



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARIA JOSÉ CRISTIANE DA SILVA

**SÍNTESE DE TIOSSEMICARBAZONAS, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL,
CITOTOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ADMET E ESTUDOS DE
INTERAÇÃO COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)**

Recife

2022

MARIA JOSÉ CRISTIANE DA SILVA

**SÍNTESE DE TIOSSEMICARBAZONAS, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL,
CITOTOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ADMET E ESTUDOS DE
INTERAÇÃO COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Correspondente ao indicado na ata de defesa

Orientador (a): Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Coorientador (a): Prof. Dr. Iranildo José da Cruz Filho

Recife

2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SILVA, MARIA JOSÉ CRISTIANE DA

Título: SÍNTESE DE TIOSSEMICARBAZONAS, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL, CITOTOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ADMET E ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração Planejamento e Síntese de Fármacos.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Profª. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Instituição: Departamento de Antibióticos - UFPE

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Instituição: Departamento de Farmácia - UEPB

Assinatura: _____

Prof. Dr. Diego Santa Clara Marques

Instituição: Departamento de Antibióticos - UFPE

Assinatura: _____

*Aos meus pais Ivonete Julia e Henrique Rosendo, dedico esta dissertação
por sempre acreditarem em mim e serem exemplos extraordinários de Amor,
Persistência, União, Honestidade, Determinação e Dedicação.
Anseio ter sido merecedora do esforço dedicado por nossa família,
principalmente quanto à minha formação profissional.
Á Willams Luiz pelo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela oportunidade de adquirir mais conhecimento e concluir mais uma das etapas que planejei alcançar para a minha realização pessoal e profissional.

À minha família, em especial, aos meus pais (Henrique e Ivonete), aos meus irmãos (Eudes, Edson e Claudiane), a minha sobrinha (Julia) e ao meu noivo Willams que, incansavelmente, sempre acreditaram e apoiaram todos os meus sonhos, embora sabendo que para a realização de cada um deles seria necessária a minha ausência em muitos momentos em família.

Aos meus amigos do LQIT/UFPE Keriolaine, Cleberson, Fernanda, Pedro e Thammyris, posso dizer que somos mais do que um grupo de pesquisa, e sim, um grupo de amigos. Vocês sempre estendem as mãos para me ajudar, me incentivam diariamente, se alegram e se entristecem junto comigo. Vocês me fizeram ser parte dessa história e eu sou muito grata por isso. Levarei lindas memórias de conquistas e superação e falarei para outras pessoas o quanto admiro cada um de vocês. Vocês me ensinaram muito, não apenas o conhecimento técnico e científico necessário para a minha formação, mas acima de tudo, me ensinaram com atitudes sobre empatia e gentileza. Receber o título de mestre não seria tão satisfatório se eu olhasse para o meu passado e não tivesse construído amizades verdadeiras. Vocês têm o coração gigante e merecem muito conquistar cada sonho lutado, porque vocês também são para mim, grandes exemplos de determinação e luta diária. Eu vou estar mesmo que de longe, com um grande sorriso no rosto e com o coração feliz por saber que vocês estão se realizando pessoalmente e profissionalmente.

Aos meus orientadores Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima e Prof. Dr. Iranildo José da Cruz Filho, que contribuíram imensuravelmente para a conquista do meu título de mestre. À Profa. Nena, em especial, eu tenho uma enorme gratidão, porque embora diante de tantas dificuldades sempre acreditou em mim e nunca soltou a minha mão, desde o meu terceiro período da graduação, às minhas iniciações científicas e agora durante o meu mestrado. Ela é muito mais do que nossa mãe científica e orientadora, mas sim, nossa segunda mãe. Ela é uma enciclopédia da ciência e da vida. Com ela aprendi muito sobre liderança, compaixão, resiliência, compreensão e sobretudo, paciência!

À Universidade Federal de Pernambuco – Campus Recife, ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial, ao Laboratório de Química e Inovação Terapêutica pela oportunidade de me capacitar e me tornar Mestre em Ciências Farmacêuticas.

A todos que contribuíram para a minha formação profissional eu tenho uma enorme gratidão!

RESUMO

Proteínas plasmáticas, como a albumina (BSA), são também utilizadas nestes estudos para verificar as propriedades farmacocinéticas dos fármacos. Nestes estudos, moléculas contendo porções fenílico e tiossemicarbazonas são consideradas promissoras por possuírem atividade biológicas. Isso é particularmente relevante para tratamentos de diversas doenças, uma vez que essa proteína se acumula no microambiente aumentando a distribuição de medicamentos, além de suprir as demandas energéticas das células. Diferentes técnicas de espectroscopia, termodinâmica e estudos *in silico* podem ser empregadas para verificar como a albumina se liga aos ligantes usando albumina sérica humana (HSA) ou albumina sérica bovina (BSA) devido à sua similaridade estrutural. Neste sentido, a BSA foi escolhida para ser estudada neste trabalho, que teve como objetivo sintetizar sete novos compostos da série (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs e investigar da capacidade de interação com a albumina sérica bovina (BSA). Todos os compostos foram sintetizados com êxito utilizando tiossemicarbazidas substituídas e o aldeído trimetoxi-benzaldeído, em temperatura ambiente, e suas estruturas químicas elucidadas satisfatoriamente por meio das técnicas de RMN ¹H e RMN ¹³C, técnica DEPT, e infravermelho (IV) apresentando rendimentos entre 60 e 85 %, e sinais diagnósticos de formação das tiossemicarbazonas. A atividade de ligação à BSA dos compostos foi estudada através das técnicas espectroscópicas de absorção e fluorescência, em diferentes concentrações, verificando-se que todos os compostos possuem afinidade de interação com esta biomolécula. Os resultados mostram que a principal interação ocorrida entre os complexos BSA-JFs foi por meio do processo de extinção estática, apresentam caráter moderado. Os compostos apresentam boa disponibilidade oral obedecendo as regras de Lipinski e Veber. Onde apenas o composto JF-14 violou uma regra. Em ensaios de atividade antioxidantes os compostos foram capazes de promover atividade antioxidante moderada para o ensaio de DPPH e ABTS. Os compostos também apresentaram uma atividade citotoxicidade de moderada em linhagem celular de macrófagos J774.A1 e HepG2. Estudos adicionais devem ser realizados para prever os mecanismos de interação entre os outros compostos e BSA, e se obter um sistema de liberação controlada e diminuição de citotoxicidade através de nanopartículas de BSA e incorporação de compostos com atividade biológica definida.

