



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
LABORATÓRIO DE QUÍMICA E INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

DANIEL PEREIRA REIS

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E
ANTIMICROBIANA *in vitro* PROMOVIDAS POR COMPOSTOS
TIOSEMICARBAZÔNICOS**

RECIFE

2023

DANIEL PEREIRA REIS

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E
ANTIMICROBIANA *in vitro* PROMOVIDAS POR COMPOSTOS
TIOSEMICARBAZÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos essenciais para a saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria do Carmo Alves de Lima

Coorientador: Prof^º. Dr^º. Iranildo José da Cruz Filho

RECIFE

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Reis, Daniel Pereira.

Avaliação das propriedades antioxidante, citotóxica e antimicrobiana *in vitro* promovidas por compostos tiossemicarbazônicos. / Recife. – 2023.

62f. : il., fig.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.

Coorientador: Iranildo José da Cruz Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação terapêutica, 2023.

Inclui referências.

1. Tiossemicarbazonas. 2. ADMET. 3. Tiazóis. 4. BSA - antimicrobiano. 5. I. Lima, Maria do Carmo Alves de. (Orient.). II. Cruz Filho, Iranildo José da. (coorient.). III. Título.

DANIEL PEREIRA REIS

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E
ANTIMICROBIANA *in vitro* PROMOVIDAS POR COMPOSTOS
TIOSEMICARBAZÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos essenciais para a saúde.

.

Aprovado em: 21/11/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Dijanah Cota Machado
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Iris Trindade Tenório Jacob
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem devo toda a honra e louvor por me permitir concluir este mestrado.

À minha linda esposa Camila, por ser um suporte durante essa caminhada.

À Geovana que abrilhanta minha vida.

Aos meus pais Lúcia e Mario por serem sempre meus incentivadores e minha base forte.

À minha orientadora Prof^a Maria do Carmo que me acolheu, me ensinou e deixou um grande legado em minha vida.

Ao meu coorientador Prof^o Iranildo por dar todo o suporte e apoio necessário durante o mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) por toda ajuda e camaradagem.

A todos os amigos e familiares que estiveram ao meu lado e que cooperaram para a concretização deste projeto.

RESUMO

A química medicinal é uma área essencial na descoberta de novos compostos com atividade terapêutica e possibilita o desenvolvimento de novos medicamentos para tratamento de diversas doenças. Além disso, modificações racionais em esqueletos químicos possibilitam a melhora da atividade terapêutica de tratamentos atualmente disponíveis na Clínica. Nesse sentido, os tiazóis e as tiossemicarbazonas têm sido objeto de pesquisas devido as suas diversas atividades farmacológicas. Neste trabalho objetivamos sintetizar e caracterizar sete novos compostos quinolínicos-tiossemicarbazônicos (CG-1 a CG-7), e avaliar suas propriedades ADMET *in silico* e *in vitro*, atividade antioxidante, citotóxica, antifúngica e interação com Albumina Sérica Bovina (BSA). Os compostos foram obtidos pela reação indireta com derivados tiossemicarbazidas, por adição nucleofílica entre hidrazina e isotiocianatos correspondentes. Os derivados foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas e por ferramentas bioinformáticas. Acerca da previsão ADMET, os compostos foram classificados como moderadamente solúveis por ligação com as proteínas séricas, e inibidores das principais isoformas de citocromo P450, com baixos valores teóricos de *clearance* total. Além disso, o composto CG3 foi o que apresentou previsão de maior risco de toxicidade. Todos os compostos apresentaram previsão de boa biodisponibilidade oral, sem violação para as regras de Lipinski e Veber. Os compostos apresentaram fraca a moderada atividade antifúngica *in vitro*, com melhor ação contra *Candida tropicalis* (HAM 44). Quanto à atividade antioxidante o CG-1 apresentou a melhor atividade em relação aos outros compostos, com resultados de 38.9% e 99.4% nos testes de DPPH e ABTS respectivamente. Na avaliação da atividade citotóxica *in vitro*, os compostos apresentaram altos valores de IC₅₀ para diferentes tipos de células e atividade hemolítica >7.0%, indicando que os compostos não são citotóxicos e nem hemolíticos. O mecanismo de supressão de fluorescência promovido pelos compostos frente à albumina bovina é de natureza dinâmico e reversível, por interações hidrofóbicas e eletrostáticas, processo espontâneo e com alta probabilidade de transferência de energia. Esses resultados contribuem fortemente com os estudos na área de inovação terapêutica na busca por novos compostos de interesse.

Palavras-chave: Tiossemicarbazonas; ADMET; Tiazóis; BSA; Antimicrobiano.

ABSTRACT

Medicinal chemistry is an essential field in the discovery of new compounds with therapeutic activity, enabling the development of new drugs to treat various diseases. Additionally, rational modifications in chemical skeletons allow for the improvement of therapeutic activity of treatments currently available in clinical settings. In this context, thiazoles and thiosemicarbazones have been the subject of research due to their diverse pharmacological activities. In this study, our aim was to synthesize and characterize seven new quinoline-thiosemicarbazone compounds (CG-1 to CG-7) and evaluate their *in silico* ADMET properties and *in vitro* antioxidant, cytotoxic, antifungal, and interaction with Bovine Serum Albumin (BSA). The compounds were obtained by the indirect reaction with thiosemicarbazide derivatives, through nucleophilic addition between hydrazine and corresponding isothiocyanates. The derivatives were characterized through spectroscopic techniques and bioinformatics tools. Regarding ADMET prediction, the compounds were classified as moderately soluble by binding with serum proteins and inhibitors of the main isoforms of cytochrome P450, with low theoretical values of total clearance. Additionally, compound CG3 showed the highest predicted toxicity risk. All compounds had good oral bioavailability prediction without violation of Lipinski and Veber rules. The compounds showed weak to moderate *in vitro* antifungal activity, with better action against *Candida tropicalis* (HAM 44). Regarding antioxidant activity, CG-1 showed the best activity compared to other compounds, with results of 38.9% and 99.4% in DPPH and ABTS tests, respectively. In the evaluation of *in vitro* cytotoxic activity, the compounds showed high IC₅₀ values for different cell types and hemolytic activity >7.0%, indicating that the compounds are not cytotoxic or hemolytic. The fluorescence suppression mechanism promoted by the compounds against bovine albumin is dynamic and reversible, through hydrophobic and electrostatic interactions, a spontaneous process with a high probability of energy transfer. These results strongly contribute to studies in the field of therapeutic innovation in the search for new compounds of interest.

Keywords: Thiosemicarbazones; ADMET; Thiazoles; BSA; antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Arsfenamina, nome químico 3,3'- diamino-4,4'- di-hidroxi-arsenobenzol	14
Figura 2. Classes químicas dos antimicrobianos que surgiram após a arsfenamina	15
Figura 3. Tiossemicarbazonas e processos de obtenção.	19
Figura 4. Representação da tiossemicarbazonas e seus bioisósteros e suas aplicações farmacológicas.	20
Figura 5. Estruturas geral das tiossemicarbazonas	20
Figura 6. Estruturas de derivados tiossemicarbazônicos importantes na medicina	21
Figura 7. Representação das configurações <i>E</i> e <i>Z</i> das tiossemicarbazonas	22
Figura 8. Estruturas das vanilina-4-metil-tiossemicarbazonas e os complexos metálicos	23
Figura 9. Estruturas químicas das <i>N</i> -(tetra- <i>O</i> -acetil- β - <i>D</i> -glucopiranosil)-tiossemicarbazonas	24
Figura 10. Estruturas químicas das <i>O</i> -carboxi-metil-quitosana-tiossemicarbazonas	24
Figura 11. Lapachol e seus derivados	25
Figura 12. Espectro de Infravermelho (IV) do derivado CG-01	38
Figura 13. Curvas de atividade antioxidante <i>in vitro</i> promovida pelos compostos CGs frente aos ensaios de DPPH• (A) e ABTS ⁺ (B) respectivamente	43

LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS

	Pág.
Esquema 1. Rota de síntese para a obtenção das tiossemicarbazidas	27
Esquema 2. Rota geral de síntese das tiossemicarbazonas (CGs)	28
Tabela 1. Lista de bactérias para promover pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. Dividida em três categorias: Crítica, Alta e Média	17
Tabela 2. Características físico-químicas dos compostos CGs	37
Tabela 3. Sinais característicos de IV para caracterização dos compostos CGs	38
Tabela 4. Parâmetros da previsão <i>in silico</i> para os compostos CGs.	39
Tabela 5. Resultados de atividade antioxidante <i>in vitro</i> promovida pelos compostos para os ensaios de DPPH• e ABTS ⁺ respectivamente	43
Tabela 6. Resultados espectroscópicos da interação dos compostos CGs com albumina obtidos pela Equação linear de Stern-Volmer	45
Tabela 7. Resultados espectroscópicos da interação dos compostos CGs com albumina obtidos pela Equação linear de Stern-Volmer modificada	46
Tabela 8. Resultados espectroscópicos para obtenção dos valores de K_a e n , constante de ligação e o número de sítios de ligação, respectivamente	47
Tabela 9. Valores dos parâmetros termodinâmicos ΔH , ΔS e ΔG para as interações entre BSA e compostos CGs em diferentes temperaturas	48
Tabela 10. Parâmetros FRET calculados para os compostos CGs avaliados	49
Tabela 11. Resultados de citotoxicidade promovida pelas compostos CGs frente a diferentes células de mamíferos	50
Tabela 12. Resultados da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	52

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1 ANTIBIOTICOTERAPIA	14
3.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	15
3.3 TIOSSEMICARBAZONAS	19
3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS TIOSSEMICARBAZONAS	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 MATERIAIS	26
4.2 MÉTODOS	27
4.2.1 Síntese das Tiossemicarbazidas	27
4.2.2 Síntese das Tiossemicarbazonas	28
4.2.3 Avaliação <i>in silico</i> dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET)	30
4.2.4 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	30
4.2.5 Espectroscopia de emissão de fluorescência dos compostos com a BSA	31
4.2.6 Determinação da Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) entre a BSA e os compostos CGs	33
4.2.7 Atividade citotóxica frente a células de mamíferos J774-A1, células VERO, fibroblastos (V79) e HepG2	34
4.2.8 Atividade hemolítica <i>in vitro</i>	35
4.2.9 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	35
4.2.10 Análise estatística	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 CARACTERIZAÇÃO POR INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURRIER	37

5.2 AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DOS PARÂMETROS DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO, EXCREÇÃO E TOXICIDADE (ADMET)	38
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	42
5.4 ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DOS COMPOSTOS COM A BSA	44
5.5 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE LIGAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	46
5.6 PARÂMETROS TERMODINÂMICOS E FORÇAS DE LIGAÇÃO	47
5.7 TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA ENTRE OS CG'S E A BSA	49
5.8 CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE HEMOLÍTICA <i>IN VITRO</i> PROMOVIDA PELOS COMPOSTOS CGS	49
5.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	50
6. CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a resistência microbiana tornou-se uma ameaça crescente. O surgimento de patógenos multirresistentes representa uma grande ameaça à saúde pública a nível global. Esta problemática se faz cada vez mais presente na clínica médica humana e veterinária. Ocasionalmente, potentes septicemias, onde os tratamentos com os antimicrobianos vem cada vez mais perdendo sua eficácia, uma vez que as propriedades evolutivas desses patógenos multirresistentes, como a aquisição de genes de resistência, ocasionada por mecanismos de transferência horizontal, práticas de prescrição inadequadas da antibioticoterapia e demais processos que induzem o processo de resistência, conseguem anular as ações dos fármacos disponíveis no mercado (Neto et al. 2020; Qin *et al.* 2012).

Essa problemática traz consigo riscos para diversas áreas da sociedade, como saúde, segurança alimentar, comércio internacional e desenvolvimento econômico. A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que a resistência antimicrobiana resulta no aumento dos custos com saúde, internações hospitalares, tratamentos ineficazes, doenças graves e até mesmo mortes (700 mil por ano) (WHO, 2022).

A resistência antimicrobiana (RAM) representa uma ameaça em todo o mundo, é uma das principais causas de morte principalmente em locais com poucos recursos. Em 2019 foi estimada 4,95 milhões de mortes, destas, 1,27 milhão das mortes foram diretamente relacionadas com as consequências da resistência aos medicamentos, onde especialistas preveem que estes números podem aumentar ainda mais nos próximos anos (Gutsanu et al. 2020). Além disso, estimativas da OMS preveem a falência completa da antibioticoterapia até 2050. (Haldar, 2023.) Associado a isso, as poucas opções terapêuticas atualmente disponíveis são frutos diretos da era de ouro dos antibióticos, onde atualmente o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos apresenta uma série de desafios a serem superados (Uddin et al., 2021.).

Além das bactérias, espécies fúngicas também vem causando preocupações no cenário clínico, onde nos últimos anos há um aumento alarmante de infecções fúngicas, principalmente daquelas causadas por *Candida sp.* e *Cryptococcus sp.* A alta incidência dessas infecções causadas por essas leveduras representa um grande desafio, devido às dificuldades no diagnóstico. A candidíase é responsável por cerca de 2-3% de todas as infecções na Europa, a taxa média de mortalidade causada por candidemia é de 43%,

praticamente maior que qualquer outro tipo de infecção do fluxo sanguíneo (Lee *et al.*, 2017).

Infecções causadas por espécies de *Candida* resistentes a antifúngicos é um problema emergente, mostram uma taxa de resistência ao fluconazol de 0-5%, os valores mais altos estão estabelecidos na África do Sul. Na Dinamarca o aparecimento de espécies *Candidas não albicans* resistentes ao fluconazol é ainda maior, cerca de 5-65%. Esse cenário é preocupante, pois esse triazol é o único antifúngico disponível no mercado para o tratamento da candidíase em muitas partes do mundo (Khan *et al.*, 2017; Neto *et al.* 2020). Diante deste cenário alarmante da RAM recomenda-se a busca de novos “*scaffolds*”, e as tiossemicarbazonas aparecem como uma potencial alternativa. Outro fator encorajador é a facilidade na obtenção de novos derivados bioativos. Na química medicinal as tiossemicarbazonas têm ganhado grande atenção devido a sua versatilidade estrutural, 13 promissoras aplicações biológicas associada ao seu potencial farmacológico, dentre suas atividades, seu potencial antimicrobiano já está bem estabelecido (Gunduz *et al.*, 2021).

Neste trabalho apresentamos a síntese, caracterização química, absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), atividade antioxidante *in vitro*, além um estudo preliminar de citotoxicidade *in vitro* dos compostos frente às linhagens J774-A1 de macrófagos, células Vero, fibroblastos (V79), HepG2 e eritrócitos de hamster. Além do estudo de mecanismo de supressão de fluorescência promovido pelos compostos frente à albumina bovina (BSA) e avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos frente às cepas padrões e isolados clínicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar compostos quinolínicos-tiossemicarbazônicos, e avaliar suas propriedades ADMET *in silico* e *in vitro* como atividade antioxidante, citotóxica, antifúngica e estudo de interação com Albumina Sérica Bovina (BSA).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar sete compostos quinolínicos-tiossemicarbazônicos inéditos através de reação indireta com derivados tiossemicarbazida;
- Realizar o estudo *in silico* ADMET de compostos quinolínicos-tiossemicarbazônicos;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos compostos quinolínicos-tiossemicarbazônicos;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos compostos frente às linhagens J774-A1 de macrófagos, células Vero, fibroblastos (V79), HepG2 e eritrócitos de hamster;
- Avaliar o mecanismo de supressão de fluorescência promovido pelos compostos frente a albumina bovina (BSA);
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos frente às cepas padrões e isolados clínicos.

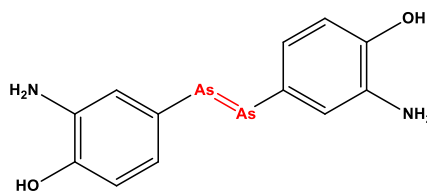
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ANTIBIOTICOTERAPIA

Antes da descoberta da penicilina em 1928, existiam poucos recursos disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas. Durante a Primeira Guerra Mundial os médicos dependiam principalmente de tratamentos não antibióticos, como banhos, compressas de água quente e cirurgia. No entanto, foram utilizados alguns antimicrobianos de forma experimental, como sulfato de cobre, mercúrio e prata para tratar infecções bacterianas (Cook; Wright, 2022). Na mesma ocasião também foram utilizados agentes químicos para limpeza de feridas, como solução de iodo e peróxido de hidrogênio. Contudo, havia uma elevada toxicidade nessas formas de tratamento. Além da ineficácia resultante das limitações no combate as infecções bacterianas, muitos soldados acabavam morrendo de infecções secundárias (Patrick, 1995; Pita;Pereira, 2014; Walsh, 2003)

O bacteriologista alemão Paul Erlich deu início à quimioterapia antimicrobiana há mais de um século, durante seus estudos para encontrar compostos que combatessem a sífilis (Sepkowitz, 2011). Em 1910, Erlich estabeleceu os conceitos fundamentais de que substâncias químicas poderiam interromper a proliferação de micro-organismos. Após experimentar mais de 600 compostos sintéticos, desenvolveu-se a arsfenamina, o primeiro antibiótico sintético, comercialmente conhecido como Salvarsan (Figura), utilizado no tratamento da sífilis (Bosch; Rosich, 2008).

