

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica



ALDO CÉSAR PASSILONGO DA SILVA

**TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Recife, 2016

ALDO CÉSAR PASSILONGO DA SILVA

**TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial ao grau de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Recife, 2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Aldo César Passilongo da

Tiossemicarbazonas: síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade biológica / Aldo César Passilongo da Silva- Recife: O Autor, 2016.

95 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências

- 1. Tiossemicarbazonas 2. Agentes antifúngicos 3. *Trypanosoma cruzi* I. Lima, Maria do Carmo Alves de (orientadora) II. Título**

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-246

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Maria Eduarda Lacerda de Larrazabal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof^a. Dr^a Maira Galdino da Rocha Pitta

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Recife, 16 de maio de 2016.

Tese de doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 16 de maio de 2016, cuja Banca Examinadora foi contituida pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima (Departamento de Antibióticos - Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira (Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Tiago Bento de Oliveira (Instituto Federal de Alagoas)

Assinatura: _____

TERCEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dr^a. Prof. Anekécia Lauro da Silva (Universidade Federal do Vale do São Francisco)

Assinatura: _____

QUARTO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular - Universidade Estadual da Paraíba)

Assinatura: _____

RESUMO

O desenvolvimento de novos fármacos é um dos grandes desafios para a indústria farmacêutica que envolve altos investimentos na área de pesquisa e desenvolvimento; apesar do baixo número de moléculas viáveis farmacologicamente, ainda o planejamento de fármacos é considerado como uma etapa crucial na descoberta de novos compostos, para tanto, é necessário implementar diversas estratégias. As tiossemicarbazonas são um grupo de moléculas pertencentes a classe das iminas ($-C=N$), e apresentam uma versatilidade reacional frente a diversos reagentes e excelentes ligantes orgânicos por sua natureza química. Desta forma, este trabalho teve por objetivo a síntese de 11 compostos derivados (AP-01 a AP-11) de forma indireta, onde as tiossemicarbazonas foram previamente preparadas a partir de reações da hidrazina (NH_2-NH_2) com isotiocianato e avaliação biológica anti-fúngica, antitripanossomida e leishmanicida de novos derivados. A fim de avaliar o modo de interação dos compostos com melhores resultados frente a inibição da enzima cruzaina, foram realizados estudos de docking. Os resultados acerca da atividade antifúngica para os derivados indol-tiossemicarbazonas sintetizados verifica-se a atividade considerável para os derivados AP-05 e AP-07 frente a cepa *Cryptococcus neoformans* URM 6898. Por outro lado, a cepa de *Candida parapsilosis* URM4970, demonstrou-se insensível aos derivados testados, onde pode ser observado ausência de atividade na máxima concentração testada ($16 \mu\text{g/mL}$). Os derivados AP-01, AP-05, AP-06, AP-09 e AP-10 apresentaram valores de IC_{50} de 4, 4, 4, 4 e $2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente para a cepa de *Candida albicans* ATCC, sendo esses valores todos melhores que um dos fármacos padrão utilizados no experimento, o cetoconazol o qual apresentou IC_{50} $8 \mu\text{g/mL}$. Para a cepa de *Candida krusei*, apenas o derivado AP-11 conseguiu resultados mais expressivos na inibição do crescimento desse fungo, apresentando $IC_{50} = 4 \mu\text{g/mL}$, sendo esse valor muito semelhante ao apresentado pelo cetoconazol ($IC_{50} = 2 \mu\text{g/mL}$). Os derivados benzodioxólicos (3a-g e 4a-b) sintetizados e caracterizados foram avaliados no potencial terapêutico frente as formas epimastigotas e tripomastigotas contra *Trypanosoma cruzi* e a forma promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A maioria dos compostos foi considerado não-tóxico em culturas de células do baço. No que diz respeito à atividade tripanocida, o composto 3c exibiu um nível elevado de atividade contra as formas epimastigota e tripomastigota ($IC_{50} = 1,48$ e $3,89 \mu\text{M}$, respectivamente). Os compostos 3a, 3f e 3g foram encontrados um elevado índice de atividade contra formas tripomastigota de *T. cruzi* ($IC_{50} = 1,57$, $0,79$ e $1,61 \mu\text{M}$, respectivamente). No caso de ação contra a *L. amazonensis*, composto 3d forneceu um resultado promissor, com $IC_{50} = 1,09 \mu\text{M}$. A fim de avaliar o modo de interação dos compostos 3a e 3g frente a cruzaina, foram realizados estudos de docking. No estudo Docking, os resultados demonstraram que as interações hidrofóbicas e, especialmente, dois sítios de interação hidrofílicos (ligações de hidrogénio com os resíduos e ASP161 MET68) são importantes para a elevada estabilidade do complexo formado entre o composto 3g e o alvo cruzaina. Portanto, outras avaliações, tais como a avaliação *in vivo* e protocolos experimentais são necessários para determinar o mecanismo de ação destes compostos tiossemicarbazonas.

Palavras-chave: Tiossemicarbazonas. Antifúngica. *T. cruzi*. *L. amazonensis*.

ABSTRACT

The development of new drugs is one of the great challenges for the pharmaceutical industry that involves high investments in the area of research and development. Despite the low number of pharmacologically viable molecules, drug planning is still considered a crucial step in the discovery of new compounds, for which it is necessary to implement several strategies. Thiosemicarbazones are a group of molecules belonging to the class of imines ($-C = N$), and have a reactional versatility against several reagents and excellent organic binders by their chemical nature. The aim of this work was to synthesize 11 indirect compounds (AP-01 to AP-11), where thiosemicarbazones were previously prepared from the reactions of hydrazine (NH_2-NH_2) with isothiocyanate and anti-biological evaluation Antitrypsinase and leishmanicide of novel derivatives. In order to evaluate the mode of interaction of the compounds with better results against the inhibition of the enzyme cruzain, docking studies were performed. The results on the antifungal activity for the indol-thiosemicarbazones synthesized derivatives show the considerable activity for the derivatives AP-05 and AP-07 against the strain *Cryptococcus neoformans* URM 6898. On the other hand, the strain of *Candida parapsilosis* URM4970, ($16 \mu g / mL$). The results showed that there was no activity at the highest concentration tested ($16 \mu g / mL$). The AP-01, AP-05, AP-06, AP-09 and AP-10 derivatives presented IC₅₀ values of 4, 4, 4, and 2 $\mu g / mL$, respectively, for the *Candida albicans* strain ATCC. Values all better than one of the standard drugs used in the experiment, ketoconazole which had IC₅₀ 8 $\mu g / mL$. For the *Candida krusei* strain, only the AP-11 derivative achieved more expressive inhibition of the growth of this fungus, with IC₅₀ = 4 $\mu g / mL$, which is very similar to that of ketoconazole (IC₅₀ = 2 $\mu g / mL$). The benzodioxolic derivatives (3a-g and 4a-b) synthesized and characterized were evaluated in the therapeutic potential against the epimastigote and trypomastigote forms against *Trypanosoma cruzi* and the promastigote form of *Leishmania amazonensis*. Most of the compounds were considered non-toxic in cultures of spleen cells. With respect to trypanocidal activity, compound 3c exhibited a high level of activity against the epimastigote and trypomastigote forms (IC₅₀ = 1.48 and 3.89 μM , respectively). Compounds 3a, 3f and 3g found a high activity index against trypomastigote forms of *T. cruzi* (IC₅₀ = 1.57, 0.79 and 1.61 μM , respectively). In the case of action against *L. amazonensis*, compound 3d provided a promising result, with IC₅₀ = 1.09 μM . In order to evaluate the interaction mode of compounds 3a and 3g against cruzain, docking studies were performed. In the Docking study, the results demonstrated that hydrophobic interactions, and especially two hydrophilic interaction sites (hydrogen bonds with residues and ASP161 MET68) are important for the high stability of the complex formed between compound 3g and cruzain target. Therefore, other evaluations, such as *in vivo* evaluation and experimental protocols are required to determine the mechanism of action of these thiosemicarbazones compounds.

Keywords: Thiosemicarbazones. Antifungal. *T. cruzi*. *L. amazonenses*.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. Figura 1. Interdisciplinaridade na produção do fármaco	25
Figura 2. Estratégia de hibridação molecular na obtenção de novos compostos antimicrobianos.	28
Figura 3. Estruturas da isatina (vermelho) ligada a chalcona (azul), à esquerda e do híbrido com melhor resposta biológica antitumoral, à direita.	29
Figura 4. Representação estrutural geral das tiossemicarbazonas	30
Figura 5. Estruturas das principais representantes da classe das tiossemicarbazonas cujo alvo biológico é a inibição da ribonucleotídeo redutase (RR).	35
Figura 6. Estruturas de derivados indenoindolona-tiossemicarbazonas potenciais inibidores da topoisomerase II.	36
Figura 7. Estruturas de tiossemicarbazonas com atividades anti-inflamatória e antinociceptiva.	37
Figura 8. Estrutura da tiossemicarbazona promissora na atividade anti-inflamatória.	38
Capítulo 2. Figura 1. Exemplo de espectro de RMN ¹ H do derivado indol-tiossemicarbazona AP-04 evidenciando os hidrogênios ligados ao nitrogênio e imínico presentes na molécula.	50
Figura 2. Espectro de RMN ¹ H do derivado AP-04 evidenciando todos os hidrogênios aromáticos presentes na estrutura.	51
Figura 3. Espectro de RMN ¹³ C do derivado AP-04 evidenciando os principais assinalamentos da tiocarbonila, carbono imínico e metila.	52
Figura 4. Estruturas gerais dos derivados indol-tiossemicarbazona AP-08 e AP-09 evidenciando o grupamento metil e metóxi ligado ao indol e o grupo 1-naftil ligado a tiossemicarbazona.	53
Figura 5. Grupos hidrofílicos assinalados em azul e grupos hidrofóbicos assinalados em vermelho.	54
Figura 6. Estrutura do derivado AP-06 evidenciando a presença de dois grupos hidrofóbicos.	55
Capítulo 3 - Figure 01. Estruturas dos prótons H5 e H8 (isômero E) não	71

se correlacionam nos espectros NOESY. O isómero (Z) e os hidrogénios H4 e H8 estão correlacionados indicando que apresentam a configuração dos compostos sintetizados neste estudo.

Figura 02. Docking de sobreposição das soluções de compostos 74
inibidores da Cruzaínaa 3a (vermelho) e 3g (laranja) ligados a enzima
(verde) e a estrutura cristalográfica do co-ligante "KB2" (preto). Vista geral
(à esquerda) e vista detalhada (à direita)

Figura 03. Vista detalhada Docking das soluções dos composto 75
3a (lado esquerdo) e 3g (lado direito). Os resíduos da cruzaína formam interações
hidrofóbicas detalhados em verde, enquanto os resíduos que formam
ligações de Hidrogênio destacados em azul.

LISTA DE ESQUEMAS

Capítulo 1 - Esquema 1. Síntese geral de tiossemicarbazonas a partir da tiossemicarbazida (comercial ou previamente preparada) e compostos carbonilados.	30
Esquema 2. Reação de S-alkilação.	30
Esquema 3. Formação do núcleo da tiazolidin-4-ona a partir da tiossemicarbazona e reação de adição de Michael no núcleo formado.	31
Esquema 4. Formação da tiazolidin-4-ona funcionalizada com grupo ácido carboxílico.	32
Esquema 5. Obtenção da 4-tiazolidinona a partir de dietil-acetileno-dicarboxilato e tiossemicarbazonas	32
Esquema 6. Obtenção do heterociclo tiazol a partir de tiossemicarbazonas	33
Capítulo 2 - Esquema 1. Prováveis reações com as tiossemicarbazidas	43
Esquema 2. Rota sintética para obtenção das tiossemicarbazonas (AP 01-11). Reagentes e condições: (a) hidrazina, isotiocianatos substituídos, diclorometano, temperatura ambiente, 120 minutos; (b) tiossemicarbazidas substituídas, 5-metil-1H-indol-3-carbaldeído ou 5-metóxi-1H-indol-3-carbaldeído, etanol, ácido acético glacial (5-10 gotas), temperatura ambiente, 120 minutos.	45
Capítulo 3 - Esquema 1 Síntese dos compostos alvo. Rota A: a) CH ₂ Br ₂ , K ₂ CO ₃ e DMF, b) ácido acético glacial, etanol, refluxo e N-aril-tiossemicarbazidas (24-48 h); C) ClCH ₂ CO ₂ Et, CH ₃ COONa, EtOH, 24-48 horas. Rota B: a) MnO ₂ , benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetanol e CH ₂ Cl ₂ , 2h; B) CH ₂ Br ₂ , K ₂ CO ₃ e DMF, c) ácido acético glacial, etanol, refluxo e N-aril-tiossemicarbazidas (24-48 h); D) ClCH ₂ CO ₂ Et, CH ₃ COONa, EtOH, 24-48 horas.	70

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 - Tabela 1. Sensibilidade Antifúngica (IC50 - µg/mL) dos 55 compostos derivados AP-01 ao AP-11 frente a *Candida Abicans* ATCC, *Candida paraptosis* URM9770, *Candida paraptosis* URM9048, *Candida krusei* ATCC e *Cryptococcus neoformans* URM 6898

Capítulo 3 - Tabela 1 Atividades anti-tripanicida e leishmanicida de 73 tiosemicarbazonas e tiazolidinonas derivadas de 1,3-benzodioxol.

Tabela 2 - Interações Intermoleculares observadas após o cálculo do 75 acoplamento. HC significa "Contatos Hidrófobos" e os números são as distâncias de Ligação de Hidrogénio, em Ångstroms.

LISTA DE ABREVIATURAS

3D: estrutura tridimensional

CCD: cromatografia de camada delgada

CIM: concentração inibitória mínima

COX – Cicloxigenase

COX-2: cicloxigenases 2

d- dupleteo

dd – Duplo dupleteo

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

GI₅₀: concentração que inibe 50% do crescimento celular

Hz – Hertz

IR: Infra-Vermelho

J – Constante de acoplamento

LOX: lipooxigenase

LQIT: Laboratório de Química e Inovação Terapêutica

NOs: óxido nítrico sintase

NOX: NADPH oxidase

OMS- Organização mundial de saúde

PGE₂: prostaglandina E do tipo 2

RMN 13C – Ressonância magnética nuclear de 13C

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze

RMN 1H – Ressonância magnética nuclear de 1H

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

RR: ribonucleotídeo redutase

s – Simpleto

WHO-World Health Organization

“Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu.”

Érico Veríssimo

Dedico este trabalho aos meus pais, Divino Inácio e Dilcea Passilongo, a minha esposa Nathalia Oliveira e aos meus mestres de conhecimentos da vida e da arte farmacêutica que me acompanharam durante minha trajetória. Todos foram e serão sempre incentivadores constantes da minha formação. Meu eterno agradecimento!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua capacidade de proporcionar a intuição, bondade, proteção e sabedoria para todos.

Aos meus pais, Divino Inácio da Silva e Dilcea Passilongo da Silva (*in memorian*), pelo apoio, incentivo, investimento e principalmente compreensão nos momentos mais difíceis.

A minha esposa Nathalia Oliveira da Silva e sua família, os quais aceitaram no seu âmbito familiar, me deram compreensão, amor, e entendimento, e fortalecimento nas mudanças profissionais.

As minhas tias, tios, primas e primos, que de a minha infância me proporcionaram sempre apoio e compreensão.

Aos meus avós, João Passilongo e Josephina Luíza Zozin Passilongo (*in memorian*), que foram sempre fundamentais na minha infância, pelos ensinamentos e gestos de carinhos.

Aos meus avós paternos, João Inácio da Silva e Maria Anastácia da Silva (*in memorian*).

A minha orientadora e professora Maria do Carmo Alves de Lima, pelas oportunidades ofertadas, paciência, orientação, confiança, presença, carinho e além de tudo a amizade prestimosa.

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

Aos meus amigos verdadeiros pernambucanos Elisângela Christianne, Laurimar Thomé, Thiago Aquino, Adriano Guedes; Agenilda, Silvana entre outros

A todos os professores, técnicos e amigos do Centro Universitário Maurício de Nassau – UNINASSAU – Recife, que entenderam todas as particularidades da gestão de coordenação, bem como a dedicação nas tarefas que realizo, e estão sempre dispostos a ajudarem no dia-a-dia;

Em especial aos amigos professores, ex-professores, funcionários que acompanham/acompanharam diretamente na coordenação, Jamerson Ferreira, Andrea Apolinário, Aracelly França, Cleiton Diniz; Daniela Aquino, Nataly Cunha, Danilo Pontes, Valerium, Edilene Dellibera, Anekecia Lauro; Magaly Lyra, Manuela Bernardo, Paula Frassinete, Renata Ramos, Renata Valença, Ronmilson e tantos outros,

A todos os coordenadores, professores, técnicos e amigos do CESMAC – Maceió - AL, que deram o apoio inicial e incentivo para a área de docência, deixando marcas profundadas na vida;

Aos meus amigos, professores e colegas do Centro Educacional Brasileiro – CEB (Barbacena - MG), pela compreensão e alegrias.

A Nilceu Carlos, Kleber Candian, René e todos os demais colegas de Dr. Sá Fortes.

A família de Thiago Aquino e a família de Mário e Rita de Cássia, pela compreensão e imensa ajuda nos momentos difíceis. Em especial aos garotos Romário e Matheus Ferreira.

Às instituições Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, Instituto Mineiro de Estudos e Pesquisa em Nefrologia – IMEPEN - Juiz de Fora/MG; Centro de Ensino Superior de Maceió – CESMAC; Centro Universitário Maurício de Nassau – UNINASSAU - Recife .

Aos dois professores e “mestres da vida”: Ayrton Pires e Manoelito Cirilo, pela ajuda inestimável, cooperação, ensinamentos e apoio. Sempre estarão na minha lembrança. Deus os abençoe. Muito obrigado!!!

A todos os amigos que contribuíram para a conclusão desta Tese, obrigado!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
3.1 GÊNESE E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS	25
3.2 O PAPEL DA QUÍMICA MEDICINAL DA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS	26
3.3 TIOSSEMICARBAZONAS	29
3.3.1. Reatividade	29
3.3.1.1 Reação de S-alquilação	30
3.3.1.2 Reação de ciclização	30
3.3.2 Importância biológica	33
4 ARIL-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	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	44
4.1.2.2 Procedimento geral para a síntese das tiossemicarbazonas (AP 01-11)	44
4.2 METODOLOGIA BIOLÓGICA	45
4.2.1 Inóculo	45
4.2.2 Teste se Sensibilidade Antifúngica	46
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.5.1 Química	46
4.5.2 Avaliação Anti-fúngica	52
5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE TIOSEMICARBAZONAS E TIAZOLIDINONAS DERIVADAS DE 1,3-BEZODIOXOL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA E ESTUDO DOCKING	57
5.1. INTRODUÇÃO	60
5.2. PARTE EXPERIMENTAL	61
5.2.1 Química	61
5.2.2 Síntese e caracterização de benzo[d][1,3]dioxol-5-carbaldeído (5)	61
5.2.3 Síntese e caracterização de tiosemicarbazonas (3a-g)	62
5.2.3.1 2- (Benzo [d] [1,3] dioxol-4-ilmetileno) -N-fenil-tiosemicarbazona (3a)	62
5.2.3.2 2-(Benzo [d] [1,3] dioxol-4-ilmetileno) -N- (4-clorofenil) –tiossemicarbazona (3b)	62
5.2.3.3 2- (benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno) -N- (naftalen-1-il) –tiossemicarbazona (3c)	63
5.2.3.4 2- (benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno) -N- (4-corofenil) –tiossemicarbazona (3d)	63
5.2.3.5 2- (benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno) -N-fenil-tiosemicarbazona (3e)	64
5.2.3.6 2-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno-N-fenetil-tiosemicarbazona (3f)	64

5.2.3.7 2-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno) -N- (4-metoxifenil) tiosemicarbazona (3 g)	64
5.2.4 Síntese e caracterização de 4-tiazolidinonas (4a-b)	65
5.2.4.1 2- Benzo [d] [1,3] dioxol-4-ilmetileno-hidrazono) -3- (4-Bromofenil) tiazolidin-4-ona (4a)	65
5.2.4.2 2- Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno-hidrazono) -3- (4-clorofenil) tiazolidin-4-ona (4b)	65
5.2.5 Citotoxicidade em esplenócitos de camundongos	66
5.2.6 Atividade anti-<i>Trypanosoma cruzi</i> (epimastigotas)	66
5.2.7 Atividade anti-<i>Trypanosoma cruzi</i> (tripomastigotas)	67
5.2.8 Atividade biológica em promastigotas de <i>L. amazonenses</i>	67
5.2.9 Estudo docking	68
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.3.1 Química	68
5.3.2 Atividade Antiparasitária	71
5.3.3 Docking	72
5.4. CONCLUSÃO	76
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
6.1 CONCLUSÕES	91
6.2 PERSPECTIVAS	91
REFERÊNCIAS	92



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

No final do século XIX, quando a atuação do químico orgânico sintético passou de basicamente três atividades: elucidação estrutural de compostos naturais, investigação de reações básicas e preparação de novas substâncias químicas, para a busca por medicamentos menos tóxicos, que resultou na introdução de substâncias sintéticas na terapêutica e seu uso foi amplamente disseminado no século XX (Thomas, 2003).

Nos dias atuais, existe uma busca incessante por novos compostos úteis no tratamento de diversas doenças. Esse objetivo é foco nos centros de pesquisas, nas universidades e nas indústrias farmacêuticas, visando desenvolver novos princípios ativos mais eficazes e menos tóxicos que podem ser obtidos através da síntese de novos compostos ou por modificações estruturais em moléculas já conhecidas, direcionados pela relação estrutura química e ação biológica (Michaela; 2009).

A introdução de novos fármacos na terapêutica é necessária para o aperfeiçoamento do tratamento de doenças já existentes, recém-identificadas ou, ainda, para a implementação de tratamentos mais seguros e eficazes (Oliveira et al., 2008).

O desenvolvimento de um fármaco pode surgir através de experimentos com produtos naturais ou sintéticos, que tenham similaridade com compostos, com reconhecida atividade para outras doenças ou através de alvos metabólicos específicos para uma determinada célula ou órgão (Fiocruz, 2009).

Os químicos orgânicos lançam mão de várias estratégias para introduzir novos fármacos na terapêutica. Porém as modificações na estrutura química de uma molécula se mostra a medida mais promissora, já que podem alterar significativamente suas propriedades físicas, químicas e biológicas e também o mecanismo de ação em nível molecular. Estas consistem na transformação química de moléculas conhecidas, com o objetivo de aumentar a potência e segurança, garantindo, assim, um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico (Wermuth, 2010). Nos últimos anos se tem verificado um crescente interesse da comunidade científica nas classes de compostos heterocíclicos de origem sintética. Diversas moléculas sintéticas podem ser obtidas a partir de derivações de anéis

heterocíclicos, devido à sua potencialidade como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos.

