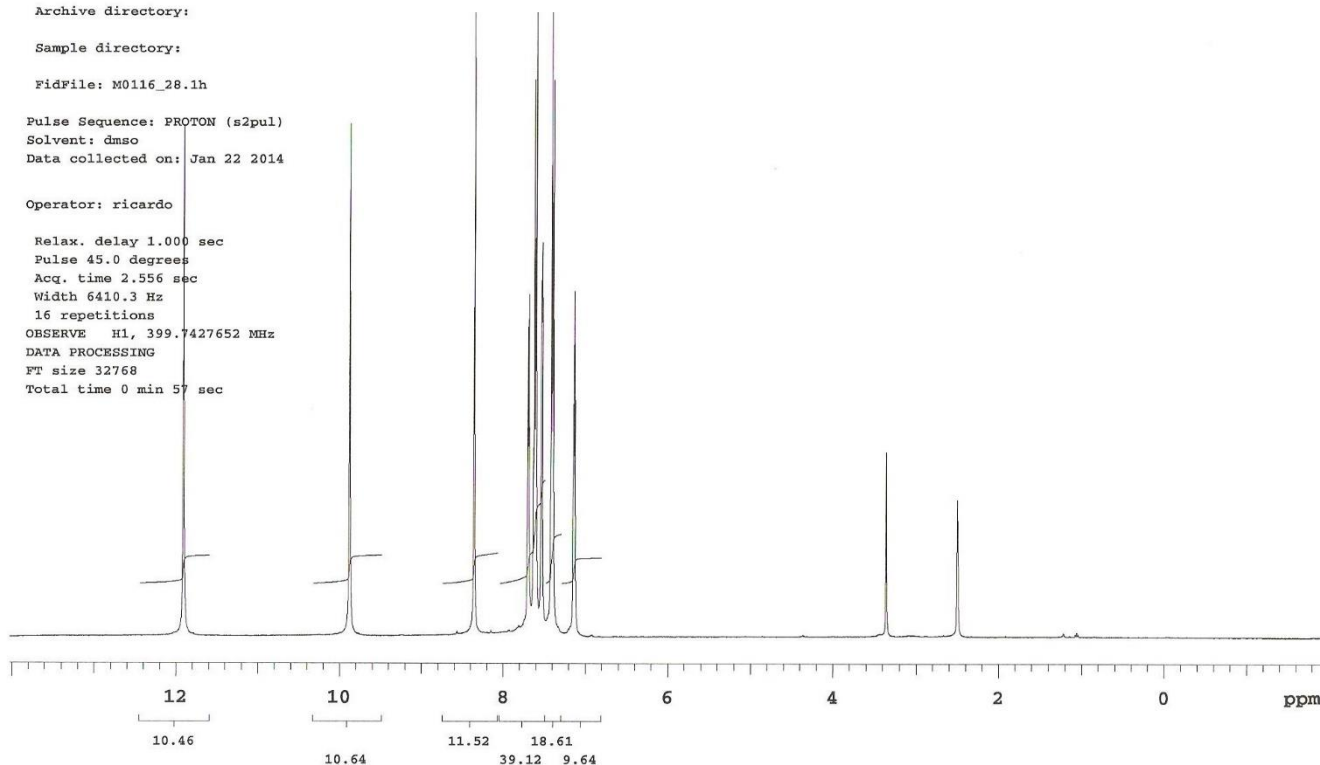
Sample directory:

FidFile: M0116_28.1h

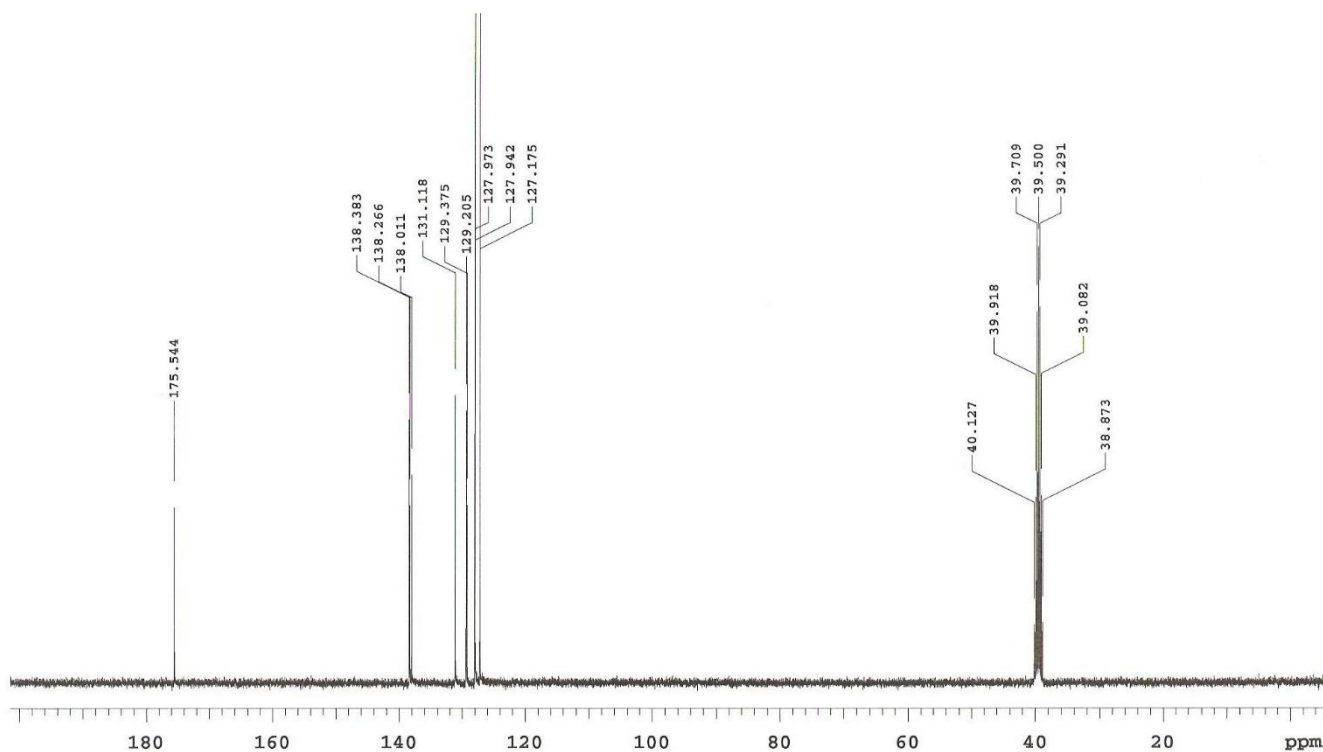
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: dmsc
 Data collected on: Jan 22 2014

Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 2.556 sec
 Width 6410.3 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE H1, 399.7427652 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min 57 sec



Espectro de RMN ^{13}C do composto 6



PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.285 sec
 Width 25510.2 Hz
 512 repetitions

OBSERVE C13, 100.5154464
 DECOUPLE H1, 399.7447683
 Power 41 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING
 Line broadening 0.5 Hz
 FT size 65536
 Total time 19 minutes

Elizabeth Almeida
 Amostra LT-2
 Solicitacao N. M0116-28
 22.01.2014 UFPE

Solvent: dmsc
 Ambient temperature
 Operator: ricardo

Elizabeth Almeida
 Amostra LT-2
 Solicitacao N. M0116-28
 22.01.2014 UFPE



Espectro de DEPT do composto 6

Sample Name:

Data Collected on:
 varian400-vnmrs400
 Archive directory:

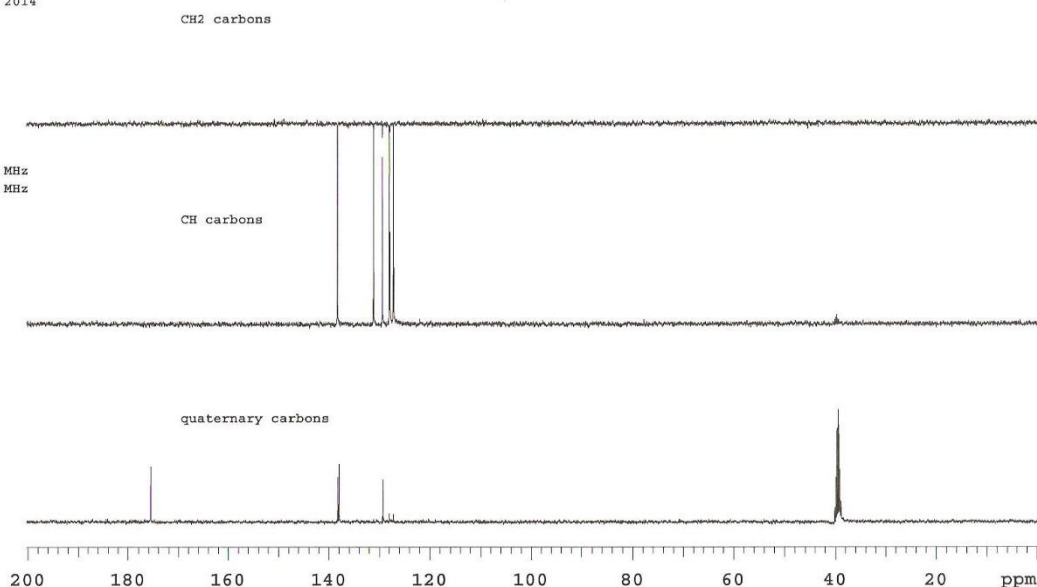
Sample directory:

FidFile: M0116_28.dept

Pulse Sequence: DEPT
 Solvent: dmsc
 Data collected on: Jan 22 2014

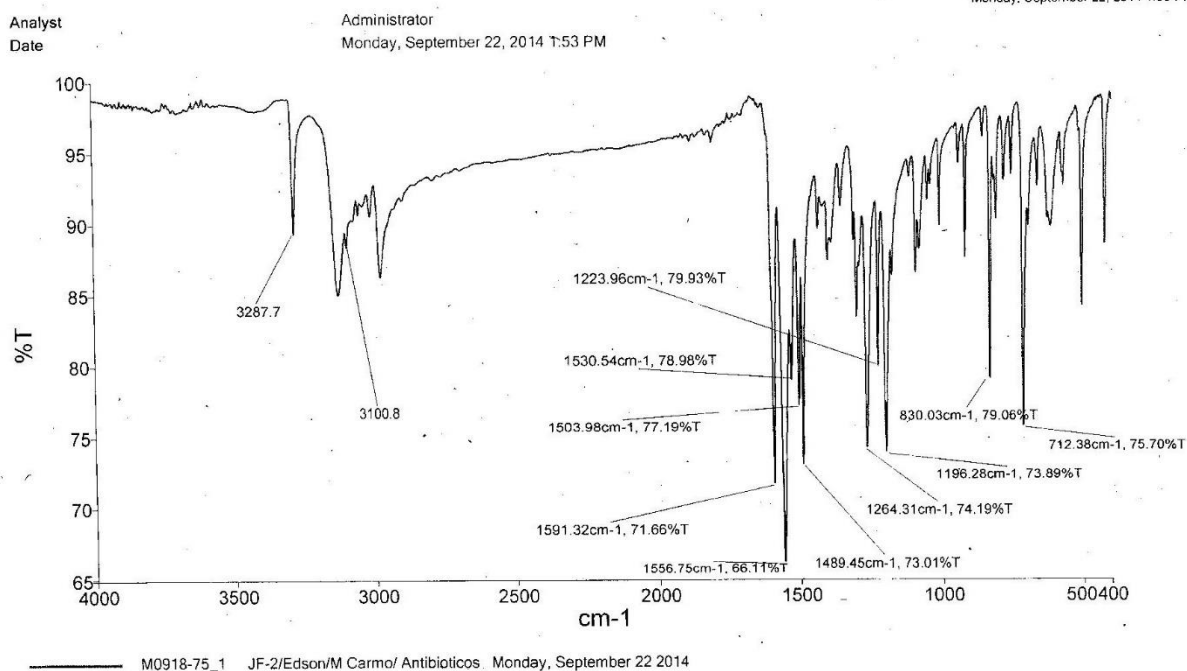
Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.285 sec
 Width 25510.2 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE C13, 100.5154457 MHz
 DECOUPLE H1, 399.7447683 MHz
 Power 41 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 3.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 28 min



Espectro de Infravermelho do composto 6

PerkinElmer Spectrum Version 10.03.09
 Monday, September 22, 2014 1:53 PM



Elizabeth Almeida
 Amostra LT-3
 Solicitacao N. M0116-30
 22.01.2014 UFPE



Espectro de RMN ^1H do composto 7

Sample Name:

Data Collected on:
 varian400-vnmrs400
 Archive directory:

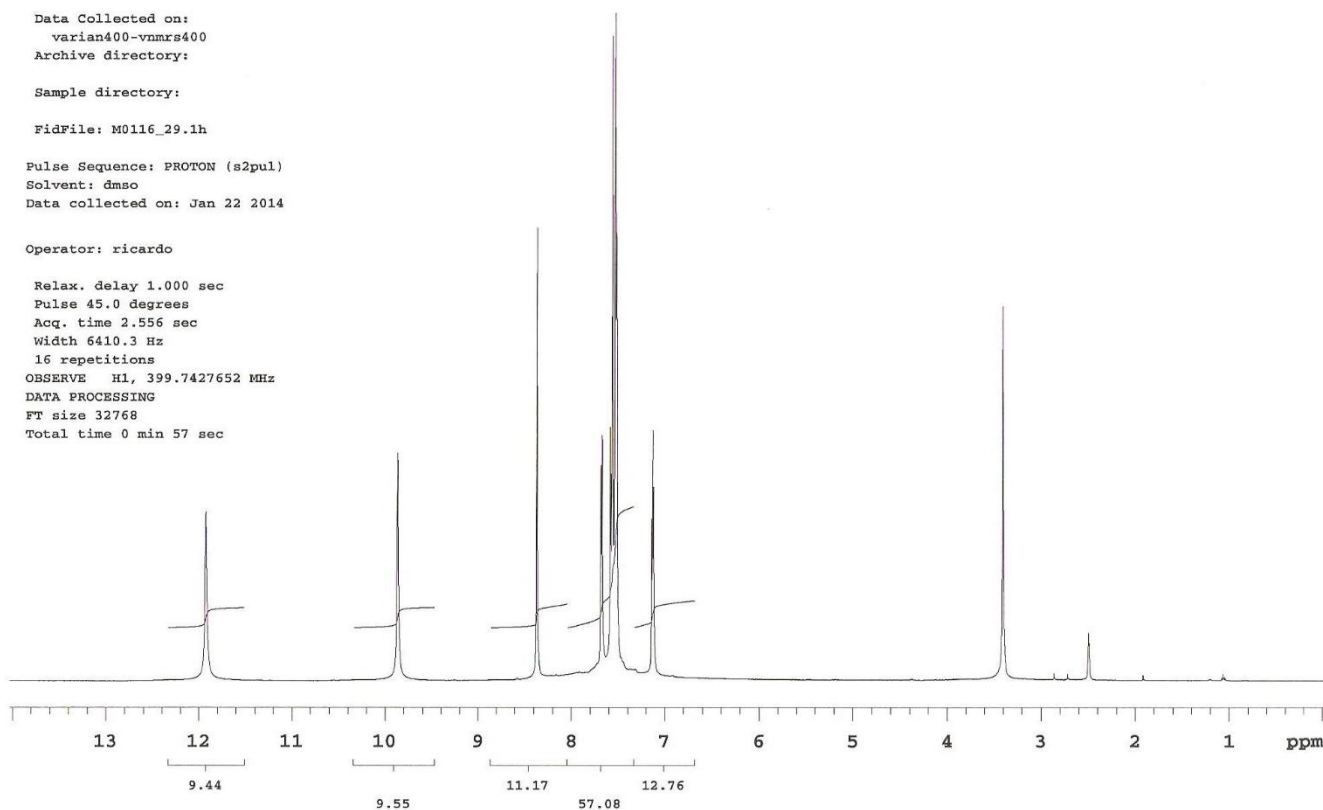
Sample directory:

FidFile: M0116_29.1h

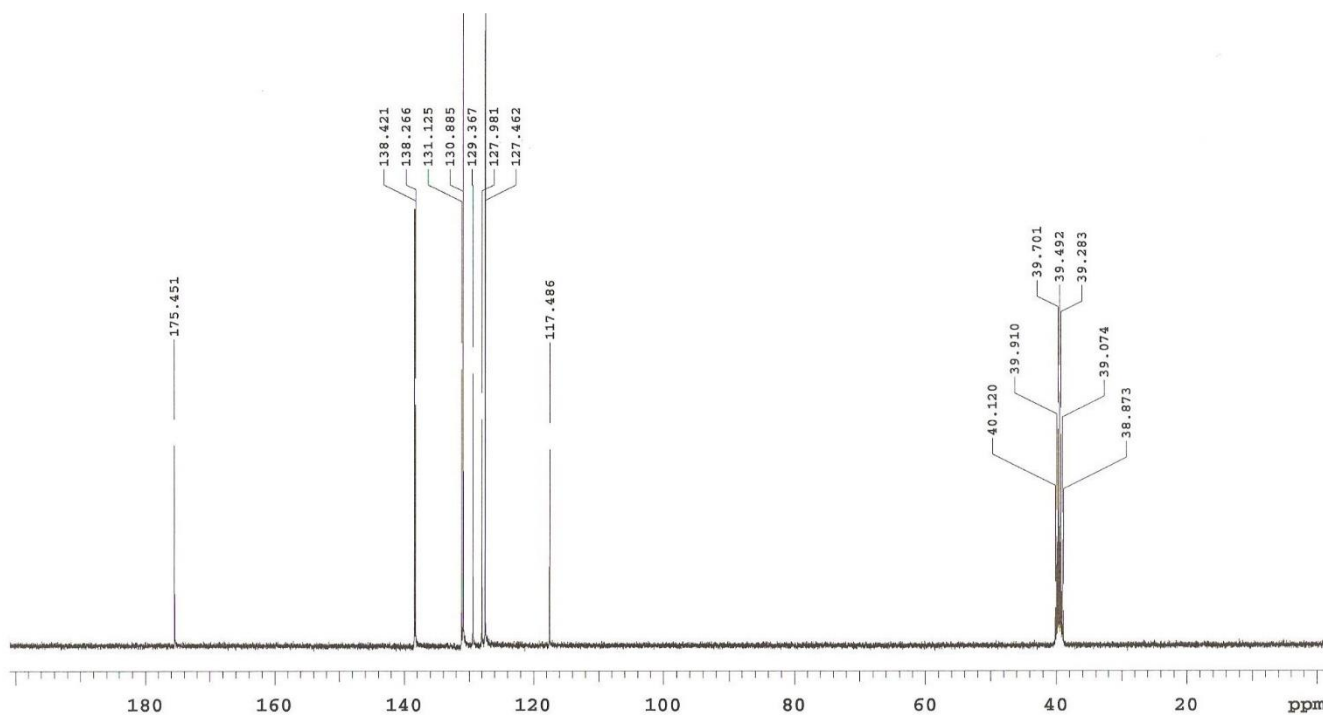
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: dmsc
 Data collected on: Jan 22 2014

Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 2.556 sec
 Width 6410.3 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE H1, 399.7427652 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min 57 sec



Espectro de RMN ^{13}C do composto 7



PULSE SEQUENCE Relax. delay 1.000 sec Pulse 45.0 degrees Acq. time 1.285 sec Width 25510.2 Hz 512 repetitions	OBSERVE C13, 100.5154456 DECOUPLE H1, 399.7447683 Power 41 dB continuously on WALTZ-16 modulated	DATA PROCESSING Line broadening 0.5 Hz FT size 65536 Total time 19 minutes	Elizabeth Almeida Amostra LT-3 Solicitacao N. M0116-30 22.01.2014 UFPE Solvent: dmsc Ambient temperature Operator: ricardo
---	---	--	---

Elizabeth Almeida
 Amostra LT-3
 Solicitacao N. M0116-30
 22.01.2014 UFPE



Espectro de DEPT do composto 7

Sample Name:

Data Collected on:
 varian400-vnmrs400
 Archive directory:

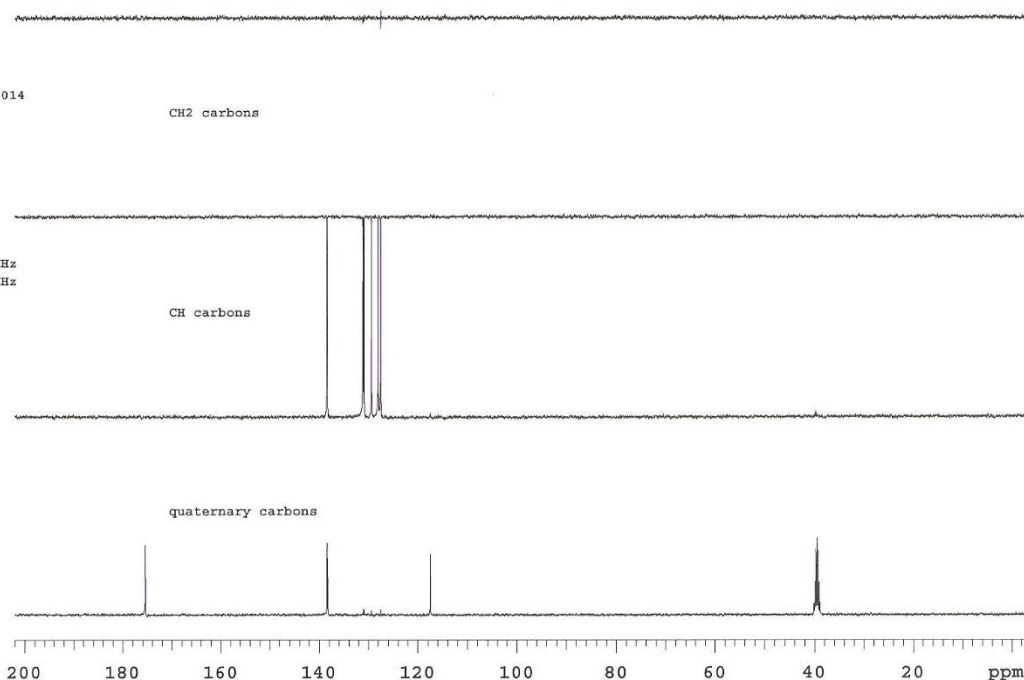
Sample directory:

FidFile: M0116_29.dept

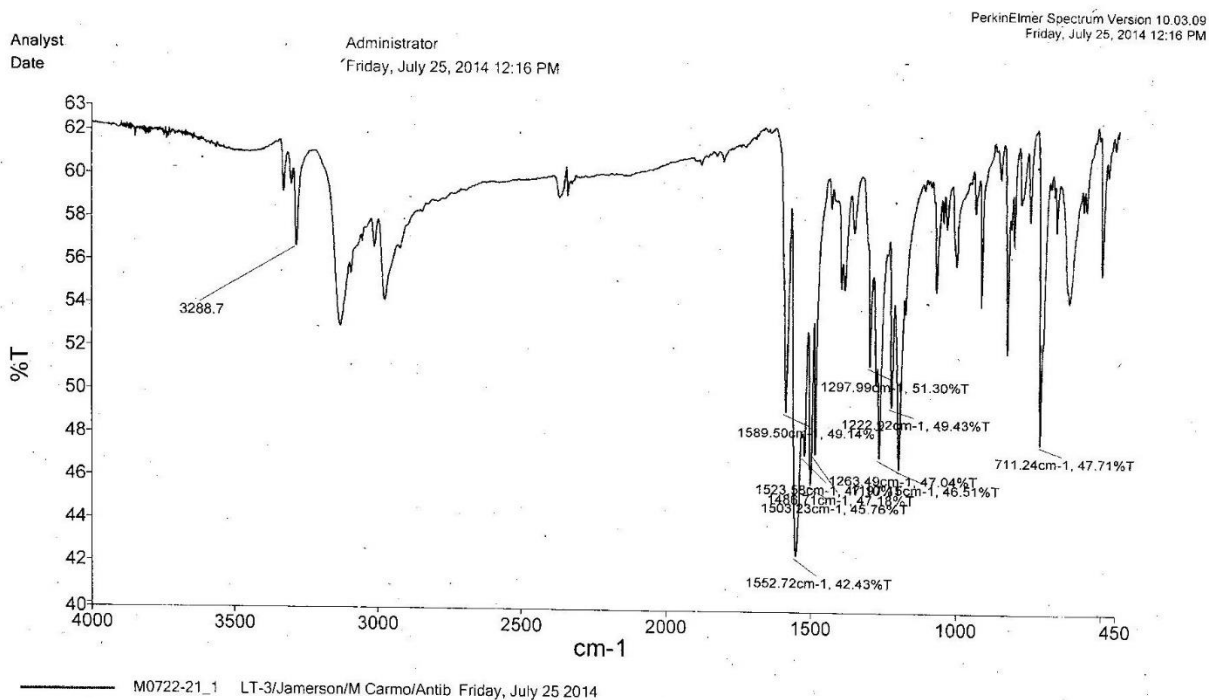
Pulse Sequence: DEPT
 Solvent: dmsd
 Data collected on: Jan 22 2014

Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.285 sec
 Width 25510.2 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE C13, 100.5154449 MHz
 DECOUPLE H1, 399.7447683 MHz
 Power 41 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 3.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 28 min