Figura 1. Arsfenamina (3,3'- diamino-4,4'- di-hidroxi-arsenobenzol)



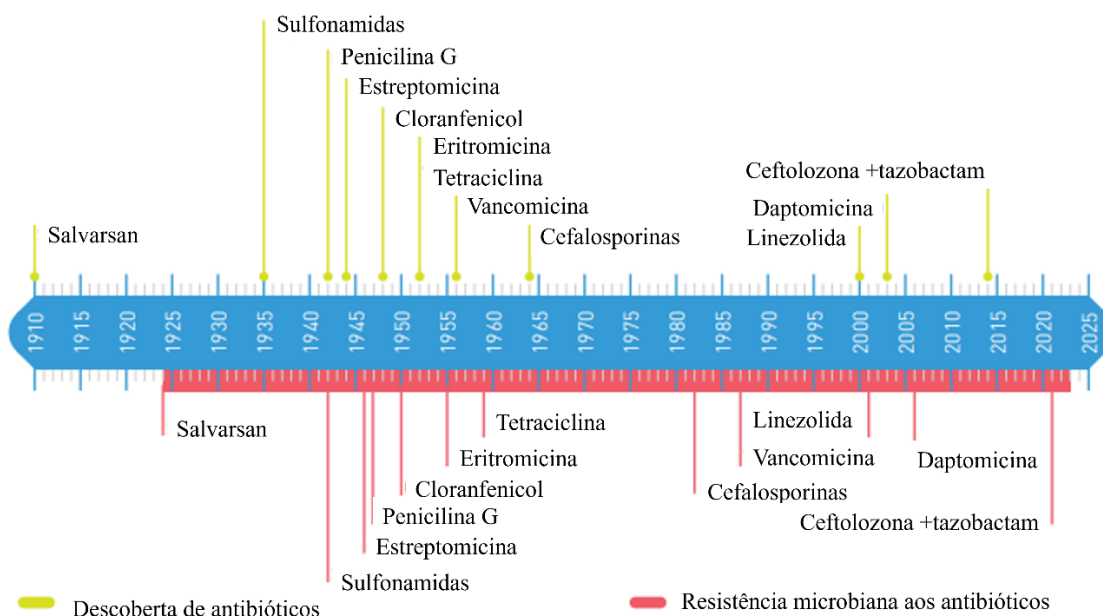
Fonte: O autor (2023).

A arsfenamina foi amplamente utilizada no tratamento da sífilis até que a penicilina, descoberta por Alexander Fleming em 1928, substituiu-a. Fleming isolou e identificou a penicilina como o primeiro antibiótico natural eficaz contra várias bactérias, incluindo aquelas responsáveis por pneumonia, meningite e infecções urinárias. Além da descoberta da penicilina, as técnicas de pesquisa in vitro para novos antimicrobianos foram desenvolvidas como resultado de seu trabalho. Apesar de seus efeitos colaterais, a

penicilina abriu novos horizontes na ciência e permitiu o desenvolvimento de uma nova geração de antimicrobianos, as sulfonamidas, na década de 1930. (Figura 2) (Patrick, 1995; Walsh, 2003).

Durante a Segunda Guerra Mundial, a crescente demanda por antimicrobianos impulsionou os esforços de pesquisa e produção. Nos Estados Unidos, a produção em massa de penicilina começou em 1941, liderada por cientistas como Howard Florey e Ernst Chain, em colaboração com a indústria farmacêutica. A penicilina, substituindo as sulfonamidas, juntamente com outros antimicrobianos, foi crucial no tratamento de feridos de guerra, salvando muitas vidas de infecções graves (Nicolau, 2008; Walsh, 2003). A partir dos anos 50, diversos novos antibióticos, como eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol e aminoglicosídeos, foram desenvolvidos para combater bactérias resistentes à penicilina, ampliando as opções de tratamento contra infecções. A descoberta de antimicrobianos continuou a acelerar nas décadas seguintes, incluindo antibióticos β -lactâmicos, análogos de penicilina e cefalexina, ácido clavulânico e aztreonam, além de novos medicamentos antivirais, antifúngicos e antiprotzoários (Guimarães *et al.*, 2010).

Figura 2. Classes químicas dos antimicrobianos que surgiram após a arsfenamina



Fonte: Adaptado de UNEP (2023)

3.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que a resistência antimicrobiana

gera aumento dos custos de saúde, internações hospitalares, falha no tratamento, doenças graves e morte. O rápido aumento da resistência antimicrobiana constitui uma das ameaças mais urgentes do mundo à saúde humana, animal, vegetal e ambiental, colocando em risco a segurança alimentar, o comércio internacional, o desenvolvimento econômico e prejudicando o progresso em direção aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (WHO, 2020).

Um dos primeiros relatos de resistência antimicrobiana data de 1947, quando isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina foram encontrados em um hospital nos Estados Unidos. Em 1952, um surto de infecções por *Salmonella typhimurium* não pôde ser tratado com sulfonamidas devido à resistência do patógeno, causada por uma mutação no gene que codifica a enzima alvo do fármaco. Em 1960, foi relatada a resistência a múltiplas drogas (MDR) pela primeira vez, com uma cepa de *S. aureus* resistente à penicilina, estreptomicina e cloranfenicol. Na década de 1990, novas classes de antimicrobianos, como fluoroquinolonas e cefalosporinas, foram desenvolvidas para combater bactérias resistentes, mas a resistência antimicrobiana persistiu como um desafio crescente, resultando em aumento da morbidade e mortalidade associadas às infecções (Jevons, 1961; Luria; Delbruck, 1943).

O crescente aumento da resistência antimicrobiana tem sido impulsionada pela disseminação excessiva e irresponsável de medicamentos antimicrobianos, o que leva à seleção de resistência, e continuam a se reproduzirem conduzindo as novas gerações de bactérias resistentes. Isso é um cenário perigoso, uma vez que as infecções resistentes a medicamentos podem refutar qualquer tipo de antibiótico disponível. Os esforços para desenvolver novas classes de antimicrobianos continuam, mas é necessário também promover a utilização racional desses medicamentos, a fim de reduzir a velocidade do desenvolvimento da resistência. Além disso, é importante desenvolver novas alternativas de antimicrobianos, como terapias imunológicas e vacinas (WHO, 2015).

Dados da OMS indicam que a resistência antimicrobiana (RAM) resulta em aproximadamente 700 mil mortes anuais globalmente, com projeções alarmantes de até 10 milhões de mortes até 2050, caso medidas urgentes não sejam adotadas para prevenir e controlar sua disseminação. A RAM já está comprometendo o tratamento de várias doenças, incluindo tuberculose, HIV/AIDS, malária e infecções bacterianas comuns, como pneumonia, infecções urinárias e sepses. Portanto, é essencial um esforço global coordenado e sustentado, abrangendo investimentos em pesquisa e desenvolvimento, prevenção e controle de infecções, uso criterioso de antimicrobianos, fortalecimento da

vigilância e monitoramento, além do desenvolvimento de novos antimicrobianos para enfrentar esse desafio (BRASIL, 2018; WHO, 2020).

No ano de 2017 a OMS divulgou uma lista com 12 bactérias e ou famílias bacterianas resistentes a antibióticos, nela encontram-se as bactérias com maior representatividade de ameaça à saúde humana (Tabela 1). A lista foi elaborada para orientar e promover pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, como parte dos esforços da OMS para enfrentar a crescente resistência. As bactérias foram divididas em três categorias: Crítica (que se enquadram as bactérias multirresistentes presentes em hospitais), Alta e Média (bactérias causadoras de infecções leves a graves).

Tabela 1. Lista de bactérias resistentes a antibióticos. Dividida em três categorias: Crítica, Alta e Média prioridade.

Bactéria ou família bacteriana	Resistência
Prioridade: Crítica	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenem
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenem
<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenem
Prioridade: Alta	
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina, Vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
<i>Campylobacter spp.</i>	Fluoroquinolona
<i>Salmonellae</i>	Fluoroquinolona
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporina, Fluoroquinolona
Prioridade: Média	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Não suscetível à penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
<i>Shigella spp</i>	Fluoroquinolona

Fonte: OMS, 2017.

A cada ano, milhões de pacientes em todo o mundo são internados em unidades de terapia intensiva (UTI), este ambiente hospitalar é frequentemente chamado de epicentro de infecções oportunistas e da propagação de microrganismos multirresistentes (Johani *et al.*, 2018). Cepas bacterianas enquadradas dentre as prioridades da OMS, geralmente são encontradas nos ambientes hospitalares. *Acinetobacter spp.* são grandes causadores de infecções hospitalares adquiridas, capazes de colonizar e infectar vários locais, possuindo a característica peculiar de serem resistentes a múltiplos fármacos (Patel *et al.*, 2019).

Pseudomonas aeruginosa tem sido reconhecida como uma bactéria mais comum

associada a infecções nosocomiais. Além disso, apresenta resistência a uma variedade de antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, quinolonas e β -lactâmicos, sendo listada como prioridade crítica pela OMS no desenvolvimento de novos antibióticos (Pang *et al.*, 2019). Cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* vêm causando muitos danos a pacientes hospitalizados, sendo a principal causa de doenças infecciosas disseminadas e potencialmente letais, incluindo pneumonia necrotizante, endocardite, osteomielite e bacteremia (Tafvizi *et al.*, 2019).

Também destacamos a emergência mundial de *New Delhi metallo- β -lactamase-1* (NDM-1) como uma carbapenemase capaz de hidrolisar quase todos os antibióticos β -lactâmicos disponíveis, fato que marcou a última década, colocando em risco tratamentos antibacterianos eficazes. Nenhum inibidor de NDM-1 está disponível em terapia, nem há compostos promissores em andamento para futuros inibidores de NDM-1 (Lincione *et al.*, 2018).

Muitas infecções hospitalares são causadas por microrganismos multirresistentes, o que prolonga o tempo de tratamento. Kato *et al.* (2018) observaram que o uso prolongado de antibióticos pode resultar em infecções fúngicas nosocomiais, associadas a 20 espécies de *Candida*. *Candida albicans* é o agente causador principal da candidíase, a infecção fúngica mais comum em humanos, sendo a principal causa de Candidemia. *Candidas* spp não-*albicans*, como *C. tropicalis*, também podem estar presentes (Ying *et al.*, 2019).

Chew *et al.* (2019) conduziram um estudo com três pacientes com sepse, nos quais *C. tropicalis*, *Trichosporon asahii* e *C. glabrata* foram identificados, resultando em óbito devido à falta de eficácia dos tratamentos utilizados, sugerindo uma possível resistência das cepas aos antifúngicos. O número de isolados clínicos resistentes está em crescimento anual, associado a resistência cruzada entre os antifúngicos, aumento de pacientes imunocomprometidos e uso prolongado ou incorreto desses medicamentos pela população (Bianchin *et al.*, 2019).

De acordo com relatório dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA, *C. glabrata* é uma ameaça crescente devido à sua frequente resistência aos antifúngicos (Alnajjar *et al.*, 2018). A terapia disponível para infecções por *Candida* spp. é restrita a quatro classes principais de antifúngicos: azóis, polienos, fluoropirimidinas e equinocandinas. Muitas cepas apresentam resistência intrínseca aos azóis, polienos e fluoropirimidinas, tornando as equinocandinas uma alternativa para os isolados resistentes (El-Houssaini *et al.*, 2019). De acordo com a OMS a resistência é um problema

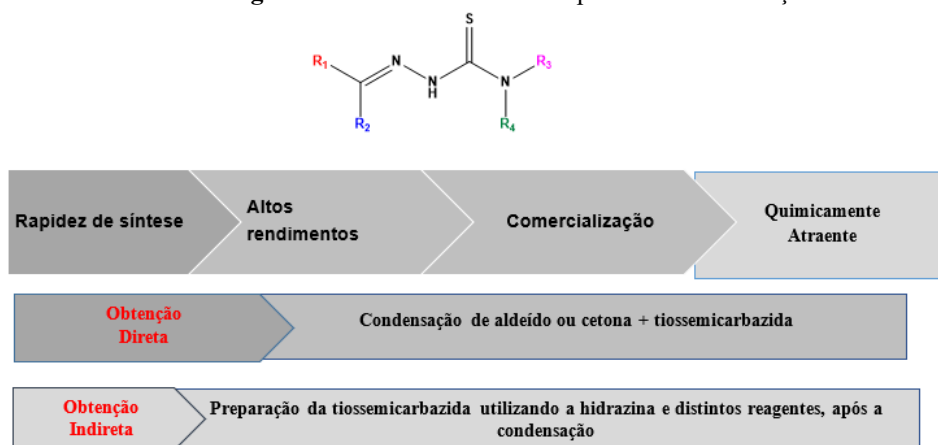
que ameaça a saúde pública, devido ao surgimento de cepas bacterianas e fúngicas resistentes aos antimicrobianos convencionais, portanto, a pesquisa e o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas tornam-se necessárias ao combate a estes organismos.

3.3 TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas, também chamadas de bases de Schiff, são compostos orgânicos versáteis com diversas atividades biológicas. São ligantes orgânicos contendo átomos de nitrogênio (N) e enxofre (S) que atuam como doadores de elétrons. Podem existir em equilíbrio tautomérico na forma tiona ou tiol, sendo úteis como intermediários na síntese de heterocíclicos e armazenadas facilmente sem necessidade de condições especiais, sendo resistentes à luz (Tenorio *et al.*, 2005; Silva, 2016).

Essas bases são facilmente acessíveis e de baixo custo na síntese química, com boa reatividade e altos rendimentos, permitindo a produção de uma variedade de análogos (Scarim *et al.*, 2019). Podem ser obtidas diretamente, pela reação da tiossemicarbazida comercial com aldeídos ou cetonas em meio alcoólico com catalisador ácido, ou indiretamente, pela prévia preparação da tiossemicarbazida e subsequente reação com o composto carbonilado desejado (Oliveira *et al.*, 2015; Tenorio *et al.*, 2005; Silva, 2016).

Figura 3. Tiossemicarbazonas e processos de obtenção.



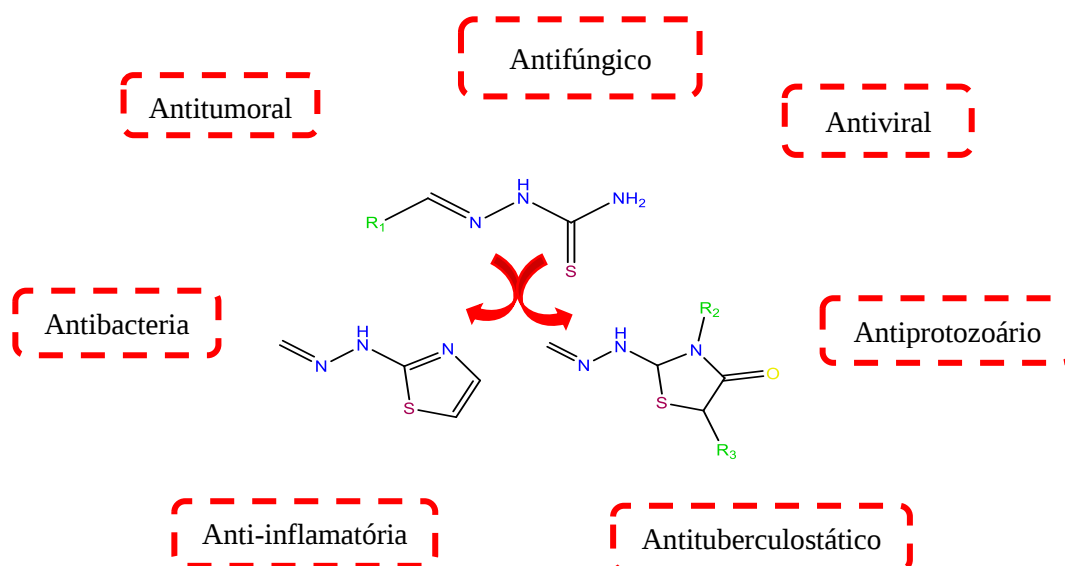
Fonte: O autor (2023).

Alterações estruturais podem resultar em diferentes atividades biológicas. Por exemplo, tiossemicarbazonas derivadas da piridina com grupos alquila no nitrogênio terminal têm maior atividade antiviral do que os análogos não substituídos. Grupos volumosos no nitrogênio terminal aumentam a atividade antitumoral, enquanto os substituintes volumosos na acetilpiridina melhoram a eficácia como agentes antimalária

(Tasdemir *et al.*, 2014).

Nas décadas de 1950 e 1960, as tiossemicarbazonas foram estudadas como potenciais agentes antitumorais devido à sua capacidade de complexar íons metálicos e inibir a atividade de enzimas como a ribonucleotídeo redutase e a Topoisomerase II (Tasdemir *et al.*, 2014). As tiossemicarbazonas, quando reagem com acetofenonas, geram seus bioisómeros tiazol e tiazolidinona, que demonstram um perfil farmacológico notável, incluindo atividades antifúngicas, antivirais e antitumorais, entre outras (Siqueira *et al.*, 2019).

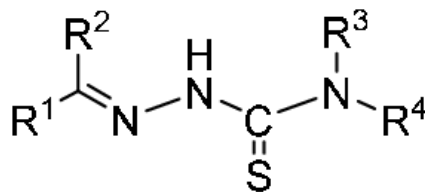
Figura 4. Representação da tiossemicarbazonas, seus bioisómeros e suas aplicações farmacológicas.



Fonte: Adaptado de SIQUEIRA et al. (2022)

As tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos têm sido estudados nos últimos 50 anos por suas diversas aplicações biológicas. Acredita-se que a presença do átomo de enxofre e sua capacidade de se ligar aos metais no sistema biológico seja a principal razão para suas atividades biológicas, como anticancerígena, antitumoral, antifúngica, antibacteriana, antimalárico, antiviral e anti-HIV (Nehar et al. 2020; Sivaraj et al. 2019).

Figura 5. Estruturas geral das tiossemicarbazonas



Fonte: O autor (2023).

As tiossemicarbazonas são consideradas ligantes orgânicos e são compostas por átomos de nitrogênio e enxofre. Essas moléculas destacam-se pela presença das partes hidrazona (HC=N-NH-) e tioamida (S=C-N-). Essa classe de compostos é conhecida por sua fácil obtenção, baixo custo de síntese e pela sua versatilidade no uso tanto como composto final quanto como intermediário na síntese de outras classes de compostos orgânicos. São moléculas com excelentes propriedades quelantes, podendo formar complexos estáveis e encontrar aplicações em diversas áreas (Neto *et al.*, 2017; Oliveria *et al.*, 2016).