Palavras-chave: Citotoxicidade, Antioxidante; Tiossemicarbazonas; BSA

ABSTRACT

Plasma proteins, such as albumin (BSA), are also used in these studies to verify the pharmacokinetic properties of drugs. In these studies, molecules containing phenyl and thiosemicarbazones are considered promising because they have biological activity. This is particularly relevant for treatments of various diseases, since this protein accumulates in the microenvironment, increasing the distribution of drugs, in addition to supplying the energy demands of cells. Different techniques of spectroscopy, thermodynamics and in silico studies can be employed to verify how albumin binds to ligands using human serum albumin (HSA) or bovine serum albumin (BSA) due to their structural similarity. In this sense, BSA was chosen to be studied in this work, which aimed to synthesize seven new compounds from the series (E)-*N*-phenyl-2-(3,4,5-trimethoxy-benzylidene)-hydrazine-substituted carbothioamides JFs and to investigate the ability to interact with bovine serum albumin (BSA). All compounds were successfully synthesized using substituted thiosemicarbazides and the aldehyde trimethoxy-benzaldehyde, at room temperature, and their chemical structures were satisfactorily elucidated using ^1H NMR and ^{13}C NMR, DEPT technique, and infrared (IR) with yields between 59.85 to 85.50%, and diagnostic signs of thiosemicarbazone formation. The BSA binding activity of the compounds was studied through spectroscopic techniques of absorption and fluorescence, at different concentrations, verifying that all compounds have an affinity for interaction with this biomolecule. The results show that the main interaction occurred between the BSA-JFs complexes was through the static extinction process, presenting a moderate character. The compounds show good oral availability following the rules of Lipinski and Veber. Where only the JF-14 compound violated a rule. In antioxidant activity assays, the compounds were able to promote moderate antioxidant activity for the DPPH and ABTS assay. The compounds also showed moderate cytotoxicity activity on macrophage cell line J774.A1 and HepG2. Additional studies should be carried out to predict the mechanisms of interaction between the other compounds and BSA, and to obtain a controlled release system and reduction of cytotoxicity through BSA nanoparticles and incorporation of compounds with defined biological activity.

Keywords: Cytotoxicity, Antioxidant; Thiosemicarbazones; BSA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da albumina do soro bovino com seus respectivos subdomínios e resíduos de triptofano	21
Figura 2 – Espectro de emissão da BSA apresentando diminuição da intensidade de fluorescência na presença de um extintor.	22
Figura 3. Estrutura geral das tiossemicarbazonas	24
Figura 4. Conformações <i>sin</i> e <i>anti</i> das tiossemicarbazonas	24
Figura 5. Derivado <i>E</i> -N-(4-etil-fenil)-2-(metil-benzilideno)-tiossemicarbazonas potenciais antioxidantes	26
Figura 6. Composto TSC-2 potencial antioxidante	26
Figura 7. Compostos Dimetoxi-indólicos-tiossemicarbazonas potenciais antioxidantes	27
Figura 8. Complexo carbonil-rutênio(II)-1-naftil-pirazolil-tiossemicarbazona (composto 2)	27
Figura 9. Compostos <i>N</i> -((piridin-2-il)-etilideno)-hidrazina- carbotioamidas (1) e (2)	28
Figura 10. Derivado aril-tiossemicarbazona <i>p</i> -nitro-substituído com atividade antichagásica	28
Figura 11. Derivados □- □□□-naftil-tiossemicarbazonas com atividade antichagásica	29
Figura 12. Derivado 2-(4-bromo-fenoxi)-1-(4-metoxi-fenil)-etan-1-ona-tiossemicarbazona JW-16-2 com atividade antileishmania	29
Figura 13. Derivado (<i>E</i>)-2-((5-bromo-7-metoxi-1 <i>H</i> -indol-3-il)-metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazina-carbotioamida 2d com atividade antileishmania	30
Figura 14. Tiossemicarbazonas substituídas com naftaleno	30
Figura 15. 2-(10-etil-4a-hidroxi-dodecahidro-5,9-metano-benzo[8]anulen-11-ilideno)-hidrazino-carbotioamida (HL)	30
Figura 16. Isatina-tiossemicarbazona	31
Figura 17. 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazona <i>N</i> 4-(3-piridil) L-10	31
Figura 18. (<i>E</i>)- <i>N</i> -fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs	33

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do composto JF-23	43
Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C do composto JF-23	43
Figura 21 Espectro de Infravermelho do JF-23	44
Figura 22. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> promovida pelos compostos JFs nos ensaios de DPPH(A) e ABTS (B).	51
Figura 23. Resultados de porcentagem de hemólise promovida pelos compostos JFs. Para este ensaio o controle positivo Triton X promoveu 100% de hemólise e o controle negativo, apenas as células, 0% respectivamente	54
Figura 24. Espectros de absorção no UV/Vis para a interação dos compostos JF-14 (A), JF- 15(B), JF-17 (C), JF-21 (D) JF- 23 (E), JF-24 (F) e JF-26 (G) com a albumina respectivamente	58
Figura 25. Espectros de fluorescência para a interação dos compostos JF-14 (A), JF- 15(B), JF-17 (C), JF-21 (D) JF- 23 (E), JF-24 (F) e JF-26 (G) com a albumina em diferentes temperaturas 298, 303, 310 e 315 K respectivamente	60
Figura 26. Espectros de fluorescência para a interação dos compostos JF-14 (A), JF- 15(B), JF-17 (C), JF-21 (D) JF- 23 (E), JF-24 (F) e JF-26 (G) com a albumina em diferentes temperaturas 298, 303, 310 e 315 K respectivamente	63
Figura 27. Espectros de fluorescência para a interação dos compostos JF-14 (A), JF- 15(B), JF-17 (C), JF-21 (D) JF- 23 (E), JF-24 (F) e JF-26 (G) com a albumina em diferentes temperaturas 298, 303, 308 e 313K respectivamente	66
Figura 28. Gráfico de Van't Hoff para a ligação dos compostos JF-14 (A), JF- 15(B), JF-17 (C), JF-21 (D), JF- 23 (E), JF-24 (F) e JF-26 (G) com a albumina respectivamente.	69