Espectro de Infravermelho do composto 7



Larissa Souza
 Amostra Lt-38
 Solicitacao M0616-3
 27.06.2014 UFPE

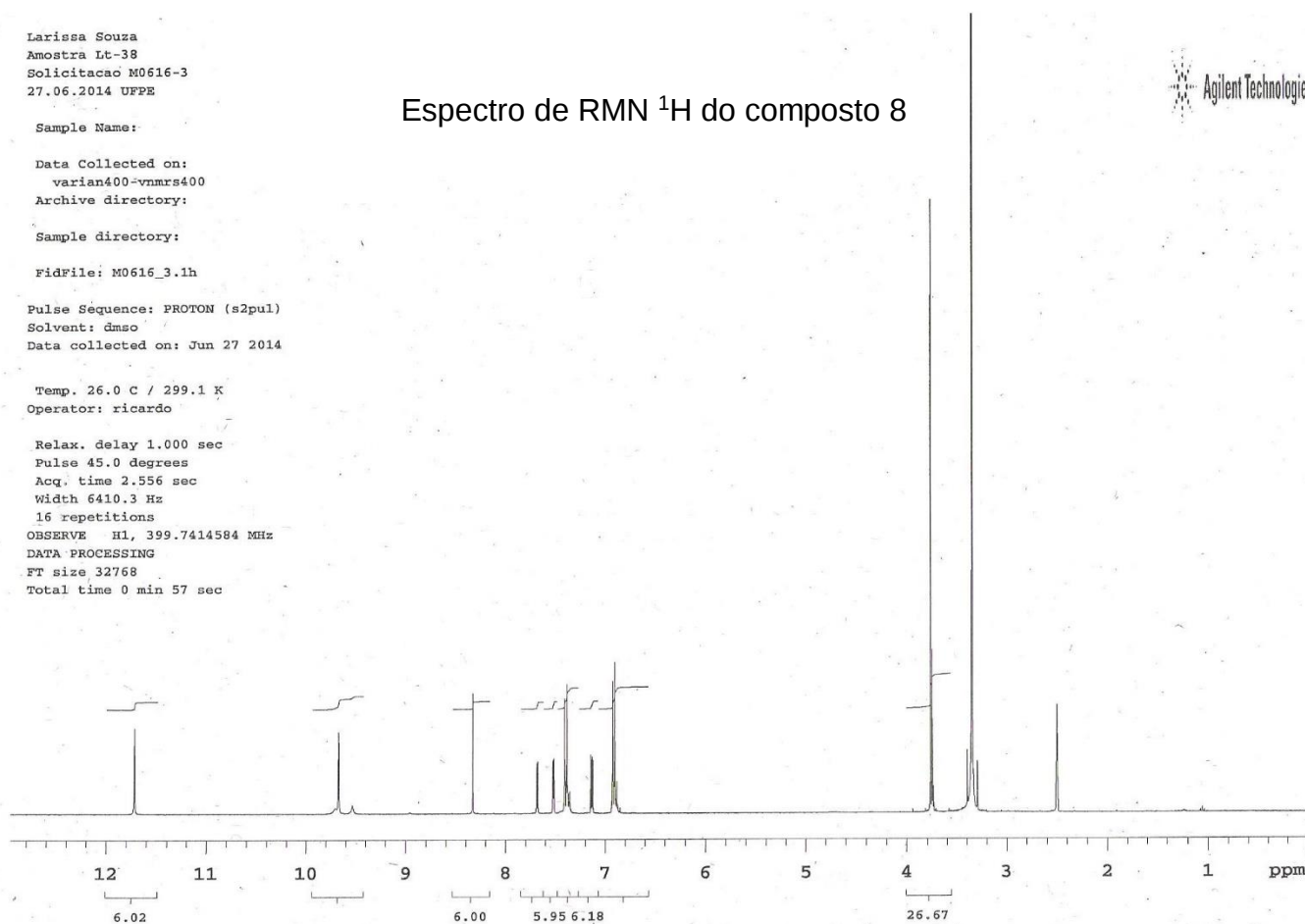


Espectro de RMN ^1H do composto 8

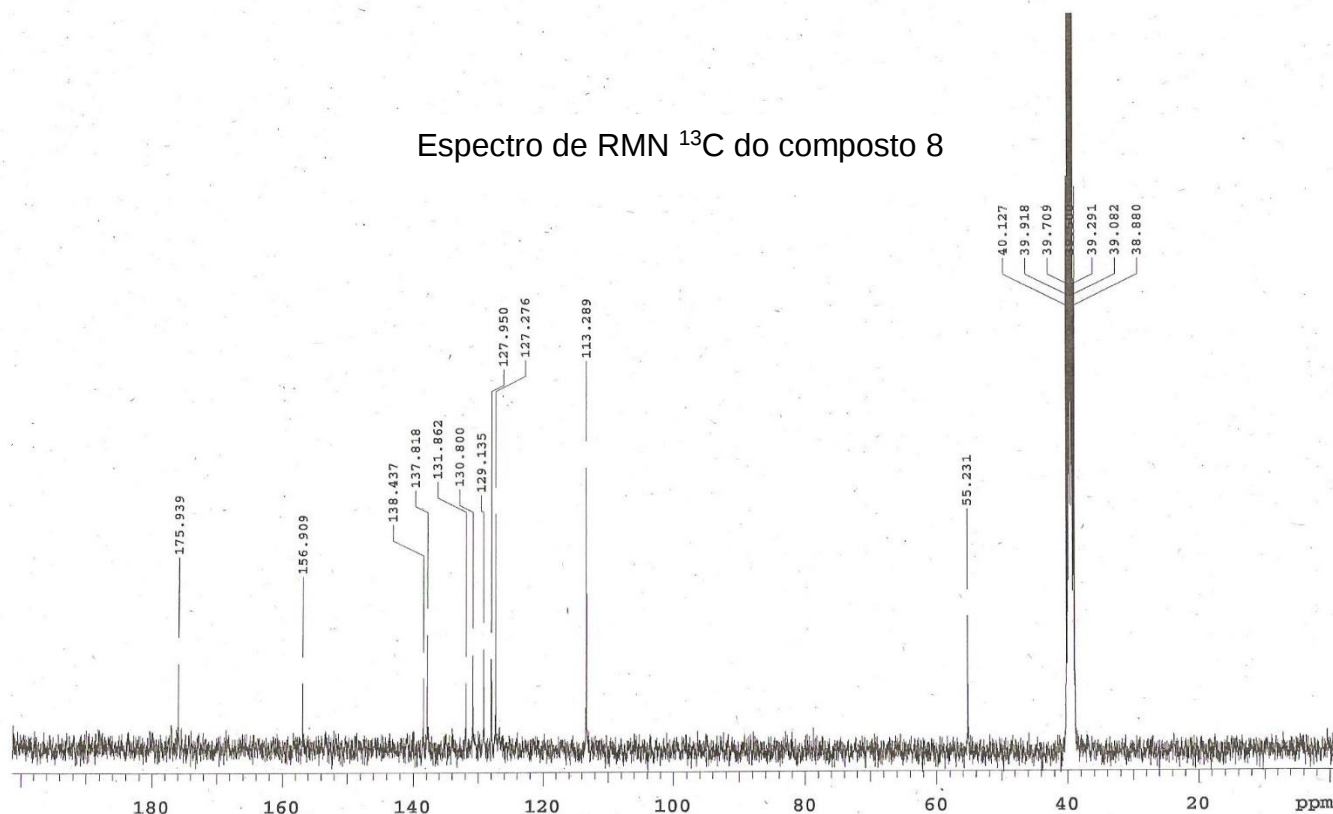
Sample Name:
 Data Collected on:
 varian400-vnmrs400
 Archive directory:
 Sample directory:
 FidFile: M0616_3.1h
 Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: dmsc
 Data collected on: Jun 27 2014