Em 1963, a metisazona, também conhecida como N-metilisatina tiossemicarbazona, teve sua eficácia comprovada na prevenção do vírus da varíola. O medicamento, denominado Marboran (Figura 6) quando comercializado, foi utilizado como profilaxia contra a varíola na Índia. No entanto, devido aos efeitos colaterais (náuseas e vômitos), o uso do composto foi suspenso (Bauer, 1965).

Figura 6. Estruturas de derivados tiossemicarbazônicos importantes na medicina



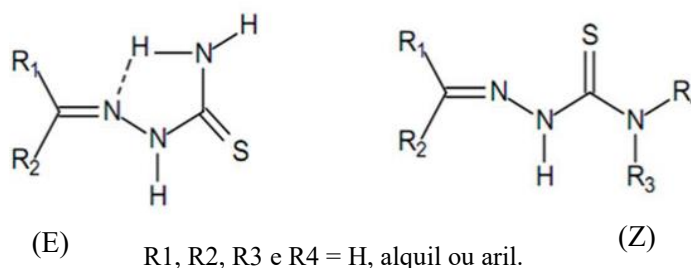
Fonte: Adaptado de SIVARAJ et al. (2019).

A tioacetazona, uma tiossemicarbazona sintetizada por Behnisch, Mietzsch e Schmidt, foi estudada por Domagk para avaliar a inibição do crescimento do bacilo da tuberculose *in vitro* e no tratamento da tuberculose experimental. Em 1950, demonstrou-se benéfica no tratamento de pacientes com tuberculose pulmonar avançada, embora com limitações devido aos efeitos adversos (Cohen;Frost;Yue, 1953). Atualmente, diversos compostos tiossemicarbazônicos, como o Triapine (3-amino-2-piridinocarboxaldeído),

DpC (di-2-piridilcetona-4-ciclohexil-4-metil-3-tiossemicarbazona) e COTI-2 ((E)-N'-(6,7-dihidroquinolina-8(5H)-ilideno)-4-(piridina-2-il)piperazina-1-carbotiohidrazida), estão sendo testados em ensaios clínicos de fase I e II contra vários tipos de câncer (Sivaraj *et al.*, 2019).

As atividades biológicas concernentes às tiossemicarbazonas resultam da habilidade de formar complexos com íons metálicos. Por consequência da deslocalização de elétrons π , elas podem coexistir nas formas tiona e tiol em equilíbrio tautomérico. A forma tiona atua como ligante neutro bidentado enquanto a forma tiol se desprotona e atua como ligante aniônico (Figura 7) (Kurup; Joseph, 2006; Tenório *et al.*, 2005).

Figura 7. Representação das configurações E e Z das tiossemicarbazonas



Fonte: O autor (2023).

As tiossemicarbazonas, no estado sólido, geralmente se apresentam como misturas dos isômeros E e Z (Afrasiabi *et al.*, 2003). Em solução, há uma isomerização da configuração Z para E devido à maior estabilidade termodinâmica do isômero E, influenciada pela presença de ácido e pelos grupos substituintes ligados ao carbono azometina e ao nitrogênio da tioamida (N-4). Tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos tendem a formar preferencialmente o isômero E, mais estável, enquanto a proporção entre os isômeros E e Z em tiossemicarbazonas derivadas de cetonas assimétricas depende da estrutura dos substituintes ligados à carbonila (; Costa *et al.*, 2003; Ota *et al.*, 1998).

3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS TIOSSEMICARBAZONAS

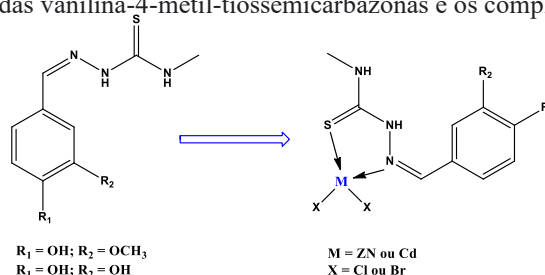
As chalconas associadas as tiossemicarbazonas vêm se destacando na literatura pela variedade de atividades biológicas, entre elas a antimicrobiana. As chalconas-tiossemicarbazonas permitem a formação de complexos metálicos com manganês, cobre e zinco. Em seguida, realizaram a avaliação da atividade biológica de todos os complexos

preparados contra bactérias *S. aureus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*. A maioria dos produtos sintetizados exibiu potência moderada a boa contra bactérias em comparação aos fármacos padrão (Hirapara et al., 2023).

Um estudo realizado por Abu-Reidah et al. (2022) descreveu a síntese de compostos chalconas-tiossemicarbazonas contendo substituintes trifluorometil e trifluorometoxi e a avaliação da atividade antibacteriana contra cepas patogênicas de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*) e Gram-negativas (*E. coli*) e fúngicas (*C. albicans* e *Aspergillus niger*). Neste estudo, os compostos com grupo trifluorometoxi foram mais eficazes do que aqueles com grupo trifluorometil. Entre os vinte compostos, dois compostos apresentaram a maior atividade antimicrobiana em comparação aos padrões, sem mostrar citotoxicidade.

Jaafar et al. (2022) destacam a síntese de complexos metálicos com tiossemicarbazonas como possíveis antimicrobianos. Foram testadas as atividades desses complexos e de vanilina-4-metil-tiossemicarbazonas e 3,4-dihidroxibenzaldeído-3 metil-tiossemicarbazona contra *Enterococcus faecalis*, *B. subtilis*, *A. baumannii*, *Paracoccus yeei*, *A. fumigatus* e *C. albicans*. Os resultados mostraram atividade antibacteriana dos ligantes contra *E. faecalis* e *A. baumannii*, com destaque para o complexo de zinco, que apresentou atividade específica contra *A. baumannii*. No entanto, os complexos de cádmio foram inativos contra bactérias Gram-positivas, mas exibiram atividade antibacteriana em uma faixa de concentração de $1,25 \pm 0,02$ e $2,08 \pm 0,4$ µg/mL contra Gram-negativas *P. yeei* e *A. baumannii*, respectivamente.

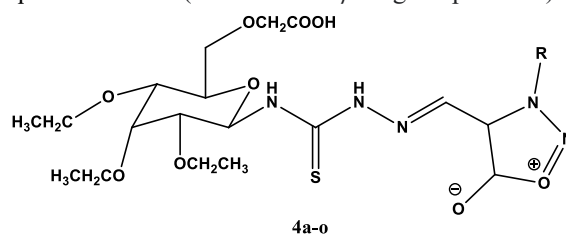
Figura 8. Estruturas das vanilina-4-metil-tiossemicarbazonas e os complexos metálicos



Than et al. (2015) realizou Fonte: O autor (2023). a síntese de *N*-(tetra-*O*-acetil- β -*D*-glucopiranosil)-tiossemicarbazonas (Figura 9) constataram que dentre os diversos compostos testados, quatro compostos (4k, 4l, 4m e 4n) se destacaram. Os derivados tiossemicarbazônicos foram os mais ativos contra todas as cepas bacterianas testadas, especialmente contra *S. epidermidis*, *B. subtilis* e *E. coli*. Os valores de MIC nesses casos são 0,156, 0,156 e 0,313 µg/mL, respectivamente. Todos os compostos apresentaram

atividade antifúngica de fraca a moderada contra *C. albicans* e *A. niger* do que a nistatina (MIC = 0,156 – 0,625 µg/mL vs. MIC = 0,078 µg/mL de nistatina), e as tiossemicarbazonas 4l, 4m e 4n exibiram atividade significativa com MIC = 0,156 µg/mL. Esses compostos também apresentaram boa atividade antifúngica contra *F. oxysporum* semelhante à nistatina (CIM = 0,156 µg/mL).

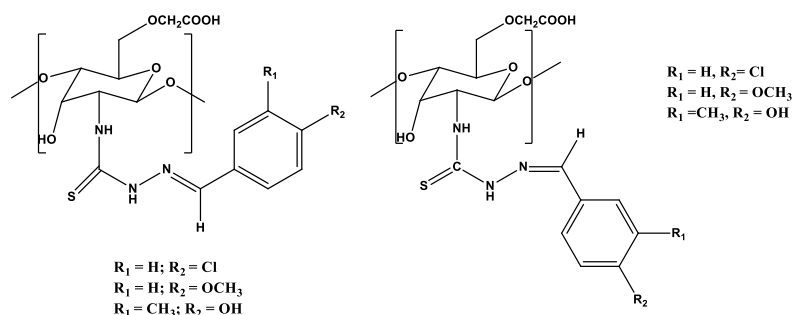
Figura 9. Estruturas químicas das *N*-(tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)-tiossemicarbazonas



Fonte: O autor (2023).

Três novos derivados de tiossemicarbazona *O*-carboximetilquitosana (Figura 10) foram obtidos por meio de uma reação de condensação de tiossemicarbazida *O*-carboxi-metil-quitosana com *o*-hidroxibenzaldeído, *p*-metoxibenzaldeído e *p*-clorobenzaldeído, respectivamente. Suas estruturas foram caracterizadas por análise elementar, FTIR, RMN¹³C e difração de raios X. O comportamento antimicrobiano dos derivados foi avaliado contra três tipos de bactérias: *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli* e três culturas de fungos patogênicos *A. fumigatus*, *Geotrichum candidum* e *C. albicans*. Os resultados indicados mostram que as atividades antibacteriana e antifúngica dos derivados foram mais potentes no caso de bactérias Gram-positivas do que Bactérias Gram-negativas. A presença de átomo de cloro retirador de elétrons na porção arila da porção de aldeído melhorou muito a atividade antimicrobiana para ser quase equivalente ao padrão utilizado (Mohamed et al., 2014).

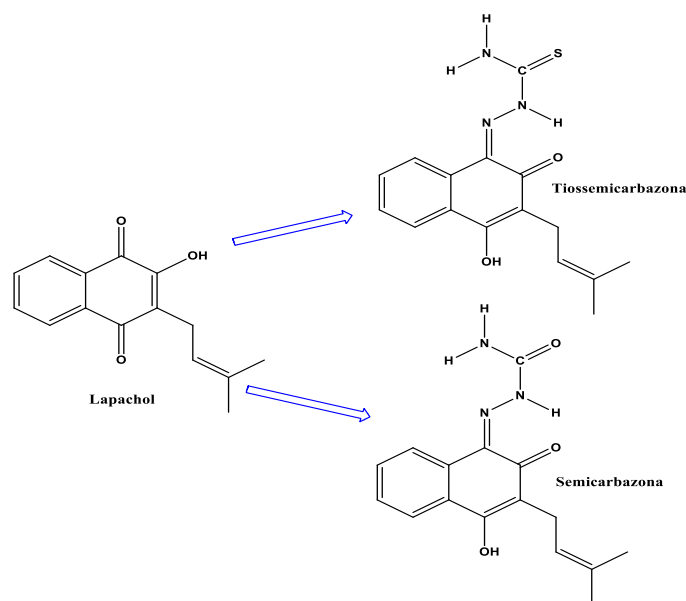
Figura 10. Estruturas químicas das *O*-carboxi-metil-quitosana-tiossemicarbazonas.



Fonte: O autor (2023).

Utilizando o Lapachol como produto de partida também obtive composto tiossemicarbazônico e semicarbazônico (Figura 11). O Lapachol é uma naftoquinona isolada de várias espécies de plantas da família Bignoniáceas. Esses derivados exibiram atividade antimicrobiana contra as bactérias *E. faecalis* e *S. aureus* na concentração inibitória mínima (MICs) de 0,05 $\mu\text{mol/mL}$. O composto tiossemicarbazônico também foi ativo contra a levedura patogênica *Cryptococcus gattii* (CIMs de 0,10 $\mu\text{mol/mL}$). Além disso, esses derivados obtidos foram ativos contra 11 isolados clínicos de *Paracoccidioides brasiliensis*, com MICs variando de 0,01 - 0,10 $\mu\text{mol/mL}$. A tiossemicarbazona derivada do Lapachol não foi citotóxica para células normais nas concentrações que foram ativas contra fungos e bactérias (Souza *et al.*, 2013).

Figura 11. Lapachol e seus derivados.



Fonte: O autor (2023).

Desta forma, o estudo estrutural e síntese de compostos obtidos a partir tiossemicarbazonas foram analisados e ainda continuam sendo explorados devido às suas notáveis atividades biológicas, e farmacêuticas. As tiossemicarbazonas geralmente atuam como ligantes quelantes com íons de metais de transição, ligando-se através dos sítios doadores mono, di ou tridentados que são encontrados no grupo tioamida e átomos de nitrogênio de hidrazina. Assim, a literatura retrata a importância das tiossemicarbazonas.

Diante da crise mundial de resistência antimicrobiana, e o esgotamento de

alternativas terapêuticas para tratar superbactérias e fungos multirresistentes, torna-se essencial o incentivo e fortalecimento da pesquisa e desenvolvimento de novos compostos como potenciais fármacos antimicrobianos. Através dos estudos apresentados é possível observar que a classe de compostos tiossemicarbazônicos tem apresentado resultados promissores na inibição de crescimento microbiano de diversos patógenos. Isso demonstra que moléculas cujo esqueleto químico contempla as tiossemicarbazonas, apresentam em sua estrutura química características importantes capazes torná-los potenciais antimicrobianos como prováveis alternativas no tratamento de microrganismos resistentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os reagentes e solventes utilizados foram: vermelho de fenol (CAS: 143-74-8), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (CAS: 1898-66-4), 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) (CAS: 30931-67-0), dimetilsulfóxido (DMSO) (CAS: 67-68-5), metanol (CAS: 67-56-1), ácido ascórbico (CAS: 50-81-7), hidroxitolueno butilado (BHT) (CAS: 128-37-0), cloreto de sódio (CAS: 7647-14-5), cloreto de cálcio (CAS: 10043-52-4), Triton™ X-100 (CAS: 9036-19-5), albumina de soro bovino (BSA) (CAS: 9048-46-8), hidrazina 80% (CAS: 302-01-2), Fenil-isotiocianato (CAS: 103-72-0); 4-flúor-fenil-isotiocianato (CAS: 1645-65-4); 4-nitro-fenil-isotiocianato (CAS: 2131-61-5); 4-etil-fenil-isotiocianato (CAS: 18856-63-8); 4-cloro-fenil-isotiocianato (CAS: 2131-55-7); 4-metóxi-fenil-isotiocianato (CAS: 2284-20-0); 4-bromo-fenil-isotiocianato (CAS: 1985-12-2), 2-Cloro-3-quinolinacarboxialdeído (CAS: 73568-25-9), 2-bromo-acetofenona (CAS: 2142-69-0), 2,4-Dibromo-acetofenona (CAS: 99-73-0).

Todos os reagentes utilizados na síntese foram fornecidos pela Merck. Já os solventes utilizados foram diclorometano, etanol absoluto, Ácido acético glacial e Acetona. Todos os solventes foram fornecidos pela Dinâmica.

A verificação da formação do produto, assim como, os seus respectivos sinais de pureza ocorreram por meio do método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel Polygram Sil G/UV 254 de 0,20 mm de espessura, sendo

reveladas por luz ultravioleta em 254 nm na câmara de radiação ultravioleta Vilber Loumart.

O sistema de solventes orgânicos utilizado na CCD foi *n*-hexano/acetato de etila, em que suas proporções dependeram diretamente da afinidade dos compostos pela fase móvel ou pela fase estacionária.

Os pontos de fusão dos compostos foram obtidos por meio da análise da amostra do produto, colocada em um capilar com uma das extremidades fechadas, em fusiômetro de ponto de fusão a seco (Modelo 431D - Fisatom, Brasil).

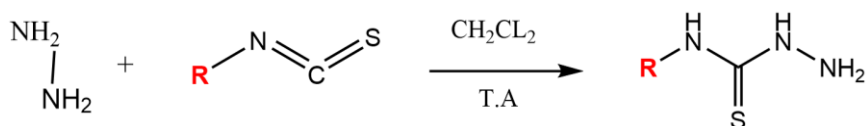
Para realizar a caracterização estrutural dos compostos sintetizados foram utilizadas técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C), realizados em Modelo *Varian Plus Spectrofotometro* (Varian, EUA) a 400 MHz e 100 MHz, respectivamente, a partir de soluções dos compostos em solvente DMSO – *d*6. Além disso, foi realizada a Espectroscopia de Infravermelho (IV) na região de 4000-400 cm^{-1} utilizando o Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier, em UATR, à temperatura ambiente.

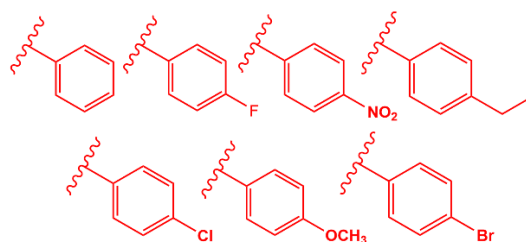
4.2 MÉTODOS

4.2.1 Síntese das Tiossemicarbazidas

Essa primeira etapa ocorreu de acordo com a metodologia aplicada por Gürsoy, Terzioglul, Ötük (1997) e Liesen et al. (2010), em que ocorre devido a uma adição nucleofílica entre a hidrazina e o isotiocianato. Para isso, inicialmente em um balão de fundo redondo de 125mL, tendo como solvente 10mL de diclorometano e 0,05mM de isotiocianato, e sob agitação, foi adicionada lentamente 1mM de hidrazina (Esquema 1). A reação ocorreu sob temperatura ambiente e agitação durante 1 hora. Todas as tiossemicarbazidas produzidas precipitaram durante a reação. Todas as reações foram acompanhadas por meio de Cromatografia em Camada Delgada.