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Equilíbrio tautomérico entre as formas tiona e tiol das tiossemicarbazonas 25
- Esquema 2.** Síntese das tiossemicarbazonas a partir da reação entre compostos carbonilados e tiossemicarbazidas 25
- Esquema 3.** Mecanismo de reação para formação das (*E*)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1) 39
- Esquema 4.** Mecanismo de reação para formação das *N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2) 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades físico-químicas dos compostos (<i>E</i>)- <i>N</i> -fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2)	41
Tabela 2.	parâmetros de ADMET e avaliação da biodisponibilidade oral para os compostos JFs	48
Tabela 3.	Resultados de atividade antioxidante <i>in vitro</i> promovida pelos compostos JFs para os ensaios de DPPH e ABTS respectivamente	52
Tabela 4.	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> frente a macrófagos J77-A1 e linhagem de hepatoma humano promovida pelos compostos (<i>E</i>)- <i>N</i> -fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas JFs	56
Tabela 5.	Dados da absorção da albumina do soro bovino na presença dos compostos JFs.	59
Tabela 6.	Resultados espectroscópicos da interação dos compostos JFs com albumina obtidos pela Equação linear de Stern-Volmer.	61
Tabela 7.	Resultados espectroscópicos da interação dos compostos JFs com albumina na obtidos pela Equação linear de Stern-Volmer modificada.	64
Tabela 8.	Os parâmetros de ligação para as interações entre BSA e compostos LQIT/JFs em diferentes temperaturas.	67
Tabela 9.	Valores dos parâmetros termodinâmicos ΔH , ΔS e ΔG para as interações entre BSA e compostos JFs em diferentes temperaturas	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA – Albumina do soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

CCD – Cromatografia de camada delgada

DC – Dicroísmo Circular

DEPT – Intensificação sem distorção por transferência de polarização (do inglês *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMSO-*d*6 – Dimetilsulfóxido deuterado

HSA – Albumina do soro humano (do inglês *Human Serum Albumin*)

IC₅₀ – Inibição em 50% das células

IV – Infravermelho

LqIT – Laboratório de Química e Inovação Terapêutica

R_f – Fator de retenção

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

Tris - Tetrametilhidroxiaminometano

Trp – Aminoácido triptofano

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

δ ppm – Deslocamento químico em parte por milhão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1. OBJETIVO GERAL	18
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Albumina	19
2.2. Tiossemicarbazonas	23
2.2.1 Atividade antioxidante	26
2.2.2 Interação Ligante-BSA	27
2.2.3 Atividade antiparasitária	28
2.2.4 Atividade antimicrobiana	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Reagentes e Solventes	32
3.2 Equipamentos	32
4. METODOLOGIA	33
4.1 Procedimentos experimentais	33
4.1.1 Síntese das (<i>E</i>)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1)	33
4.1.2 Síntese das (<i>E</i>)- <i>N</i> -fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2)	33
4.2 Avaliação <i>in silico</i> dos parâmetros farmacocinéticos, toxicológicos e de biodisponibilidade oral	34
4.3 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	34
4.4 Atividade hemolítica <i>in vitro</i>	35
4.5 Atividade citotóxica frente a células de macrófagos J774-A1 e HepG2	36
4.6 Estudos de interação dos compostos tiossemicarbazonas-BSA.	36
4.6.1 Preparo da solução da BSA e dos compostos-teste	36
4.6.2 Estudos de interação compostos com a BSA por espectrofotometria de UV/Vis	37
4.6.3 Espectroscopia de emissão de fluorescência dos compostos com a BSA	37
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

6.1. Estudo Químico	39
6.1.1 Mecanismo reacional de síntese das (<i>E</i>)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1) <i>N</i> -4 substituídas (etapa 1)	39
6.1.2 Mecanismo reacional de síntese das (<i>E</i>)- <i>N</i> -fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2) (etapa b)	40
6.1.3 Características Físico-químicas das <i>N</i> -fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2).	41
6.1.3.1 Descrição dos Compostos (<i>E</i>)- <i>N</i> -fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-1-carbotioamida JFs	44
6.2. Avaliação <i>in silico</i> dos parâmetros farmacocinéticos, toxicológicos e de biodisponibilidade oral	47
6.3. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	51
6.4. Atividade citotóxica frente a células de mamíferos	53
6.5. Atividade hemolítica <i>in vitro</i>	53
6.6. Atividade citotóxica <i>in vitro</i> frente a macrófagos J774-A1 e HepG2	54
6.7. Estudo de interação dos compostos tiossemicarbazonas e albumina	56
6.8. Espectroscopia no UV/Vis interação dos compostos tiossemicarbazonas e albumina	56
6.9. Espectroscopia de fluorescência determinação do mecanismo de interação	59
6.10. Espectroscopia de fluorescência determinação das constantes de ligação	64
6.11. Espectroscopia de fluorescência determinação dos parâmetros termodinâmicos	67
12. CONCLUSÕES	71
13. PERSPECTIVAS	72
14. REFERENCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

As tiossemicarbazonas são amplamente exploradas na química medicinal como ligantes entre anéis heterocíclicos como potenciais fragmentos bioativos. Nos últimos anos muitos trabalhos relatam as tiossemicarbazonas associadas a anéis heterocíclicos como potenciais fragmentos bioativos (Li *et al.*, 2021).

Dentre eles, destaca-se os núcleos de acridina, indol, quinolina, naftil, e mesmo anéis fenólicos importantes núcleos para o desenvolvimento de quimioterápicos.

Os derivados tiossemicarbazonas têm recebido destaque no âmbito da química medicinal visto suas grandes versatilidades químicas e devido às suas promissoras aplicações biológicas, associadas ao seu importante potencial farmacológico (Bharti *et al.*, 2010), dentre os quais já se é relatada: atividade antiviral (Glisoni *et al.*, 2010), antiparasitária (Britta *et al.*, 2014; Queiroz *et al.*, 2020), antimicrobiana (Montazeri, Salehzadeh, Zamani, 2020), atividade antiproliferativa (Almeida *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2019), antioxidante (Nguyen, 2013) e também antimicrobiana (De Araújo Neto *et al.*, 2017). Além de poderem agir como intercaladores de DNA e inibidores da topoisomerase IIa (Ribeiro *et al.*, 2019).

Além de fármacos tiossemicarbazônicos empregados na terapêutica ou em estudos clínicos avançados, a exemplo da Tiacetazona®, usado na terapia da tuberculose (Domagk *et al.*, 1946); Triapine®, usado na terapia do câncer (Finch *et al.*, 2000; Attia *et al.*, 2008; Kunos *et al.*, 2013).