As tiossemicarbazidas se destacam na literatura por suas aplicações terapêuticas tais como: antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, antiparasitária, hipoglicemiante, entre outras (Oliveira et al., 2008).

Desta forma, desenvolvemos a síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade biológica de alguns derivados com aldeídos aromáticos derivados do safrol, indóis e contendo grupamentos métoxi, metílico e halogênios. Os compostos obtidos foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas como a ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C além de infravermelho e espectrometria de massas, tendo suas estruturas confirmadas. Após a caracterização os derivados foram submetidos a avaliação biológica antifúngica, tripanossomida e leshimanicida.



SOULTBO



2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar vinte derivados aril-tiossemicarbazonas a partir de aldeídos aromáticos derivados do safrol e indóis e contendo grupamentos métoxi, metílico e halogênicos, tendo em vista busca de novos agentes terapêuticos anti-fúngicos e antiparasitários.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a síntese de 20 compostos da série aril-tiossemicarbazonas;
- ✓ 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 o potencial anti-fúngico *in vitro* dos derivados aril-tiossemicarbazonas;
- ✓ Avaliar o efeito leishmanicida *in vitro* dos derivados sobre as fases promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- ✓ Avaliar o efeito tripanocida *in vitro* dos derivados sobre as fases epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
- ✓ Avaliar o pontecial citotóxico dos derivados em linhagens de células macrófagas J774A 1;
- ✓ Realizar estudo Docking dos principais derivados aril-tiossemicarbazonas frente a enzima cruzaina.



PRIMEIRO CAPITULO



3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 GÊNESE E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

O desenvolvimento de novos fármacos é um dos grandes desafios para a indústria farmacêutica que envolve altos investimentos na área de pesquisa e desenvolvimento (P&D) e ocupa milhares de pesquisadores titulados, de diferentes áreas, em diversos laboratórios de pesquisa, tanto industriais como acadêmicos que contrasta com o baixo número de novos medicamentos que atingiu ao mercado nos últimos anos (Munos, 2009; Barreiro et al., 2002). O processo de descoberta de novos fármacos é caracterizado por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas moléculas capazes de apresentarem efeitos farmacológicos satisfatórios e com certo grau de especificidade, biodisponibilidade adequada ao emprego terapêutico e segurança (Wermuth, 1996; Ratti and Trist, 2001) (Figura 1)

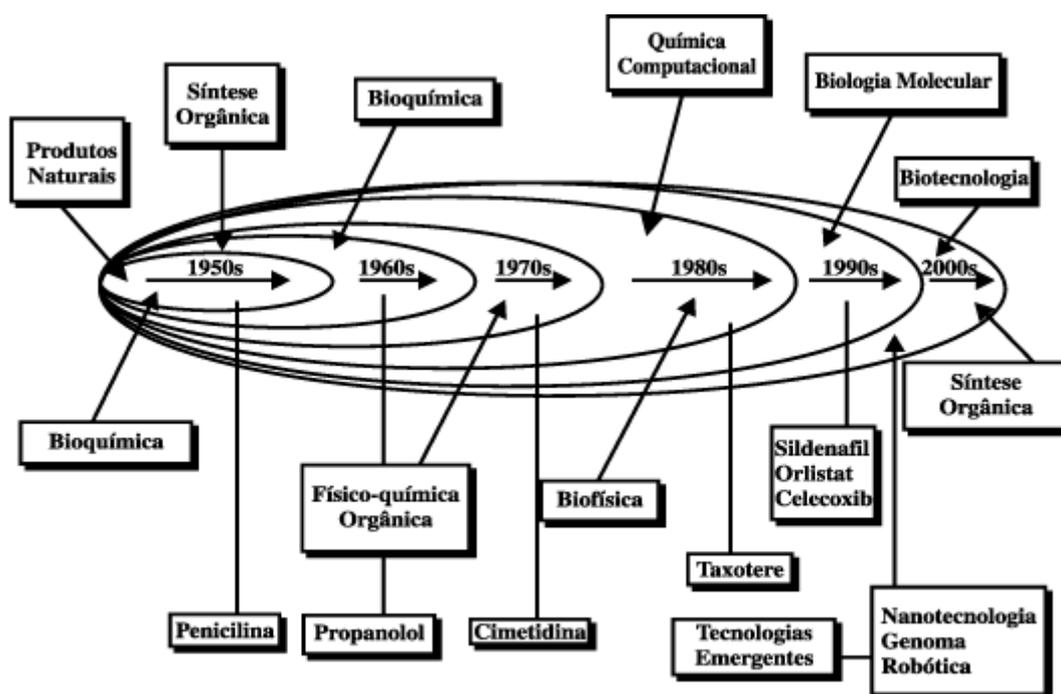


Figura 1. Interdisciplinaridade na produção do fármaco

Em face aos impressionantes avanços científicos, tecnológicos observados em diversas áreas como a biologia estrutural, molecular e a química computacional, por exemplo, o planejamento racional de novos fármacos tornou-se uma realidade (Barreiro, 2002). Apesar de um processo complexo, longo e de alto custo, tendo

suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas (Guido, Andricopulo, 2009).

Nos anos 80, a indústria farmacêutica redirecionou todo o processo de seleção de produtos ativos na otimização racional (processo denominado de “busca racional de Fármacos”) pelo uso bioensaios específicos para enzimas, receptores, DNA, etc, e principalmente pelo conhecimento de mecanismo de ação de novas substâncias bioativas. Dentro desse modelo, uma indústria farmacêutica de grande porte selecionava em média, cerca de 5.000 substâncias por ano (Leitão, Montanari, Donnici, 2000; Ooms, 2000). Nos anos 90, com advento da química combinatória, banco de germoplasma e bioensaios em larga escala “high-throughput screening” (HTS), os programas de descoberta de novos fármacos alteram a produtividade de novos compostos potenciais radicalmente, através da química combinatória como ferramenta (Leitão, Montanari, Donnici, 2000; kniaz, 2000).

Tradicionalmente, a pesquisa de fármacos concentra seus esforços iniciais na fase farmacodinâmica, a qual relaciona-se com a interação do fármaco com seu alvo terapêutico. Nas triagens preliminares utilizam modelos in vitro, tais como enzimas, receptores ou tecidos, para obter a relação entre os novos compostos e sua potência agonista ou antagonista, conforme o caso. A partir destes estudos, triagens secundárias e terciárias frequentemente são dirigidas à administração dos compostos a animais, por via oral ou intravenosa, com observação dos possíveis efeitos farmacológicos dentro da triagem da toxicidade aguda. Entretanto, muitos dos compostos que se demonstram promissores nos testes in vitro não apresentam boa atividade nos testes, geralmente associado à farmacocinética dos compostos, biodisponibilidade, duração do efeito para determinada ação farmacológica e metabolismo (Masimirembwa, Bredberg, Andersson, 2003; Abdel; Kauffman, 2004; Pereira, 2007).

3.2 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 μM ; e o composto SID 92097880, CIM: 9.15 μM . Os melhores compostos híbridos apresentaram valores de CIM que variaram entre 9.28 – 11.72 μM evidenciando o sucesso da estratégia de modificação molecular (figura 2).

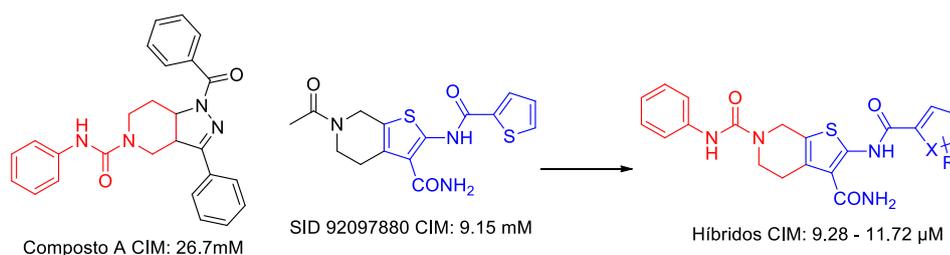
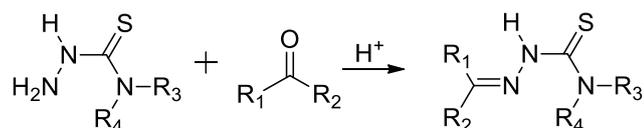


Figura 2. Estratégia de hibridação molecular na obtenção de novos compostos antimicrobianos.

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 gastrintestinal (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 3). 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.



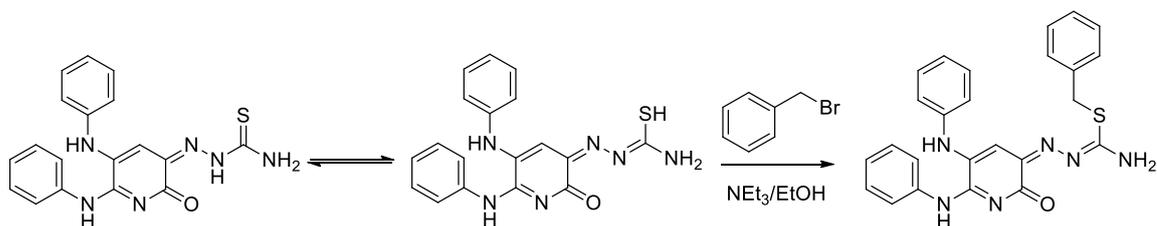
Esquema 1. Síntese geral de tiossemicarbazonas a partir da tiossemicarbazida (comercial ou previamente preparada) e compostos carbonilados.

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.

3.3.1.1 Reação de S-alkilação

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-alkilação 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 (-CH₂-) do grupamento benzil introduzido (Xie et al., 2014).



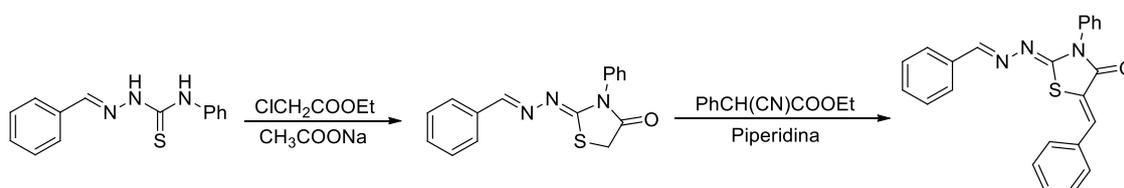
Esquema 2. Reação de S-alkilação.

3.3.1.2 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).

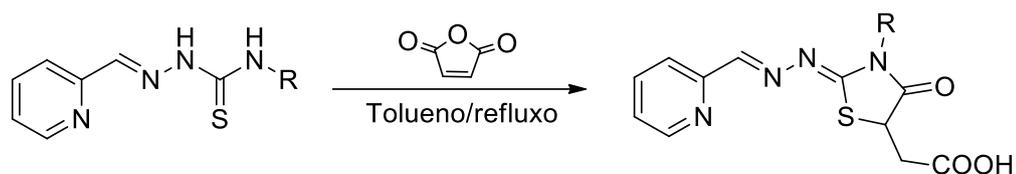
A caracterização desses compostos pode ser efetuada através da análise da espectroscopia de absorção no infravermelho, onde é possível observar um estiramento característico da carbonila ($-C=O$) na posição 4 do núcleo formado. Além disso, após a reação de adição com ésteres cianocinâmicos, a caracterização 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).

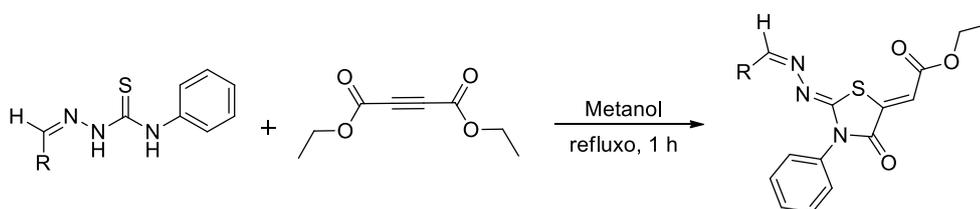


Esquema 4. Formação da tiazolidin-4-ona funcionalizada com grupo ácido carboxílico.

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 *EZ*. 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).

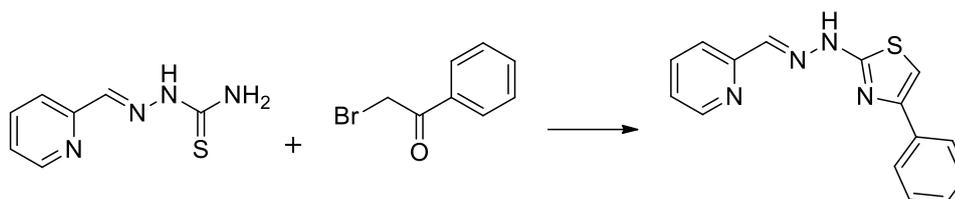


Esquema 5. Obtenção da 4-tiazolidinona a partir de dietil-acetileno-dicarboxilato e tiossemicarbazonas

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 (C=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

3.3.2 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).

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 5). 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).

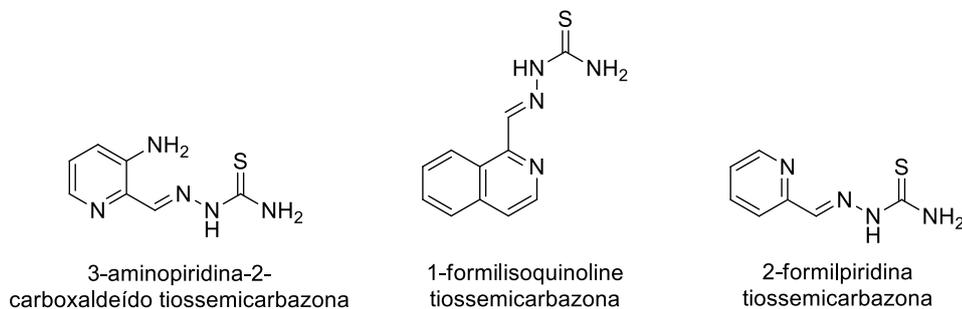


Figura 5. Estruturas das principais representantes da classe das tiossemicarbazonas cujo alvo biológico é a inibição da ribonucleotídeo redutase (RR).

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 doxorubicina 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 6). 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).

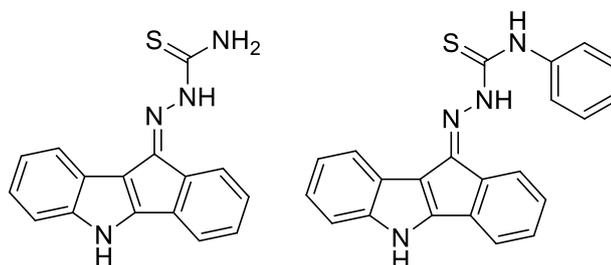


Figura 6. Estruturas de derivados indenoindolona-tiossemicarbazonas potenciais inibidores da topoisomerase II.

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 7) 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).

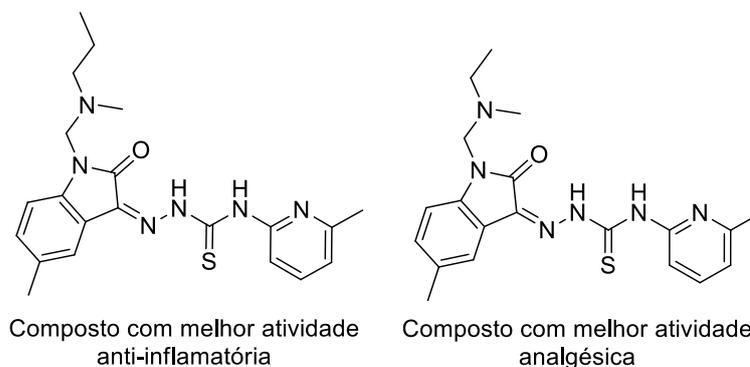


Figura 7. Estruturas de tiossemicarbazonas com atividades anti-inflamatória e antinociceptiva.

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 8) 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).

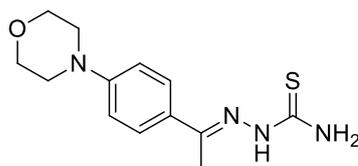


Figura 8. Estrutura da tiossemicarbazona promissora na atividade anti-inflamatória.

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 aos modelos experimentais de câncer e inflamação, com a finalidade de obtenção de moléculas promissoras para o tratamento dessas doenças.

Apesar do baixo número de moléculas viáveis farmacologicamente, o planejamento de fármacos é considerado como uma etapa crucial na descoberta de novos compostos, para tanto, é necessário implementar diversas estratégias 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. A fusão dessas subunidades conduz a concepção de um novo híbrido mantendo as características das moléculas originais pré-selecionadas (Kauffman, 2004, Lima, 2007, Addla et al., 2012).

Tradicionalmente, pequenas moléculas têm sido uma fonte confiável para desenvolvimento de compostos biologicamente ativos, em especial os compostos de enxofre e derivados. Os compostos cíclicos de enxofre, como triazol, tiadiazol e heterociclos de oxadiazol apresentam relatados de diversas atividades farmacológicas como anti-inflamatório, anti-cancro, analgésicos, antimicrobianos, anticonvulsivantes, anti-alérgica entre outros (Varvaressou et al, 1998; Shafiee, Jalilian, 2000; Jalilian et al, 2003; Bineshmarvasti, 2003)

Quando comparados com moléculas de origem natural com estruturas complexas, pode-se verificar que são facilmente sintetizadas e sua otimização estrutural suave normalmente é um indicativo de uma possível candidata farmacológica (Arora et al, 2013). A química de substâncias cíclicas contendo o átomo de enxofre, tais como tiossemicarbazonas (TSC) tem recebido uma atenção

considerável na química medicinal devido a estratégia clássica para a síntese de compostos heterociclos através de reações de compostos $C = O$ e grupos $C = N$ e para a indústria farmacêutica relacionada a estratégia e desenvolvimento de moléculas com propriedades farmacológicas (Kalinowski et al, 2009; Kesel, 2011; Basu, 2013)

As atividades biológicas dos compostos tiocarbonilados podem estar relacionadas a expressão e correlação de efeitos fisiológicos através de mecanismos de S-oxidação. Este processo de oxidação organo-enxofre pode estar envolvido em múltiplas atividades celulares, incluindo a degradação de hormônios polipeptídeos e proteínas, regulação da síntese de proteínas, manutenção do potencial redox intracelular, proteção de células contra danos oxidativos, entre outros (Del Corso et al, 1994)

Vários TSC e seus derivados tiadiazolina heterocíclico (TZH) têm sido utilizados em uma variedade de categorias de drogas, tais como antimicrobianos, anti-HIV-1, anti-câncer e inibidores do Sistema Nervoso Central (SNC) e a literatura sobre estas atividades é cada vez maior. A síntese de TSC foi desenvolvida devido à sua facilidade de substituir os grupos substituintes de alquila, arila, ou heterocíclicos derivados e levando assim a um amplo espectro de novos ligantes multi-denteados, capaz de coordenar a centros de metal através do azoto da imina e do átomo de enxofre, no entanto, o possível mecanismo de ação não está restrito a esta capacidade de se ligar ao íon metálico de modo variável, mas também a sua capacidade de se ligar a função aldeído ou cetona. (Garcia et al; 2003; Chellan et al, 2010; Glisoni et al, 2010; Silva et al, 2010; Geng, 2013).

Doenças infecciosas são causadas por micro-organismos patogênicos (por exemplo, bactérias, vírus, fungos e parasitas) que invadem as células do hospedeiro para a sua reprodução. Essas doenças representam graves problemas de saúde pública que afetam uma fração significativa da população mundial e, em razão de seu aspecto socioeconômico, representam um dos principais desafios para o século XXI, especialmente nas regiões mais pobres e vulneráveis do planeta. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente um terço das causas de mortalidade no mundo. A relação entre essas enfermidades e a baixa renda das populações mais carentes fica evidente ao se constatar que as doenças infecciosas ocupam a primeira posição

entre as principais causas de morte e incapacidade permanente nos países em desenvolvimento (WHO, 2008; Guido et al, 2010).

Várias espécies de fungos são patogênicas e causar danos graves para plantas e animais. Devido ao surgimento e diversidade de cepas resistentes a fármacos, a procura de novos antifúngicos aumentou acentuadamente nos últimos anos (Marui 2010). Os pacientes imunossuprimidos são altamente suscetíveis a infecções potencialmente fatais causadas por fungos oportunistas. A utilização de agentes imunossupressoras e anti-neoplásicos têm proporcionado uma oportunidade para tais microorganismos causar graves infecções. Adicionalmente, apesar de muitos avanços significativos na terapia antimicrobiana, doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos continuam a ser um importante problema de saúde em todo o mundo devido ao rápido desenvolvimento da resistência à antibacteriano existente e antifúngicos, reforçando a necessidade de procuras de novos agentes anti-fungicos mais seguros (Aly, 2013; Altintop et al,2016).

As propriedades antibacterianas e antifúngicas das tiossemicarbazonas vêm sendo estudada desde 1946, nos primeiros relatos da atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*. Desde então, estas atividades e outras propriedades biológicas de tiossemicarbazonas vem sendo descritas, através da capacidade de quelar metais essenciais no metabolismo destes microorganismos (Rodríguez-Argüelles, 2005).

As tiossemicarbazonas são um grupo de moléculas pertencentes a classe das iminas ($-C=N$), conhecidas como base de Schiff, devido a reação de condensação de tiosemicarbazidas com aldeídos ou cetonas 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 (Lobana et al., 2009). Estes ligantes possuem uma conjugação N, N, S; sistema tridentado que tem demonstrado ser particularmente importante quanto à sua atividade citotóxica (Kalinowski, Richardson, 2007). A formação de complexos com metais de transição com átomos de Ferro, Cobre, Zinco entre outros podem acarretar efeitos citotóxicos; catalisando formação de espécies reativas de oxigênio, que podem levar o processo

de danificação do DNA e inibindo o processo de proliferação celular (Kalinowski, Richardson, 2007; Verçozza et al, 2009; Pelosi, 2010).