Esquema 1. Rota de síntese para a obtenção das tiossemicarbazidas



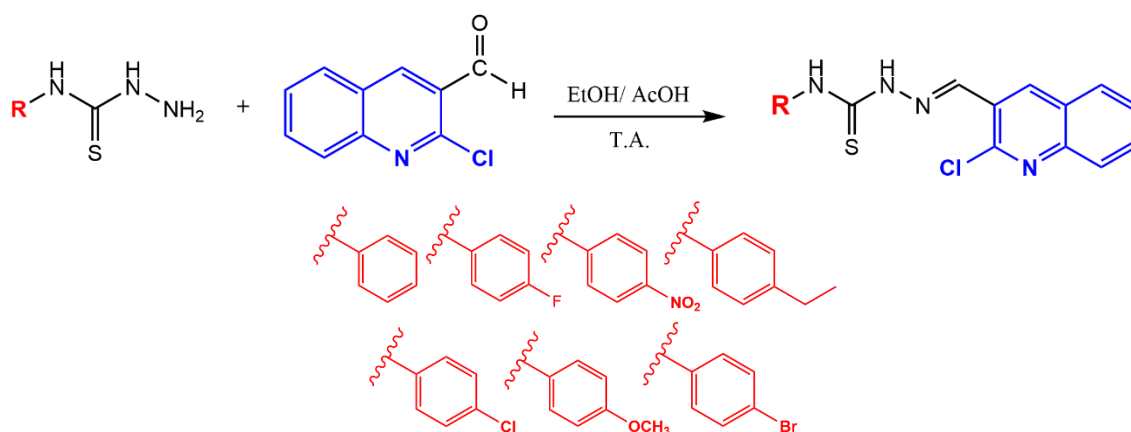


Fonte: O autor (2023).

4.2.2 Síntese das tiossemicarbazonas

Para a segunda etapa objetivou-se a obtenção dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas segundo a metodologia descrita por Jacob et al. (2023), onde o núcleo quinolínico se destaca com o “*scaffolds*” para conduzir as tiossemicarbazonas em estudo (Esquema 2). A síntese foi realizada em proporções equimolares (1:1) sob agitação e temperatura ambiente. Inicialmente, em um balão de 125 mL foram adicionados 10 mL de etanol e a 2-cloro-quinolina carbaldeído. O sistema reacional ocorreu sob agitação e temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 2 mL de ácido acético e após 10 minutos sob agitação foi adicionado o intermediário tiossemicarbazidas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) para verificar a formação do produto e o seu término e da reação. Após o término da reação as amostras foram filtradas e purificadas através de cristalizações sucessivas em solvente adequado.

Esquema 2. Rota geral de síntese das tiossemicarbazonas (CGs)



Fonte: O autor (2023).

Composto CG01: Síntese do (E)-2-((2-cloro-7,8-di-hidroquinolin-3-il)-metileno)-N-fenil-hidrazina-1-carbotioamida. A mistura de 2-cloroquinolina-3-carbaldeído (0,8g - 4,18mmol), *N*-fenil-hidrazino-carbotioamida (0,7g - 4,18 mmol), etanol absoluto (20mL),

ácido acético glacial (1mL) foram mantidos sob agitação e na temperatura de ambiente durante 1-2 horas.

Composto CG02: Síntese do (E)-2-((2-cloro-7,8-dihidroquinolin-3-il)-metileno)-N-(4-fluorofenil)-hidrazina-1-carbotioamida. A mistura de 2-cloroquinolina-3-carbaldeído (0,72g - 3,78mmol), *N*-(4-fluorofenil)-hidrazino-carbotioamida (0,7g - 3,78mmol), etanol absoluto (20mL), ácido acético glacial (1mL) foram mantidos sob agitação e na temperatura ambiente durante 1-2 horas.

Composto CG03: Síntese do (E)-2-((2-cloro-7,8-dihidroquinolin-3-il)-metileno)-N-(4-nitrofenil)-hidrazina-1-carbotioamida. A mistura de 2-cloroquinolina-3-carbaldeído (0,63g - 3,3mmol), *N*-(4-nitrofenil) hidrazino-carbotioamida (0,7g - 3,3mmol), etanol absoluto (20mL), ácido acético glacial (1mL) foram mantidos sob agitação e na temperatura ambiente durante 1-2 horas.

Compostos CG04: Síntese do (E)-2-((2-cloro-7,8-dihidroquinolin-3-il)-metileno)-N-(4-etilfenil)-hidrazina-1-carbotioamida. A mistura de 2-cloroquinolina-3-carbaldeído (0,68g - 3,6mmol), *N*-(4-etilfenil) hidrazino-carbotioamida (0,7g - 3,6mmol), etanol absoluto (20mL), ácido acético glacial (1mL) foram mantidos sob agitação e na temperatura ambiente durante 1-2 horas.

Composto CG05: Síntese do (E)-2-((2-cloro-7,8-dihidroquinolin-3-il)-metileno)-N-(4-clorofenil)-hidrazina-1-carbotioamida. A mistura de 2-cloroquinolina-3-carbaldeído (0,66g - 3,5 mmol), *N*-(4-clorofenil) hidrazino-carbotioamida (0,7g - 3,5 mmol), etanol absoluto (20mL), ácido acético glacial (1mL) foram mantidos sob agitação e na temperatura ambiente durante 1-2 horas.

Composto CG06: Síntese do (E)-2-((2-cloro-7,8-dihidroquinolin-3-il)-metileno)-N-(4-metoxifenil)-hidrazina-1-carbotioamida. A mistura de 2-cloroquinolina-3-carbaldeído (0,48g - 2,5mmol), *N*-(4-metoxifenil)-hidrazino-carbotioamida (0,5g - 2,5mmol), etanol absoluto (20mL), ácido acético glacial (1mL) foram mantidos sob agitação e na temperatura durante 1-2 horas.

Compostos CG07: Síntese do (E)-N-(4-bromofenil)-2-((2-cloro-7,8-dihidroquinolin-3-il)-metileno)-hidrazina-1-carbotioamida. A mistura de 2-cloroquinolina-3-carbaldeído (0,39g - 2,04mmol), *N*-(4-bromofenil)-hidrazino-carbotioamida (0,5g - 2,06mmol), etanol absoluto (20mL), ácido acético glacial (1mL) foram mantidos sob agitação e na temperatura durante 1-2 horas.

4.2.3 Avaliação *in silico* dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET)

A previsão de propriedades farmacocinéticas em estágios iniciais de descoberta de novos fármacos, usando métodos baseados ferramentas bioinformáticas, está se tornando cada vez mais comum (Awadelkareem *et al.*, 2022; Lombardo *et al.*, 2003; Gleeson *et al.*, 2011; Hodgson, 2001). A lógica por trás das abordagens *in silico* é o custo relativamente menor e o fator de tempo envolvido, quando comparados às abordagens experimentais padrão para perfis ADMET (Dimasi *et al.*, 2003; Darvas *et al.*, 2002).

Para avaliação das propriedades farmacocinéticas e biodisponibilidade dos sete compostos, foram utilizadas duas plataformas gratuitas: pkcsm (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcs/prediction>) e swissadme (<http://www.swissadme.ch/index.php>). Os parâmetros obtidos foram avaliados segundo Pires *et al.* (2015) e Daina *et al.* (2017).

4.2.4 Atividade antioxidante *in vitro*

Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados de acordo com Jacob *et al.* (2023) e Santos *et al.* (2023) com poucas modificações. Inicialmente, os compostos foram dissolvidos em DMSO 1% em concentrações que variaram de 7.9 a 1000µg/mL. Para o ensaio de captura do radical livre DPPH, foi preparada uma solução de DPPH em etanol em uma concentração de 1 mM. Em seguida, alíquotas (1.0mL) dos compostos nas diferentes concentrações foram adicionadas a 2.0 mL do reagente DPPH. Os sistemas foram incubados a 25°C por 30 min na ausência de luz. Ao final da reação foram determinadas as absorbâncias em um espectrofotômetro UV-VIS a 517 nm. O branco do equipamento foi formado apenas por etanol e o controle experimental apenas a solução de DPPH. Para o ensaio de ABTS inicialmente, foi preparado o cátion ABTS•+ (5mL de solução-estoque de ABTS•+ com 88µL de solução de persulfato de potássio incubado por

16 h a 25°C na ausência de luz). A solução de ABTS•+ foi diluída em etanol até obter 0.75 a 734 nm. O sistema reacional foi formado por 1.0 mL dos compostos em diferentes concentrações e 2.0 mL do reagente ABTS. Em seguida, foram incubados por 20 min a 25°C na ausência de luz. Por fim, as absorbâncias foram determinadas em um UV-VIS a 734 nm. O branco do equipamento foi etanol e o controle experimental foi o reagente ABTS. Os padrões experimentais utilizados foram o ácido ascórbico e o hidroxitolueno butilado (BHT) nas mesmas condições experimentais para os ensaios (DPPH/ABTS). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a atividade antioxidante para ambos ensaios (DPPH/ABTS) foi calculada pela Equação 1.

$$\text{DPPH/ABTS (\%)} = \left(\frac{\text{ABS}_{\text{controle}} - \text{ABS}_{\text{amostra}}}{\text{ABS}_{\text{controle}}} \right) * 100 \quad (1)$$

Onde: ABS controle = absorbância de controle; ABS amostra = absorbância da amostra contendo o composto após o ensaio.

O coeficiente de inibição (EC_{50}), ou seja, a concentração mínima composto necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH ou ABTS+ em 50%, foi determinado por ajuste de regressão não linear da capacidade antioxidante versus as concentrações dos compostos.

4.2.5 Espectroscopia de emissão de fluorescência dos compostos com a BSA

Os ensaios de interação dos compostos com a albumina foram realizados segundo Jacob et al. (2023), Santos et al. (2023) e Xiao et al. (2023) com poucas modificações. Inicialmente, a BSA foi diluída em tampão Tris-HCl (0.1 M, pH 7.6) em uma concentração de 10 µM. Em seguida, foram adicionados 5.0 µL dos compostos em diferentes concentrações que variaram de 5 e 40 µM. Esse estudo foi realizado em três diferentes temperaturas: 298 K (25 °C), 303 K (30 °C) e 310 K (37 °C). Os sistemas foram homogeneizados por 10 min e posteriormente analisados em espectrofluorímetro Jasco FP-6300 utilizando uma cubeta de quartzo retangular, com comprimento de percurso óptico de 1 cm. Os parâmetros do equipamento para a realização das análises foram: varredura de 300 a 400 nm, comprimento de onda de excitação de 285 nm, bandas de excitação e emissão de 2.5 nm, resposta média, alta sensibilidade e velocidade de varredura em 500 nm/min. O mecanismo de extinção (interação) foi determinado através da equação de Stern-Volmer representada pela Equação 2 e 3 (Lakowicz, 2006).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0 \quad (2)$$

$$K_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0} \quad (3)$$

Onde: F_0 e F são as intensidades de fluorescência relativas na ausência e presença de composto, respectivamente, $[Q]$ é a concentração do composto (μM), K_{sv} é a constante de Stern-Volmer (M^{-1}), K_q é a constante de taxa de extinção bimolecular ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) e τ_0 é o tempo de vida médio do fluoróforo no estado excitado geralmente que geralmente tem um valor de $\sim 6.02 \times 10^{-9}$ s. Para obter a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi construído um gráfico F/F_0 versus $[Q]$.

Além da determinação das constantes de Stern-Volmer foi calculada a constante de Stern-Volmer modificada (K_a), isto é, a constante de supressão efetivas para os fluoróforos acessíveis, calculada pela Equação 4.

$$\frac{F_0}{(F_0 - F)} = \frac{1}{fK_a} * \frac{1}{[Q]} + \frac{1}{f} \quad (4)$$

Onde: K_a = constante de supressão efetiva para os fluoróforos acessíveis, ou constante de ligação de Stern-Volmer modificada; $[C]$ = concentração do composto, f = intensidade de fluorescência máxima fracional da proteína ou fração da fluorescência inicial que é acessível ao supressor (composto); F_0 e F são as intensidades de fluorescência relativas na ausência e presença do composto. Para obter a constante de Stern-Volmer modificada $F_0/(F_0-F)$ versus $[Q]$ foi plotado, onde $[C]$ é a concentração do composto.

Por fim, foram determinadas as forças de ligação e os parâmetros termodinâmicos, estes foram calculados pelas Equações 5, 6 e 7.

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_a + n \log[Q] \quad (5)$$

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (6)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

Onde: K_a e n são a constante de ligação e o número de sítios de ligação, respectivamente, que foram obtidos a partir do gráfico $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log [Q]$. R é a constante

universal do gás ($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (K), ΔH e ΔS representa a variação de entalpia e variação de entropia, respectivamente. Os parâmetros foram calculados a partir do gráfico de $\ln K_a$ versus $1/T$. ΔG é a variação de energia livre de Gibbs.

4.2.6 Determinação da Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET) entre a BSA e os compostos CGs

A eficiência do processo de transferência de energia por ressonância de Förster, E , é dependente da distância entre o doador (BSA) e os compostos CGs. A eficiência foi obtida utilizando a Equação 8 (LYNDEM et al. 2023).

$$E = 1 - \left(\frac{F}{F_0} \right) = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (8)$$

Onde: F e F_0 são as intensidades de fluorescência do doador em presença e em ausência dos compostos, respectivamente; R_0 , denominado raio de Förster, é a distância crítica entre o doador e o receptor onde a eficiência do processo é de 50%; e r é a distância centro a centro entre o doador e o receptor. O valor de R_0 foi obtido utilizando-se a Equação 9 (LYNDEM et al. 2023).

$$R_0 = 0.211 \left[\frac{\kappa^2 \phi_D J(\lambda)}{n^4} \right]^{\frac{1}{6}} \quad (9)$$

Onde: κ^2 é o fator de orientação espacial que descreve a geometria dos dipolos doadores e receptores ($2/3$); n é o índice de refração médio (1.33); ϕ_D é o rendimento quântico de fluorescência do doador em ausência do receptor (0.15); e J é o grau de sobreposição espectral entre espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do receptor. O valor de J foi obtido utilizando-se o software ae, Fluortools, e a Equação 10 (LYNDEM et al. 2023).

$$J = \int I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (10)$$

Onde: $I_D(\lambda)$ é a intensidade de emissão normalizada em determinado comprimento de onda. $\varepsilon_A(\lambda)$ é o coeficiente de excitação do receptor em determinado comprimento de

onda. As condições utilizadas para avaliar a FRET foram: temperatura de 298K, concentração dos compostos em 40 μ M (UV/Vis) e albumina em 10 μ M (fluorescência).

4.2.7 Atividade citotóxica frente a células de mamíferos J774-A1, células VERO, fibroblastos (V79) e HepG2

A fim de avaliar os efeitos citotóxicos em células de mamíferos foi realizado o ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) de acordo com Jacob et al. (2023) e Santos et al. (2023). Inicialmente, os compostos foram dissolvidos em DMSO 1% em uma concentração de 1000 μ M e em seguida diluídos em concentrações que variaram de 900 a 0.1 μ M. Para os ensaios de citotoxicidade as células utilizadas foram macrófagos J774-A1, células VERO, fibroblastos (V79) e HepG2. As células foram semeadas em uma concentração de 1×10^5 em placas de 96 poços contendo meio RPMI com vermelho de fenol suplementado e incubadas em uma atmosfera a 5% de CO₂ e 37 °C. Após 24 horas, as células foram incubadas na presença de várias concentrações dos compostos (0.1 a 900 μ M) por 72 horas.

Duas horas antes do término do tratamento, em cada poço foi adicionado 20 μ L da solução de MTT (5mg/mL). As placas foram incubadas novamente por mais 2 horas. Completado o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado com auxílio de uma micropipeta e os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 100 μ L de DMSO a cada poço. A leitura da absorbância dos cristais de formazan foi determinada por meio de ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA) em comprimento de onda 540 nm.

O controle experimental constituiu em apenas células crescidas em meio de cultura. Cada experimento foi conduzido em triplicata e réplica biológica. Além disso, foi avaliado o fluconazol nas mesmas condições dos compostos. A viabilidade celular foi calculada utilizando a Equação 11.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left(\frac{VC}{TC} \right) * 100\% \quad (11)$$

Onde VC é a quantidade de células em diferentes concentrações, TC é concentração de células no controle a qual representa viabilidade de 100%.

4.2.8 Atividade hemolítica *in vitro*

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz número de protocolo 164/2020.

Os experimentos foram realizados segundo Nehar et al. (2020) e Jacob et al. (2023) com modificações. Inicialmente, amostras de sangue foram coletadas de Hamster *Mesocricetus auratus*, (peso corporal médio de 30 g e idade de 7 a 8 semanas). Em microplacas de 96 poços foram adicionadas 50 µL de uma solução de NaCl a 0.85% contendo CaCl₂ a 10 mM, logo após receberam um volume de 50 µL dos compostos diluídos em DMSO 1% em concentrações que variaram de 28.12 a 900 µM. Em seguida, 100 µL de uma suspensão a 2% (v/v) de eritrócitos de hamster em solução salina contendo 10 mM de CaCl₂ foi adicionado. O controle consistiu de 100 µL de solução salina acrescido de 100 µL de suspensão de eritrócitos. Após centrifugação por 1 h, seguida de incubação por 1 h a 27 °C, o sobrenadante foi utilizado para determinar a absorbância da hemoglobina liberada em um comprimento de onda de 540nm em um leitor de placas Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

Os resultados da atividade hemolítica foram expressos pela Equação 12. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O controle positivo foi o Triton-X (100% de Hemólise), já o controle negativo (0% de hemólise) foi apenas a solução de eritrócitos.

$$\text{Hemólise (\%)} = \left[\frac{(\text{ABS amostra} - \text{ABS branco})}{(\text{ABS Triton X} - \text{ABS branco})} \right] * 100 \quad (12)$$

Onde: ABS amostra = Absorbância da amostra; ABS branco = absorbância do controle negativo; ABS Triton X = absorbância controle positivo.