Neste contexto, enfatizamos a importância da albumina que tem sido empregada em vários estudos para avaliar as interações ligante-proteína. A BSA é obtida a partir de soro bovino. BSA é amplamente utilizado devido à sua homologia estrutural de 76% com HSA, baixo custo e boa disponibilidade, bem como à semelhança de sítios de ligação IIA e IIIA aos subdomínios HSA. Outra característica da BSA é a presença de dois resíduos de triptofano (Trp), Trp-134 e Trp-212, em vez de um único como no HSA. Em ambas as proteínas, Trp-212 e Trp-214 estão localizados na mesma região, enterrados nos bolsões hidrofóbicos do subdomínio IIA. Essa semelhança é uma das características que permite estudos espectroscópicos e de exploração de ambas as proteínas para prever o perfil de ligação entre novos compostos químicos e a biomolécula (Ribeiro *et al.*, 2021).

Neste trabalho descreveremos a síntese de novos compostos da série (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs e a investigação da capacidade de interação com a albumina sérica bovina (BSA). Além de avaliar a atividade antioxidante,

realizar o estudo *in silico* do perfil de biodisponibilidade e avaliar a citotoxicidade *in vitro* em células de mamíferos (Macrófagos J774-A1, HepG2 e hemácias).

1.1. OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar diferentes compostos tiossemicarbazonas, avaliar as atividades antioxidantes, citotóxicas e a biodisponibilidade *in silico*, além de determinar o perfil de interação molecular com a albumina (BSA).

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e determinar as propriedades físico-químicas das tiossemicarbazonas substituídos;
- Elucidar estruturalmente por meio de técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono (RMN ^{13}C), e espectroscopia no infravermelho (IV);
- Analisar as propriedades farmacocinéticas ADMET *in silico* dos compostos das séries das tiossemicarbazonas;
- Avaliar a atividade antioxidante pelos métodos DHPP e ABTS;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos novos compostos sintetizados pelo método do MTT em macrófagos J774 e HepG2;
- Avaliar a atividade hemolítica;
- Realizar ensaios de interação com albumina a fim de elucidar um mecanismo de interação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Albumina

A albumina é sintetizada no fígado e continuamente secretada na corrente sanguínea. São biomoléculas chave para várias funções celulares no corpo humano. A albumina é considerada a principal proteína extracelular do sistema circulatório, representando cerca de 55-60% de todas as proteínas plasmáticas. Vários receptores estão fortemente envolvidos na distribuição e metabolismo da proteína. As interações receptor-albumina podem ser modificadas por mutações específicas, um achado que pode ser de interesse farmacêutico e médico (Kragh-Hansen 2016; Ebrahimipour *et al.*, 2017; Čoćić *et al.*, 2018). Por isso, atuam como transportadoras de diversos ligantes endógenos e exógenos, incluindo ácidos graxos, aminoácidos e nutrientes, sendo capaz de vincular também metais e produtos farmacêuticos a locais de ligação específicos (Da Silva *et al.*, 2019; Kragh-Hansen 2016).

Geralmente é sintetizado pelas células do fígado (cerca de 10 a 15 g/dia) e liberado na corrente sanguínea. Apesar da predominância da síntese hepática de albumina, a produção extra-hepática de albumina em órgãos como rins, pâncreas, cérebro, coração e pulmão tem sido identificada em alguns animais (Varanko, Soumen, Chilkoti, 2020).

No sangue, a albumina desempenha uma série de funções importantes, incluindo a manutenção da pressão oncótica, regulação do pH, bem como transporte e distribuição de uma infinidade de ligantes endógenos e exógenos insolúveis e hidrofóbicos, como metais, ácidos graxos (FAs), hormônios, aminoácidos, produtos residuais, toxinas e medicamentos (Berna *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2021). No corpo humano, tanto na saúde quanto na doença, sua função de transporte é destacada pela ligação aos medicamentos e consequente distribuição na corrente sanguínea até o local de ação do fármaco (Peters 1995; Kragh-Hansen, Chuang, Otagiri 2002; Fasano *et al.* 2005).

A maior concentração de albumina é encontrada nos espaços extravasculares, embora em menor concentração do que na corrente sanguínea. A maior concentração na circulação é o principal contribuinte para a pressão coloidosmótica do plasma e para o efeito Gibbs-Donnan nos capilares (Kragh-Hansen 2016).

A albumina parece ser o antioxidante circulante quantitativamente mais importante e possui propriedades enzimáticas tão pronunciadas que provavelmente são de importância biológica (Anraku *et al.*, 2013).

Sendo assim, os fármacos e suas propriedades físico-químicas e farmacológicas são influenciadas pela ligação e afinidade às proteínas plasmáticas, incluindo albumina sérica e glicoproteínas. Essa ligação fármaco-proteína é de natureza reversível, e espera-se o equilíbrio entre a molécula do fármaco ligado e a livre. Os efeitos terapêuticos são demonstrados apenas pela fração não ligada do fármaco e o grau de ligação às proteínas varia de fármaco para fármaco (Ràfols, Zarza, Bosch 2014; Abdelhameed *et al.*, 2017).

Portanto, a tendência de ligação proteína-fármaco é considerada um dos fatores mais significativos na avaliação de atividades farmacológicas específicas (Ribeiro *et al.*, 2021).

Na literatura se encontram muitas informações sobre a localização e estrutura dos sítios de ligação e sobre potenciais interações de ligantes. As informações estruturais também são úteis ao projetar novos fármacos, seja para evitar a ligação ou para fazer uso da função de depósito da proteína. Terapêuticas não-ligantes podem obter estabilidade melhorada e se beneficiar da longa meia-vida biológica da albumina formando complexos com ela. A formação do complexo pode ocorrer enriquecendo a terapêutica com uma molécula orgânica que pode se ligar reversivelmente ou covalentemente à proteína. Se o fármaco for um polipeptídeo ou proteína, as proteínas de fusão podem ser produzidas (Kragh-Hansen 2016; Ribeiro *et al.*, 2021).

Existem vários métodos desenvolvidos e relatados para a preparação de complexo fármaco-albumina para obter forma farmacêuticas estáveis e adequadas com base em uma variedade de moléculas candidatas a fármacos, como métodos de emulsificação, formação de complexos e de solvatação (Weber, Coester, Kreuter Langer, 2000; Nagati *et al.*, 2020).