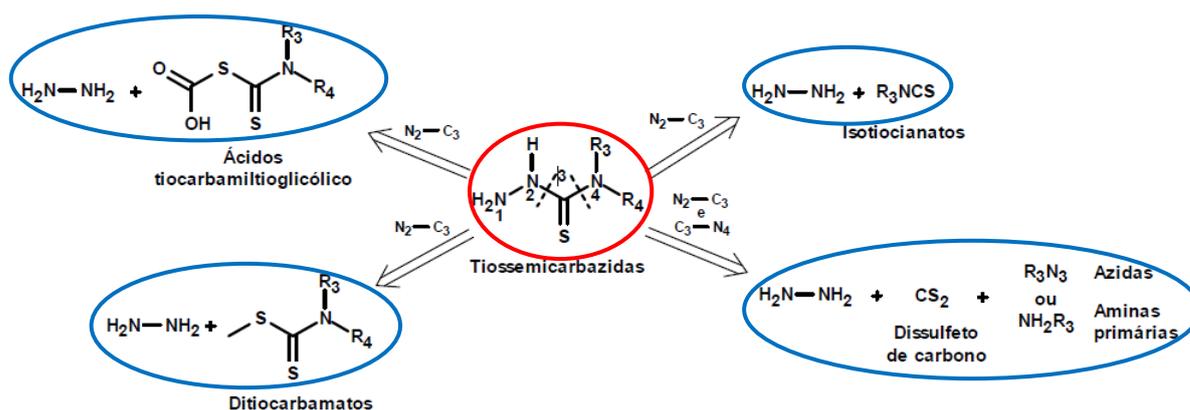
Várias investigações centraram-se na busca de moléculas com Semicarbazonas e tiosemicarbazonas para Identificar o seu papel na inibição de enzimas, ou em interagir com o DNA. Diferentes classes de compostos foram estudadas no contexto de Sua reação ao *T. cruzi*, e uma relação molecular estrutura-atividade Tem sido sugerido como um parâmetro importante Os efeitos estéricos e eletrostáticos. Além da lipofilicidade dos compostos e, no caso de derivados nitro, são conhecidos por sua capacidade de redução para formar ânion superóxido, e, sob condições específicas, a sua capacidade para inativar a enzima tripanotiona Redutase (Perez-Campos, 2014)



SEGUNDO CAPÍTULO

4. ARIL-TIOSSEMICARBAZONAS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE ANTI-FÚNGICA

Existem duas estratégias gerais de síntese para as tiossemicarbazonas: A primeira de forma direta, a partir de reações quimiosseletivas entre tiossemicarbazidas e aldeídos ou cetonas (SARODINICK et al., 2003; HOLLA et al., 2003); a segunda de forma indireta, onde as tiossemicarbazidas são previamente preparadas a partir de reações da hidrazina ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$) com isotiocianatos (PAPASTAIKOUDI et al., 1995; GÜRISOY et al., 1997; DUFFY et al., 2002; LI et al., 2006), ditiocarbamatos (ASHTON et al., 1993), ácidos tiocarbamiltioglicólicos ou dissulfeto de carbono, este último em presença de azidas ou aminas primárias (ASHTON et al., 1993; TENÓRIO et al., 2005b) (Esquema 1).



Esquema 1: Prováveis reações com as tiossemicarbazidas

4.1 METODOLOGIA

4.1.1 Metodologia química

4.1.1.1 Materiais e Equipamentos

Os reagentes e solventes comuns utilizados para a síntese e análise foram hidrazina 80%, 5-metil-1*H*-indol-3-carbaldeído, 5-metóxi-1*H*-indol-3-carbaldeído, fenil-isotiocianato, 4-bromo-fenil-isotiocianato, 4-cloro-fenil-isotiocianato, 4-metóxi-fenil-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).

4.1.1.2 Procedimento Experimental

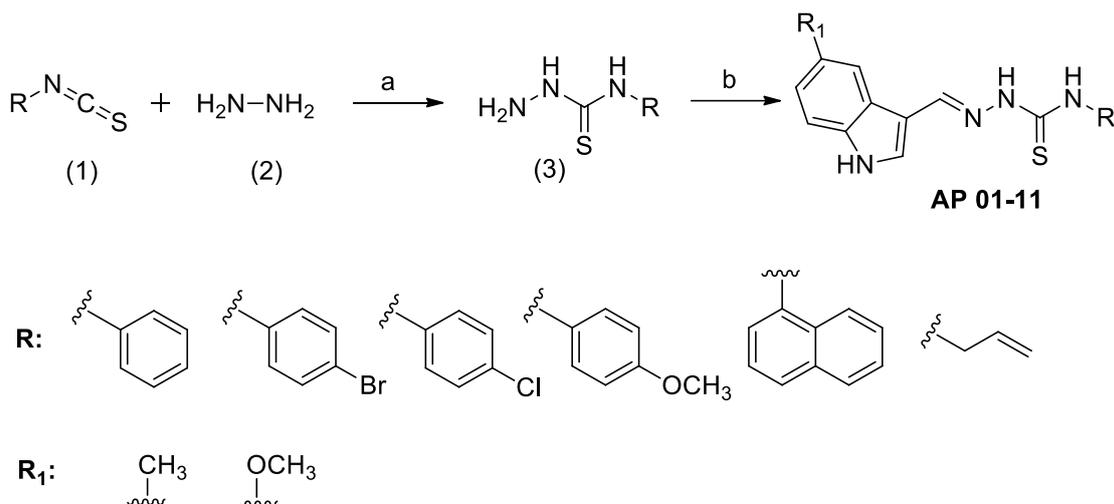
4.1.1.2.1 *Procedimento geral para a síntese das tiossemicarbazidas*

A uma solução de diferentes isotiocianato (1) (0,5 mmol), em diclorometano como solvente (10 mL), foi adicionado lentamente a hidrazina (2) (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.

4.1.1.2.2 *Procedimento geral para a síntese das tiossemicarbazonas (AP 01-11)*

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 indol e tiossemicarbazonas, cujas modificações moleculares são oriundas dos isotiocianato utilizados nesta síntese.

A uma solução de 5-metil-1*H*-indol-3-carbaldeído ou 5-metóxi-1*H*-indol-3-carbaldeído (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) (**AP 01-11**) foi então filtrado, lavado com etanol e seco em dessecador para posterior caracterização estrutural e avaliação biológica (Esquema 2).



Esquema 2. Rota sintética para obtenção das tiossemicarbazonas (AP 01-11). Reagentes e condições: (a) hidrazina, isotiocianatos substituídos, diclorometano, temperatura ambiente, 60-120 minutos; (b) tiossemicarbazidas substituídas, 5-metil-1*H*-indol-3-carbaldeído ou 5-metóxi-1*H*-indol-3-carbaldeído, etanol, ácido acético glacial (5-10 gotas), temperatura ambiente, 120 minutos.

4.2 METODOLOGIA BIOLÓGICA

4.2.1 Inóculo

As leveduras foram crescidas em meio de cultura Ágar Dextrose Sabouraud a 35°C durante 24h para as espécies de *Candida* e 48h para *Cryptococcus neoformans*. Foi retirado um inóculo das culturas e suspensos em 5,0 ml de solução salina estéril a 0,085% e colocadas em Vortex por 15 segundos. A densidade celular foi ajustada por espectrofotômetro acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância (80-90) equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 em comprimento de onda de 530nm. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^2 células por ml. A suspensão

para os testes foi obtida fazendo-se uma diluição 1/100 em salina seguida de uma diluição de 1/20 em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com MOPS.

4.2.2 Teste de Sensibilidade Antifúngica

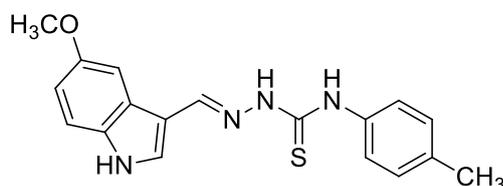
Os testes foram realizados segundo a CLSI (2002) de acordo com a norma M27-A2 no qual é um método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. Foram pesados 6,4 mg das onze moléculas sintetizadas e solubilizadas em 1,0 mL de DMSO. Em seguida, as soluções foram filtradas em filtros de 22 µm de diâmetro para que 10 µL fossem retirados e diluídos em 0,99 mL do meio RPMI 1640 com MOPS obtendo-se ao final uma diluição de 1/100 a uma concentração de 64 µg/mL e DMSO a 1%.

Placas de 96 poços de fundo chato foram previamente preenchidas com 100 µL de meio RPMI 1640 com MOPS. Após isso, 100µL da droga foi adicionado no 1° poço e então homogeneizado e retirado 100 µL para ser colocado no 2° poço de forma que uma diluição seriada de 1/2 fosse feita até o 10° poço e este último retirado e colocado no 11° poço para servir como controle. Assim as concentrações dos compostos do 1° ao 10° poço foram: 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062 µg/mL. Depois das diluições seriadas, 100 µL da suspensão de células de leveduras foi adicionado a todos os poços. O 12° poço foi usado como controle positivo do teste. Ao final as concentrações das drogas foram reduzidas novamente pela metade de modo que o 1° poço tenha uma concentração de 16µg/mL. As placas foram incubadas a 35 °C.

A leitura visual dos resultados foi realizada em 24 h para as espécies de *Candida* e 48 h para *Cryptococcus neoformans*. Os testes foram realizados em duplicata com três repetições independentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Química

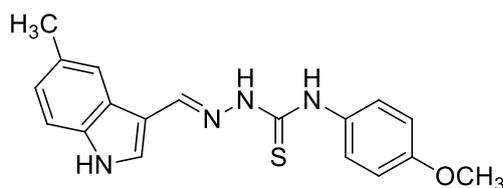
(E)-2-((5-metóxi-1H-indol-3-il)metileno)-N-(p-tolil)-tiossemicarbazona (AP-01)

$C_{17}H_{16}N_4S$. Rendimento: 47%. Faixa de fusão: 187-189° C. Rf 0,54 (*n*-hexano/acetato de etila, 1:1).

IR (KBr, cm^{-1}): 1490 (C=S), 1546 (C=N), 2938 (NH), 3110 (NH), 3212 (NH).

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): 2.42 (s, 3H, CH_3), 7.04 (d, 1H, $J=8$ Hz, CH indol), 7.32 (t, 3H, $J=8$ Hz, CH fenil), 7.55 (d, 2H, $J=8$ Hz, CH fenil), 7.73 (d, 1H, $J=8$ Hz, CH indol), 7.87 (s, 1H, CH indol), 7.96 (s, 1H, CH indol), 8.39 (s, 1H, HC=N), 9.68 (s, 1H, NH), 9.88 (s, 1H, NH), 11.60 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 21.36, 110.43, 111.61, 121.19, 124.10, 124.35, 124.66, 124.82, 128.12, 128.19, 129.38, 131.18, 135.36, 139.12, 139.23, 141.17, 181.50.

(E)-N-(4-metóxi-fenil)-2-((5-metil-1H-indol-3-il)metileno)-tiossemicarbazona (AP-02)

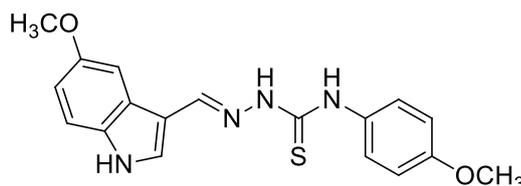
$C_{18}H_{18}N_4OS$. Rendimento: 68%. Faixa de fusão: 204-206° C. Rf 0,50 (*n*-hexano/acetato de etila, 1:1).

IR (KBr, cm^{-1}): 1509 (C=S), 1546 (C=N), 3208 (NH), 3326 (NH).

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): 2.41 (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 6.90 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, CH indol), 6.97 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, CH fenil), 7.33 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, CH indol), 7.54 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, CH fenil), 7.85 (s, 1H, CH indol), 7.96 (s, 1H, CH indol), 8.38 (s, 1H, HC=N), 9.50 (s, 1H, NH), 11.50 (s, 1H, NH), 11.55 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 21.35, 55.23, 110.50, 111.57, 113.36, 121.19, 124.14, 124.37, 126.36, 129.34, 130.97, 132.20, 135.35, 140.97, 156.61, 174.60

(E)-2-((5-metóxi-1*H*-indol-3-il)metileno)-*N*-(4-metóxi-fenil)-tiossemicarbazona (AP-03)



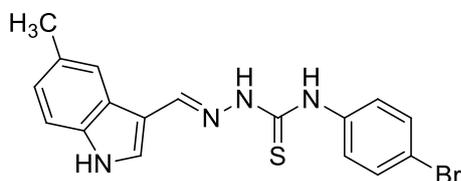
$C_{18}H_{18}N_4O_2S$. Rendimento: 67%. Faixa de fusão: 198° C. Rf 0,45 (*n*-hexano/acetato de etila, 1:1).

IR (KBr, cm^{-1}): 1509 (C=S), 1546 (C=N), 3208 (NH), 3326 (NH).

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 6.43 (dd, 1H, J = 8.8 Hz, CH indol), 6.92 (d, 2H, J = 9.2 Hz, CH fenil), 7.34 (d, 1H, J = 8.8 Hz, CH indol), 7.55 (d, 2H, J = 9.2 Hz, CH fenil), 7.66 (s, 1H, CH indol), 7.85 (s, 1H, CH indol), 8.38 (s, 1H, HC=N), 9.51 (s, 1H, NH), 11.51 (s, 1H, NH), 11.54 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 21.36, 110.43, 111.61, 121.19, 124.10, 124.35, 124.66, 124.82, 128.12, 129.38, 131.18, 135.36, 139.12, 139.23, 141.17, 181.50.

(E)-*N*-(4-bromo-fenil)-2-((5-metil-1*H*-indol-3-il)metileno)-tiossemicarbazona (AP-04)

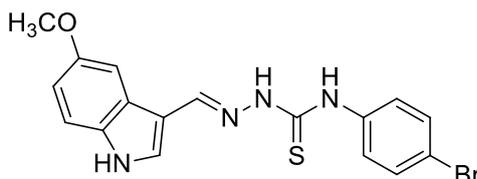


$C_{17}H_{15}BrN_4S$. Rendimento: 53%. Faixa de fusão: 201-203° C. Rf 0,48 (*n*-hexano/acetato de etila, 1:1).

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): 2.41 (s, 3H, CH₃), 7.03 (d, 1H, J = 8.4 Hz, CH indol), 7.33 (d, 1H, J = 8.4 Hz, CH indol), 7.55 (d, 2H, J = 8.4 Hz, CH fenil), 7.71 (d, 2H, J = 9.2 Hz, CH fenil), 7.87 (d, 1H, J = 2.8 Hz, CH indol), 7.96 (s, 1H, CH indol), 8.40 (s, 1H, HC=N), 9.70 (s, 1H, NH), 11.58 (s, 1H, NH), 11.67 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 21.35, 110.40, 111.59, 116.72, 121.29, 124.17, 124.36, 126.27, 129.39, 130.92, 131.25, 135.35, 138.74, 141.52, 174.01.

(E)-N-(4-bromo-fenil)-2-((5-metóxi-1H-indol-3-il)metileno)-tiossemicarbazona (AP-05)



$\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{BrN}_4\text{OS}$. Rendimento: 31%. Faixa de fusão: 180-182° C. Rf 0,44 (*n*-hexano/acetato de etila, 1:1).

IR (KBr, cm^{-1}): 1500 (C=S), 1548 (C=N), 3135 (NH), 3313 (NH).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 3.79 (s, 3H, OCH_3), 6.84 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, CH indol), 7.34 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, CH indol), 7.53 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, CH fenil), 7.66 (s, 1H, CH indol), 7.73 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, CH fenil), 7.86 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz CH indol), 8.40 (s, 1H, HC=N), 9.73 (s, 1H, NH), 11.56 (s, 1H, NH), 11.69 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 55.03, 103.53, 110.69, 112.59, 112.63, 116.53, 124.58, 125.84, 130.90, 131.69, 131.91, 138.75, 141.58, 154.49, 173.92.

Para a caracterização das moléculas foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C além de Infravermelho (IV). Como pontos característicos na elucidação estrutural dos novos derivados indol-tiossemicarbazonas através da análise do RMN ^1H , foram observados singletos referentes ao próton presente no núcleo indólico (NH) o qual apresentou deslocamento químico que variou de 11.50 a 11.58 ppm. Outro ponto importante presente nos compostos sintetizados é a presença dos prótons oriundos da formação da ligação H-C=N (imina) a partir da condensação entre as tiossemicarbazidas e os aldeídos indólicos o qual apresentou variação entre 8.38 a 8.40 ppm. Os hidrogênios NH que estão próximos a tiocarbonila também apresentaram deslocamentos característicos que variaram entre 11.54 a 11.69 e 9.50 a 9.73 ppm (Figura 1).

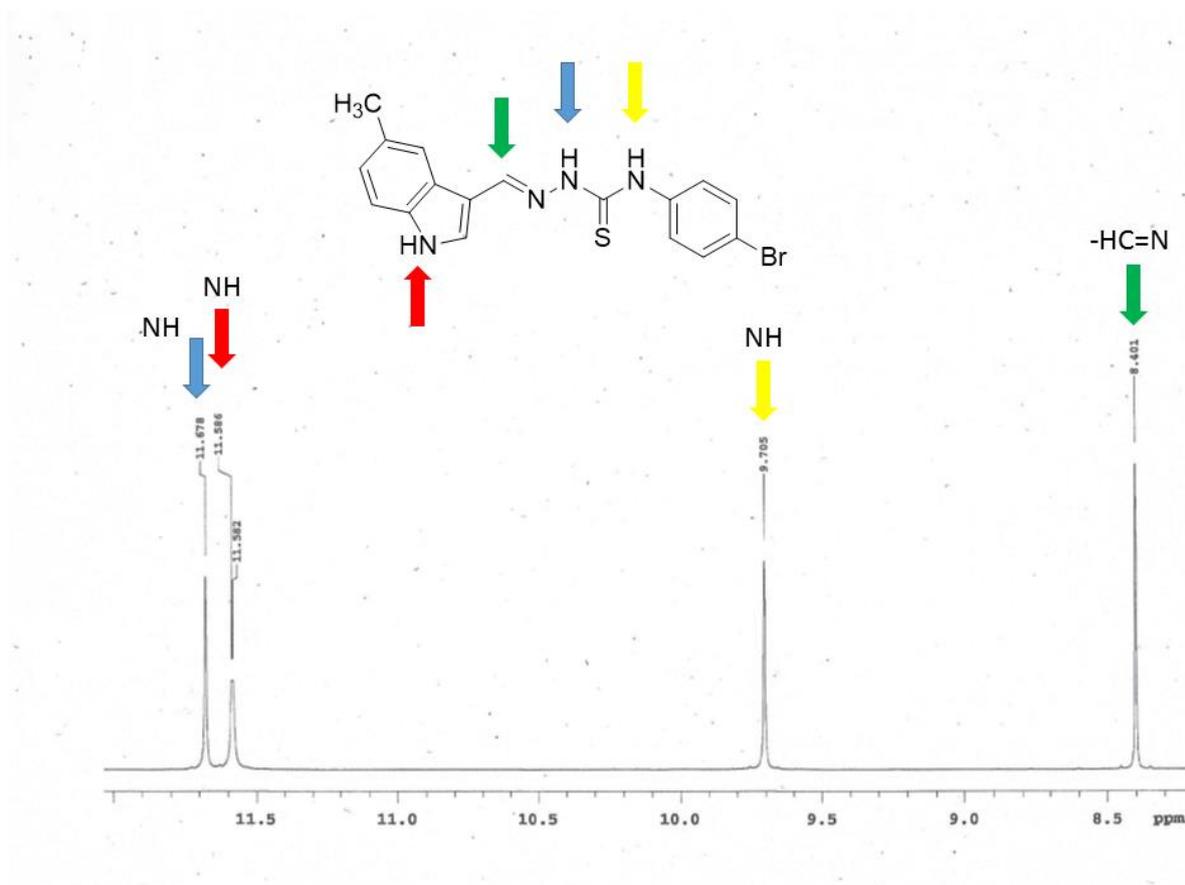


Figura 1. Exemplo de espectro de RMN ^1H do derivado indol-tiossemicarbazona AP-04 evidenciando os hidrogênios ligados ao nitrogênio e imínico presentes na molécula.

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios relativos aos grupos metil ($-\text{CH}_3$) e metóxi ($-\text{OCH}_3$) variaram entre 2.41 a 2.42 e 3.76 a 3.79, respectivamente. Além disso, em todos os espectros analisados observaram-se sinais de singlete (s), dubleto (d), tripleto (t), duplo dubleto (dd), na região característica de grupamentos aromáticos (Figura 2).

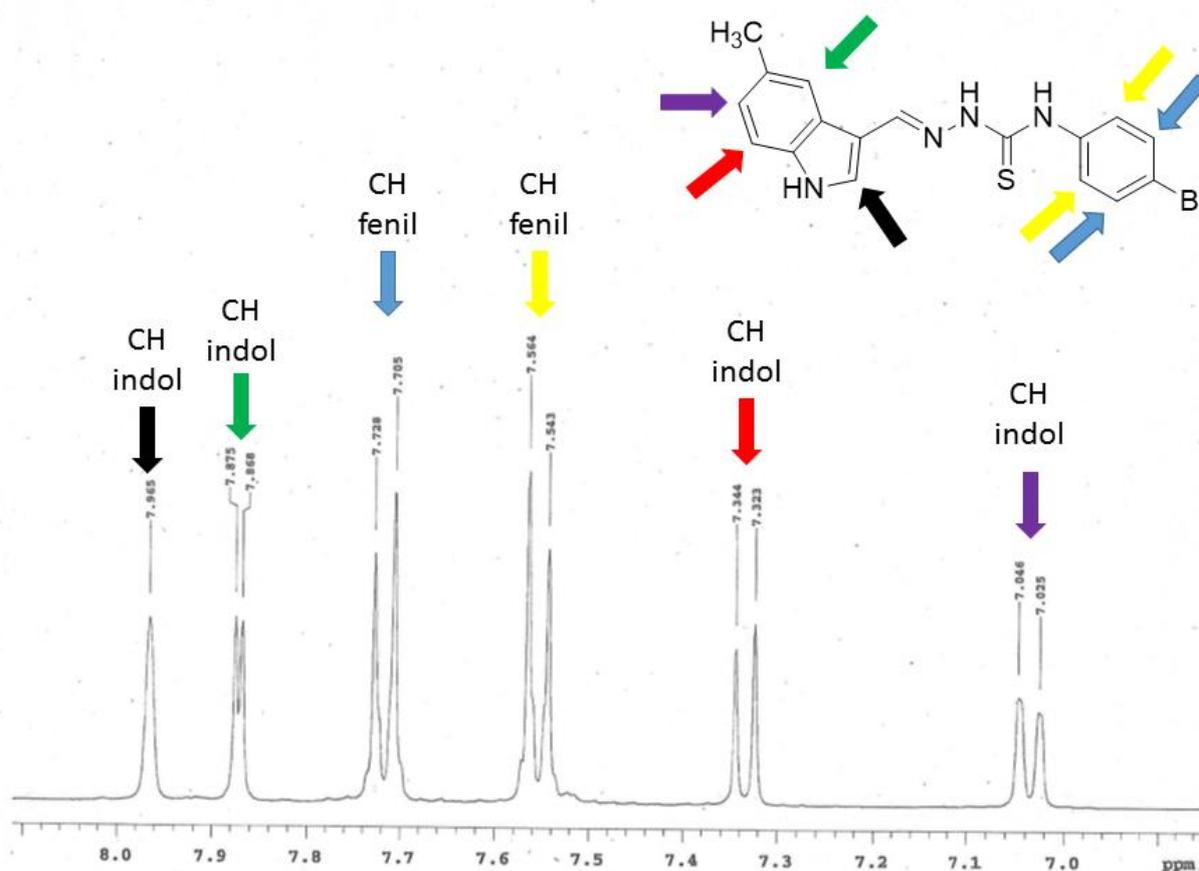


Figura 2. Espectro de RMN ^1H do derivado AP-04 evidenciando todos os hidrogênios aromáticos presentes na estrutura.