4.2.9 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Os microrganismos foram cedidos pela Coleção de Culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Bioiências da Universidade Federal de Pernambuco. Foram selecionadas espécies de *Candida* spp. isolados clínicos e padrões, listados a seguir: HAM 11 - *C. albicans*; HAM 13 - *C. albicans*; HAM 14 - *C. parapsilosis*; HAM 15 - *C. albicans*; HAM 33 - *C. tropicalis*; HAM 43 - *C. tropicalis*; HAM 44 - *C. tropicalis*; ATCC90028 - *C. albicans*; URM 6393 - *C. glabrata*; 8026-15 - *C. parapsilosis*. A atividade foi determinada através da técnica de microdiluição seriada

em placa de 96 poços, seguindo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M60, 2018 para as leveduras).

Inicialmente foram preparadas as soluções mãe dos compostos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. Posteriormente foram preparadas as placas de 96 poços. 100 µL de meio RPMI foram adicionados em todos os poços, na coluna 1 fora adicionado mais 93,5 µL do meio RPMI e 6,5 µL da solução mãe contendo o composto, completando assim 200 µL de solução com a concentração inicial do composto em 128 µg/mL. Em seguida, a microdiluição seriada foi realizada até a coluna 9, obtendo assim as concentrações de 128 a 0,5 µg/mL do composto. As colunas 10, 11 e 12 foram utilizadas como controles. A coluna 10 como controle do fármaco padrão: RPMI + Fluconazol (com concentração de 64 µg/mL para todas as cepas testadas), a coluna 11 como controle do crescimento microbiano: RPMI + Microrganismos, e a coluna 12 como controle do meio de cultura: apenas o RPMI. Após as diluições e montagem dos controles, 10 µL de suspensão com concentração de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL de cada cepa foi adicionada às colunas 1 a 11. Após, as placas foram incubadas a 30° C por 48 horas. Passadas as 48 horas foram observadas as inibições visuais por poço. Para a confirmação da leitura 10 µL de cada poço das colunas 1 a 12 foram inoculadas em quadrantes criados em meio Agar Sabouraud Dextrose sobre placas de Petri, após foram incubadas a 30° C por 48 horas. Passado o tempo necessário, novas leituras foram realizadas baseadas na presença ou ausência de crescimento microbiano e na avaliação da redução de crescimento microbiano comparado com os controles utilizados.

4.2.10 Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos como média $\pm$ Desvio Padrão (DP). Comparações estatísticas foram feitas usando análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Um valor de $p < 0,05$ (probabilidade menor ou igual a 5%) indicou significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para desenvolver novos fármacos antifúngicos promissores, é essencial planejar estrategicamente sua síntese, visando substâncias que sejam ativas, seguras, seletivas, potentes e de fácil administração, com baixa toxicidade e boa biodisponibilidade. Isso requer um planejamento racional que leve em consideração a finalidade terapêutica desejada e utilize as melhores estratégias de síntese da química medicinal.

Desta forma, apresentamos a obtenção dos compostos 2-cloro-quinolínico-tiossemicarbazonas (CGs), que consiste em geral em duas etapas. Inicialmente foram obtidas as tiossemicarbazidas apresentando sete substituições. E, em seguida, por meio de uma reação de condensação com o 2-cloro-quinolina carbaldeído foram obtidas as tiossemicarbazonas (CGs). Os compostos sintetizados foram obtidos na forma de pó amorfo, em sua maioria de coloração amarelada. As faixas de fusão apresentaram oscilação de 182 a 217 °C, o Sistema utilizado para obtenção do fator de retenção foi o *n*-hex:AcOET, e os rendimentos variaram entre 45.01 a 91 % (tabela 2).

Tabela 2. Características físico-químicas dos compostos

CÓDIGO	R	F.M	Rdt%	P.F (°C)	RF / Sistema de eluição	M. M.(g/mol)
CG-01	H	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄ S	50.47	195 - 196	0,51 <i>n</i> -hex:AcOET 8:2	340.83
CG-02	F	C ₁₇ H ₁₂ ClFN ₄ S	64.45	182 - 183	0,57 <i>n</i> -hex:AcOET 7:3	358.82
CG-03	NO ₂	C ₁₇ H ₁₂ ClN ₅ O ₂ S	91	214 - 215	0,60 <i>n</i> -hex:AcOET 7:3	385.83
CG-04	CH ₂ CH ₃	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄ S	45.01	210 - 211	0,59 <i>n</i> -hex:AcOET 8:2	368.88
CG-05	Cl	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ S	65.35	213 - 214	0,51 <i>n</i> -hex:AcOET 8:2	375.27
CG-06	OCH ₃	C ₁₈ H ₁₅ ClN ₄ OS	70.35	204 - 205	0,51 <i>n</i> -hex:AcOET 7:3	370.86
CG-07	Br	C ₁₇ H ₁₂ BrClN ₄ S	58.58	215 - 216	0,61 <i>n</i> -hex:AcOET 8:2	417.97

Fonte: O autor (2023).

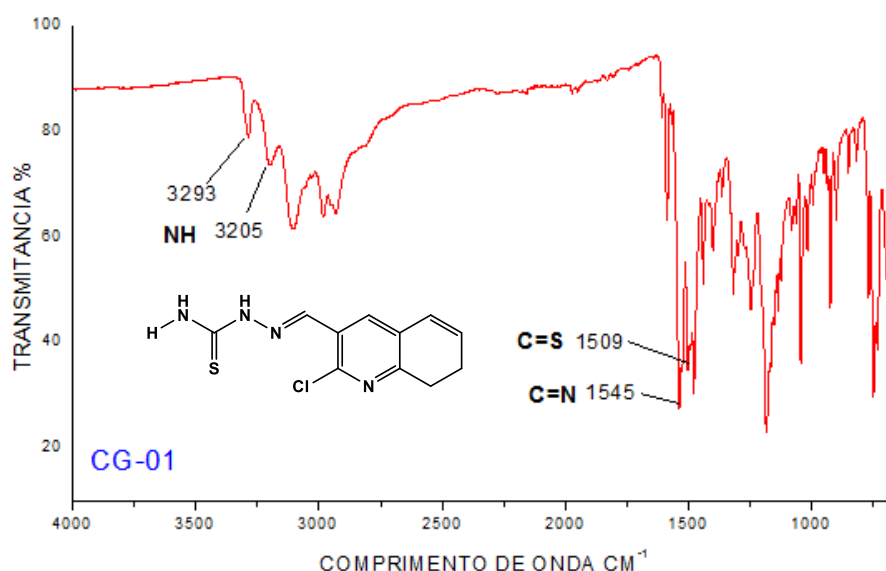
5.1 CARACTERIZAÇÃO POR INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURRIER

Tendo em vista complementar a caracterização estrutural dos compostos, foram então realizadas análises espectroscópicas no infravermelho para identificar os grupos funcionais presentes neles. Dessa forma, analisando a figura 12 que representa o espectro de infravermelho do derivado CG-01, percebe-se que foram identificadas bandas de absorção referentes ao grupo NH em 3293 e 3205 cm⁻¹. Além disso, bandas de forte

intensidade nas regiões de 1545 e 1509 cm^{-1} foram encontradas sendo referentes aos grupos C=N e C=S, respectivamente.

A confirmação do anel aromático é realizada por meio de bandas de média intensidade na região de 1600-1500 cm^{-1} evidenciando assim, a ligação C=C do anel.

Figura 12. Espectro de Infravermelho (IV) do derivado CG-01.



Fonte: O autor (2023).

Na tabela 3 estão dispostas todas as bandas de absorção que evidenciam os grupos funcionais dos compostos 2-cloro-quinolinas-tiossemicarbazonas (CGs).

Tabela 3. Sinais característicos de IV para caracterização dos compostos CGs.

Composto	NH (Quinolina)	C=N	C=S	R
CG-01	3205/3293	1545,00	1509	H
CG-02	3336,51/3254,64	1537,76	1506,91	F
CG-03	3270,01/3128,81	1547,22	1519,61	NO ₂
CG-04	3330,08/3130,72	1537,70	1514,29	CH ₂ CH ₃
CG-05	3285,08/3134,13	1536,00	1502,47	Cl
CG-06	3211/3143	1531,00	1509,00	OCH ₃
CG-07	3288,54/3123,16	1537,74	1501,23	Br

Fonte: O autor (2023).

5.2 AVALIAÇÃO *IN SILICO* DOS PARÂMETROS DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO, EXCREÇÃO E TOXICIDADE (ADMET)

No presente estudo, foram utilizados dados *in silico* para prever parâmetros farmacocinéticos teóricos, incluindo absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMET) dos compostos sintetizados. Segundo Kumar, Kini e Rath (2021), a predição desses parâmetros é crucial na indústria farmacêutica, acelerando o processo de descoberta e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (Kar; Chatterjee, 2021). As regras de Lipinski e Veber (Lipinski *et al.*, 1997; Veber *et al.*, 2002) são duas técnicas frequentemente utilizadas para avaliar o potencial de biodisponibilidade oral de um fármaco.

Tabela 4. Parâmetros da previsão *in silico* para os compostos CGs.

Parâmetros	CG1	CG2	CG3	CG4	CG5	CG6	CG7	Unidade
Absorção								
Solubilidade em água	-5.00	-4.98	-5.05	-5.36	-5.46	-5.14	-5.53	log mol/L
Permeabilidade Caco2	1.44	1.05	1.33	1.05	1.05	1.28	1.28	log Papp 10 ⁻⁶ cm/s
Absorção intestinal	90.91	89.82	91.76	90.73	89.31	91.15	87.90	% absorvido
Permeabilidade cutânea	-2.82	-2.72	-2.74	-2.83	-2.82	-2.86	-2.81	log Kp
Substrato glicoproteína P	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim/Não
Inibidor glicoproteína P (I)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim/Não
Inibidor glicoproteína P (II)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim/Não
Distribuição								
Volume de distribuição	0.04	-0.01	-0.20	0.23	0.08	0.06	0.08	log L/kg
Fração não ligada à proteína	0.08	0.02	0	0.03	0.04	0.03	0	Fu
Permeabilidade BHE	0.26	0.28	-0.48	0.25	0.28	0.16	0.36	log BB
Permeabilidade SNC	-1.66	-1.72	-1.88	-1.63	-1.55	-1.85	-1.55	log PS
Metabolismo								
Substrato CYP2D6	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim/Não
Substrato CYP3A4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim/Não
Inibidor CYP1A2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim/Não
Inibidor CYP2C19	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim/Não
Inibidor CYP2C9	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim/Não
Inibidor CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim/Não
Inibidor CYP3A4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim/Não
Excreção								
Clearance total	-0.05	-0.14	0.02	-0.14	-0.12	0.09	-0.14	log mL/min/kg
Substrato OCT2 renal	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim/Não
Toxicidade								
Toxicidade AMES	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim/Não
Dose máxima tolerada	0.15	0.17	0.48	0.24	0.21	0.14	0.35	log mg/kg/dia
Inibidor hERG I	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim/Não
Inibidor hERG II	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim/Não
Toxicidade aguda oral em ratos	2.32	2.17	2.24	2.31	2.29	2.37	2.38	mol/kg
Toxicidade crônica oral em ratos	1.19	1.27	2.57	1.13	1.17	1.19	1.93	log mg/kg_pc/dia
Hepatotoxicidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim/Não
Sensibilização cutânea	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim/Não
Toxicidade <i>T. Pyriformis</i>	1.55	1.29	0.47	1.40	1.43	1.11	0.85	log µg/L
Toxicidade Minnow	1.42	1.85	-2.00	0.96	0.94	0.68	-2.23	log mM
Biodisponibilidade Oral								
Lipinski	0	0	0	0	0	0	0	Violação
Veber	0	0	0	0	0	0	0	Violação

Fonte: O autor (2023).

A tabela 4 apresenta os resultados de previsão dos parâmetros farmacocinéticos e de biodisponibilidade por via oral para cada um dos compostos avaliados. O primeiro parâmetro de absorção a ser avaliado foi a solubilidade em água (LogS), que reflete a solubilidade da molécula em água a 25°C. Os compostos podem ser classificados de acordo com os valores de LogS pela seguinte escala: insolúvel < -10 pouco solúvel < -6 < moderadamente solúveis < -4 < solúvel < -2 < muito solúvel < 0 (Pires; Blundell; Ascher, 2015). Os compostos aqui avaliados foram classificados como moderadamente solúveis.

A permeabilidade frente a células de Caco-2 (células de adenocarcinoma colorretal humano) avalia se os compostos apresentariam a capacidade de permear células da mucosa intestinal humana. Para isto, foi utilizada a escala de permeabilidade, compostos pouco permeáveis apresentam valores < $1 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, moderadamente permeáveis valores entre 1 e $10 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ e permeáveis com valores > $10 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Os sete compostos apresentam permeabilidade moderada frente a células de Caco-2, e alta absorção intestinal com valores > 87.90%. Em relação a permeabilidade na pele os compostos podem apresentar alta permeabilidade ($\log K_p < -2.5$) (Pires; Blundell; Ascher, 2015). As glicoproteínas-P são importantes transportadores que desempenham a função de retirar moléculas de dentro das células, atuando como bomba de efluxo e protegendo o organismo de toxinas e xenobióticos. Todos os sete compostos são substratos, e também atuam como inibidores da glicoproteína-P.

O segundo perfil a ser avaliado é o de distribuição, ou seja, como os compostos podem ser distribuídos em diferentes regiões do organismo (Kar; Leszczynski, 2020). Compostos cujos valores de volume de distribuição (VDss) são < 0.15 tendem a ser mais facilmente distribuídos no plasma, enquanto aqueles com valores de VDss > 0.45 são mais propensos a serem distribuídos nos tecidos. Isso foi observado nos compostos CG1, CG2, CG3, CG5, CG6 e CG7, que tendem a ser mais facilmente distribuídos no plasma, enquanto o composto CG4 apresenta maior tendência para ser distribuído nos tecidos. Além disso, os compostos também se ligam fortemente às proteínas séricas, pois apresentam baixos valores de fração não ligada (fu).

Com relação à permeabilidade diante da barreira hematoencefálica (BHE), compostos com $\log BB > 0,3$ são altamente capazes de atravessá-la, enquanto aqueles com $\log BB < -1$ podem ter baixa capacidade. O CG7 tem uma capacidade significativamente maior de atravessar a barreira hematoencefálica, enquanto os demais compostos têm uma capacidade moderada. No que se refere à capacidade de penetrar no Sistema Nervoso

Central (SNC), compostos com $\log PS > -2$ são capazes de penetrar, enquanto aqueles com $\log PS < -3$ não são capazes de fazê-lo. Todos os compostos avaliados foram classificados como penetrantes.

O terceiro perfil a ser avaliado foi o metabolismo, nesta etapa foi avaliada uma família de proteínas responsáveis pelo metabolismo de fármacos, dentre as diferentes proteínas foram avaliadas as isoformas de citocromo P450. Sendo assim, foi avaliado se os compostos CGs poderiam atuar como substrato ou inibidor dessas proteínas. Apenas os compostos CG3 e CG7 foram classificados como substratos de CYP2D6, e todos os compostos foram classificados como substratos de CYP3A4. Em seguida foi avaliado se os compostos poderiam atuar como inibidores. Todos os compostos são inibidores das isoformas CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4. Nenhum dos compostos foram classificados como inibidor frente a CYP2D6.

O quarto perfil avaliado foi a excreção dos compostos, que apresentaram baixos valores de clearance total (renal e hepático) e não foram identificados como substratos do transportador orgânico de cátions (OCT2). Esse transportador é responsável pela captação renal e eliminação de drogas e compostos endógenos, desempenhando um papel importante na disposição e depuração renal (Pires; Blundell; Ascher, 2015).

O quinto e último perfil do ADMET avaliado foi a toxicidade, nesta previsão é avaliada a toxicidade em diferentes modelos experimentais. Em relação ao teste de AMES apenas o composto CG3 apresentou resultado positivo indicando que este composto pode apresentar potencial mutagênico. A dose máxima tolerada recomendada (MRTD) é estimada como uma dose limiar tóxica para humanos. Sendo assim, compostos que apresentem MRTD menor ou igual a $0.477 \log(\text{mg/kg/dia})$ é considerado baixo e alto se maior que $0.477 \log(\text{mg/kg/dia})$ (Pires; Blundell; Ascher, 2015). Apenas o composto CG3 foi considerado como alto. Em relação a hERG I os compostos foram classificados como não inibidores. Já para hERG II todos os compostos foram classificados como inibidores.

A dose de toxicidade aguda oral em ratos (LD50) variou de 2.17 a 2.38 mol/kg. A dose de toxicidade crônica oral em ratos apresentou valores que variaram de 1.13 a 2.57 $\log \text{mg/kg_pc/dia}$. Em relação a toxicidade a nível hepático apenas os compostos CG3, CG5 e CG7 foram considerados como não hepatotóxicos. Além disso, nenhum dos compostos são capazes de promover aumento da irritabilidade da pele. Foi verificado que os compostos podem ser capazes de apresentar toxicidade frente a *Tetrahymena Pyriformis* ($\log \mu\text{g/L} > -0.5$). Além disso, foi observado que os compostos CG3 e CG7

apresentaram $\log LC_{50} < -0.3$ caracterizando alta toxicidade aguda no ensaio de Toxicidade Minnow.

A regra dos 5 de Lipinski estabelece que uma molécula para ser um bom fármaco deve apresentar peso molecular ≤ 500 g/mol, número de aceptores de hidrogênio (ALH) ≤ 10 , número de doadores de hidrogênio (DLH) ≤ 5 e coeficiente de lipofilicidade ($cLogP$) ≤ 5 , e a regra de Veber avalia ligações rotacionáveis ≤ 10 e área de superfície polar (TPSA) ≤ 140 Å (Lipinski *et al.*, 2012; Veber *et al.*, 2002). Os resultados de previsão de biodisponibilidade oral mostraram que todos os compostos apresentaram boa disponibilidade, obedecendo as regras de Lipinski e Veber, com nenhuma violação apresentada.