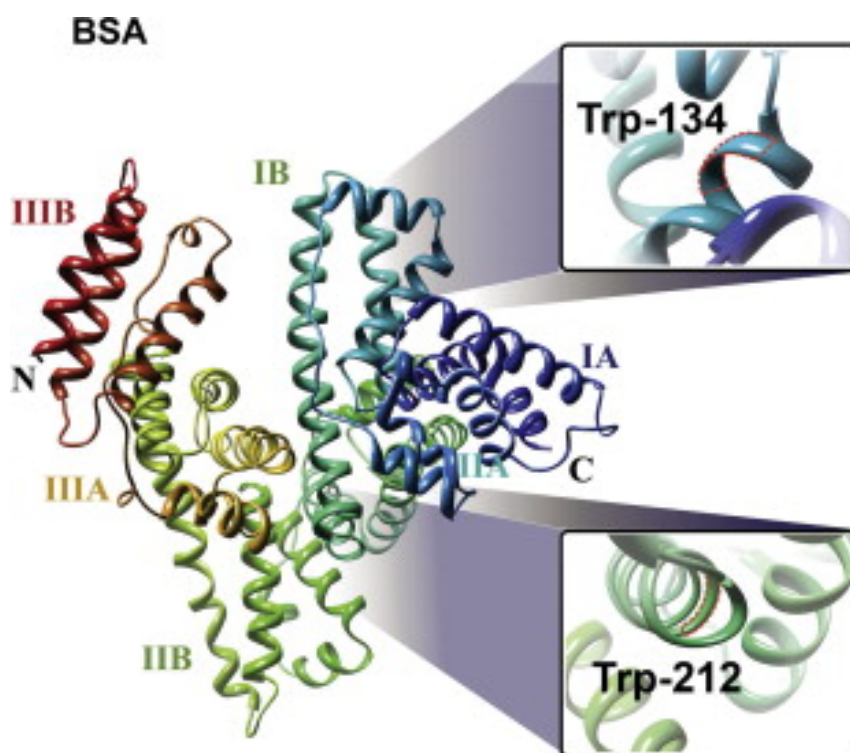
Isso é particularmente relevante para tratamentos de diversas doenças, uma vez que essa proteína se acumula no microambiente aumentando a distribuição de medicamentos, além de suprir as demandas energéticas das células. Diferentes técnicas de espectroscopia, termodinâmica e estudos *in silico* podem ser empregadas para verificar como a albumina se liga aos ligantes usando albumina sérica humana (HSA) ou albumina sérica bovina (BSA) devido à sua similaridade estrutural (Liu *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2021).

A albumina do soro bovino (BSA) faz parte deste grupo de proteínas amplamente estudadas devido à sua estrutura terciária homóloga de 76% com a albumina do soro humano (HSA), além do baixo custo e boa disponibilidade. A BSA é constituída de três grandes domínios (I, II e III), similares em estrutura e classificados em A e B. Estes domínios são divididos em nove alças (L1-L9) por 17 ligações dissulfeto. As regiões onde ocorre o armazenamento dos compostos são frequentemente localizadas em cavidades hidrofóbicas (subdomínios IIA e IIIA),

conhecidas como sítios I e II de sudlow (Figura 1) (Da Silva *et al.*, 2019; Suryawanshi *et al.*, 2016).

Comparativamente, a BSA possui dois resíduos de triptofano (Trp) denominados Trp-134 e Trp-212, situados nos subdomínios IB e IIA, enquanto que a HSA contém apenas o resíduo Trp-214, no subdomínio IIA (Da Silva *et al.*, 2019). O resíduo Trp-134 está localizado na superfície da estrutura da BSA e o Trp-212 nos bolsos de ligação hidrofóbicos (Abdi *et al.*, 2012; Belatik *et al.*, 2012).

Figura 1. Estrutura da albumina do soro bovino com seus respectivos subdomínios e resíduos de triptofano.



Fonte: Abdi *et al.*, (2012, p. 21).

Habitualmente, a ligação entre fármacos e proteínas acontece reversivelmente através de interações químicas como, por exemplo, ligações iônicas, interações de Van der Waal, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, com as hidroxilas, carboxilas ou outras regiões disponíveis nos aminoácidos que formam sítios de ligação (Singh; Mehta, 2006).

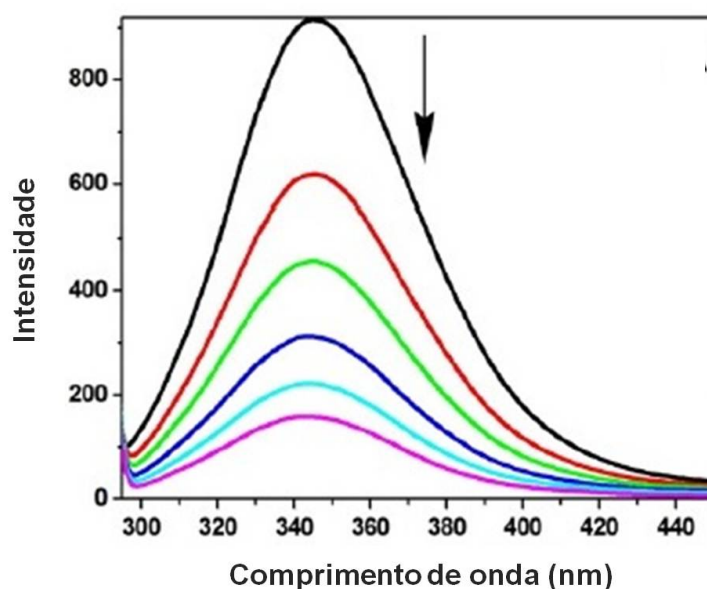
Estas interações podem ocasionar o aumento da solubilidade de fármacos no plasma e facilitar sua distribuição para os alvos biológicos, influenciando também na estabilidade e toxicidade durante a terapêutica, e, conseqüentemente, desempenhar papel fundamental na eficácia farmacológica (Hu *et al.*, 2005; Hebha *et al.*, 2014). Nesta perspectiva, avaliar a afinidade de um fármaco com a BSA, é um fator importante para obtenção de tratamentos mais eficazes e

espera-se, com isso, que os diagnósticos e terapias passem a utilizar essas interações como mais uma nova alternativa para obtenção de resultados (Hu *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2021).

Uma maneira de monitorar a eficácia dos fármacos no organismo e obter seus parâmetros físicos químicos é estudar essas proteínas através de técnicas espectroscópicas de absorção e fluorescência, pois, alterações no seu perfil espectral são capazes de informar certas mudanças estruturais e moleculares, quando em contato com as substâncias de estudo (Moreira *et al.*, 2015; Singla; Luxami; Paul, 2016). Essas alterações são bastante úteis para posterior análise de suas mudanças causadas pelo ligante, investigando-se o mecanismo de interação por meio dos efeitos de aumento ou diminuição da luz e desvios para a região do vermelho e azul (Mishra *et al.*, 2014). Estudos através de docking molecular também são úteis para facilitar a análises destas interações (Chaves *et al.*, 2017).