Temp. 26.0 C / 299.1 K
 Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 2.556 sec
 Width 6410.3 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE H1, 399.7414584 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min 57 sec



Espectro de RMN ^{13}C do composto 8



PULSE SEQUENCE Relax. delay 1.000 sec Pulse 45.0 degrees Acq. time 1.295 sec Width 25510.2 Hz 1024 repetitions	OBSERVE C13, 100.5151172 DECOUPLE H1, 399.7434654 Power 33 dB continuously on WALTZ-16 modulated	DATA PROCESSING Line broadening 2.0 Hz FT size 65536 Total time 38 minutes	Larissa Souza Amostra Lt-38 Solicitacao M0616-3 27.06.2014 UFPE Solvent: dmsc Temp. 26.0 C / 299.1 K Operator: ricardo
--	--	--	--

Larissa Souza
 Amostra LT-38
 Solicitacao M0616-3
 27.06.2014 UFPE

Espectro de DEPT do composto 8



Sample Name:

Data Collected on:
 varian400-vnmrs400
 Archive directory:

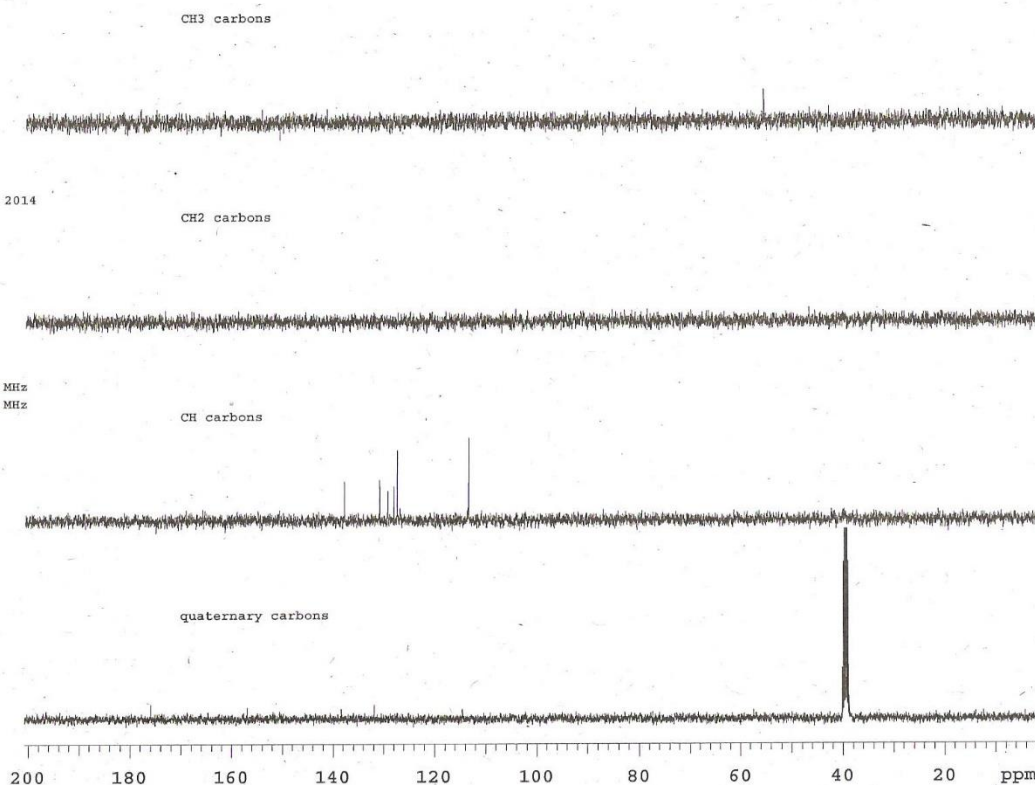
Sample directory:

FidFile: M0616_3.dept

Pulse Sequence: DEPT
 Solvent: dmsd
 Data collected on: Jun 27 2014

Temp. 26.0 C / 299.1 K
 Operator: ricardo

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.285 sec
 Width 25510.2 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE C13, 100.5151172 MHz
 DECOUPLE H1, 399.7434654 MHz
 Power 33 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 2.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 28 min



Espectro de Infravermelho do composto 8