Vale a pena salientar que o estudo *in silico* é uma previsão, em muitos casos os compostos podem se comportar diferente a depender da concentração avaliada em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

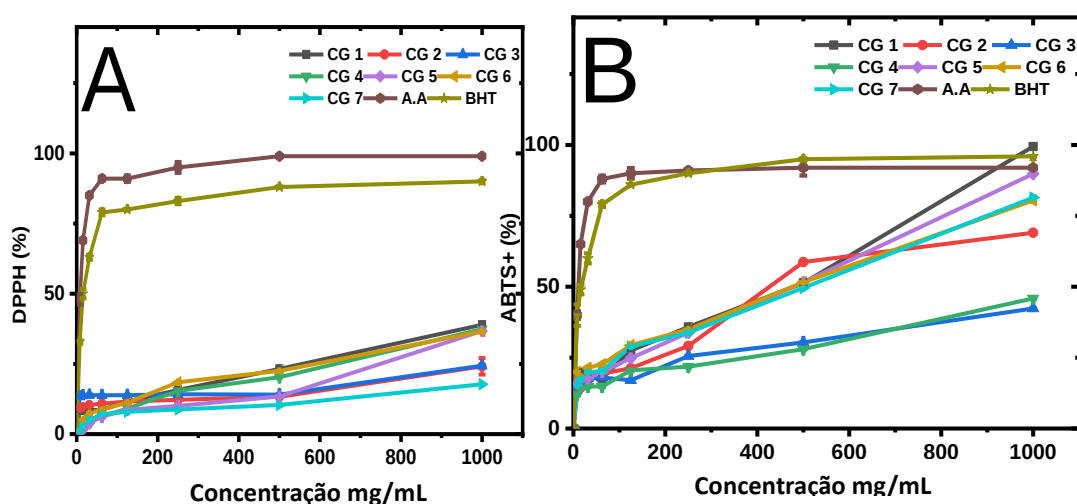
O estudo de Sibuh *et al.* (2021) realizou predição ADMET dos compostos 3-metoxibenzaldeído tiossemicarbazona (3-MBTSc) e 4-Nitrobenzaldeído tiossemicarbazona (4-NBTSc). Tanto o 3-MBTSc quanto o 4-NBTSc têm alta absorção intestinal e permeabilidade BHE. Ao prever o efluxo pela glicoproteína P (P-gp) e metabolização pelas isoformas CYP450, eles não são substrato e nem não inibidor. Ambos os compostos não são cancerígenos e têm um bom LD50. Os dois compostos não violaram a regra de cinco de Lipinski e mostraram uma pontuação de biodisponibilidade boa e semelhante.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

As tiossemicarbazonas são capazes de promover atividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*. Esta atividade está diretamente relacionada a sua estrutura química. As tiossemicarbazonas apresentam a capacidade de doar pares de elétrons (agente redutor) (Geronikaki, Pitta;Liaras, 2013; Bingul *et al.*, 2019). Esta característica é devida a presença de átomos de nitrogênio, principalmente na forma de base de Schiff, e do enxofre como tiocarbonila (Siddiqui *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020). Dentre os métodos, os mais comumente utilizados para avaliar a atividade antioxidante são os de captura de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) e ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).

O método de inibição de radicais DPPH baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. Nesta reação ocorre a mudança de cor roxa para amarela. Já o radical ABTS é gerado por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Os ensaios de captura pelo método de ABTS são mais versáteis, isto é, podem determinar a atividade antioxidante de compostos tanto de natureza hidrofílica quanto lipofílica. A reação é acompanhada pela mudança de cor decaindo de verde para sem coloração (Youssef, 2014; Bingul *et al.*, 2019).

Figura 13. Curvas de atividade antioxidante *in vitro* promovida pelos compostos CGs frente aos ensaios de DPPH• (A) e ABTS⁺ (B) respectivamente.



Fonte: O autor (2023).

Os resultados exibidos na Figura 13 indicam que os compostos são capazes de oferecer uma atividade antioxidante fraca para o teste de DPPH e uma atividade fraca a moderada para o teste de ABTS. As curvas obtidas em cada ensaio forneceram dados acerca da porcentagem de radicais capturados na concentração mais elevada e os valores de EC₅₀ (a concentração necessária para capturar 50% dos radicais).

Tabela 5. Resultados de atividade antioxidante *in vitro* promovida pelos compostos para os ensaios de DPPH• e ABTS⁺ respectivamente.

Compostos	DPPH•		ABTS ⁺			
	% Máxima	EC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µM)	% Máxima	EC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µM)
CG-01	38.9 ± 0.4	>1000	>2940.7	99.4 ± 0.1	424.6 ± 2.2	1248.6
CG-02	24.1 ± 2.9	>1000	>2792.9	69.0 ± 0.1	624.0 ± 3.5	1742.7
CG-03	24.3 ± 0.2	>1000	>2610.6	42.3 ± 0.0	>1000	>2610.6
CG-04	37.3 ± 0.1	>1000	>2716.7	45.8 ± 0.1	>1000	>2716.7
CG-05	36.7 ± 0.2	>1000	>2673.6	89.8 ± 0.0	467.6 ± 0.5	1250.2
CG-06	36.5 ± 0.2	>1000	>2702.1	80.4 ± 0.2	493.9 ± 1.8	1334.6
CG-07	17.7 ± 0.1	>1000	>2381.1	81.4 ± 0.1	506.6 ± 0.8	1206.3

A.A	95.0 ± 1.0	7.76 ± 0.0	44.0	90.1 ± 0.5	18.8 ± 0.4	107.1
BHT	95.0 ± 0.1	13.37 ± 0.1	60.6	95.7 ± 0.9	5.2 ± 0.2	23.9

Valores de média e desvio padrão; % Máxima: Sequestros do radical na maior concentração testada (1000µg/mL); EC₅₀ (µg/mL): quantidade em gramas necessária para sequestrar 50% do radical em solução; EC₅₀ (µM): Concentração em micromolar necessária para sequestrar 50% do radical em solução. A.A: ácido ascórbico; BHT: hidroxitolueno butilado.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que na maior concentração avaliada (1000µM) os compostos foram capazes de promover captura variando de 17.7 a 38.9 % no ensaio de DPPH, e nenhum composto apresentou valor de EC₅₀ definido. Em relação ao ensaio de ABTS os compostos apresentaram porcentagens de captura na maior concentração variando de 42.3% a 99.4%, estes resultados foram maiores quando comparado ao DPPH. Além disso, os compostos apresentaram valor de EC₅₀ sendo estes CG-1 (424.6 µM), CG-2 (624.0 µM), CG-5 (467.6 µM), CG-6 (493.9 µM), CG-7 (506.6 µM).

O composto CG-1 apresentou a melhor atividade antioxidante em comparação com os outros compostos, com 38.9% e 99.4% de sequestro do radical na maior concentração testada (1000µg/m) nos testes de DPPH e ABTS respectivamente. Isso sugere que a presença da ligação C-H na porção tioamida pode favorecer a doação de um átomo de hidrogênio para o radical. A conjugação de elétrons na estrutura estabiliza o radical, impedindo-o de participar de novas reações (Nguyen, 2013).

A avaliação da atividade antioxidante de um conjunto de compostos tiossemicarbazonas derivados de dimetoxi-indóis realizado por Yildiz et al. (2022) revelou que eles apresentaram valores variados de atividade antioxidante *in vitro*, oscilando entre 17,38 e 96,10 µM (EC₅₀) no ensaio ABTS e de 26,88 a 119,75 µM (EC₅₀) no ensaio DPPH.

5.4 ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DOS COMPOSTOS COM A BSA

A espectroscopia de fluorescência é um método eficaz para investigar interações entre albuminas e compostos candidatos a fármacos (Ruankham *et al.*, 2021; Sreedharannair *et al.*, 2022). As albuminas apresentam fluorescência intrínseca devido a presença de triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) em sua estrutura química (Ruankham *et al.*, 2021; Sreedharannair et al. 2022; Lyndem *et al.*, 2022).

Quando excitada, a BSA exibe uma forte emissão fluorescente em torno de 340 nm, causada principalmente pelo triptofano. A fluorescência da tirosina é praticamente extinta se estiver em meio ionizado ou próximo a um grupo carboxila, amino ou mesmo

a um resíduo de triptofano e a fenilalanina possui um rendimento quântico muito baixo (Cao *et al.*, 2018; Ghisaidoobe; Chung, 2014; Mohamadi *et al.*, 2017; Qin; Yin; Shen, 2015; Shi *et al.*, 2018).

Quando diferentes compostos interagem com a albumina podem ocasionar supressão na fluorescência intrínseca (Avdović *et al.*, 2022). O fenômeno de supressão pode ser explicado por dois mecanismos, estático (formação do complexo de estado fundamental) ou dinâmico (desativação do estado excitado por colisão) (Avdović *et al.*, 2022; Szymaszek *et al.*, 2022). No mecanismo estático ocorre diminuição da constante de interação com a diminuição da temperatura já o dinâmico ocorre o aumento do valor da constante de interação com o aumento da temperatura (Ruankham *et al.*, 2021; Sreedharannair *et al.*, 2022; Avdović *et al.*, 2022; Szymaszek *et al.*, 2022).

Tabela 6. Resultados espectroscópicos da interação dos compostos CGs com albumina obtidos pela Equação linear de Stern-Volmer.

Compostos	T (K)	Equação da reta ^a	R ² ^b	Ksv (M ⁻¹) ^c	Kq (M ⁻¹ ·s ⁻¹) ^d
CG-1	298	2897.2 x + 1.53	0.9185	2.9·10 ³	4.82·10 ¹¹
	303	3388.9 x + 1.49	0.8038	3.3·10 ³	5.48·10 ¹¹
	310	336124.0x + 1.79	0.8715	3.3·10 ⁵	5.48·10 ¹³
CG-2	298	5007.8x + 1.20	0.8196	5.0·10 ³	8.31·10 ¹¹
	303	7376.1x + 1.13	0.9071	7.3·10 ³	1.21·10 ¹²
	310	44069.0x + 1.31	0.9073	4.4·10 ⁴	7.31·10 ¹²
CG-3	298	7089.1x + 1.15	0.9357	7.0·10 ³	1.16·10 ¹²
	303	9499.9x + 1.16	0.8191	9.4·10 ³	1.56·10 ¹²
	310	46922.0x + 1.05	0.9062	4.6·10 ⁴	7.64·10 ¹²
CG-4	298	4759.0x + 1.14	0.9531	4.7·10 ³	7.81·10 ¹¹
	303	5068.4x + 1.24	0.9182	5.0·10 ³	8.31·10 ¹¹
	310	6951.8x + 1.42	0.9687	6.9·10 ³	1.15·10 ¹²
CG-5	298	8145.3x + 1.16	0.9364	8.1·10 ³	1.35·10 ¹²
	303	29042x + 1.19	0.9436	2.9·10 ⁴	4.82·10 ¹²
	310	78440x + 1.15	0.9889	7.84·10 ⁴	1.3·10 ¹³
CG-6	298	2255x + 1.19	0.9717	2.2·10 ³	3.65·10 ¹¹
	303	7639x + 1.27	0.9255	7.6·10 ³	1.12·10 ¹²
	310	37408x + 1.317	0.9906	3.74·10 ⁴	6.21·10 ¹²
CG-7	298	5291.6x + 1.26	0.9232	5.2·10 ³	8.64·10 ¹¹
	303	7292.5x + 1.29	0.9607	7.2·10 ³	1.20·10 ¹²
	310	66407x + 1.33	0.9912	6.6·10 ⁴	1.10·10 ¹³

^aEquações das lineares de Stern-Volmer (Ksv). ^bCoefficiente de correlação. ^cConstante de supressão de Stern-Volmer (Ksv) obtida com base na fluorescência de BSA na presença de diferentes concentrações dos derivados de CG (5-40 µM), em temperaturas diferentes. ^dConstante de taxa bimolecular (Kq) obtida com base na fluorescência de BSA na presença de diferentes concentrações dos derivados CG (5-40 µM) em diferentes temperaturas.

De acordo com a tabela 6 os valores de Ksv foram classificados, a nível de interação com albumina, como capazes de promover interação fraca (1x10³ a 1x10⁴ M⁻¹), moderada (1x10⁴ a 1x10⁵ M⁻¹) e alta (1x10⁵ a 1x10⁶ M⁻¹) (Silva Filho *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021; Szymaszek *et al.*, 2022). As interações para os compostos foram classificadas

como alta para o composto CG-1 na temperatura de 310K e para os demais compostos nas diferentes temperaturas classificadas como fracas a moderadas.

Todos os compostos apresentaram aumento do Ksv com o aumento da temperatura, este fato indica que o mecanismo de supressão promovida pelos compostos frente a albumina é de natureza dinâmico (Ding *et al.*, 2013; Ni *et al.*, 2011).

Tabela 7. Resultados espectroscópicos da interação dos compostos CGs com albumina obtidos pela Equação linear de Stern-Volmer modificada.

Compostos	T (K)	Equação da reta	R ²	F	Ksv (M ⁻¹)
CG-1	298	$2.0 \cdot 10^{-6}x + 1.01$	0.9759	0.99	$5.0 \cdot 10^5$
	303	$3.0 \cdot 10^{-6}x + 2.56$	0.9946	0.39	$8.5 \cdot 10^5$
	310	$2.0 \cdot 10^{-6}x + 2.56$	0.8350	0.39	$1.2 \cdot 10^6$
CG-2	298	$2.0 \cdot 10^{-5}x + 3.12$	0.8257	0.32	$1.5 \cdot 10^5$
	303	$1.0 \cdot 10^{-5}x + 3.39$	0.8521	0.29	$3.4 \cdot 10^5$
	310	$8.0 \cdot 10^{-7}x + 1.09$	0.8588	0.91	$1.3 \cdot 10^6$
CG-3	298	$2.0 \cdot 10^{-5}x + 2.96$	0.9810	0.33	$1.6 \cdot 10^4$
	303	$2.0 \cdot 10^{-5}x + 2.47$	0.9501	0.40	$2.2 \cdot 10^4$
	310	$1.0 \cdot 10^{-5}x + 1.59$	0.4396	0.62	$1.6 \cdot 10^5$
CG-4	298	$2.0 \cdot 10^{-5}x + 4.06$	0.7830	0.24	$2.0 \cdot 10^5$
	303	$9.0 \cdot 10^{-6}x + 3.62$	0.8737	0.27	$4.0 \cdot 10^5$
	310	$4.0 \cdot 10^{-6}x + 3.58$	0.6583	0.27	$9.2 \cdot 10^5$
CG-5	298	$2.0 \cdot 10^{-5}x + 2.89$	0.9225	0.34	$1.4 \cdot 10^5$
	303	$6.0 \cdot 10^{-6}x + 3.14$	0.9606	0.31	$5.3 \cdot 10^5$
	310	$8.0 \cdot 10^{-6}x + 1.14$	0.9906	0.87	$1.43 \cdot 10^5$
CG-6	298	$1.0 \cdot 10^{-5}x + 2.70$	0.8998	0.37	$2.7 \cdot 10^5$
	303	$1.0 \cdot 10^{-5}x + 1.39$	0.9883	0.72	$1.39 \cdot 10^5$
	310	$1.0 \cdot 10^{-5}x + 4.39$	0.9441	0.22	$4.5 \cdot 10^5$
CG-7	298	$9.0 \cdot 10^{-6}x + 2.68$	0.9525	0.37	$3.0 \cdot 10^5$
	303	$8.0 \cdot 10^{-6}x + 1.18$	0.9889	0.85	$1.5 \cdot 10^5$
	310	$9.0 \cdot 10^{-6}x + 3.06$	0.9547	0.32	$3.4 \cdot 10^5$

Fonte: O autor (2023).

Os valores de constante de supressão efetivas para os fluoróforos acessíveis, ou constante de ligação de Stern-Volmer modificadas (Ksv), também aumentaram com o aumento da temperatura (tabela 7). Esses resultados confirmam que o mecanismo de supressão para todos os compostos avaliados é de natureza dinâmica. Perfil semelhante também foi obtido por Hu et al. (2005) avaliando 6-mercaptopurina com potencial antineoplásico e por Szymaszek et al. (2022) avaliando derivados de piridina.

5.5 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE LIGAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Muitos fármacos ocupam o mesmo microambiente na albumina, dessa forma, a absorção e a biodisponibilidade de um fármaco em relação aos demais ocorre via mecanismo de competição pelo sítio de ligação desta proteína. Nesse contexto, a

distribuição, ação e eliminação dos fármacos no organismo humano dependem da força de ligação desses derivados com a cadeia polipeptídica da biomolécula, que pode ser inferida a partir dos valores de constante de ligação (Storr, 2014; Ghuman *et al.*, 2005).

A constante de ligação (K_a) está relacionada com a força de ligação que por sua vez relaciona-se com a biodisponibilidade, isto é, a capacidade do composto se difundir pelo sistema circulatório até um determinado alvo biológico. A maioria dos ligantes interagem reversivelmente e exibem afinidades para proteínas com constante de ligação na faixa de $1\text{-}15 \times 10^4$ (Colmenarejo *et al.*, 2001).

Tabela 8. Resultados espectroscópicos para obtenção dos valores de K_a e n , constante de ligação e o número de sítios de ligação, respectivamente.