Na espectroscopia de fluorescência, é interessante notar a capacidade da proteína em emitir luz através de seus aminoácidos aromáticos. Os resíduos da BSA, quando excitados em 280 nm, exibem uma emissão de fluorescência intrínseca na faixa de 320 a 400 nm. A ligação de substâncias aos resíduos de triptofano, fenilalanina ou tirosina pode gerar alterações do sinal fluorescente e, conseqüentemente, melhor entendimento das mudanças estruturais (Figura 2). (Eswaran *et al.*, 2016; Singla; Luxami; Paul 2016). Esta supressão pode ser induzida através de transferências de energia, formação de complexos, rearranjos moleculares e colisões moleculares. Dentre a BSA e a HSA, a emissão dos resíduos Trp são as mais significativas por conta da natureza química do microambiente onde estão situados (Moreira *et al.*, 2015).

Figura 2 – Espectro de emissão da BSA apresentando diminuição da intensidade de fluorescência na presença de um extintor.



Fonte: Adaptado de Eswaran *et al.*, (2016, p. 6).

Pode-se, ainda, mencionar os mecanismos de interação de fármacos e albumina através de duas formas: mecanismo estático e mecanismo dinâmico. No mecanismo de extinção estática, o ligante (fluoróforo) ao entrar em contato com a albumina se complexa a esta no estado fundamental, resultando em alterações significativas nas propriedades de absorção da proteína. A extinção dinâmica afeta somente o estado excitado dos fluoróforos quando colide com a proteína, sem alterar os espectros de absorção (Eswaran *et al.*, 2016; Kalaivani *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2014; Raja, Bhuvanesh, Natarajan, 2012; Prabhakaran *et al.*, 2013). Estas informações são úteis e valiosas para, assim, encontrar a maneira como as diversas substâncias químicas podem interagir no meio biológico e causar efeitos terapêuticos.

Também se observa uma tendência crescente de usar a albumina em análises das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) e da formação de nanopartículas de BSA e moléculas candidatas a fármacos com finalidade de contribuição como transporte, liberação controlada e menor citotoxicidade.

Nagati *et al.*, (2020) estudou a obtenção de nanopartículas de HSA carregadas com forskolina (FR-HSANPs) através de métodos de incorporação e ligação por afinidade. Os FR-HSANPs foram caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão que a maioria deles tem formato circular e tamanho em torno de 340 nm. A carga do fármaco foi superior a 88% e outros perfis de liberação sustentada foram observados, que foi de 77,5% em 24 h. Além de diminuir a citotoxicidade em linhagens de células de mamíferos.

Kalhor *et al.*, (2020) avaliaram a liberação controlada e diminuição da toxicidade da 2,6-divanililidenociclohexanona (DVH) como um derivado estável da curcumina. As nanopartículas de BSA (BSANPs) e DVH (DVH@BSANPs) mostraram liberação sustentada, reduziram significativamente a citotoxicidade de DVH em linhas celulares normais, e a atividade antitumoral de DVH foi aumentada quando foi carregado em BSANPs sem conduzir a necrose. Assim, sugerem que DVH@BSANPs são um novo sistema de liberação sustentada biocompatível para abordagem terapêutica eficaz.

Desta forma, os estudos de interação com BSA ou HSA se tornam importantes para avaliar o armazenamento, distribuição e a liberação controlada, com possibilidade de diminuir a citotoxicidade de novos compostos potenciais bioativos.

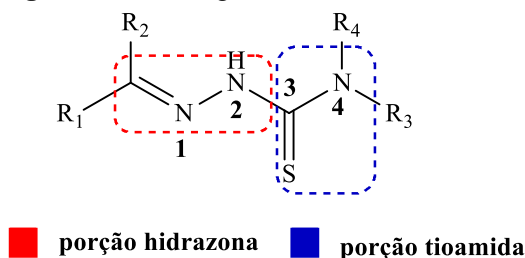
2.2. Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas correspondem a uma classe de compostos orgânicos constituída pela presença de heteroátomos de nitrogênio e enxofre, das quais destacam-se as porções

hidrazona ($\text{HC}=\text{N}-\text{NH}-$) e tioamida ($\text{S}=\text{C}-\text{N}-$). Devido à facilidade em sua obtenção e à versatilidade em seu emprego final ou intermediária para a síntese de outras classes de compostos orgânicos, as tiossemicarbazonas são vastamente empregadas na síntese orgânica.

A estrutura básica das tiossemicarbazonas e as respectivas numerações para seus átomos podem ser determinadas conforme estabelecido pela IUPAC (1993) (Figura 3).

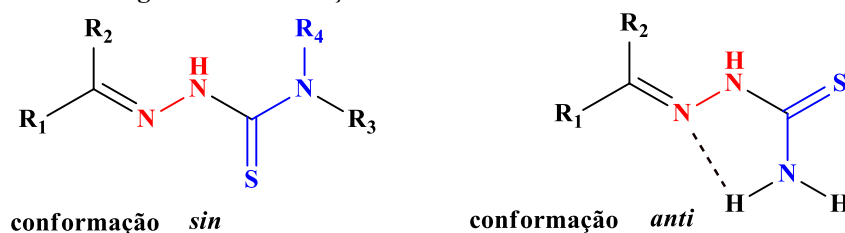
Figura 3. Estrutura geral das tiossemicarbazonas



Fonte: O próprio autor.

Devido a fatores eletrônicos e estéricos, as tiossemicarbazonas podem apresentar-se em duas conformações, em relação à ligação C-N: *sin*, quando os átomos de enxofre e nitrogênio hidrazônico estão do mesmo lado; e *anti*, quando os átomos de enxofre e nitrogênio hidrazônico encontram-se em lados opostos (Figura 4). De um modo geral, as tiossemicarbazonas não substituídas em N4 costumam apresentar a conformação *anti* (conformação em que pode ser estabelecida ligação de hidrogênio $\text{N1} \cdots \text{H}-\text{N4}$) enquanto aquelas, onde N4 é substituído, apresentam-se prioritariamente na conformação *sin*. (Casas, García-Tasende, Sordo, 2002).