O espectro de RMN ^{13}C evidencia as absorções dos átomos de carbono característicos dos derivados indol-tiossemicarbazonas. Os deslocamentos dos carbonos referentes à tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$) da tiossemicarbazona são evidenciados nos sinais entre 173.92 a 181.50 ppm. Os deslocamentos químicos dos carbonos imínicos ($\text{C}=\text{N}$) variaram entre 140.97 a 141.58 ppm. Além disso, os grupos metil ($-\text{CH}_3$) e metóxi ($-\text{OCH}_3$) apresentaram deslocamentos 21.35 e 55.03 ppm, respectivamente (Figura 3).

A espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada como ferramenta adjunta na caracterização dos compostos sintetizados, na qual é possível evidenciar grupos funcionais característicos presentes dos compostos sintetizados. Os derivados indol-tiossemicarbazonas presentes aqui neste trabalho, apresentaram estiramentos/bandas características dos grupos funcionais N-H ($3132\text{-}3390\text{ cm}^{-1}$) e

C=N (1546-1550 cm^{-1}) além do sinal característico a funcionalidade C=S (1500-1510 cm^{-1}).

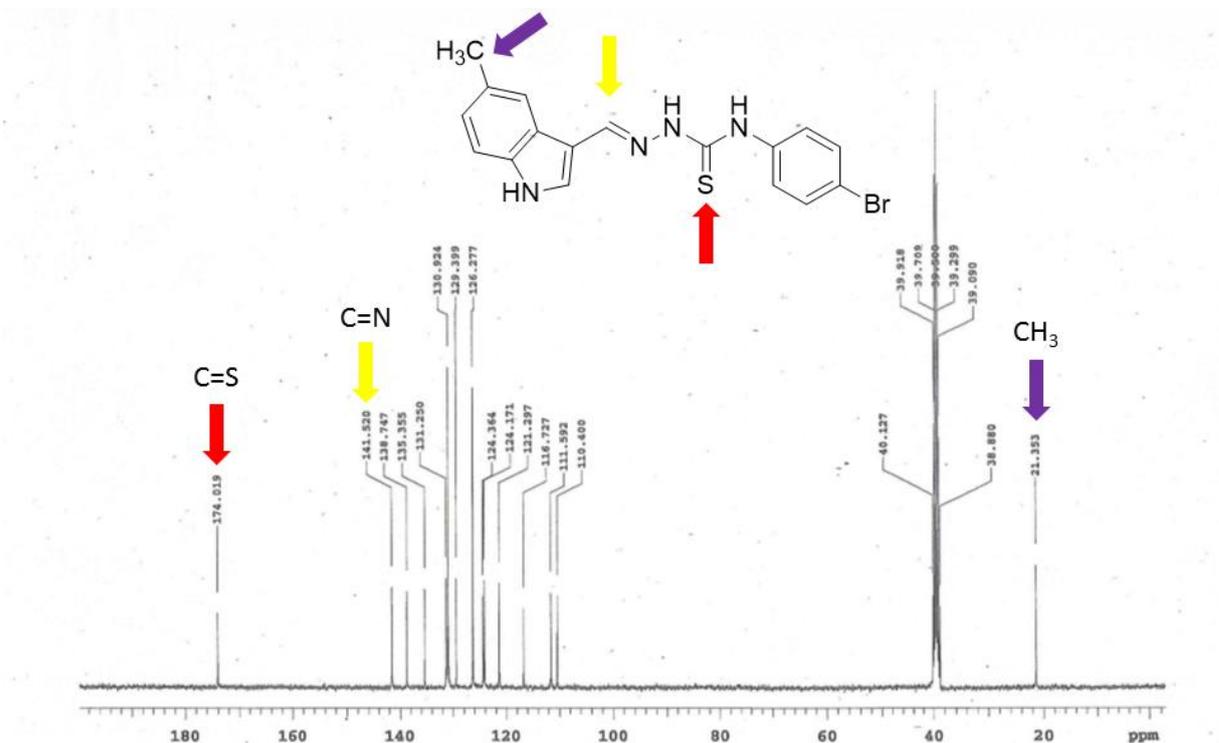


Figura 3. Espectro de RMN ^{13}C do derivado AP-04 evidenciando os principais assinalamentos da tiocarbonila, carbono imínico e metila.

5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os resultados acerca da atividade antifúngica para os derivados indol-tiossemicarbazonas estão expressos na Tabela 1 como sensibilidade antifúngica em $\mu\text{g/mL}$.

De início, podemos observar que a cepa de *Cryptococcus neoformans* URM 6898 foi a mais sensível para os 11 derivados indol-tiossemicarbazona, no qual os derivados AP-05 e AP-07 foram os que mais se destacaram apresentando valores de $\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$, sendo esses valores melhores ao apresentado pelo fluconazol (fármaco padrão) o qual foi de $\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{g/mL}$. Por outro lado, a cepa de *Candida parapsilosis* URM4970, demonstrou-se insensível aos derivados testados, onde pode ser observado ausência de atividade na máxima concentração testada (16 $\mu\text{g/mL}$).

Ao ser observado os resultados apresentados pelo derivado AP-08, pode ser constatado ausência de atividade do composto nas cepas de *Candida*, sendo a atividade do composto seletiva para a cepa de *Cryptococcus neoformans* (IC_{50} = 8 μ g/mL). A estrutura geral desse composto mostra a presença de um grupamento 1-naftil diretamente conectado a posição N^4 da tiossemicarbazona, além de um grupo metil, ligado a posição 5 do núcleo indólico (figura 4). Ambos os grupamentos ligados ao esqueleto da molécula favorecem ao aumento da lipofilicidade do composto e conseqüentemente uma maior facilidade de permear as membranas biológicas até alcançar o sítio alvo (Gillis et al., 2015). No entanto, tal fator parece não ter exercido influência positiva em relação a atividade farmacológica, pois em contraposição, o seu análogo estrutural, o derivado AP-09 que possui como única diferença a presença de um grupo metóxi (OCH_3) ligado ao indol, demonstrou uma melhor atividade frente a *Cryptococcus neoformans* (IC_{50} = 4 μ g/mL) além de apresentar atividade em todas as cepas de *Candida*. Tal fato pode ser explicado visto que o grupamento metóxi é altamente acceptor de ligações de hidrogênio o que faz com que aumente a sua hidrofiliicidade e conseqüentemente um aumento da taxa de dissolução do composto, fazendo com que ele consiga chegar ao seu local de ação mais facilmente (Altintop et al., 2015).

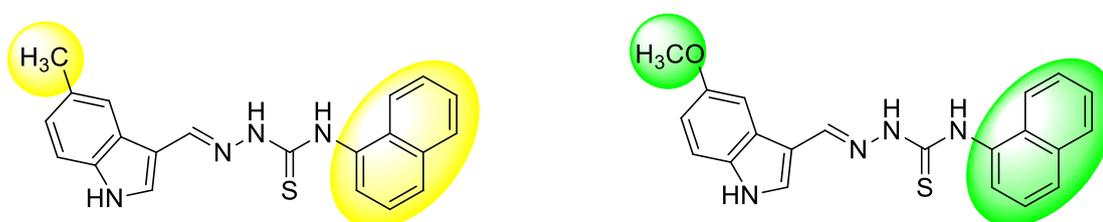


Figura 4: Estruturas gerais dos derivados indol-tiossemicarbazona AP-08 e AP-09 evidenciando o grupamento metil e metóxi ligado ao indol e o grupo 1-naftil ligado a tiossemicarbazona.

Os derivados AP-01, AP-05, AP-06, AP-09 e AP-10 apresentaram valores de IC_{50} de 4, 4, 4, 4 e 2 μ g/mL, respectivamente para a cepa de *Candida albicans* ATCC, sendo esses valores todos melhores que um dos fármacos padrão utilizados no experimento, o cetoconazol o qual apresentou IC_{50} 8 μ g/mL. Para a cepa de *Candida krusei*, apenas o derivado AP-11 conseguiu resultados mais expressivos na

inibição do crescimento desse fungo, apresentando $IC_{50} = 4 \mu\text{g/mL}$, sendo esse valor muito semelhante ao apresentado pelo cetoconazol ($IC_{50} = 2 \mu\text{g/mL}$).

A variação estrutural encontrada nos compostos avaliados permitiu uma diversidade de resultados apresentadas. O núcleo indol possui duas substituições (metil e metóxi). Já na posição N^4 da tiossemicarbazona, os substituintes utilizados foram fenil, 4-bromo-fenil, 4-cloro-fenil, 4-metóxi-fenil, 1-naftil e alil. De uma maneira geral, a presença de um grupo mais lipofílico de um lado da molécula e de um grupo hidrofílico na outra porção, parece ter exercido melhor influência em relação aos achados na atividade biológica, como apresentado nos derivados AP-05 (indol: 5-metóxi; TSC: 4-bromo-fenil) e AP-07 (indol: 5-metóxi; TSC: alil) (Figura 5)

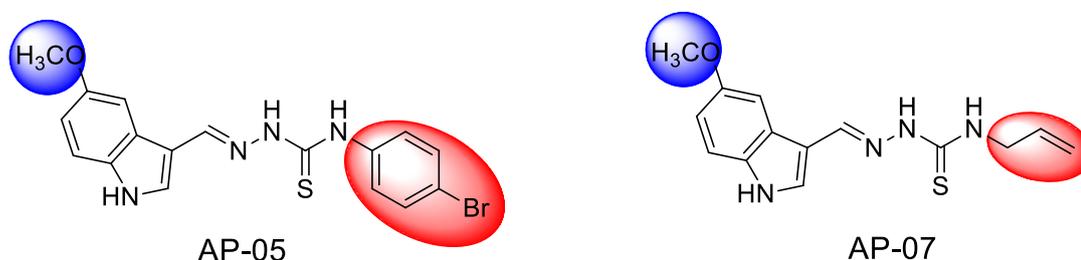


Figura 5: Grupos hidrofílicos assinalados em azul e grupos hidrofóbicos assinalados em vermelho.

O derivado AP-06 possui como substituição no indol a porção 5-metil e na posição N^4 da tiossemicarbazona, a substituição alil (Figura 6). Ambas as substituições conferem um maior caráter lipofílico ao composto. Isso repercutiu negativamente na atividade antifúngica onde o composto apresentou $IC_{50} = 16 \mu\text{g/mL}$ para a cepa de *Cryptococcus neoformans*. Dessa maneira, pode-se inferir que um equilíbrio hidro-lipofílico nos compostos parece exercer fundamental importância no desenvolvimento da atividade biológica, uma vez que um caráter hidrofílico é necessário para promover uma maior taxa de dissolução do composto. Já o caráter lipofílico, é fundamental para o composto chegar até o seu local de ação.

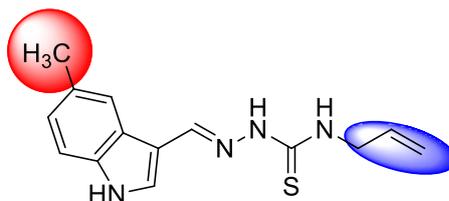


Figura 6: Estrutura do derivado AP-06 evidenciando a presença de dois grupos hidrofóbicos.

Tabela 1. Teste de sensibilidade antifúngica realizada com os derivados da série indol-tiossemicarbazona.

Sensibilidade Antifúngica (IC ₅₀ - µg/mL)					
Compostos	<i>Candida albicans</i> ATCC	<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Candida krusei</i> ATCC	<i>Cryptococcus neoformans</i> URM 6898
		URM4970	URM7048		
AP-01	4,0	-	4,0	-	4,0
AP-02	-	-	4,0	-	2,0
AP-03	-	-	-	-	2,0
AP-04	-	-	4,0	-	8,0
AP-05	4,0	-	-	-	1,0
AP-06	4,0	-	-	-	16,0
AP-07	-	-	-	8,0	1,0
AP-08	-	-	-	-	8,0
AP-09	4,0	-	4,0	8,0	4,0
AP-10	2,0	-	2,0	8,0	4,0
AP-11	-	-	8,0	4,0	2,0
CET	16,0	0,06	0,06	2,0	0,06
FLC	NT	8.0	4.0	NT	2.0
ITC	NT	0.125	0.125	NT	NT
AMB	0.06	0.06	0.06	0.06	0.03

Todos esses valores são IC₅₀ e não MIC. Os traços indicam que não houve atividade nas concentrações testadas. CET: cetoconazol, FLC: fluconazol, ITC: itraconazol, AMB: anfotericina B.

A avaliação da atividade antifúngica revelou para os derivados indol-tiossemicarbazonas que a presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos promovem um aumento da atividade biológica, quando comparados com duas substituições hidrofóbicas que diminuem a atividade antifúngica.



TERCEIRO CAPÍTULO

ARTIGO A SER SUBMETIDO

5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE TIOSEMICARBAZONAS E TIAZOLIDINONAS DERIVADAS DE 1,3-BENZODIOXOL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA E ESTUDO DOCKING

RESUMO

Neste trabalho houve a síntese de uma série de derivados benzodioxol (3a-g e 4a-b), os quais foram realizados testes de suas atividades biológicas para avaliar seu potencial terapêutico contra os parasitas (*Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*). Os compostos foram sintetizados, caracterizados e depois testados quanto à atividade contra *T. cruzi* em formas epimastigotas e tripomastigotas e contra formas promastigotas de *L. amazonensis*. Verificou-se que a maioria dos compostos não apresentavam toxicidade em culturas de células de baço. Em relação à atividade tripanocida, o composto 3c apresentou um elevado nível de atividade contra formas epimastigotas e tripomastigotas (IC₅₀ = 1,48 e 3,89 µM, respectivamente). Verificou-se que os compostos 3a, 3f e 3g tinham um elevado nível de atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀ = 1,57, 0,79 e 1,61 µM, respectivamente). No caso de ação contra *L. amazonensis*, o composto 3d proporcionou um resultado promissor com IC₅₀ = 1,09 µM. Para avaliar o modo de interação dos compostos 3a e 3g frente de cruzaina, foram realizados estudo Docking. Os resultados demonstraram que as interações hidrofóbicas e especialmente dois locais de interação hidrofílicos (ligações de hidrogênio com os resíduos ASP161 e MET68) são importantes para a alta estabilidade do complexo formado entre o composto 3g e o alvo de cruzaina. Por conseguinte, são necessárias outras avaliações, tais como a avaliação *in vivo* e protocolos experimentais para determinar o mecanismo de ação destes compostos.

Palavras-chave: Benzodioxol. Tiossemicarbazona. Tiazolidinona. Doença de Chagas. Leishmaniose. Antiproliferativa.

ABSTRACT

In this work a serie of benzodioxole derivatives was synthesized and tested your biological activity (**3a-g** and **4a-b**) in order to assess their therapeutic potential against the parasites (*Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*). The compounds were synthesized, characterized and then tested for activity against *T. cruzi* in epimastigote and trypomastigote forms and against promastigotes forms of *L. amazonensis*. Most of the compounds were found to be non-toxic in spleen-cell cultures. With regard to trypanocidal activity, compound **3c** exhibited a high level of activity against epimastigote and trypomastigote forms (IC_{50} = 1.48 and 3.89 μ M, respectively). The compounds **3a**, **3f** and **3g** was found to have a high level of activity against trypomastigote forms of *T. cruzi* (IC_{50} = 1.57, 0.79 and 1.61 μ M, respectively). In the case of action against *L. amazonensis*, compound **3d** provided a promising result with IC_{50} = 1.09 μ M. In order to evaluate the interaction mode of the compounds **3a** and **3g** front of cruzaina, docking studies were performed. The results showed that hydrophobic interactions and especially two hydrophilic interaction sites (hydrogen bonds with the residues ASP161 and MET68) are important for the high stability of the complex formed between the compound **3g** and cruzaina target. Therefore, further evaluations, such as *in vivo* assessment and experimental protocols are required to determine the mechanism of action of these compounds.

Keywords: Benzodioxole. Thiosemicarbazone. Thiazolidinone. Chagas disease. Leishmaniasis. Antiproliferative.

5.1 INTRODUÇÃO

Os compostos contendo o grupo benzodioxol exibem uma ampla gama de atividade biológica de interesse em química medicinal (El-Behairy et al., 2015, Brito et al., 2010; Romeiro et al., 2011). A doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas no mundo (Rassi Jr et al, 2010). O único fármaco em uso é o Benznidazol (LAFEPE, Brasil), que não é eficaz em pacientes que evoluíram para a fase crônica (Urbina, 2009; Machado et al, 2012). Além disso, o benznidazol provoca efeitos colaterais graves, levando à interrupção do tratamento em um número significativo de pacientes (Pinazo, 2010). Assim, há uma necessidade de identificar novos fármacos para o seu tratamento.

Leishmanioses é um grupo de doenças causadas por muitas espécies de *Leishmania* (Kevric et al, 2015). O tratamento de primeira linha para a leishmaniose baseia-se principalmente no uso de antimoniais pentavalentes, isotionato de pentamidina, anfotericina B ou miltefosina (de Menezes et al, 2015). Apesar dessas opções, o tratamento não é ideal devido aos estreitos índices de seletividade desses fármacos (de Menezes et al, 2015).

Para abordar a descoberta de fármacos contra *T. cruzi* e *Leishmania*, uma série de alvos moleculares drogas foram investigados. Exemplos de tais alvos são a lanosterol 14 alfa-desmetilase (Buckner e Urbina 2012), a tripanotiona redutase (Lantwin et al., 1994) e as cisteína proteases (Engel et al., 1998; Selzer et al, 1999). A Cruzaína, a principal protease de cisteína tripanosomal, está envolvida durante a invasão, diferenciação e proliferação de parasitas em células hospedeiras (Selzer et al., 1999; Doyle et al, 2007). Esta enzima é responsável pela degradação das proteínas das células hospedeiras e, assim, participa do resultado da infecção (Duschak et al, 2001). Na identificação de inibidores de cruzaína, a maioria dos trabalhos foram realizadas por peptídeos e compostos semelhantes a peptídeos, tais como ureias (Du et al, 2000), hidrazonas (Doyle et al, 2007) e tiosemicarbazonas (Du et al, 2000, Greenbaum et al, 2004, Siles et al., 2006). De fato, as tiosemicarbazonas foram consideradas uma classe de anti-T Cruzi potente e seletiva na inibição da atividade da cruzaína (Lozano et al, 2012, Porcal et al., 2008; Caputto et al, 2011; Blau et al., 2013).

De fato, o benzodioxol é um grupo químico que confere uma boa lipofilicidade na concepção de fármacos e, assim, foi aplicado em muitos casos de desenvolvimento de fármacos (Kümmerle et al., 2012; Com base nestes achados, criou-se a hipótese que o uso da síntese de derivados de benzodioxol produziria compostos antiparasitário e antiproliferativo. Neste trabalho, há o relato da síntese e caracterização espectroscópica de tiosemicarbazonas e tiazolidinonas derivadas de benzodioxol, avaliação do efeito anti-T. *Cruzi*, anti-*L. Amazonenses* frente a cruzaina para os compostos (3a-g, 4a-b).

5.2. PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1 Química

Os espectros de IV foram registados em pellets de brometo de potássio com um espectrofotômetro Bruker IFS-66 IR (Bruker, EUA). Os espectros de RMN de ¹H foram registados a 400 MHz num espectrômetro Varian 400-MR. Os espectros de RMN ¹³C foram registados a 100 MHz num espectrômetro Varian, USA 400-MR com tetrametilsilano como padrão interno e DMSO-d₆ como solvente. Utilizou-se gel de sílica 60-N (esférico e neutro, 100-210 m, 37560-79), fornecido por Kanto Chemical Co, para cromatografia em coluna. Todos os pontos de fusão foram medidos em um aparelho Quimis-340.27 (Quimis, Diadema, SP, Brasil).

5.2.2 Síntese e caracterização de benzo[*d*][1,3]dioxol-5-carbaldeído (5)

Adicionou-se gota a gota uma solução de 3,4-dihidroxibenzaldeído (5 g, 0,011 mol) em DMF (150 mL) a uma suspensão de CH₂Br₂ (31,4 mL, 16,7 mols) e K₂CO₃ (10 g, 0,0362 mol) em DMF 30 mL) de acordo com o protocolo de Wang et al. (2010) (Wang et al, 2010) com pequenas modificações. A mistura foi agitada e aquecida a refluxo durante 24 horas, depois arrefecida e filtrada. O filtrado foi concentrado, diluído com água e extraído com acetato de etilo (3 x 100 mL). A fase orgânica foi lavada com NaOH a 10% (25 mL), água (25 mL), seca (Na₂SO₄) e evaporada para dar 2 g (38%) como um óleo amarelo. O aldeído também foi obtido a partir do álcool piperonílico otimizado (Tojo e Fernández 2006). A reação consiste na oxidação de

álcool (1g, 0,0065 mol) com 15 equivalentes de óxido de manganês IV (8,55 g) em diclorometano seco (15 mL) durante 2 horas a 25 ° C. Após 2 horas, o filtrado obtido foi rotaevaporado e levada ao congelador obtendo-se um precipitado cristalino com um rendimento de 85%. O benzo [d] [1,3] dioxol-4-carbaldeído foi obtido comercialmente.

5.2.3 Síntese e caracterização de tiosemicarbazonas (3a-g)

Em seguida adicionou-se ácido acético glacial (1,5 mL) a uma solução de benzo [d] [1,3] dioxole-4-carbaldeído ou benzo [d] [1,3] dioxole-5-carbaldeído (0,5 g, 0,0043 mol) e as N-aril-tiosemicarbazidas apropriadas (0,0043 mol) em etanol absoluto (40 mL). A reação de condensação foi agitada sob refluxo durante o tempo apropriado (controlado por CCD). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida para dar o respectivo produto em bruto. Após secagem, o produto foi recristalizado a partir de tolueno (Oliveira et al, 2015).