Compostos	T (K)	Equação da reta	R^2	n	K_a (M^{-1})
CG-1	298	$0.0181x + 0.1394$	0.0409	0.01	$1.4 \cdot 10^1$
	303	$0.1178x + 0.3159$	0.9558	0.11	$2.1 \cdot 10^1$
	310	$0.7742x + 4.6669$	0.9321	0.77	$4.6 \cdot 10^4$
CG-2	298	$0.3306x + 1.0468$	0.9027	0.33	$1.1 \cdot 10^1$
	303	$0.501x + 1.8237$	0.9204	0.50	$6.6 \cdot 10^1$
	310	$0.7884x + 3.7886$	0.9358	0.78	$6.1 \cdot 10^3$
CG-3	298	$0.4718x + 1.7042$	0.9773	0.47	$5.0 \cdot 10^1$
	303	$0.5512x + 2.1565$	0.9384	0.55	$1.4 \cdot 10^2$
	310	$0.7803x + 3.6649$	0.7679	0.78	$4.6 \cdot 10^3$
CG-4	298	$0.3468x + 1.0266$	0.9251	0.34	$1.0 \cdot 10^1$
	303	$0.269x + 1.8155$	0.9542	0.26	$6.5 \cdot 10^1$
	310	$0.1118x + 1.9069$	0.868	0.11	$8.0 \cdot 10^1$
CG-5	298	$0.4634x + 1.7135$	0.9707	0.46	$5.1 \cdot 10^1$
	303	$0.1708x + 1.8897$	0.7866	0.17	$7.7 \cdot 10^1$
	310	$0.8531x + 4.2525$	0.9956	0.85	$1.79 \cdot 10^3$
CG-6	298	$0.1709x + 0.1986$	0.9648	0.17	$1.57 \cdot 10^1$
	303	$0.3326x + 1.2088$	0.9617	0.33	$1.1 \cdot 10^1$
	310	$0.6687x + 3.1863$	0.9956	0.67	$1.54 \cdot 10^3$
CG-7	298	$0.2682x + 0.8418$	0.9608	0.26	$6.94 \cdot 10^1$
	303	$0.3057x + 1.0957$	0.9956	0.30	$1.1 \cdot 10^1$
	310	$0.7586x + 3.801$	0.991	0.76	$6.32 \cdot 10^3$

Fonte: O autor (2023).

De acordo com a Tabela 8, os compostos apresentaram aumento da constante de ligação com o aumento da temperatura, com valores que variaram de 10^1 a $10^4 M^{-1}$ indicando que os compostos apresentam afinidade com a albumina, se ligando reversivelmente. Chaves *et al* (2019) observou $K_a \approx 10^4 (M^{-1})$ para o composto 4-*N*-(2'-metoxi-estiril)-tiossemicarbazona indicando ligação moderada com a albumina.

5.6 PARÂMETROS TERMODINÂMICOS E FORÇAS DE LIGAÇÃO

Para obter informações detalhadas sobre as interações moleculares e forças atuantes entre os compostos e a BSA, é necessário determinar os parâmetros

termodinâmicos: variação de entalpia (ΔH), variação de entropia (ΔS) e variação de energia livre de Gibbs (ΔG). De acordo com Ross e Subramanian (1981), se $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ as principais forças são as interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Se $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ as interações são hidrofóbicas. E se $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ o principal tipo de interação são forças eletrostáticas.

Tabela 9. Valores dos parâmetros termodinâmicos ΔH , ΔS e ΔG para as interações entre BSA e compostos CGs em diferentes temperaturas.

Compostos	T (K)	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol·K]	ΔG [kJ/mol]	Equação da reta	R ²
CG-1	298	-705.01	2.36	-0.78	$-84798x + 283.31$	0.8449
	303			-1.82		
	310			-28.17		
CG-2	298	-438.01	1.49	-5.94	$-52684x + 179.74$	0.8473
	303			-10.55		
	310			-27.05		
CG-3	298	-399.89	1.52	-9.69	$-48098x + 164.72$	0.9235
	303			-12.45		
	310			-25.79		
CG-4	298	-152.2	0.54	-9.69	$-18306x + 65.079$	0.887
	303			-10.52		
	310			-16.08		
CG-5	298	388.08	1.33	-9.74	$-46678x + 159.78$	0.8654
	303			-10.74		
	310			-25.24		
CG-6	298	446.89	1.5	-9.74	$-53751x + 180.45$	0.9743
	303			-6.04		
	310			-18.91		
CG-7	298	-451.44	1.52	-4.80	$-54299x + 183.22$	0.8637
	303			-6.04		
	310			-22.56		

Fonte: O autor (2023).

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que os compostos CG-5 e CG-6 apresentaram valores positivos de ΔH e ΔS e estes estão associados a interações hidrofóbicas com a BSA. O resíduo de triptofano Trp-212 está localizado dentro de um sítio de ligação hidrofóbico da proteína, no subdomínio IIA e é um possível local de interação desses compostos na BSA (Ebrahimipour *et al.*, 2017; Roy *et al.*, 2017). Os demais compostos (CG-1, CG-2, CG-3, CG-4 e CG-7) apresentaram $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ indicando que esses compostos interagem com a BSA através de forças eletrostáticas. Os valores negativos de ΔG indicam que o processo de ligação entre os compostos e BSA é espontâneo (exotérmico), e quanto maior a temperatura mais espontâneo é esse processo.

Na literatura foi possível identificar que outros estudos também apresentaram resultados semelhantes. Ganorkar *et al.* (2021) avaliando diferentes tiossemicarbazonas obtiveram valores positivos de ΔH e ΔS , indicando a presença de interação hidrofóbica.

Chaves et al (2019) observou que as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio são as principais forças de ligação entre a 4-*N*-(2'-metoxi-estiril)-tiossemicarbazona e a albumina.

5.7 TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA ENTRE OS CG'S E A BSA

Förster Resonance Energy Transfer (FRET) é um mecanismo de transferência de energia entre dois cromóforos. Um cromóforo doador pode transferir energia de excitação de forma não radioativa através de interação dipolo - dipolo para o cromóforo aceptor. Esta transferência de energia de ressonância leva a diminuição da intensidade do doador e (se o aceptor for fluorescente) aumento da intensidade do aceptor (Lakowicz, 2006; Sarkar, 2013).

Tabela 10. Parâmetros FRET calculados para os compostos CGs avaliados.

Compostos	J [nm ⁴ ·M ⁻¹ ·cm ⁻¹]	E	R ₀ [nm]	r [nm]
CG-1	1.28 x10 ¹²	0.40	1.14	1.16
CG-2	1.18x10 ¹²	0.28	1.12	1.30
CG-3	9.56x10 ¹¹	0.30	1.09	1.25
CG-4	1.123x10 ¹²	0.26	1.11	1.29
CG-5	1.132 x10 ¹²	0.32	1.0	1.13
CG-6	9.213x10 ¹¹	0.37	1.10	1.87
CG-7	9.561x10 ¹¹	0.32	1.09	1.14

Fonte: O autor (2023).

Através dos resultados da tabela 10 é possível notar que a distância de ligação (r) dos compostos é < 8 nm e 0.5 R₀ < r < 1.5 R₀ indicando que a transferência de energia da BSA para os compostos ocorre com alta probabilidade (Valeur; Brochon, 2011).

Swarup et al (2023) ao avaliar um complexo metálico com tiossemicarbazona (C₃₄H₃₈N₈O₄S₂Ni) obteve o valor de r₀ dentro da faixa de Förster, indicando que a transferência de energia da BSA para o composto ocorre com grande eficiência.

5.8 CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE HEMOLÍTICA *IN VITRO* PROMOVIDA PELOS COMPOSTOS CGS

A partir do teste de citotoxicidade *in vitro* foi possível avaliar os resultados promovidos pelos compostos frente às células macrófagos J774, Células Vero, Fibroblasto V79 e Hepatoma HepG2 e Eritrócitos.

Tabela 11. Resultados de citotoxicidade promovida pelos compostos CGs frente a diferentes células de mamíferos.

Compostos	Macrófagos J774 (IC ₅₀)	Células Vero (IC ₅₀)	Fibroblastos V79 (IC ₅₀)	Hepatoma HepG2 (IC ₅₀)	Eritrócitos (%)
CG-1	230.0 ± 0.1	123.0 ± 0.3	101.6 ± 0.4	> 500	<7.0
CG-2	249.1 ± 0.2	178.7 ± 0.8	99.89 ± 0.8	> 500	<7.0
CG-3	279.9 ± 0.12	159.0 ± 0.9	111.5 ± 0.9	> 500	<7.0
CG-4	200.1 ± 0.1	149.1 ± 0.8	134.9 ± 1.0	> 500	<7.0
CG-5	258.5 ± 0.8	188.5 ± 0.1	187.4 ± 0.6	> 500	<7.0
CG-6	214.6 ± 0.9	135.6 ± 0.3	92.09 ± 0.1	> 500	<7.0
CG-7	222.9 ± 0.2	156.9 ± 0.7	88.90 ± 0.5	> 500	<7.0

Fonte: O autor (2023).

Os valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 11 para os macrófagos J774 mostraram que os compostos CGs apresentaram valores que variaram de 200.1 ± 0.1 a 279.9 ± 0.12 µM. Os compostos apresentaram IC₅₀ maior do que 200.1 ± 0.1 µM (CG-4), sugerindo baixa toxicidade frente às células de macrófagos J774. Em relação as células Vero os compostos apresentaram IC₅₀ variando de 123.0 ± 0.3 a 188.5 ± 0.1 µM. Em relação as células Fibroblasto V79 os compostos apresentaram IC₅₀ variando de 88.9 ± 0.5 a 187.4. Em relação as células Hepatoma HepG2 os compostos apresentaram IC₅₀ >500 µM. Esses resultados confirmam a baixa toxicidade desses compostos frente as células avaliadas.

Os resultados da atividade hemolítica (tabela 11) revelam que os compostos, em diferentes concentrações (28.12 a 900 µM), apresentaram atividade hemolítica < 7.0 %. Segundo Preté et al. (2011), valores percentuais de hemólise superiores a 15% são considerados elevados, pois indicam danos consideráveis à membrana eritrocitária. Sendo assim pode-se concluir que os compostos apresentam baixa toxicidade hemolítica. Resultado semelhante também foi observado por Queiroz et al (2020), avaliando 2-(4-bromofenoxi)-1-(4-metoxifenil)-etan-1-ona-tiossemicarbazona com atividade hemolítica <5%, e por Jacob et al (2023) que utilizou indol-tiossemicarbazona e apresentou resultado de atividade hemolítica <10% para todos os compostos.

5.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A microdiluição em caldo é o método de referência adotado pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) para testar a susceptibilidade de leveduras que são responsáveis por infecções invasivas, como *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*. O parâmetro mais comumente utilizado para avaliar a sensibilidade aos medicamentos

antifúngicos é a concentração inibitória mínima (CIM) (Cuenca-Estrella *et al.*, 2002). A CIM é definida como a menor concentração do medicamento que é capaz de impedir o crescimento de fungos no teste de sensibilidade realizado através de diluição em ágar ou caldo (CLSI, 2002).

Tabela 12 - Resultados da atividade antimicrobiana *in vitro*

COMPOSTOS			LEVEDURAS									
			HAM11	HAM13	HAM14	HAM15	HAM33	HAM43	HAM44	ATCC90028	URM 6393	8026-15
CG-01 MM: 340,05	CMI	μg	>128	64	>128	>128	>128	>128	64	32	>128	128
		μM	>376,41	188,20	>376,41	>376,41	>376,41	>376,41	188,20	94,10	>376,41	376,41
	CMF	μg	>128	64	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	>128
		μM	>376,41	188,20	>376,41	>376,41	>376,41	>376,41	>376,41	376,41	>376,41	>376,41
CG-02 MM: 358,05	CMI	μg	>128	64	>128	128	>128	128	64	128	>128	>128
		μM	>357,49	178,74	>357,49	357,49	>357,49	357,49	178,74	357,49	>357,49	>357,49
	CMF	μg	>128	64	>128	>128	>128	128	>128	>128	>128	>128
		μM	>357,49	178,74	>357,49	>357,49	>357,49	357,49	>357,49	>357,49	>357,49	>357,49
CG-03 MM: 385,04	CMI	μg	>128	64	128	128	128	64	64	64	>128	>128
		μM	>332,43	166,21	332,43	332,43	332,43	166,21	166,21	166,21	>332,43	>332,43
	CMF	μg	>128	64	128	>128	128	64	>128	64	>128	>128
		μM	>332,43	166,21	332,43	>332,43	332,43	166,21	>332,43	166,21	>332,43	>332,43
CG-04 MM: 368,09	CMI	μg	64	128	>128	>128	128	64	64	>128	>128	>128
		μM	173,87	347,74	>347,74	>347,74	347,74	173,87	173,87	>347,74	>347,74	>347,74
	CMF	μg	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
		μM	173,87	>347,74	>347,74	>347,74	>347,74	>347,74	>347,74	>347,74	>347,74	>347,74
CG-05 MM: 374,02	CMI	μg	>128	32	128	64	>128	>128	128	>128	>128	128
		μM	>342,22	85,55	342,22	171,11	>342,22	>342,22	342,22	>342,22	>342,22	342,22
	CMF	μg	>128	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128
		μM	>342,22	171,11	>342,22	>342,22	>342,22	>342,22	>342,22	>342,22	>342,22	342,22
CG-06 MM: 370,07	CMI	μg	>128	>128	32	128	>128	>128	64	>128	>128	>128
		μM	>345,88	>345,88	86,47	345,88	>345,88	>345,88	172,94	>345,88	>345,88	>345,88
	CMF	μg	>128	>128	32	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
		μM	>345,88	>345,88	86,47	345,88	>345,88	>345,88	>345,88	>345,88	>345,88	>345,88
CG-07 MM: 419,96	CMI	μg	64	32	64	128	>128	64	32	128	>128	32
		μM	152,39	76,19	152,39	304,79	>304,79	152,39	76,19	304,79	>304,79	76,19
	CMF	μg	64	32	128	>128	>128	64	32	>128	>128	64
		μM	152,39	76,19	304,79	>304,79	>304,79	152,39	76,19	>304,79	>304,79	152,39
Fluconazol MM: 306,27	CMI	μg	0,5	4	1	1	16	32	128	-	64	-
		μM	1,63	13,06	3,26	3,26	52,24	104,48	417,93	-	208,96	-
	CMF	μg	0,5	4	1	1	16	32	128	-	64	-
		μM	1,63	13,06	3,26	3,26	52,24	104,48	417,93	-	208,96	-

Os resultados do estudo de atividade antifúngica *in vitro* (Tabela 12) mostraram que os compostos no geral apresentaram atividade fraca a moderada contra as leveduras estudadas, em comparação com os valores de MIC do controle (fluconazol).

Contra a espécie de *Candida tropicalis* (HAM 44) os compostos tiveram a maior atividade de inibição com valores de MIC de 32 µg/mL a 128 µg/mL, e seis compostos apresentaram MIC inferior ao controle (128 µg/mL). A ordem de atividade antifúngica para esta levedura foi CG7 > CG1, CG2, CG3, CG4, CG6 > CG5.

Em relação a *Candida glabrata* (URM 6393) todos os compostos apresentaram fraca atividade de inibição com valores de MIC > 128 µg em comparação com o controle (64 µg/mL).

O CG1 apresentou o menor MIC (32 µg/mL) para *Candida albicans* (ATCC90028) e o CG6 o menor valor de MIC (32 µg/mL) para *Candida parapsilosis* (HAM14) em relação aos outros compostos.

O CG7 foi o composto que além de apresentar o menor MIC para *Candida tropicalis* (HAM 44), também apresentou melhor atividade inibitória para *Candida parapsilosis* (8026-15) e *Candida albicans* (HAM13 e HAM11) em relação aos outros compostos. O CG7 apresenta um átomo de bromo em sua estrutura, e por mais que esse átomo confira alto peso molecular ao composto, a ligação de halogênio realizada pelo bromo pode aumentar a afinidade de ligação e especificidade com o alvo. Existem diversos exemplos em que a ligação de halogênio foi utilizada com sucesso na descoberta de drogas nos últimos anos, inclusive aumentou a potência de diferentes classes de inibidores da enzima transcriptase reversa (Wilcken *et al.*, 2013). Um estudo de Hardegger *et al.* (2011) revela que afinidades de ligação de inibidores de catepsina humana L e MEK1 quinase são significativamente melhores quando substitui um grupo aril por halogênio (cloro, bromo ou iodo). Em ambos os casos a afinidade com o ligante aumenta com o tamanho do halogênio. A presença de um grupo retirador de elétrons (bromo), que é cercado por alta densidade eletrônica, pode ser a razão para a moderada atividade antifúngica do CG7 (Shakhatreh *et al.*, 2016).

6. CONCLUSÃO

A resistência antimicrobiana pode levar ao aumento de infecções fúngicas graves em humanos, dificultando o tratamento eficaz dessas doenças. Portanto, a descoberta de novos compostos que sejam eficazes contra fungos resistentes é de extrema importância para a saúde pública.

As tiossemicarbazonas representam classes promissoras de compostos com atividade antimicrobiana devido às suas propriedades químicas e biológicas. Os compostos deste trabalho foram classificados como moderadamente solúveis, ligando fortemente às proteínas séricas, são inibidores das principais isoformas de citocromo P450, apresentaram baixos valores de *clearance* total e o CG3 foi o que apresentou previsão de maior risco de toxicidade. Todos os compostos apresentaram previsão de boa biodisponibilidade oral, sem nenhuma violação para as regras de Lipinski e Veber.

Os compostos apresentaram fraca a moderada atividade antifúngica *in vitro*, com melhor ação contra *Candida tropicalis* (HAM 44) quando comparado com o controle. Quanto à atividade antioxidante o CG-1 apresentou a melhor atividade em relação aos outros compostos, com resultados de 38.9% e 99.4% nos testes de DPPH e ABTS respectivamente. Na avaliação da atividade citotóxica *in vitro*, os compostos apresentaram altos valores de IC₅₀ para diferentes tipos de células e atividade hemolítica >7.0%, indicando que os compostos não são citotóxicos e nem apresentam potencial de causar hemólise.