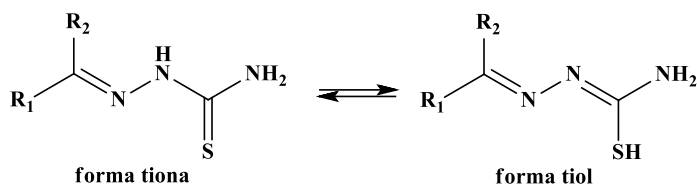
Figura 4. Conformações *sin* e *anti* das tiossemicarbazonas



Fonte: O próprio autor.

Além disso, as tiossemicarbazonas constituem uma classe orgânica reconhecida por possuir significativa deslocalização eletrônica. Em consequência disso, tais compostos podem apresentar-se em equilíbrio tautomérico nas formas tiona ($\text{C}=\text{S}$) ou tiol ($\text{C}-\text{SH}$) (Esquema 1), podendo haver predominância ou existência exclusiva de apenas uma destas formas (Li *et al.*, 2010).

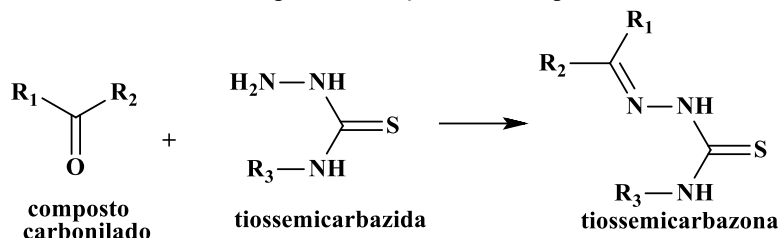
Esquema 1. Equilíbrio tautomérico entre as formas tiona e tiol das tiossemicarbazonas



Fonte: O próprio autor.

As tiossemicarbazonas são geralmente obtidas mediante a reação entre tiossemicarbazidas e compostos carbonilados (aldeídos ou cetonas), geralmente empregando catalizador ácido (Esquema 2). Por sua vez, as tiossemicarbazidas podem ser comercialmente adquiridas ou devidamente preparadas a partir da reação entre hidrato de hidrazina e reagentes como isotiocianatos, ácido tioglicólico e ditiocarbamato (Tenório *et al.*, 2005).

Esquema 2. Síntese das tiossemicarbazonas a partir da reação entre compostos carbonilados e tiossemicarbazidas



Fonte: O próprio autor.

Sob a perspectiva sintética as tiossemicarbazonas tem como característica principal a variabilidade de formas de obtenção, assim como uma ampla aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Além de apresentarem baixo custo de síntese; grande economia de átomos, visto que, todos os átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final, com exceção da água que é liberada, e rapidez de síntese obtendo altos rendimentos (Oliveira *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2019; Jacob *et al.*, 2021).

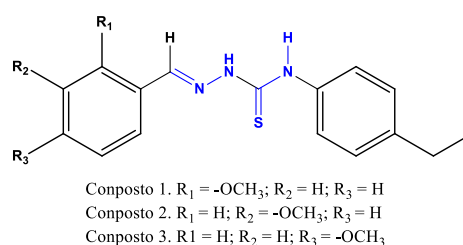
As tiossemicarbazonas são amplamente exploradas na química medicinal como ligantes entre anéis heterocíclicos como potenciais fragmentos bioativos. Muitos trabalhos associando anéis heterocíclicos como potenciais fragmentos bioativos têm sido relatados nos últimos anos (Li *et al.*, 2021). Dentre eles, destaca-se os núcleos de acridina, indol, quinolina, naftil, fenil, piridil, importantes núcleos para o desenvolvimento de novos compostos candidatos a fármacos que contribuíram com o arsenal terapêutico.

As tiossemicarbazonas também são amplamente utilizadas devido a diversidade de atividades biológicas.

3.2.1 Atividade antioxidante

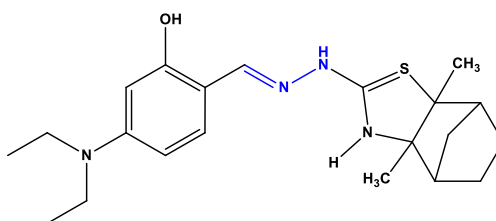
Zhang et al. (2020) sintetizaram três (*E*)-*N*-(4-etil-fenil)-2-(metil-benzilideno)-tiossemicarbazonas foram submetidos a avaliação antioxidante pelo método de eliminação de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) *in vitro* e os resultados mostraram que todos os compostos sintetizados possuem boa atividade antioxidante na seguinte ordem 3>2>1 (Figura 5).

Figura 5. Derivado *E*)-*N*-(4-etil-fenil)-2-(metil-benzilideno)-tiossemicarbazonas potenciais antioxidantes



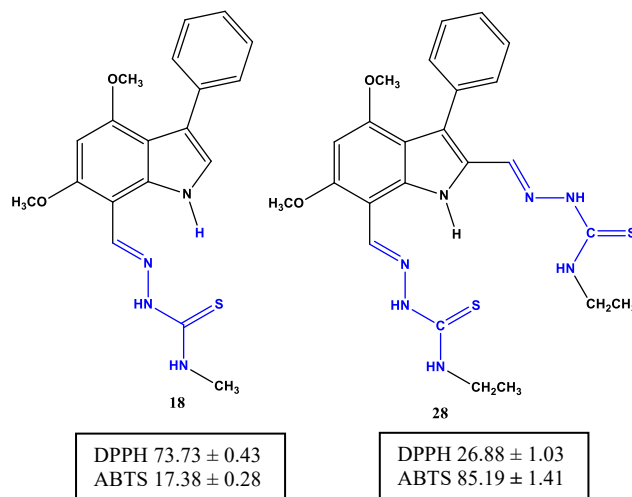
Yang et al., (2020) obtiveram tiossemicarbazonas à base de canfeno e investigaram a atividade antioxidante por ensaios de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os resultados revelam que o composto TSC-2 exibiu o melhor efeito com o menor EC₅₀ 16.78 ± 0.12 µM (0,208 ± 0,004 mol/mol DPPH) (Figura 6).

Figura 6. Composto TSC-2 potencial antioxidante



Yıldız et al., (2022) sintetizaram compostos Dimetoxi-indólicos-tiossemicarbazonas e avaliaram o potencial de eliminação de radicais livres foi determinado utilizando os métodos de eliminação de radicais livres 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Observaram que os potenciais antioxidantes foram moderados para os ensaios DPPH e ABTS e os compostos 28 e 18 foram os candidatos mais potentes para ambos os ensaios antioxidantes (Figura 7).