5.2.3.1 2- (Benzo [d] [1,3] dioxol-4-ilmetileno) -N-fenil-tiosemicarbazona (3a)

Obteve-se o composto 3a sob a forma de um pó branco (63%): R_f = 0,55 (n-Hex / AcOEt 8: 2); P_f: 192-193 ° C; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 12,00 (1H, s, NH); 10,12 (1H, s, NH); 8,26 (1H, s, -CH =); 7,71 (1H, d, Ar, J = 8 Hz); 7,61 (3H, m, Ar); 7,42 (2H, d, Ar, J = 8,8 Hz); 6,95 (1H, d, Ar, J = 8,8 Hz); 6,86 (1H, t, Ar, J = 8 Hz); 6,11 (2H, s) ppm; ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 101,54 (1C, CH₂); 121,37 (1C, Ar), 121,57 (1C, Ar), 125,3 (2C, Ar), 128 (2C, Ar), 136,2 (1C, Ar) (1C, Ar), 138,9 (1C, Ar), 146,53 (1C, Ar), 147,56 (1C, C = N), 175,86 (1C, C = S) ppm; IV (KBr, cm⁻¹) 3307 (NH); 1543 (C = N); 1511 (C = S). HRMS m / z [M + H]⁺ + calcd para C₁₅H₁₃N₃O₂S: 300,07; Encontrado: 300,04.

5.2.3.2 2-(Benzo [d] [1,3] dioxol-4-ilmetileno) -N- (4-clorofenil) -tiossemicarbazona (3b)

Obteve-se o composto 3b sob a forma de um pó branco (50%): R_f = 0,60 (n-Hex / AcOEt 8: 2); P_f: 220-221 ° C; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 12,01 (1H,

s, NH); 10,12 (1H, s, NH); 8,26 (1H, s, -CH =); 7,7 (1H, d, Ar, J = 8 Hz); 7,61 (2H, d, Ar, J = 6,4 Hz); 7,4 (2H, d, Ar, J = 6,4 Hz); 6,94 (1H, d, Ar, J = 7,6 Hz); 6,87 (1H, t, Ar, J = 8 Hz); 6,11 (2H, s) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 101,547 (1C, CH₂); (1C, Ar), 121, 57 (1C, Ar), 121,57 (1C, Ar), 127,31 (2C, Ar), 127,94 (2C, Ar), 129,30 (1C, Ar), 136,54 (1C, Ar), 146,63 (1C, Ar), 147,58 (1C, C = N), 175,87 (1C, C = S) ppm. IR (KBr, cm⁻¹) 3310 (NH); 1541 (C = N); 1506 (C = S). HRMS m / z [M + H] + calcd para C₁₅H₁₂CIN₃O₂S: 334,03; Encontrado: 334,08.

5.2.3.3 2- (benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno) -N- (naftalen-1-il) -tiossemicarbazona (3c)

Obteve-se o composto 3c sob a forma de um pó branco (42%): R_f = 0,62 (n-Hex / AcOEt 8: 2); P_f: 213-214 ° C; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 11,8 (1H, s, NH); 10,3 (1H, s, NH); 8, 12 (1H, s, -CH =); 7,8 (3H, m, Ar); 7,5 (4H, m, Ar); 6,96 (1H, d, Ar, J = 8 Hz); 7,1 (1H, d, Ar, J = 8 Hz); 7,9 (1H, s, Ar); 6,06 (2H, d, CH₂) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 101,4 (1C, CH₂); 105,5 (1C, Ar), 125,9 (1C, Ar), 125,9 (1C, Ar), 126,5 (1C, Ar), 124,4 (1C, Ar), 130,6 (1C, Ar), 133,6 (1C, Ar), 135,7 (1C, Ar), 142,3 (1C, Ar) 1C, Ar), 148,04 (1C, Ar), 148,9 (1C, C = N), 177,6 (1C, C = S). IR (KBr, cm⁻¹) 3310,3 (NH); 1550 (C = N); 1499 (C = S). HRMS m / z [M + H] + calcd para C₁₉H₁₅N₃O₂S: 350,09; Encontrado: 350,20.

5.2.3.4 2- (benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno) -N- (4-corofenil) -tiossemicarbazona (3d)

Obteve-se o composto 3d sob a forma de um pó branco (35%): R_f = 0,60 (n-Hex / AcOEt 8: 2); P_f 169-171 ° C; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 11,8 (1H, s, NH); 10,1 (1H, s, NH); 8,06 (1H, s, -CH =); 7,4 (2H, d, Ar, J = 8,8 Hz); 7,6 (2H, d, Ar, J = 8,8 Hz); 6,94 (1H, d, Ar, J = 7,6 Hz) 7,1 (1H, d, Ar, J = 6,8 Hz); 7,8 (1H, s, Ar); 6,0 (2H, d, CH₂) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 101,6 (1C, CH₂); (1C, Ar), 121, 57 (1C, Ar), 121,57 (1C, Ar), 127,31 (2C, Ar), 127,94 (2C, Ar), 129,30 (1C, Ar), 136,54 (1C, Ar), 146,63 (1C, Ar), 155,9 (1C, C = N), 175,9 (1C, C = S) ppm. IR (KBr, cm⁻¹) 3294,2 (NH); 1548 (C = N); 1497 (C = S). HRMS m / z [M + H] + calcd para C₁₅H₁₂CIN₃O₂S: 334,03; Encontrado: 334,08.

5.2.3.5 2-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno) -N-fenil-tiosemicarbazona (3e)

Obteve-se o composto 3e sob a forma de um pó branco (54%): Rf = 0,55 (n-Hex / AcOEt 8: 2); Pf: 185-187 ° C; RMN de 1H (400 MHz, DMSO-d6): δ 11,7 (1H, s, NH); 10,08 (1H, s, NH); 8,06 (1H, s, -CH =); 7,2 (1H, d, Ar, J = 7,2 Hz); 7,54 (1H, d, Ar, J = 7,6 Hz); 7,36 (3H, m, Ar); 6,91 (1H, d, Ar, J = 7,6 Hz); 7,3 (1H, d, Ar, J = 7,6 Hz); 7,8 (1H, s, Ar); 6,07 (2H, d, CH2) ppm. 13C RMN (DMSO): δ 101,6 (1C, CH2); 105,7 (1C, Ar), 108,2 (1C, Ar), 116,9 (1C, Ar), 121,1 (1C, Ar), 124,4 (1C, Ar), 125,4 (1C, Ar), 129,09 (1C, Ar), 146,63 (1C, Ar), 149,1 (1C, Ar) 155,8 (1C, C = N), 175,9 (1C, C = S) ppm. IV (KBr, cm⁻¹) 3303,8 (NH); 1550 (C = N); 1499 (C = S). HRMS m / z [M + H]⁺ calcd para C₁₅H₁₃N₃O₂S: 300,07; Encontrado: 300,12.)

5.2.3.6 2-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno-N-fenetil-tiosemicarbazona (3f)

O composto 3f foi obtido como um pó branco (72%): Rf = 0,63 (n-Hex / AcOEt 8: 2); Pf: 257-258 ° C; RMN de 1H (400 MHz, DMSO-d6): δ 11,4 (1H, s, NH); 8,55 (1H, s, NH); 7,9 (1H s, -CH =); 7,59 (1H, s, Ar); 7,3 (1H, d, Ar, J = 7,6 Hz); 7,22 (3H, m, Ar); 7,08 (1H, d, Ar, J = 6,8 Hz); 7,06 (1H, d, Ar, J = 6,8 Hz); 6,94 (1H, d, Ar, J = 7,6 Hz); 6,08 (2H, d, CH2); 3,89 (2H, m, CH2); 2,89 (2H, m, CH2); Ppm. 13C RMN (100 MHz, DMSO-d6): δ 45,32 (1C, CH2); 35,3 (1C, CH2); 101,8 (1C, CH2); 105,7 (1C, Ar); 108,5 (1C, Ar); 124,1 (1C, Ar); 126,5 (1C, Ar); 128,8 (1C, Ar); 128,9 (2C, Ar); 129,08 (2C, Ar); 139,6 (1C, Ar); 141,9 (1C, Ar); 148,3 (1C, Ar); 149,2 (1C, C = N); 177,1 (1C, C = O) ppm. IV (KBr, cm⁻¹) 3336 (NH); 1540 (C = N); 1448 (C = S). HRMS m / z [M + H]⁺ calcd para C₁₇H₁₇N₃O₂S: 328,10; Encontrado: 328,12.

5.2.3.7 2-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno) -N- (4-metoxifenil) tiosemicarbazona (3g)

Obteve-se o composto 3g sob a forma de um pó branco (60%): Rf = 0,50 (n-Hex / AcOEt 8: 2); Pf: 175-177 ° C; RMN de 1H (400 MHz, DMSO-d6): δ 11,6 (1H, s, NH); 10,0 (1H, s, NH); 8,04 (1H, s, -CH =); 7,38 (2H, d, Ar, J = 8,8 Hz); 7,13 (2H, d, Ar, J = 9,2 Hz); 7,11 (1H, d, Ar, J = 8 Hz); 6,93 (1H, d, Ar, J = 8 Hz); 7,8 (1H, s, Ar);

6,06 (2H, s, CH₂); 3,34 (3H, s, CH₃) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 55,2 (1C, CH₃); 101,4 (1C, CH₂); 105,5 (1C, Ar); 108,1 (1C, Ar); 113,1 (1C, Ar) 124,2 (1C, Ar); 127,7 (1C, Ar); 128,6 (2C, Ar); 132 (1C, Ar); 142,3 (1C, Ar); 148,05 (2C, Ar); 148,9 (1C, Ar); 156,9 (1C, C = N); 176,1 (1C, C = S) ppm. IR (KBr, cm⁻¹) 3316,7 (NH); 1542 (C = N); 1499 (C = S). HRMS m / z [M + H]⁺ + calcd para C₁₆H₁₅N₃O₃S: 330,08; Encontrado: 330,12.

5.2.4 Síntese e caracterização de 4-tiazolidinonas (4a-b)

Em seguida adicionou-se 0,0017 mols do intermediário condensado necessário, 0,0019 mols de cloroacetato de etilo (1,1 eq.), 0,0069 mols de acetato de sódio anidro (4 eq.) e 25 mL de etanol num balão. A mistura foi agitada sob as mesmas condições à temperatura de refluxo até à conclusão da reação (18-96 h, monitorização por CCD). Após a finalização, a solução final foi esfriada a temperatura ambiente, e subsequentemente banho de gelo. Após secagem, o produto foi recristalizado a partir de tolueno (Benmohammed et al., 2014).

5.2.4.1 2- Benzo [d] [1,3] dioxol-4-ilmetileno-hidrazono) -3- (4-Bromofenil) tiazolidin-4-ona (4a)

Obteve-se o composto 4a sob a forma de um pó branco (75%): R_f = 0,60 (n-Hex / AcOEt 8: 2); P_f: 239-240 ° C; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,24 (1H, s, -CH =); 7,57 (2H, d, Ar, J₃ = 12 Hz); 7,42 (2H, d, Ar, J = 12 Hz); 7,25 (1H, d, Ar, J = 10 Hz); 7,0 (1H, d, Ar, J = 10 Hz); 6,8 (1H, t, Ar, 10 Hz); 6,09 (2H, s, CH₂); 4,08 (2H, s, CH₂) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 32,3 (1C, CH₂); 101,6 (1C, CH₂); (1C, Ar), 121, 57 (1C, Ar), 121,57 (1C, Ar), 127,31 (2C, Ar), 127,94 (2C, Ar), 129,30 (1C, Ar), 136,54 (1C, Ar), 146,63 (1C, Ar), 155,9 (1C, Ar), 175,9 (1C, C = O) ppm. IR (KBr, cm⁻¹) 1592 (C = N); 1543 (C = O). HRMS m / z [M + H]⁺ + calcd para C₁₇H₁₂BrN₃O₃S: 417,98; Encontrado: 417,97.

5.2.4.2 2- Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetileno-hidrazono) -3- (4-clorofenil) tiazolidin-4-ona (4b)

Obteve-se o composto 4b sob a forma de um pó branco (45%): Rf = 0,60 (n-Hex / AcOEt 8: 2); Pf: 248-249 ° C; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,22 (1H, s, -CH =); 7,57 (2H, d, Ar, J = 8 Hz); 7,44 (2H, d, Ar, J = 8 Hz); 7,28 (1H, s, Ar); 7,22 (1H, d, Ar, J = 8 Hz); 6,97 (1H, d, Ar, 8 Hz); 6,08 (2H, s, CH₂); 4,08 (2H, s, CH₂) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 32,3 (1C, CH₂); 101,65 (1C, CH₂); 105,6 (1C, Ar), 108,5 (1C, Ar), 124,2 (1C, Ar), 128,3 (1C, Ar), 129,1 (1C, Ar), 130,1 (2C, Ar), 133,2 (2C, Ar) (1C, Ar), 149,7 (1C, Ar), 149,7 (1C, Ar), 146,63 (1C, Ar), 149,7 (1C, C = N), 171,8 (1C, C = O). IV (KBr, cm⁻¹) 1590 (C = N); 1540 (C = O). HRMS m / z [M + H]⁺ calcd para C₁₇H₁₂N₃O₃S: 374,03; Encontrado: 374,07.

5.2.5 Citotoxicidade em esplenócitos de camundongos

Os esplenócitos de camundongos BALB / c foram semeados a 5x 10⁶ células / poço numa placa de 96 poços. Os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio RPMI-1640 numa diluição em série (1,23, 3,7, 33,33 e 100 células / mL) e adicionados aos respectivos poços, em triplicata. A concentração final de DMSO foi de 1%. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 ° C e 5% de CO₂. Depois, adicionou-se 1,0 µCi de 3H-timidina (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), incubou-se e recolheu-se as células e depois transferiu-se para um contador de cintilador líquido (WALLAC 1209, Rackbeta Pharmacia, Estocolmo, Suécia) e a percentagem de 3H -timidina. A maior concentração não citotóxica (HNC) foi determinada para cada composto (Santiago et al, 2014).

5.2.6 Atividade anti-Trypanosoma cruzi (epimastigotas)

Os epimastigotas (Dm28c) em meio LIT foram contados num hemocítmetro e depois semeados a 10⁶ células / poço numa placa de 96 poços. Os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio LIT numa diluição em série (1,23, 3,70, 11,11, 33,33 e 100 µg / mL) e adicionados aos respectivos poços, em triplicado. A concentração final de DMSO na placa foi de 1%. A placa foi incubada

durante 5 dias a 26 ° C, foram recolhidas alíquotas de cada poço e o número de parasitas viáveis foi contado numa câmara de Neubauer e comparado com cultura de parasita não tratada. A concentração inibitória para 50% (IC50) foi calculada usando a regressão não linear no software Prism 4.0 GraphPad. Benznidazol e nifurtimox foram utilizados como fármacos de referência (Zingales et al, 2009).

5.2.7 Atividade anti-Trypanosoma cruzi (tripomastigotas)

As tripomastigotas metacíclicas foram recolhidas a partir do sobrenadante de células LLC-MK2 infectadas e depois semeadas a 4×10^5 células / poço em meio RPMI-1640. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e depois diluídos em meio RPMI-1640 numa diluição em série (1,23, 3,70, 11,11, 33,33 e 100 ug / mL) e adicionados aos respectivos poços, em triplicata. A concentração final de DMSO foi de 1%. A placa foi incubada durante 24 h a 37 ° C e 5% de CO₂. Foram recolhidas alíquotas de cada poço, e o número de parasitas viáveis foi contado numa câmara de Neubauer. A percentagem de inibição foi calculada em relação às culturas não tratadas. A concentração citotóxica para o cálculo de 50% (CC50) também foi realizada usando regressão não linear com o software Prism 4.0 GraphPad. Benznidazol e nifurtimox foram utilizados como fármacos de referência (Zingales et al, 2009).

5.2.8 Atividade biológica em promastigotas de *L. amazonensis*

Os promastigotas de *Leishmania amazonensis* (estirpe WHOM / 00 LTB 0016) foram mantidos a 26 ° C em meio de Schneider suplementado com 10% de soro bovino fetal. Parasitas na fase de crescimento exponencial foram utilizados em todas os experimentos. Os parasitas (10^6 células / mL) foram incubados a 26 ° C na presença de diferentes concentrações destes compostos (0,19 a 100 µg / mL) durante 96 h. Parasitas apenas incubadas com meio de cultura e anfotericina B foram utilizadas como controlo negativo e positivo, respectivamente. A incubação também foi realizada com a mesma gama de concentração de DMSO (0,01 a 1%) presente na diluição dos compostos. O crescimento celular foi mensurado através de IC50 / 96h determinado por análise de regressão. As concentrações utilizadas para

a determinação de IC50 (concentração capaz de inibir 50% de crescimento de parasitas) foram: 0:19, 1:56, 6:25, 25 e 100 µg / mL. Cada ensaio foi realizado em triplicata (Zingales et al, 2009).

5.2.9 Estudo docking

Todas as estruturas moleculares foram otimizadas pela aplicação da abordagem semi-empírica RM1 (Rocha et al, 2006), disponível como parte do programa SPARTAN 08 [Spartan "08 Tutorial and User's Guide: Wavefunction, 2008], utilizando configurações padrão internas para critérios de convergência. A estrutura-alvo (Brak et al., 2010) para o cálculo e análise de ancoragem foi a cruzaina de *T. cruzi*, disponível no RCSB Protein Data Bank (PDB ID: 3IUT), que é composta como um complexo com um inibidor co-cristalizado, Como "KB2". O local de ligação foi definido como todos os átomos dentro de um raio de 6,0 Å a partir do ligando co-cristalizado. Os resíduos GLN19, CYS25, SER61, LEU67, MET68, ASN70, ASP161, HIS162 e TRP184 foram tratados como flexíveis durante os cálculos, de modo a ter em conta alguns efeitos de ajuste induzidos. O programa GOLD 5.2 (GOLD Suite, CCDC, <http://www.ccdc.cam.ac.uk>) foi utilizado para o cálculo do docking, seguido do programa BINANA (Durrant e McCammon, 2011), que foi utilizado para a análise de As interações moleculares, particularmente para as melhores soluções de Docking obtidas em cada caso. Uma configuração padrão foi usada durante a análise, exceto para a distância da ligação H, que foi alterada para um máximo de 3,5 Å. Todas as figuras foram produzidas com o software Pymol [The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.3, Schrödinger, LLC, 2002].

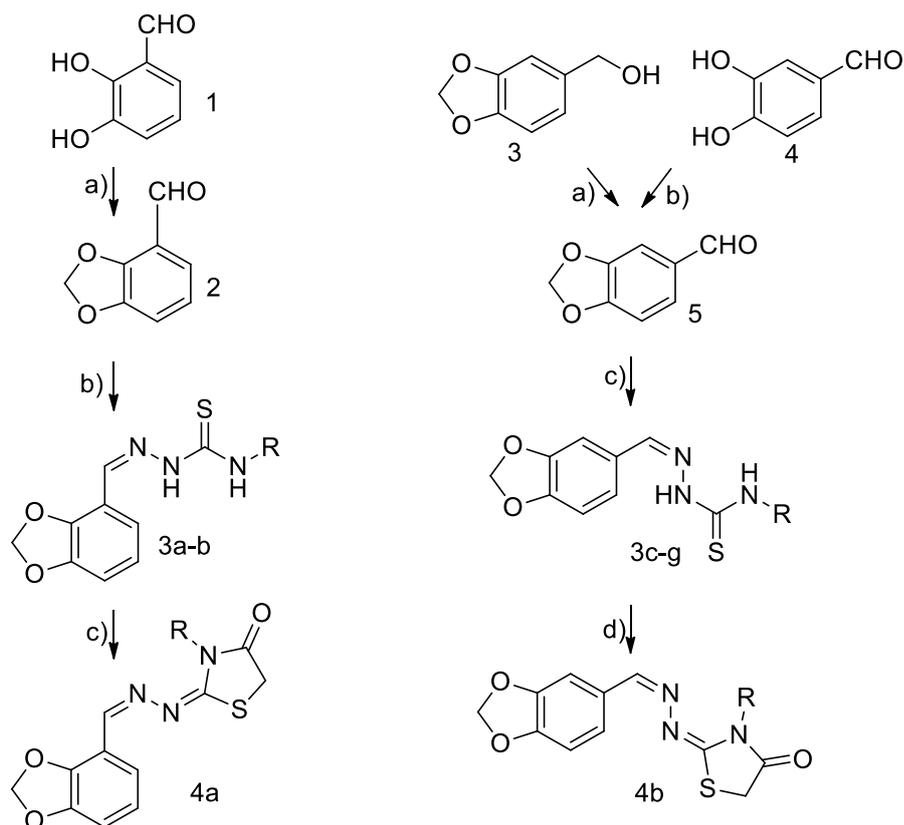
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Química

Salvo indicação em contrário, todos os reagentes comercialmente disponíveis para a obtenção dos compostos 3a-g e 4a-b foram quantidades de Aldrich® Chemical. O benzo- [d] [1,3] -dioxol-4-carbaldeído (2) foi obtido com rendimentos muito baixos pelos métodos utilizados. Assim, era preferível utilizar o aldeído obtido

comercialmente. O benzo- [d] [1,3] -dioxol-5- carbaldeído (5) foi inicialmente obtido por uma reação de substituição nucleofílica SN2 entre 3,4-di-hidroxibenzaldeído e dibromometano. A formação do derivado foi confirmada por sinais característicos de RMN de ^1H , representada por hidrogénios de metileno a 6 ppm na forma de um singuleto, indicando a formação do anel pentamérico de aldeído.

A síntese do aldeído (5) foi otimizada utilizando a oxidação de álcool piperonílico com um rendimento de 85%. Os derivados 3a-g foram obtidos utilizando uma reação de condensação entre aldeídos e tiossemicarbazidas previamente sintetizados (Oliveira et al., 2015), como confirmado por ^1H NMR, onde foi possível observar a presença de hidrogénios a partir do singuleto imina ($\text{CH} = \text{N}$) A cerca de 8 ppm e para identificar bandas de IV correspondentes ao grupo tiocarbonilo ($\text{C} = \text{S}$), imina ($\text{C} = \text{N}$) e NH (Oliveira et al, 2015). Finalmente, as 4a e 4b foram obtidas por meio da ciclização de tiosemicarbazonas e cloroacetato de etilo em meio básico, levando à formação do anel de 4-tiazolidinona, como confirmado pela presença de ^1H NMR com singuleto a 6 e 4 ppm correspondendo aos metilenos das moléculas de benzodioxol e tiazolidinona, respectivamente (Benmohammed et al, 2014). O esquema de síntese adoptado para obter os derivados de 1,3-benzodioxol pode ser demonstrado no Esquema 1. Alguns compostos avaliados neste estudo foram previamente sintetizados (compostos 3d, 3e e 3g) (Klayman et ai, 1979; Murobushi et ai, 1953, Tondeur et al, 1964). Contudo, tais compostos não foram investigados contra os seus potenciais antiparasitários e antiproliferativos.