O mecanismo de supressão de fluorescência promovido pelos compostos frente à albumina bovina é de natureza dinâmico e reversível, por interações hidrofóbicas e eletrostáticas, processo espontâneo e com alta probabilidade de transferência de energia.

REFERÊNCIAS

- ABU-REIDAH, I. M et al. Synthesis, characterization, antibacterial and antifungal activities of chalcone-based thiosemicarbazones. **Medicinal Chemistry Research**, 29(12), 2541-2558, 2020.
- AFRASIABI, Z. et al. Transition Metal Complexes of Phenanthrenequinone Thiosemicarbazone as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Structure, Spectroscopy, Electrochemistry and in Vitro Anticancer Activity Against Human Breast Cancer Cell-line, T47D **J. Inorg. Biochem.** 2003, 95, 306.
- ALNAJJAR, L. M.; BULATOVA, Nailya R.; DARWISH, Rula M. Evaluation of four calcium channel blockers as fluconazole resistance inhibitors in *Candida glabrata*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 14, p. 185-189, 2018.
- AMSTERDAM, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. **Antibiotics in laboratory medicine**, 1996.
- AWADELKAREEM, A. M., et al. Phytochemical and In Silico ADME/Tox Analysis of *Eruca sativa* Extract with Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Potential against Caco-2 and HCT-116 Colorectal Carcinoma Cell Lines. **Molécules**, 27 (4), 1409, 2022.
- BAUER, DJ. Clinical experience with the antiviral drug marboran (1-methylisatin 3-thiosemicarbazone). **Ann N Y Acad Sci.** 1965 Jul 30;130(1):110-7.
- BIANCHIN, M.D. et al. Lipid core nanoparticles as a broad strategy to reverse fluconazole resistance in multiple *Candida* species. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 523-529, 2019.
- BINGUL, M.E. et al. Synthesis, photophysical and antioxidant properties of carbazole-based bis-thiosemicarbazones. **Res. Chem. Intermed.**, 45(9) (2019), 4487-4499.
- BOSCH, F.; ROSICH, L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. **Pharmacology**, v. 82, n. 3, p. 171-179, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde. Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (1998-2018) / Ministério da Saúde, Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- CHAVES, O.A et al. In vitro and in vivo cytotoxic activity and human serum albumin interaction for a methoxy-styryl-thiosemicarbazone. **Invest New Drugs** 37, 994–1005 (2019).
- CHEW, Ka Lip et al. Delay in effective therapy in anidulafungin-resistant *Candida tropicalis* fungaemia: Potential for rapid prediction of antifungal resistance with whole-genome-sequencing. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 16, p. 105-107, 2019.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – second edition M27-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa. 2002.
- CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 1st ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

COHEN, SS; FROST, RH; YUE, WY. Tibione in the treatment of pulmonary tuberculosis. **Dis Chest**. 1953 May;23(5):507-17

COLMENAREJO, GA et al. Cheminformatic models to predict 663 binding affinities to human serum albumin, **Journal of Medicinal Chemistry**. 44 (2001) 4370– 664 4378.

COOK, M. A.; WRIGHT, G. D. The past, present, and future of antibiotics. **Science Translational Medicine**, v. 14, n. 657, p. eabo7793, 2022.

COSTA, P et al. **Substâncias carboniladas e seus derivados**. 1ª ed., Bookman: Porto Alegre/MG, 2003.

CUENCA-ESTRELLA, M; LEE-YANG, W; CIBLAK, MA; ARTHINGTON-SKAGGS, BA; MELLADO, E; WARNOCK, DW et al. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(11):3644-3647.

DAINA, A; MICHELIN, O; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

DARVAS, F et al. *In Silico* and *Ex silico* ADME approaches for drug discovery. **Top Med Chem** 2002, 2: 1287-1304.

DE SIQUEIRA, LRP et al. Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 170, p. 237-260, 2019.

DEGOLA, F et al. In vitro evaluation of the activity of thiosemicarbazone derivatives against mycotoxigenic fungi affecting cereals, **International Journal of Food Microbiology**, Volume 200, 2015, Pages 104-111.

DIMASI, JA; HANSEN, RW; GRABOWSK HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **J Health Econ** 2003, 22: 151-185. 10.1016/S0167-6296(02)00126-1

DING, LP. et al, Systematic investigation of the toxicity 651 interaction of ZnSe@ZnS QDs on BSA by spectroscopic and microcalorimetry techniques. **Chemosphere**. 92 (2013) 892–897.

EBRAHIMIPOUR, SY. et al. Synthesis and structure elucidation of novel salophen-based dioxo-uranium(VI) complexes: In-vitro and in-silico studies of their DNA/BSA-binding properties and anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 140, p. 172–186, 2017.

EL-HOUSSAINI, Houdaii H. et al. Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. **Microbial pathogenesis**, v. 128, p. 13-19, 2019.

FLEMING, Alexander. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226, 1929.

GANORKAR, K et al. Stabilization of a potential anticancer thiosemicarbazone derivative in Sudlow site I of human serum albumin: In vitro spectroscopy coupled with molecular dynamics simulation. **Biophysical Chemistry**, v. 269, p. 106509, 2021.

GERONIKAKI, AA; PITTA, EP; LIARAS, KS. Thiazoles and thiazolidinones as antioxidants. **Curr. Med. Chem.**, 20(36) (2013), 4460-4480.

GHUMAN, J et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **J Mol Biol.** 2005 Oct 14;353(1):38-52.

GLEESON, MP; HERSEY, A; HANNONGBUA, S. *In - silico* ADME models: a general assessment of their utility in drug discovery applications. **Curr Top Med Chem** 2011, 11(4):358-381. 10.2174/156802611794480927.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

GÜRSOY, A; TERZIOGLU, N; ÖTÜK, G. Synthesis of some new hydrazide-hydrazones, thiosemicarbazides and thiazolidinones as possible antimicrobials, **European Journal of Medicinal Chemistry**, Volume 32, Issue 9, 1997, Pages 753-757.

HALDAR, J. Confronting the Rising Threat of Antimicrobial Resistance: A Global Health Imperative. **ACS Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1-2, 2023

HARDEGGER, LA et al. Halogen bonding at the active sites of human cathepsin L and MEK1 kinase: efficient interactions in different environments. **ChemMedChem** 2011, 6 (11), 2048–2054.

HIRAPARA, Bhavdip et al. DESIGN AND SYNTHESIS OF THIOSEMICARBAZONE METAL COMPLEX DERIVATIVE AS ANTIMICROBIAL AGENT. **Chemistry & Biology Interface**, v. 13, n. 1, 2023.

HU Yan-Jun, et al. Fluorometric investigation of the interaction of bovine serum albumin with surfactants and 6-mercaptopurine, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Volume 80, Issue 3, 2005, Pages 235-242

JAAFAR, Amani et al. Synthesis, Characterization, Antibacterial and Antifungal Activities Evaluation of Metal Complexes With Benzaldehyde-4-methylthiosemicarbazone Derivatives. **ChemistrySelect**, v. 7, n. 10, p. e202104497, 2022.

JACOB, IT et al. Interaction study with DNA/HSA, anti-topoisomerase II α , cytotoxicity and in vitro antiproliferative evaluations and molecular docking of indole-thiosemicarbazone compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 234, p. 123606, 2023.

JEVONS, M. Patricia. “Celbenin”-resistant staphylococci. **British medical journal**, v. 1, n. 5219, p. 124, 1961.

JOHANI, Khalid et al. Characterization of microbial community composition, antimicrobial resistance and biofilm on intensive care surfaces. **Journal of infection and public health**, v. 11, n. 3, p. 418-424, 2018.

- KATO, Hideaki et al. Prevalence of, and risk factors for, hematogenous fungal endophthalmitis in patients with Candida bloodstream infection. **Infection**, v. 46, p. 635-640, 2018.
- KURUP, MRP; JOSEPH, M. Transition metal complexes of furan-2-aldehyde thiosemicarbazone. **Synth React Inorg Met Org Chem**. 2003; 33:275–281.
- LAKOWICZ, JR. (Ed.). **Principles of fluorescence spectroscopy**. Boston, MA: springer US, 2006.
- LIESEN, AP et al. Synthesis and evaluation of anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 3685-3691, 2010
- LIPINSKI, CA; LOMBARDO, F; DOMINY, BW; FEENEY, P. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 64, 4-17, 2012.
- LIPINSKI, CA et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Volume 23, Issues 1–3, 1997, Pages 3-25.
- LOMBARDO, F; GIFFORD, E; SHALAEVA, MY. *In silico* ADME prediction: data, models, facts and myths. **Mini Rev Med Chem** 2003, 3: 861-875.
- LURIA, Salvador E.; DELBRÜCK, Max. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. **Genetics**, v. 28, n. 6, p. 491, 1943.
- LYNDEM, S et al. A comprehensive in vitro exploration into the interaction mechanism of coumarin derivatives with bovine hemoglobin: Spectroscopic and computational methods. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 436, p. 114425, 2023.
- MOHAMED, Nadia A.; MOHAMED, Riham R.; SEOUDI, Rania S. Synthesis and characterization of some novel antimicrobial thiosemicarbazone O-carboxymethyl chitosan derivatives. *International journal of biological macromolecules*, v. 63, p. 163-169, 2014.
- MOHARRAM, HA; YOUSSEF, MM. Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.*, 11(1) (2014), 31-42.
- NEHAR, OK et al. New thiosemicarbazone Schiff base ligands: Synthesis, characterization, catecholase study and hemolytic activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1204, p. 127566, 2020
- NETO, LNA et al. Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. **Chemico-biological interactions**, v. 272, p. 172-181, 2017.
- NGUYEN, DT et al. Antioxidant activities of thiosemicarbazones from substituted benzaldehydes and N-(tetra-O-acetyl-β-d-galactopyranosyl) thiosemicarbazide, **European Journal of Medicinal Chemistry**, Volume 60, 2013, Pages 199-207.
- NI, Y; ZHU, R; KOKOT, S. Competitive binding of small molecules with biopolymers: A 656 fluorescence spectroscopy and chemometrics study of the interaction of aspirin and 657 ibuprofen with BSA, **Analyst**. 136 (2011) 4794–4801.

NICOLAOU, Kyriacos C.; MONTAGNON, Tamsyn. **Molecules that changed the world**. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.

OLIVEIRA, Jamerson Ferreira de et al. Síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade antitumoral e anti-inflamatória de novos derivados 2-tiofenotiossemicarbazonas. 2016.

OLIVEIRA, JF, et al. "Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (E)- N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone." **Biomedicine & Pharmacotherapy** 80 (2016): 388-392.

OTA, AT et al. Modeling of the interconversion between Z and E isomeric forms of pyridine-2-formyl thiosemicarbazone, **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, Volume 451, Issue 3, 1998, Pages 269-275.

PANG, Zheng et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019.

PARUMS, DV. Editorial: The World Health Organization (WHO) Fungal Priority Pathogens List in Response to Emerging Fungal Pathogens During the COVID-19 Pandemic. **Med Sci Monit**. 2022 Dec 1;28:e939088.

PATEL, Krishna Kumar et al. Alginate lyase immobilized chitosan nanoparticles of ciprofloxacin for the improved antimicrobial activity against the biofilm associated mucoid *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis. **International journal of pharmaceutics**, v. 563, p. 30-42, 2019.

PEDROSA, S. Síntese, caracterização estrutural e estudos do mecanismo de ação antitumoral de derivados indólicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

PIRES, DEV; BLUNDELL, TL.; ASCHER, David B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015.

PITA, J.R.; PEREIRA, A.L. Farmácia e medicamentos na I Guerra Mundial (1914-1918): traços gerais. **Revista CEPIHS**, 4, 169-187. 2014.

PRETÉ, PSC et al. (2011) Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction—a spin label study. **Biochim. Biophys Acta** 1808:164–170

QUEIROZ, CM et al. Thiosemicarbazone and thiazole: in vitro evaluation of leishmanicidal and ultrastructural activity on *Leishmania infantum*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 11, p. 2050-2065, 2020.

ROSS, PDS. Subramanian, Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces 673 Contributing to Stability, **Biochemistry**. 20 (1981) 3096–3102.

ROY, A. et al. Underlying molecular interaction of bovine serum albumin and linezolid: A biophysical outlook. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 36, n. 2, p. 387– 397, 2017.

SANTOS, NFN et al. Synthesis, characterization, antioxidant and antiparasitic activities new naphthyl-thiazole derivatives. **Experimental Parasitology**, p. 108498, 2023.

SARKAR, D. Probing the interaction of a globular protein with a small fluorescent probe in the presence of silver nanoparticles: Spectroscopic characterization of its domain specific association and dissociation, **RSC Advances**, 3 (2013) 24389–24399.

SCARIM, Cauê Benito; PAVAN, Fernando Rogério. Thiazole, triazole, thio- and semicarbazone derivatives-Promising moieties for drug development for the treatment of tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, v. 1, p. 100002, 2021.

SEPKOWITZ, Kent A. One hundred years of Salvarsan. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 4, p. 291-293, 2011.

SHAKHATREH, MA et al. Study of the antibacterial and antifungal activities of synthetic benzyl bromides, ketones, and corresponding chalcone derivatives. *Drug Des Devel Ther*. 2016 Nov 8;10:3653-3660.

SIBUH, BZ et al. Synthesis, In Silico Study, and Anti-Cancer Activity of Thiosemicarbazone Derivatives. **Biomedicines** 2021, 9, 1375.

SIDDIQUI, EJ; AZAD, I; KHAN, AR; KHAN T. Thiosemicarbazone complexes as versatile medicinal chemistry agents: a review. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 689-703, 2019.

SILVA, Aldo César Passilongo da et al. Tiossemicarbazonas: síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade biológica. 2016.

SIVARAJ, S et al. Molecular structures, Hirshfeld analysis and biological investigations of isatin based thiosemicarbazones, **Journal of Molecular Structure**, Volume 1198, 2019, 126904

SOBHI, MG et al. Thiazole-Based Thiosemicarbazones: Synthesis, Cytotoxicity Evaluation and Molecular Docking Study. **Drug Design, Development and Therapy**, 15:, 659-677, 2021.

SOUZA, Marina Azevêdo et al. The antimicrobial activity of lapachol and its thiosemicarbazone and semicarbazone derivatives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 342-351, 2013

STORR, T.; **Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry**, 1st ed., Wiley: New York, 2014.

SWARUP, KT et al. Cytotoxic behavior and DNA/BSA binding activity of thiosemicarbazone based Ni(II) complex: bio-physical, molecular docking and DFT study, **Journal of Molecular Liquids**, Volume 383, 2023, 121921.

TAFVIZIZAVAREH, Shima et al. Antibiotic hypersensitivity in MRSA induced by special protein aggregates. **International journal of biological macromolecules**, v. 137, p. 528-536, 2019.

TAŞDEMİR, Demet et al. Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of novel chiral thiosemicarbazone derivatives as potent anticancer agents. **Chirality**, v. 27, n. 2, p. 177-188, 2015.

TENORIO, Rômulo P. et al. Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-Toxoplasma gondii activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 15, n. 10, p. 2575-2578, 2005.

TENÓRIO, Rômulo P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, p. 1030-1037, 2005.

TENÓRIO, RP et al. Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

THANH, N.D., Duc, H.T., Duyen, V.T. *et al.* Synthesis and antibacterial and antifungal activities of *N*-(tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)thiossemicarbazones of substituted 4-formylsydnones. **Chemistry Central Journal** 9, 60 (2015).

THANH, Nguyen Dinh et al. Synthesis and antibacterial and antifungal activities of *N*-(tetra-*O*-acetyl- β -d-glucopyranosyl) thiossemicarbazones of substituted 4-formylsydnones. **Chemistry Central Journal**, v. 9, p. 1-14, 2015.

UDDIN, Tanvir Mahtab et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of infection and public health**, v. 14, n. 12, p. 1750-1766, 2021.

VALEUR, B; BROCHON JC. **New Trends in Fluorescence Spectroscopy**, Springer Press, Berlin, 2001. p. 25

VEBER, DF et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Med. Chem** 2002, 45, 2615.

VERMA, A; SARAF, SK. 4-thiazolidione-A biologically active scaffold. *European journal of medicinal chemistry*, v.43, n. 5, p. 897-905, 2008.

WALSH, Christopher et al. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. American Society for Microbiology (ASM), 2003.

WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. GENEVA, 2017. Acesso em: 14/08/2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

WHO, 2020. <https://www.who.int/news/item/20-11-2020-world-leaders-join-forces-to-fight-the-accelerating-crisis-of-antimicrobial-resistance>. Acesso em 02 de junho de 2023

WILCKEN R, ZIMMERMANN MO, LANGE A, JOERGER AC, BOECKLER FM. Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. *J Med Chem*. 2013 Feb 28;56(4):1363-88.

WILCKEN, R; ZIMMERMANN, MO; LANGE, A; JOERGER, AC; BOECKLER, FM. Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. **J Med Chem**. 2013 Feb 28;56(4):1363-88.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Report. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Oct 25, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2017-2018. In: **Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2017-2018**. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan on antimicrobial resistance. 2015. <Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>> Acesso em 07 de maio de 2023.

XIAO, Qi et al. Interaction thermodynamics investigation of bovine serum albumin with black phosphorus quantum dots via spectroscopic and molecular simulation techniques. **Journal of Molecular Structure**, v. 1276, p. 134725, 2023.

YANG, L; LIU, H; XIA, D; WANG, S. Antioxidant properties of camphene-based thiosemicarbazones: Experimental and theoretical evaluation. **Molecules**, 25(5) (2020), 1192.

YILDIZ, M et al. Dimethoxyindoles based thiosemicarbazones as multi-target agents; synthesis, crystal interactions, biological activity and molecular modeling. **Bioorganic Chemistry**, v. 120, p. 105647, 2022.

YING, Li et al. The inhibition of trans-cinnamaldehyde on the virulence of *Candida albicans* via enhancing farnesol secretion with low potential for the development of resistance. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 515, n. 4, p. 544-550, 2019.