Esquema 1. Síntese dos compostos alvo. Rota A: a) CH_2Br_2 , K_2CO_3 e DMF, b) ácido acético glacial, etanol, refluxo e N-aryl-tiosemicarbazidas (24-48 h); C) $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, CH_3COONa , EtOH, 24-48 horas. Rote B: a) MnO_2 , benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetanol e CH_2Cl_2 , 2h; B) CH_2Br_2 , K_2CO_3 e DMF, c) ácido acético glacial, etanol, refluxo e N-aryl-tiosemicarbazidas (24-48 h); D) $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, CH_3COONa , EtOH, 24-48 horas.

A análise por RMN de ^1H do composto 4b tornou possível atribuir todos os prótons relacionados com a estrutura. Adicionalmente, registramos também espectros NOESY para o composto 4b, onde atribuímos sinais e utilizamos tais informações para confirmar diversos aspectos da estrutura proposta e também para ter acesso à isomeria E-Z da molécula. Mais especificamente, o sinal NOESY (ver material suplementar) entre H8 (a 8,22 ppm) e H4 (a 7,22 ppm) revela a proximidade espacial entre esses prótons e fornece o isômero Z como produto principal (Figura 1).

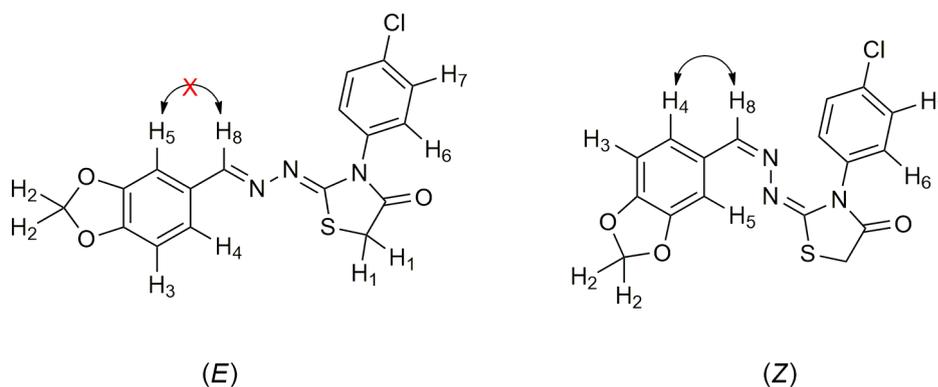


Figura 1. Estruturas que mostram que os prótons H5 e H8 (isómero E) não se correlacionam em espectros NOESY. No isómero (Z) e os hidrogénios H4 e H8 estão correlacionados indicando que esta é a configuração dos compostos sintetizados neste estudo.

5.3.2 Atividade Antiparasitária

A atividade antiparasitária e citotóxica dos compostos 1,3-benzodioxoles-tiossemicarbazonas e 1,3-benzodioxoles-tiazolidinonas está resumida na Tabela 1. Em geral, os compostos 3b, 4a, 4c ($CC_{50} > 100 \mu M$) e 3c ($CC_{50} = 34,94 \mu M$) foram consideradas não tóxicas numa cultura de esplenócitos. Os outros derivados (3a, 3d, 3e, 3f e 3g) provaram ser citotóxicos em células saudáveis, demonstrando baixos valores de CC_{50} . No entanto, estes dados de toxicidade *in vitro* preliminares não excluem definitivamente estes derivados, uma vez que a potência de um composto pode diferir de acordo com o alvo biológico a ser examinado.

Em relação à atividade tripanocida, o composto 3c (1-naftilo) apresentou níveis elevados de atividade contra formas epimastigotas e tripomastigotas ($IC_{50} = 1,48$ e $3,89 \mu M$, respectivamente). Os compostos 3a e 3e (fenilo) também exibiram atividade anti-parasitária significativa, com uma IC_{50} de $4,67$ e $4,45 \mu M$ (epimastigota) e $1,57$ e $2,02 \mu M$ (tripomastigota), respectivamente. A única diferença estrutural entre os dois é a forma como a tiossemicarbazona é inserida no núcleo de 1,3-benzodioxole (3a: posição 4 e 3e: posição 5). Os compostos 3f (2-feniletilo) e 3g (p-metoxi) exibiram atividade apenas contra a forma tripomastigote com IC_{50} de $0,79$ e $1,61 \mu M$, indicando a importância de um agrupamento de espaçamento na atividade contra *T. cruzi*, observado no trabalho de Guo (2015) (Guo et al., 2015), que inseriram a valina como o grupo de espaçamento para produzir uma excelente atividade anti-tumoral.

Os compostos 3b e 3d (p-cloro) também diferem quanto à forma como a tiosemicarbazona é inserida no anel de benzodioxol. Os halogênicos têm a capacidade de aumentar a lipofilicidade de uma molécula, facilitando a interação com o alvo biológico (Hernandes et al, 2010). No entanto, a presença de um átomo de cloro na estrutura destas tiosemicarbazonas parece não ter produzido um aumento na atividade biológica. Estes compostos foram considerados inativos contra estirpes de *T. cruzi*, com IC50 elevada.

As tiazolidinas exibem um amplo espectro de atividade biológica, incluindo propriedades anti-microbiana (anti-convulsiva), anti-cancro (Lafayette et al, 2013) e anti-parasita (Moreira et al. Al, 2013). O comprometimento de átomos na estrutura de tiosemicarbazonas para posterior formação no anel de 4-tiazolidinona foi outro fator determinante dessa atividade, com ausência de atividade para os derivados 4a e 4c (IC50 = 48,99 e 24,78 μM), respectivamente, contra a forma tripomastigota. Todos os compostos avaliados neste estudo, com exceção da derivada 3d, mostraram ser mais seletivos para o tripomastigota de *T. cruzi* em comparação com os esplenócitos.

A atividade contra a *Leishmania* de derivados de 1,3-benzodioxole apresentou um resultado promissor para o composto 3d, com um IC50 de 1,09 μM . Tal como com a atividade tripanocida, os compostos 3a e 3e exibiram uma boa CI50 contra *Leishmania* (IC50 = 1,07 e 1,57 μM , respectivamente), indicando a importância do núcleo aromático não substituído nas tiosemicarbazonas no aumento da atividade antiparasitária (Santiago et al, 2014). Os compostos 3c e 3g exibiram atividade moderada contra *Leishmania*, com um IC50 de 5,35 e 2,56 μM , respectivamente.

O composto 4b exibiu uma IC50 de 24,1 μM contra a forma promastigota de *Leishmania*. Esta tiazolidinona mostrou-se também inativa contra o parasita, como no caso de *T. cruzi*, indicando a importância da porção tiosemicarbazona na atividade antiparasitária, como também foi encontrado nos estudos das propriedades esquistossomicidas de tiosemicarbazonas (Santiago et al, 2014).

Tabela 1. As atividades anti-Tripanocida e leishmanicida de tiosemicarbazonas e tiazolidinonas derivadas de 1,3-benzodioxol.

Compostos	<i>Trypanosoma cruzi</i>		Citotóxica CC ₅₀ (µM)	SI	<i>Leishmania amazonensis</i>
	IC ₅₀ (µM) epimastigota	IC ₅₀ (µM) Tripomastigota			IC ₅₀ (µM) Promastigota
3a	4.67	1.57	3.35	2.13	1.09
3b	ND	17.59	>100	>5.68	ND
3c	1.48	3.89	28.62	7.35	5.35
3d	5.87	27.89	3.01	0.10	1.09
3e	4.45	2.02	3.34	1.65	1.57
3f	ND	0.79	3.05	3.86	ND
3g	ND	1.61	3.03	1.88	2.56
4a	3.4	48.99	>100	>2.04	ND
4b	ND	24.78	>100	>4.03	24.11
BDZ	6.6	6.2	96.1	15.5	-
NFX	5.7	2.7	3.5	1.29	-
AMPH-B	-	-	8.11	-	1.08

BDZ = benznidazole; NFX = nifurtimox. AMPH-B: anfotericina B. ND: significa não determinado, porque a falta de atividade nas concentrações testadas não nos permitiu calcular os valores de IC₅₀. SI: Índice de seletividade (esplenócitos CC₅₀) / (tripomastigotas IC₅₀).

5.3.3 Docking

Os estudos de acoplamento foram conduzidos para elucidar o modo de ligação das moléculas 3a e 3g como inibidores da cruzaina. Os modos de ligação para estes ligantes foram determinados pelos pontos de ancoragem mais elevados (mais positiva) entre as soluções possíveis para cada ligantes. Estes cálculos foram gerados de acordo com a função de pontuação Goldscore.

Para estabelecer as razões moleculares para os baixos valores de IC₅₀ (ou alta inibição) para 3a (1,57 µM) e 3g (1,61 µM) para a forma tripomastigota, foi realizada uma análise detalhada das interações intermoleculares com o alvo de cruzaina para as soluções de acoplamento obtidos. Estes dois compostos são muito semelhantes entre si, diferindo apenas pela presença de um grupo p-metoxi ligado ao anel fenilo durante 3 g, e a posição de substituição para o sistema 1,3-benzodioxol (posição 4 para 3a e posição 5 Para 3 g). Os resultados comparativos para as melhores posições de ancoragem podem ser encontrados na Figura 2.

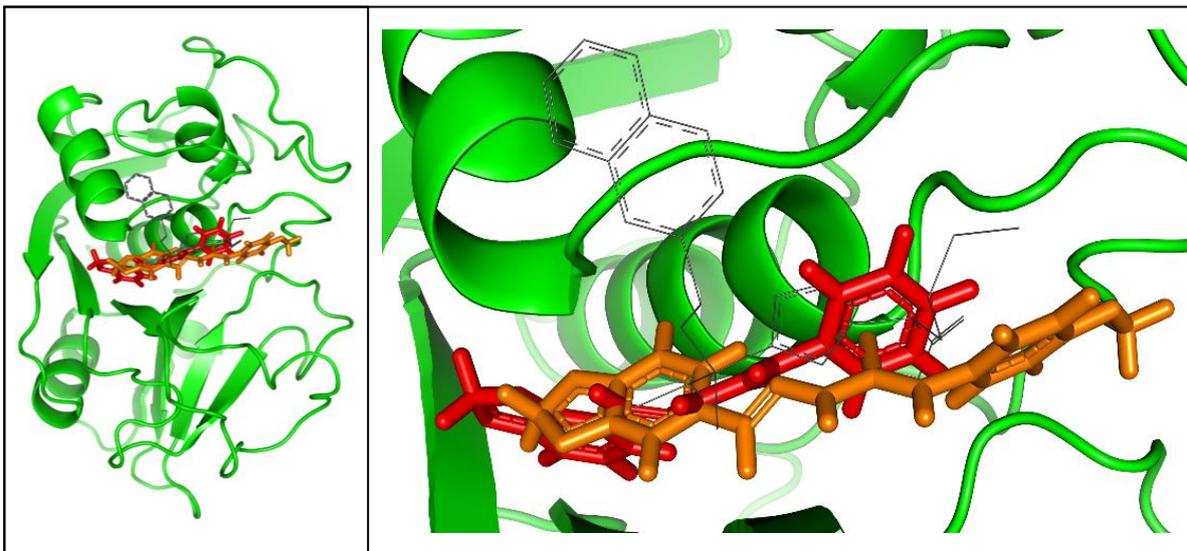


Figura 2. Docking de sobreposição das soluções de compostos inibidores da Cruzaína 3a (vermelho) e 3g (laranja) ligados a enzima (verde) e a estrutura cristalográfica do co-ligante "KB2" (preto). Vista geral (à esquerda) e vista detalhada (à direita)

A diferença entre os modos de ligação destas duas moléculas é apresentada em pormenor na Figura 3 e na Tabela 2. Apesar do grande número de contatos hidrofóbicos encontrados para a molécula 3a, a presença de duas ligações de hidrogénio para a molécula 3g parece ser a principal responsável pela maior Estabilidade do complexo formado entre o composto 3g e o alvo de cruzaína. As ligações de hidrogênio com os resíduos ASP161 (2,6 Å) e MET68 (3,0 Å) são responsáveis pela diferença entre as pontuações de ancoragem entre os complexos com 3a (Pontuação: 51,27) e 3g (Pontuação: 53,25). Este resultado *in silico* mostrou que a molécula de 3g foi identificada com a maior afinidade *in silico* (53,25 contra 51,27) pela cruzaína, e isso está relacionado com duas ligações de hidrogênio estáveis que a molécula 3g estabelece com o alvo de cruzaína. Moreira et al. (2014) avaliaram em seu estudo a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de derivados de tiosemicarbazonas e tiazolidinonas. O estudo de ancoragem apresentou frente à cruzaína e mostrou a importância das interações hidrofílicas e hidrofóbicas dos compostos para o alvo.

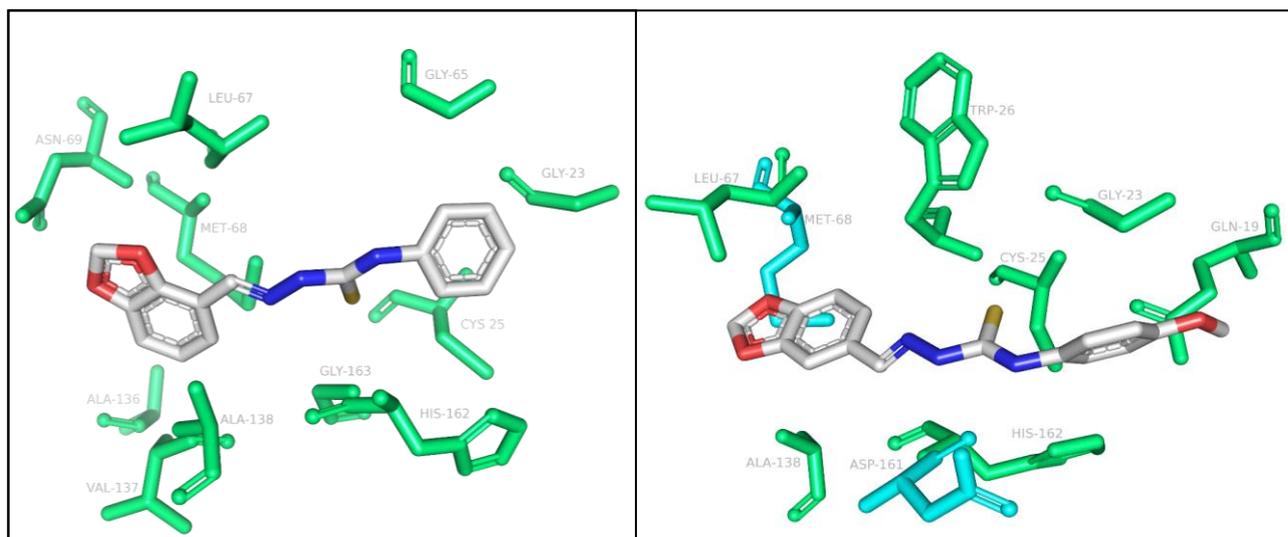


Figura 3. Vista detalhada Docking das soluções dos composto 3a (lado esquerdo) e 3g (lado direito). Os resíduos da cruzaina formam interações hidrofóbicas detalhados em verde, enquanto os resíduos que formam ligações de Hidrogênio destacados em azul.

Tabela 2 - Interações Intermoleculares observadas após o cálculo do acoplamento. HC significa "Contatos Hidrofóbicos" e os números são as distâncias de Ligação de Hidrogênio, em Ångstroms.

Resíduos	Compostos	
	3a	3g
GLN19	-	HC
GLY23	HC	HC
CYS25	HC	HC
TRP26	-	HC
GLY65	HC	-
LEU67	HC	HC
MET68	HC	3.0
ASN69	HC	-
ALA138	HC	HC
ALA136	HC	-
VAL137	HC	-
ASP161	-	2.6
HIS162	HC	HC
GLY163	HC	-
Goldscore	51.27	53.25

5.4 CONCLUSÃO

O presente trabalho descreveu nove compostos contendo fragmentos de 1,3-benzodioxol. Alguns destes demonstraram exibir propriedades promissoras anti-Trypanosoma e anti-Leishmania. Verificou-se que os compostos 3a, 3f e 3g apresentam um elevado nível de atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*, revelando valores de IC50 inferiores comparados com benznidazol, fármaco padrão. O composto 3d produziu um resultado promissor Contra *Leishmania*. No que se refere ao mecanismo provável para a atividade tripanocida destes compostos, os ensaios de acoplamento molecular contra cruzaina revelaram o grande número de contatos hidrofóbicos e hidrofílicos para o composto 3g, demonstrou que esta protease como um possível alvo biológico.

AGRADECIMENTOS

Este estudo contou com o apoio das agências brasileiras, Processo nº 473676 / 2012-5, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE)

INTERESSES COMPETITIVOS

Os autores declararam que não existem interesses de conflito.

REFERENCIAS

Benmohammed, A., Khoumeri, O., Djafri, A., Terme, T., Vanelle, P., 2014. Synthesis of novel highly functionalized 4-thiazolidinone derivatives from 4-phenyl-3-thiosemicarbazones. *Molecules*, 19, 3068-3083. DOI: 10.3390/molecules19033068.

Blau, L., Menegon, R.F., Trossini, G.H., Molino, J.V., Vital, D.G., Cicarelli, R.M., Passerini, G.D., Bosquesi, P.L., Chin, C.M., 2013. Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. *Eur. J. Med. Chem.* 67, 142-151. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.04.022

Brak, K., Kerr, I.D., Barrett, K.T., Fuchi, N., Debnath, M., Ang, K., Engel, J.C., McKerrow, J.H., Doyle, P.S., Brinen, L.S., Ellman, J.A., 2010. Nonpeptidic

tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzaina inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy, *J. Med. Chem.* 53, 1763-1773. DOI: 10.1021/jm901633v

Brito, F.C., Kummerle, A.E., Lugnier, C., Fraga, C.A., Barreiro, E.J., Miranda, A.L., 2010. Novel thienylacylhydrazone derivatives inhibit platelet aggregation through cyclic nucleotides modulation and thromboxane A2 synthesis inhibition. *Eur J Pharmacol.* 638, 5-12. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.04.003

Buckner, F.S., Urbina, J.A., 2012. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug. Resist.* 2, 236-242. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2011.12.002.

Caputto, M.E., Fabian, L.E., Benítez, D., Merlino, A., Ríos, N., Cerecetto, H., Moltrasio, G.Y., Moglioni, A.G., González, M., Finkielstein, L.M., 2011. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 6818-6826. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.09.037

de Menezes, J.P., Guedes, C.E., Petersen, A.L., Fraga, D.B., Veras, P.S., 2015. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Biomed. Res. Int.* 2015, 11. DOI: 10.1155/2015/815023

Doyle, P.S., Zhou, Y.M., Engel, J.C., McKerrow, J.H., 2007. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3932-3939. DOI: 10.1128/AAC.00436-07

Du, X., Guo, C., Hansell, E., Doyle, P.S., Caffrey, C.R., Holler, T.P., McKerrow, J.H., Cohen, F.E., 2002. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio- semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzaina. *J. Med. Chem.* 45, 2695-2707. DOI: 10.1021/jm010459j

Du, X., Hansell, E., Engel, J.C., Caffrey, C.R., Cohen, F.E., McKerrow, J.H., 2000. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. *Chem. Biol.* 7, 733-742. DOI: 10.1016/S1074-5521(00)00018-1

Durrant, J.D., McCammon, J.A., 2011. BINANA: a novel algorithm for ligand-binding characterization, *J. Mol. Graph. Model.* 29, 888-893. DOI: 10.1016/j.jmglm.2011.01.004.

Duschak, V.G., Ciaccio, M., Nasser, J.R., Basombrio, M.A., 2001. Enzymatic activity, protein expression and gene sequence of cruzipain in virulent and attenuated *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.* 87, 1016-1022.

El-Behairy, M.F., Mazeed, T.E., El-Azzouny, A.A., Aboul-Enein, M.N., 2015. Design, synthesis and antibacterial potential of 5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-tert-butyl-1-substituted-4,5-dihydropyrazoles. *Saudi Pharm J.* 23, 202-209. DOI: 10.1016/j.jsps.2014.07.009

Engel, J.C., Doyle, P.S., Hsieh, I., McKerrow, J.H., 1998. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 188, 725-734. DOI: 10.1084/jem.188.4.725

Greenbaum, D.C., Mackey, Z., Hansell, E., Doyle, P., Gut, J., Caffrey, C.R., Lehrman, J., Rosenthal, P.J., McKerrow, J.H., Chibale, K., 2004. Synthesis and structure-activity relationships of parasitocidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Chem.* 47, 3212-3219. DOI: 10.1021/jm030549j

Guo, N., Jiang, D., Wang, L., You, X., Teng, Y.O., Yu, P., 2015. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Water-Soluble Poly-(ethylene glycol)-10-hydroxycamptothecin Conjugates. *Molecules* 20, 9393-9404. DOI: 10.3390/molecules20059393.

Hernandes, M.Z., Cavalcanti, S.M.T., Moreira, D.R.M., Azevedo Júnior, W.F., Leite, A.C.L., 2010. Halogen atoms in modern medicinal chemistry: Hints for the drugs desing. *Curr Drug Targets* 11, 303-3014. DOI: 10.2174/1389450107907119.

Kevric, I., Cappel, M.A., Keeling, J.H., 2015. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. *Dermatol. Clin.* 33, 579-593. DOI: 10.1016/j.det.2015.03.018.

Klayman, D.L., Bartosevich, J.F., Griffin, T.S., Mason, C.J., Scovill, J.P., 1979. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 1. A new class of potential antimalarial agents. *J Med Chem.* 22, 855-862.

Kümmerle, A.E., Schmitt, M., Cardozo, S.V., Lugnier, C., Villa, P., Lopes, A.B., Romeiro, N.C., Justiniano, H., Martins, M.A., Fraga, C.A., Bourguignon, J.J., Barreiro, E.J., 2012. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of N-acylhydrazones and novel conformationally constrained compounds as selective and potent orally active phosphodiesterase-4 inhibitors. *J. Med. Chem.* 55, 7525-7545. DOI: 10.1021/jm300514y.

Lafayette, E.A., Vitalino, S.M.A., Pitta, M.G., Carneiro-Beltrão, E.I., Silva, T.G., Moura, R.O., Pitta, I.R., Carvalho-Jr, L.B., Lima, M.C., 2013. Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. *Molecules.* 18, 15035-15050. DOI: 10.3390/molecules181215035.

Lantwin, C.B., Schlichting, I., Kabsch, W., Pai, E.F., Krauth-Siegel, R.L., 1994. The structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in the oxidized and NADPH reduced state. *Proteins* 18, 161-173. DOI: 10.1002/prot.340180208

Leal, C.M., Pereira, S.L., Kümmerle, A.E., Leal, D.M., R., de Sant'Anna, C.M., Fraga, C.A., Barreiro, E.J., Sudo, R.T., Zapata-Sudo, G., 2012. Antihypertensive profile of 2-thienyl-3,4-methylenedioxybenzoylhydrazone is mediated by activation of the A2A adenosine receptor. *Eur. J. Med. Chem.* 55, 49-57. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.06.056

Lozano, N.B., Maltarollo, V.G., Weber, K.C., Honorio, K.M., Guido, R.V., Andricopulo, A.D., Da Silva, A.B., 2012. Molecular features for antitrypanosomal activity of thiosemicarbazones revealed by OPS-PLS QSAR studies. *Med. Chem.* 8, 1045-1056.

Machado, F.S., Jelicks, L.A., Kirchhoff, L.V., Shirani, J., Nagajyothi, F., Mukherjee, S., Nelson, R., Coyle, C.M., Spray, D.C., de Carvalho, A.C., Guan, F., Prado, C.M., Lisanti, M.P., Weiss, L.M., Montgomery, S.P., Tanowitz, H. B., 2012. Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol. Rev.* 20, 53–65. DOI: 10.1097/CRD.0b013e31823efde2.

Moreira, D.R., Leite, A.C., Cardoso, M.V., Srivastava, R.M., Hernandes, M.Z., Rabello, M.M., da Cruz, L.F., Ferreira, R.S., de Simone C.A., Meira, C.S., Guimaraes, E.T., da Silva, A.C., dos Santos, T.A., Pereira, V.R., Soares, M.B., 2014. Structural design, synthesis and structure-activity relationships of thiazolidinones with enhanced anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *ChemMedChem.* 9, 177-188. DOI: 10.1002/cmdc.201300354

Moreira, T.L.B., Barbosa, A.F.S., Veiga-Santos, P., Henriques, C., Henriques-Pons, A., Galdino, S.L., Lima, M.C.A., Pitta, I.R., Souza, W., Carvalho, T.M.U., 2013. Effect of thiazolidine LPSF SF29 on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* 41, 183-187. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2012.09.018.

Murobushi, K., Kawaguchi, K., Ashikawa, E., 1953. Synthetic retarders for photographic emulsions. IV. Photographic properties of thiosemicarbazone derivatives. *Nippon Kagaku Kaishi.* 56, 373-375.

Nikalje, A.P., Ansari, A., Bari, S., Ugale, V., 2015. Synthesis, Biological Activity, and Docking Study of Novel Isatin Coupled Thiazolidin-4-one Derivatives as Anticonvulsants. *Arch Pharm (Weinheim)* 348, 433-445. DOI: 10.1002/ardp.201500020.

Oliveira, J.F., Silva, A.L., Vendramini-Costa, D.B., Amorim, C.A.C., Campos, J.F., Ribeiro, A.G, Moura, R.O., Neves, J.L., Ruiz, A.L.T.G, Carvalho, J.E., Lima, M.C.A., 2015. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. *Eur J Med Chem.* 104, 148-156. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.09.036.

Pinazo, M.J., Muñoz, J., Posada, E., López-Chejade, P., Gállego, M., Ayala, E., del Cacho, E., Soy, D., Gascon, J., 2010. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4896–4899. DOI: 10.1128/AAC.00537-10

Porcal, W., Hernández, P., Boiani, L., Boiani, M., Ferreira, A., Chidichimo, A., Cazzulo, J.J., Olea-Azar, C., González, M., Cerecetto, H., 2008. New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 6995-7004. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.05.038

Rassi Jr., A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet* 375, 1388-402. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X

Rocha, G.B., Freire, R.O., Simas, A.M., Stewart, J.J.P., 2006. RM1: a reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I, J. Comput. Chem. 27, 1101-1111. DOI: 10.1002/jcc.20425

Romeiro, L.A., Ferreira, M.S., Silva, L.L., Castro, H.C., Miranda, A.L., Silva, C.L., Noel, F., Nascimento, J.B., Araújo, C.V., Tibiriçá, E., Barreiro, E.J., Fraga, C.A., 2011. Discovery of LASSBio-772, a 1,3-benzodioxole *N*-phenylpiperazine derivative with potent alpha 1A/D-Adrenergic receptor blocking properties. Eur J Med Chem. 46, 3000-3012. DOI:10.1016/j.ejmech.2011.04.032

Santiago, E.F., Oliveira, S.A., Filho, G.B.O., Moreira, D.R.M., Gomes, P.A.T., Silva, A.L., Barros, A.F., Silva, A.C., Santos, T., A.R., Pereira, V.R.A., Gonçalves, G.G.A., Brayner, F.A., Alves, L.C., Wanderley, A.G., Leite, A.C.L., 2014. Evaluation of the anti-Schistosoma mansoni activity of thiosemicarbazones and thiazoles. Antimicrob Agents Chemother. 58, 352-363. DOI: 10.1128/AAC.01900-13.

Selzer, P.M., Pingel, S., Hsieh, I., Ugele, B., Chan, V.J., Engel, J.C., Bogyo, M., Russell, D.G., Sakanari, J.A., McKerrow, J.H., 1999. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 96, 11015-11022. DOI: 10.1073/pnas.96.20.11015

Siles, R., Chen, S.E., Zhou, M., Pinney, K.G., Trawick, M.L., 2006. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 4405-4409. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.05.041

Singh, N., Kuma, M., Singh, R.K., 2012. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. Asian Pac J Trop Med. 5, 485-497. DOI: 10.1016/S1995-7645(12)60084-4.

Tojo, G., Fernández, M., 2006. Oxidation of Primary Alcohols to Carboxylic Acids: A Guide to Current Common Practice. Springer: New York.

Tondeur, R., Sion, R., Deray, E., 1964. Synthesis of 2-alkyl and 2-arylthiazolidines with or without substituent on the nitrogen atom. B Soc Chim Fr. 10, 2493-2499.

Urbina, J.A., 2009. New Advances in the management of a long-neglected disease. Clin. Infect. Dis. 49, 1685-1687. DOI: 10.1086/648073

Wang, M., Gao, M., Miller, K.D., W. Sledge, G., Hutchins, G.D., Zheng, Q.H., 2010. Synthesis of carbon-11-labeled casimiroin analogues as new potential PET agents for imaging of quinone reductase 2 and aromatase expression in breast cancer. Steroids 75, 967-973. DOI: 10.1016/j.steroids.2010.06.004.

Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104, 1051-1054.

Figure S1. ¹H-NMR spectrum (DMSO) of compound 3a

Willams Leal/Antibioticos
Amostra NW-02
Solicitacao N. N0408-11
22.04.2015 UFPE

Sample Name:

Data Collected on:
varian400-vnmrs400
Archive directory:

Sample directory:

FidFile: PROTON

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Apr 22 2015

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, 399.7414628 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 32768
Total time 0 min 57 sec

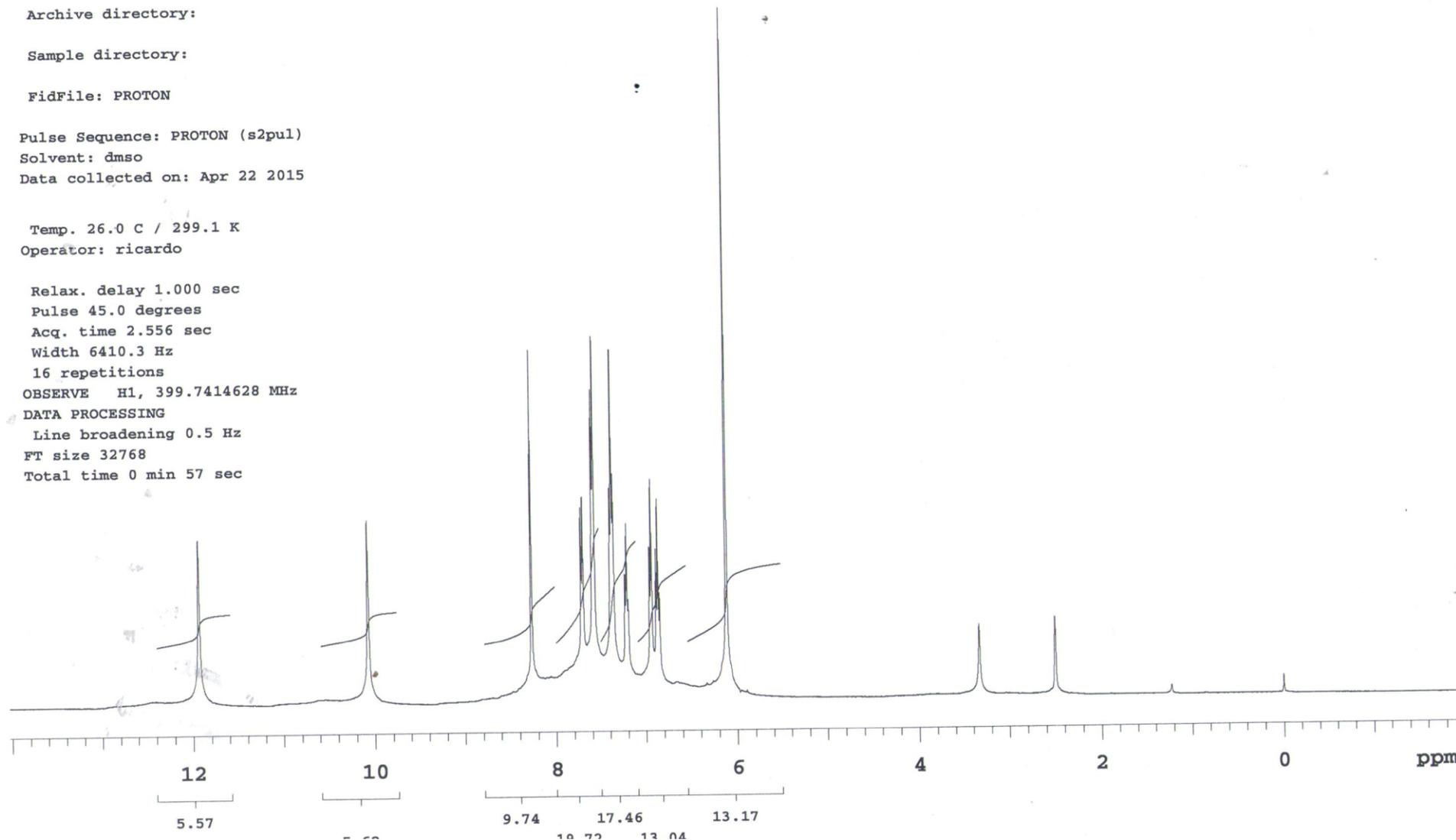


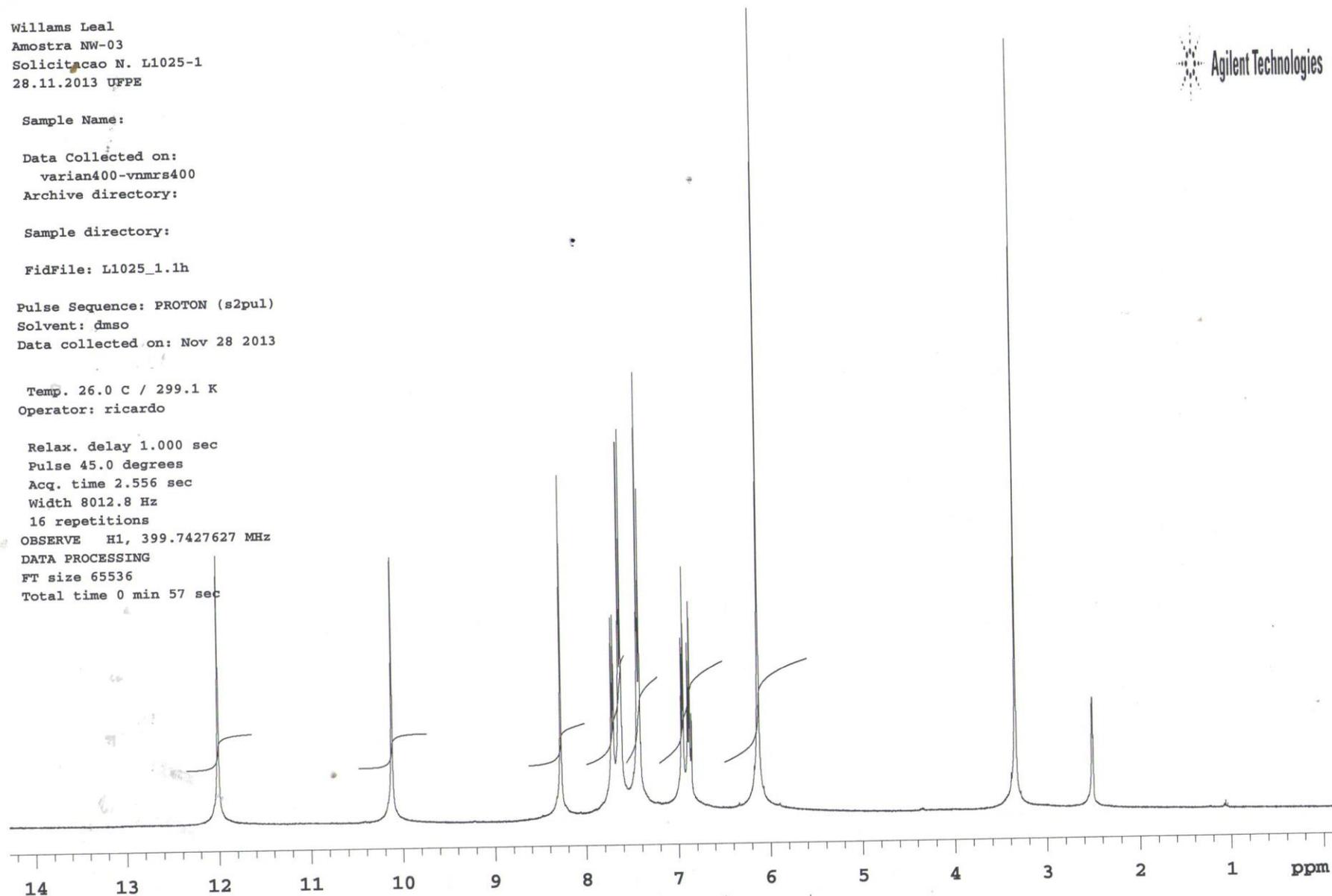
Figure S3. ^1H -NMR spectrum (DMSO) of compound 3b

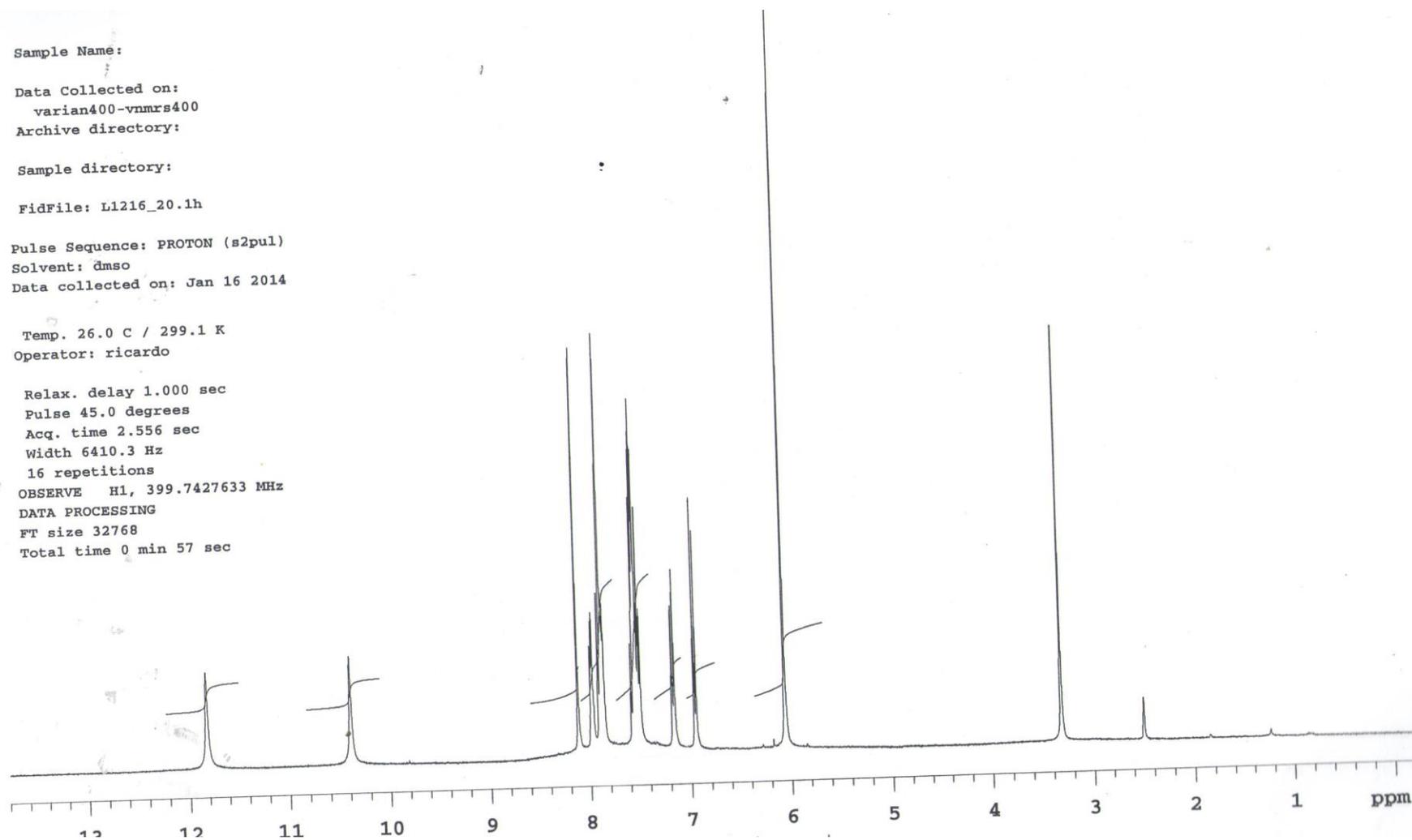
Figure S5. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (DMSO) of compound 3c

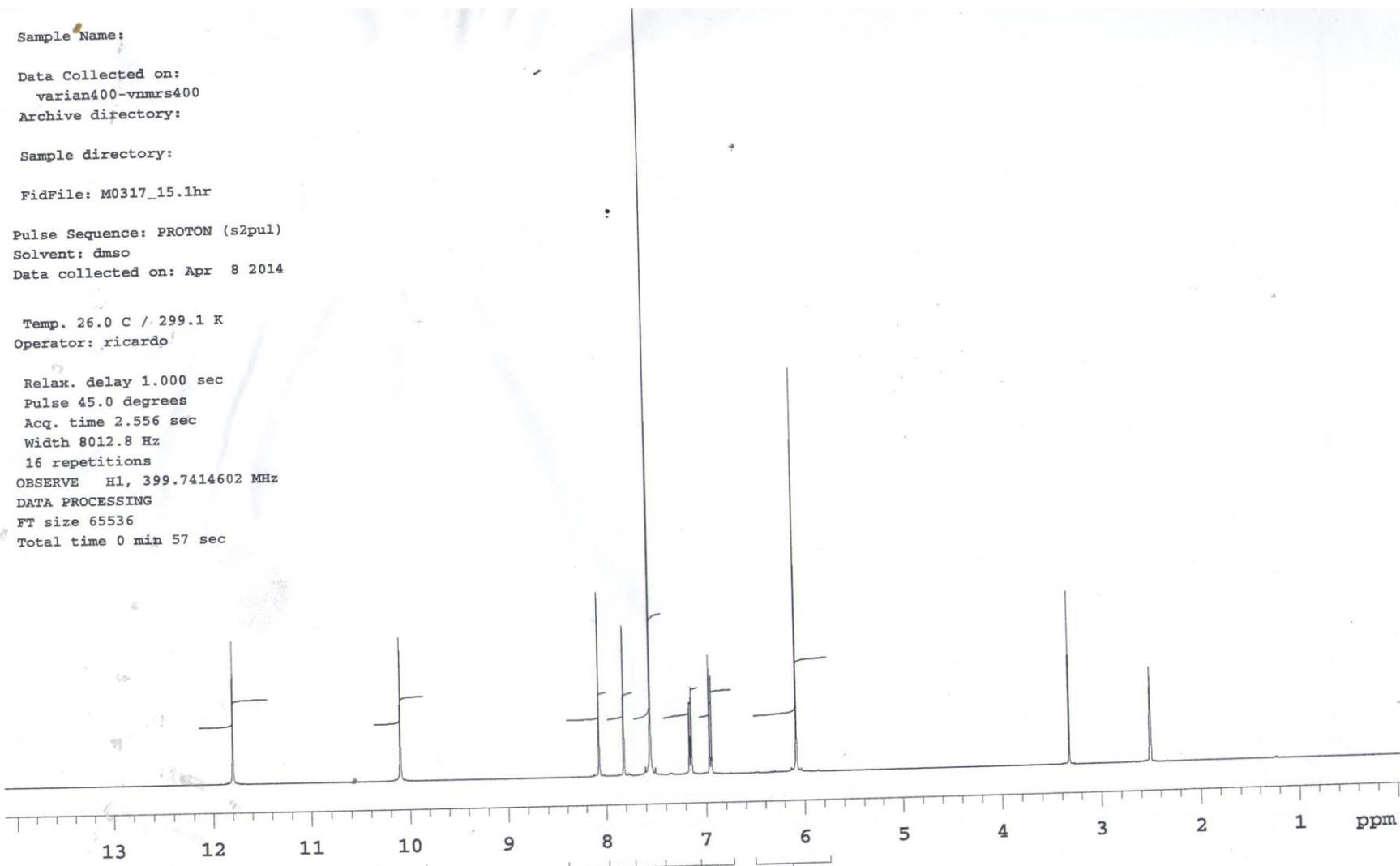
Figure S7. ^1H -NMR spectrum (DMSO) of compound 3d

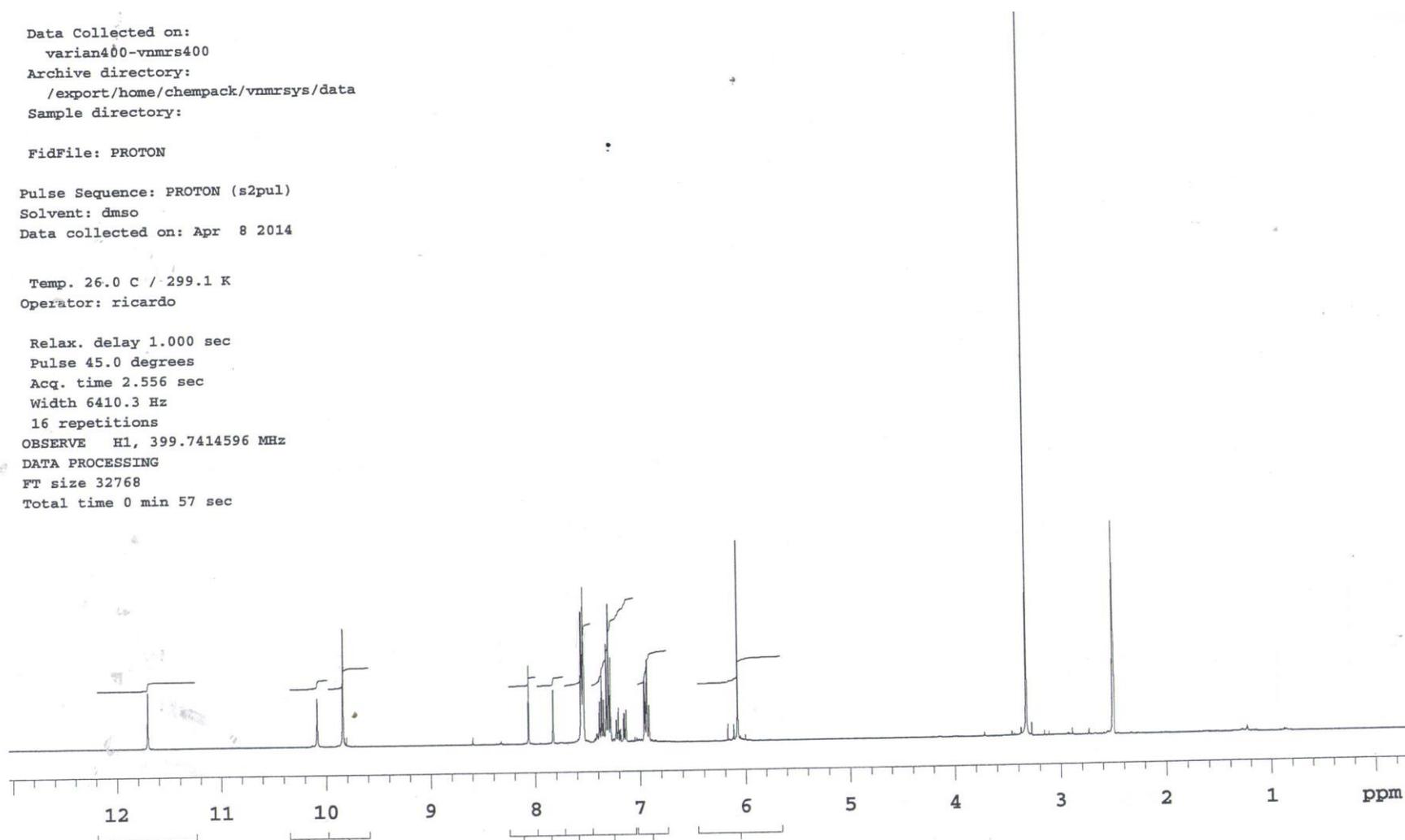
Figure S9. ^1H -NMR spectrum (DMSO) of compound 3e

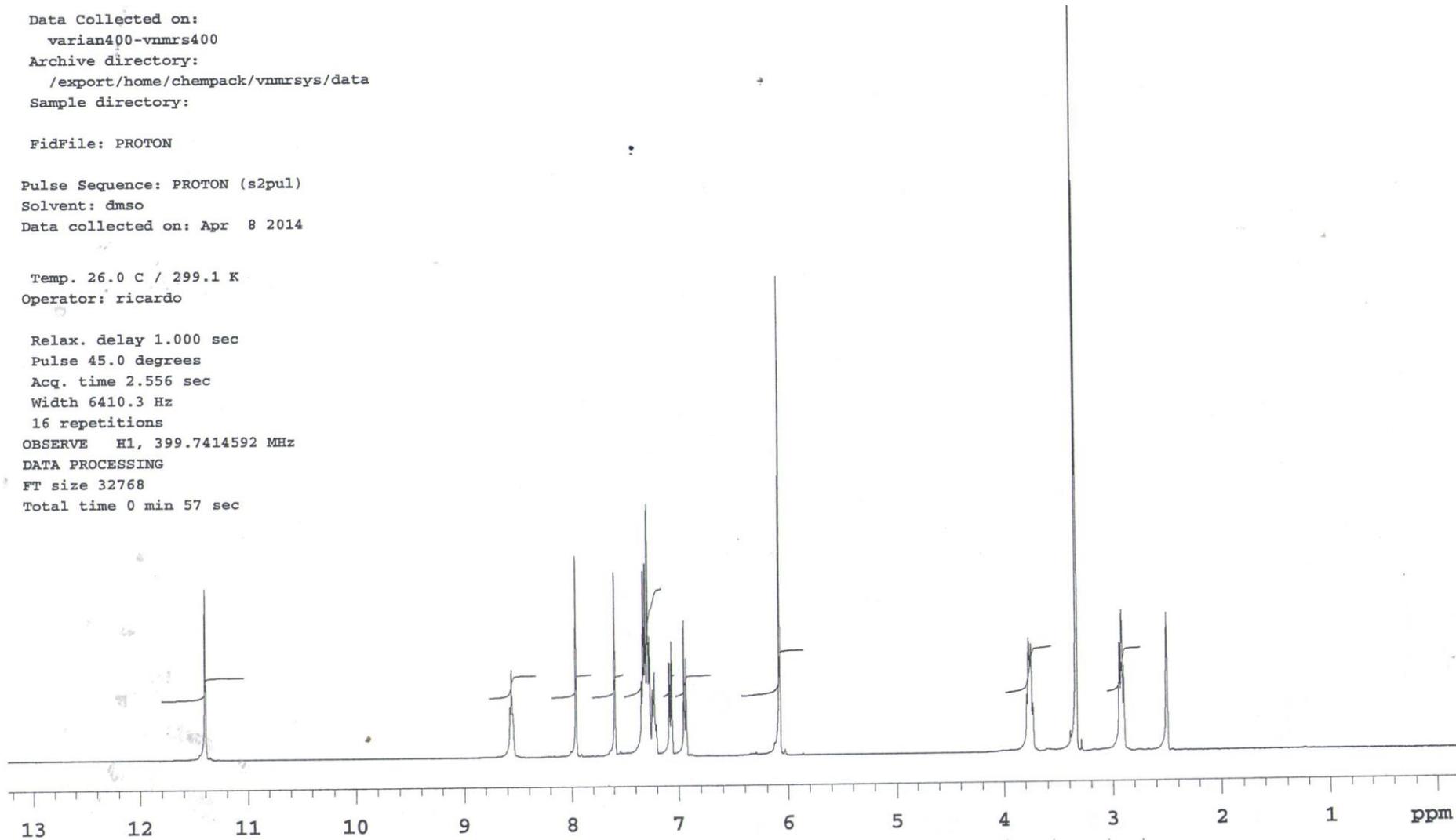
Figure S11. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (DMSO) of compound 3f

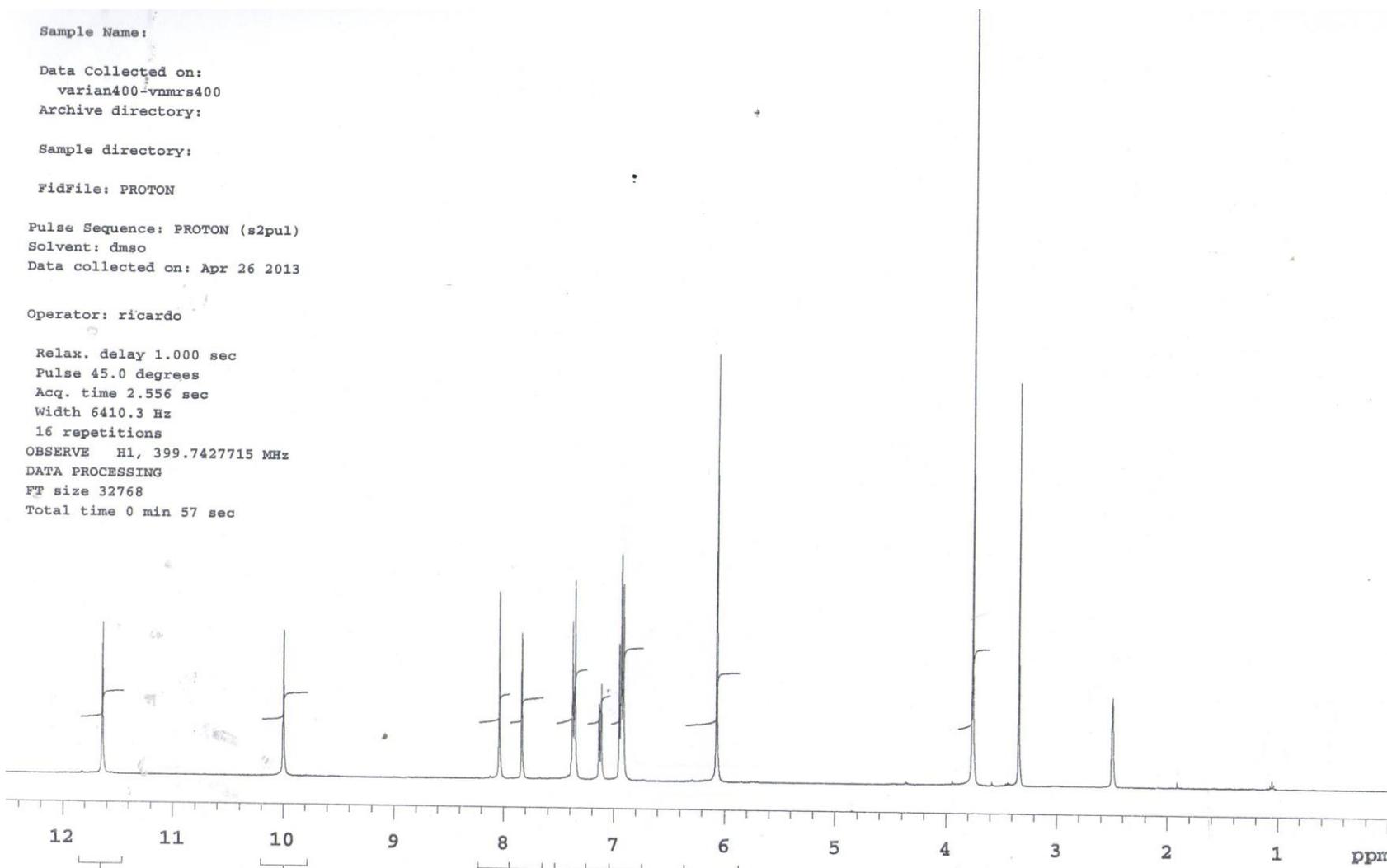
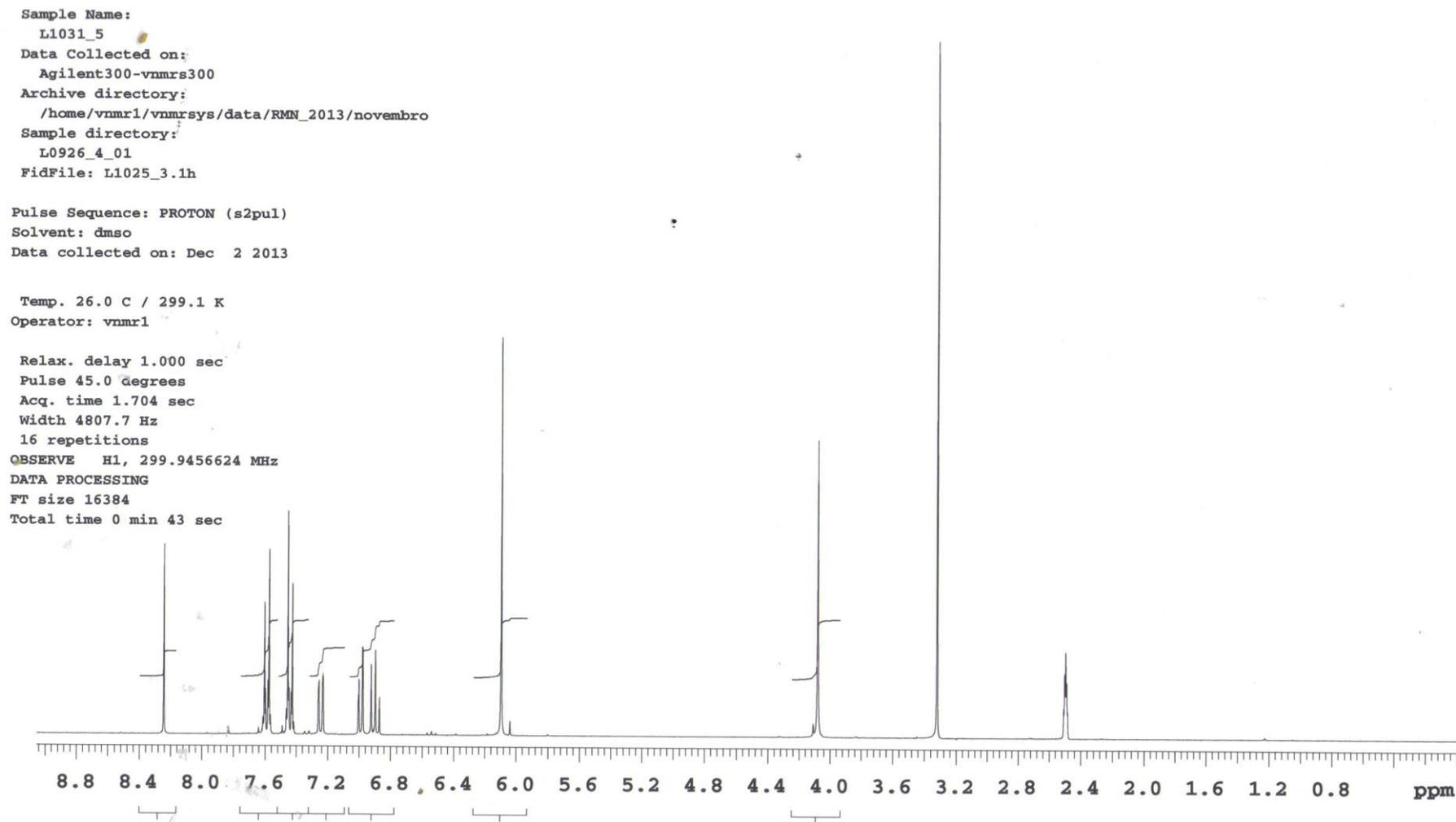
Figure S13. ^1H -NMR spectrum (DMSO) of compound 3g

Figure S15. ^1H -NMR spectrum (DMSO) of compound 4a



CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÕES

Os compostos da série aril-tiossemicarbazonas 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, 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 antifúngica revelou para os derivados indol-tiossemicarbazonas que a presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos promovem um aumento da atividade biológica, quando comparados com duas substituições hidrofóbicas que diminuem a atividade antifúngica.

A avaliação da atividade antiparasitária realizada com os derivados 1,3-benzodioxol-tiossemicarbazona revelou que o comprometimento dos átomos na ciclização da tiazolidin-4-ona repercute de maneira negativa para a atividade antiparasitária. Além disso, estudos de docking molecular evidenciaram que a presença de grupos hidrofílicos aumenta a força de ligação do composto com a cruzaina.

6.2 PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar o estudo frente a inibição da enzima ergosterol 14-alfa-desmetilase com o melhor derivado avaliado na atividade antifúngica;
- ✓ Investigar alterações morfológicas na superfície dos microorganismos avaliados utilizando a microscopia eletrônica de varredura do melhor derivado avaliado na atividade antifúngica;
- ✓ Avaliar o potencial inibitório do melhor derivado da série 1,3-benzodioxol-tiossemicarbazona frente a inibição da enzima cruzaina.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abdel-Rahman, S.; Kauffman, R. E. The integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics: understanding dose-response. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 44, p. 111-136. 2004.
- 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
- Altıntop, M.D., Atlı, Ö., İlgin, S., Demirel, R., Özdemir, A., Kaplancıklı, Z.A. Synthesis and biological evaluation of new naphthalene substituted thiosemicarbazone derivatives as potent antifungal and anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. V. 108, 406-414. 2016.
- Aly, M. M.; Mohamed, Y. A.; El-Bayouki, K A.; Basyouni, W.M.; Abbas, S. Y *European Journal of Medicinal Chemistry*.v. 67, September 2013, p. 263–268. 2013
- Barreiro; Eliezer J. Estratégia de Simplificação Molecular no Planejamento Racional de fármacos: A Descoberta de Novo Agente Cardioativo, *Química Nova*, v. 25, No. 6B, p. 1172-1180, 2002.
- Basu, A., Thiyagarajan, D. , Kar, C., Ramesh, A., Das, A. Synthesis, crystal structure and bio-macromolecular interaction studies of pyridine-based thiosemicarbazone and its Ni(II) and Cu(II) complexes. *RSC Adv*. v. 3, p.14088– 14096, 2013.
- Bineshmarvasti, M., Sharifzadeh, M., Jalilian. A,R., Soltaninejad, K., Shafiee, A. Syntheses and anticonvulsant activity of N4-substituted triazolylthiazoles. *Daru*, v.11, p.74-78, 2003.
- Chellan, P., Nasser, S., Vivas, L., Chibale, K., Smith, G. S., Cyclopalladated complexes containing tridentate thiosemicarbazone ligands of biological significance: Synthesis, structure and antimalarial activity. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 695, p.2225–2232, 2010.
- Del Corso, A., Cappiello, M., Mura , U. Thiol dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *International Journal of Biochemistry* v. 26, n.6, p.745-750. 1994.
- García, C.C.; Brousse, B.N., Carlucci, M.J., Moglioni, A.G., Martins. Alho, M, Moltrasio, G.Y., D'Accorso, N.B., Damonte, E.B. Inhibitory effect of thiosemicarbazone derivatives on Junin virus replication in vitro. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, v. 14, n. 2, p. 99-105. 2003.
- Geng, S., Wu Q., Shi L., Cui F. Spectroscopia study one thiosemicarbazone derivative with ctDNA using ethidium bromide as a fluorescence probe. *International Journal of Biological Macromolecules* v. 60, p. 288–294. 2013

Glisoni, R.J., Quintana, S., Molina, M.A., Calderon, M., Moglioni, A.G., Sosnik, A. New J. Chem. Antiviral activity against the hepatitis C virus (HCV) of 1-indanone thiosemicarbazones and their inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, v. 34, p. 2047–2058, 2010

Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D. Modelagem Molecular de Fármacos. Revista processos químicos, v. 3, p. 24-36, 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.

Jalilian, A.R., Sattari, S., Bineshmarvasti. M., Daneshtalab, M., Shafiee, A.R. Synthesis and in vitro antifungal and cytotoxicity evaluation of substituted 4,5-dihydronaphtho[1,2- d][1,2,3]thia(or selena)diazoles. Il Farmaco , v. 58, p. 63-68. 2003

Kalinowski, D.S., Richardson, D.R., Future of ToxicologyIron Chelators and Differing Modes of Action and Toxicity: The Changing Face of Iron Chelation Therapy. Chemical Research in Toxicology. v, 20, p. 715–720. 2007.

Kalinowski, D.S.; Quach, P., Richardson, D.R. Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment. Future Medicinal Chemistry, v. 1, p. 1143–1151; 2009.

Kesel, A.J. Broad-spectrum antiviral activity including human immunodeficiency and hepatitis C viruses mediated by a novel retinoid thiosemicarbazone derivative. European Journal of Medicinal Chemistry. v. 46 p. 1656–1664, 2011.

Kniaz, D.; Drug discovery adopts factory model. Modern Drug Discovery. V. 5, p. 67-82. 2000

Leitão, A.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Química Nova, v. 23, No. 2, p. 178-184, 2000.

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

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.

Marui, J., Yoshimi, A., Hagiwara, D., Fujii-Watanabe. Y., Oda, K., Koike, H., Tamano, K., Ishii, T., Sano, M., Machida, M., Abe, K., Use of the *Aspergillus oryzae* actin gene promoter in a novel reporter system for exploring antifungal compounds and their target genes. Applied Genetics and Molecular Biotechnology. v. 87 p.1829 - 1840. 2010.

Masimirembwa, C. M.; Bredberg, U.; Andersson, T. B.; Metabolic stability for drug discovery and development: pharmacokinetic and biochemical challenges. Clinical Pharmacokinetics. v.42, p.515-528. 2003

Munos, B.; Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, p. 959-968; 2009.

Ooms, F.; Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. *Current medicinal chemistry*. v. 7, n.2, p.141-158, 2000

Pelosi, Giorgio. Thiosemicarbazone Metal Complexes: From Structure to Activity. *The Open Crystallography Journal*, v. 3, p.16-28, 2010

Pereira, D. G., Importância do metabolismo no planejamento racional de Fármacos. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p.171-177, 2007

Ratti, E.; Trist, D.; The continuing evolution of the drug discovery process in the pharmaceutical industry. *IL Farmaco* V. 56, Jan-Fev; p. 9-13 2001.

Rodríguez-Argüelles, M.C., López-Silva, E.C., Sanmartín, J., Pelagatti, P., Zani, F. Copper complexes of imidazole-2-, pyrrole-2- and indol-3-carbaldehyde thiosemicarbazones: Inhibitory activity against fungi and bacteria. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v. 99, p. 2231–2239. 2005.

Shafiee AR, Jalilian B. Selenium heterocycles XLIV. Syntheses of 8,9-dihydro-1,2,3-thiadiazolo[4,5-a]-4,7-dihydronaphthalene and 1,2,3-selenadiazolo[4,5-a]-4,7-dimethoxynaphthalene. *Journal of Heterocyclic Chemistry*; v. 37, p.1325-1327, 2000.

Shailey Singhal, Shefali Arora, Shilpi Agarwal, Rajan Sharma, Naveen A Review on Potential Biological Activities of Thiosemicarbazides. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* v. 2, Issue 6, p.4661-4681 2013

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.

Varvaresou T, Siatra-Papastaikoudi A, Tsotinis D, Tsantili-Kakaulidou A, Amvakides VA. Synthesis, lipophilicity and biological evaluation of indole-containing derivatives of 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole. *Farmaco*; v. 53, p. 320-326, 1998.

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.

WHO. The global burden of disease. Geneva: World Health Organization,. p.1-146. 2008