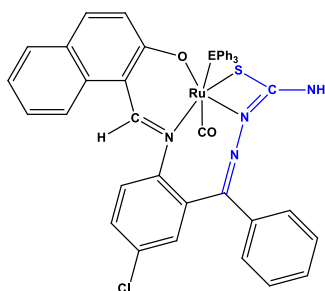
Figura 7. Compostos Dimetoxi-indólicos-tiossemicarbazonas potenciais antioxidantes



2.2.2 Interação Ligante-BSA

Vijayan *et al.*, (2014) sintetizaram complexos carbonil de rutênio (II) a partir dos compostos pirazolil-tiossemicarbazonas e, avaliaram a interação com a BSA. Onde observaram que o complexo 2 interage com BSA mais fortemente do que os outros complexos, devido à presença do sistema de anel naftil num compartimento do ligando. Os maiores valores de a constante de extinção K_q (M^{-1}) = $2,33 \times 10^5$ e a constante de ligação K_b (M^{-1}) = $7,71 \times 10^4$, o que indica uma forte interação entre o BSA e o complexo (Figura 8).

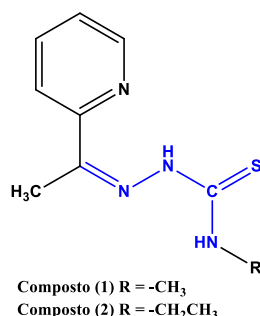
Figura 8. Complexo carbonil-rutênio(II)-1-naftil-pirazolil-tiossemicarbazona (composto 2)



Biswas *et al.*, (2019) ao estudar compostos *N*-((piridin-2-il)-etilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1) e (2), observou que o valor da constante de taxa de extinção (k_q) é cerca de 100 vezes maior que a taxa de colisão óptica constante, $2 \times 10^{10} M^{-1}$. Esses resultados indicam que tanto 1 quanto 2 interagem fortemente com a BSA pelo processo de extinção estática, apresentado valores de K_{sv} (M^{-1}) = 6.30×10^4 , K_q (M^{-1}) = 6.31×10^{12} e K_b (M^{-1}) = 4.99×10^5 para o composto (1) e, para o composto (2) valores de K_{sv} (M^{-1}) = 4.28×10^4 , K_q (M^{-1}) = $4.28 \times$

10^{12} e $K_b (M^{-1}) = 4.01 \times 10^5$, o que indica uma forte interação entre o BSA e os compostos (1) e (2) (Figura 9).

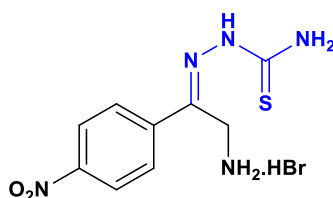
Figura 9. Compostos *N*-((piridin-2-il)-etilideno)-hidrazina- carbotioamidas (1) e (2)



2.2.3 Atividade antiparasitária

Blau *et al.*, (2013) realizaram a síntese de doze aril tiossemicarbazonas, avaliando sua atividade contra formas epimastigotas de *T. cruzi* (agente etiológico da tripanossomíase americana, mais comumente denominada doença de Chagas) e seu perfil de inibição frente à cruzaina (Figura 10). Os compostos apresentaram significativa atividade antichagásica *in vitro*, sobretudo quando o grupo nitro esteve presente na posição *para* do anel aromático e quando o grupo amino esteve ausente na estrutura. Contudo, não foi encontrada correlação direta entre os resultados *in vitro* contra os parasitos e o percentual de inibição da cruzaina, o que sugere a participação de outros mecanismos como estresse oxidativo devido à presença do grupo nitro.

Figura 10. Derivado aril-tiossemicarbazona *p*-nitro-substituído com atividade antichagásica

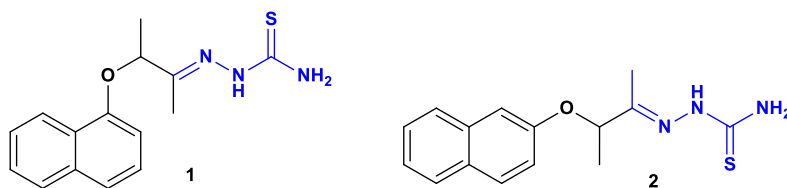


Legenda: Composto mais ativo da série ($IC_{50} = 6,3$ nM *versus* 34,6 nM do controle positivo benznidazol).

Fonte: O próprio autor.

Moreira *et al.*, (2014) avaliaram a atividade de aril-tiossemicarbazonas contra as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*. Os resultados revelaram o perfil promissor da maior parte dos compostos estudados, inclusive dos derivados naftil tiossemicarbazonas (α -naftil e β -naftil) (Figura 11). Embora não se tenha identificado potencial de inibição para estas moléculas, as análises de citometria de fluxo positivas para anexina V e iodeto de propídeo sugeriram um mecanismo apoptótico relacionado à ação tripanocida destes compostos.

Figura 11. Derivados α - e β -naftil-tiossemicarbazonas com atividade antichagásica

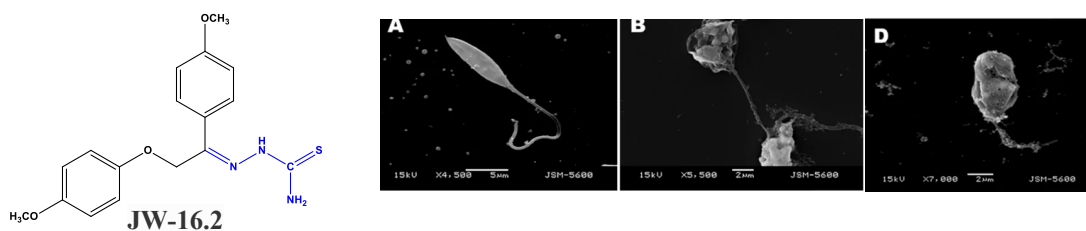


Legenda: α -naftil tiossemicarbazona (1) e β -naftil tiossemicarbazona (2): valores de IC_{50} contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* de 4,9 μ M e 17,9 μ M, respectivamente; e valores de CC_{50} contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* de 1,5 μ M e 5,6 μ M, respectivamente.

Fonte: o próprio autor.

Queiroz *et al.*, (2020) avaliaram algumas tiossemicarbazonas como agentes antiparasitários, especialmente os compostos que tiveram, o substituinte metóxi ligado ao anel fenil, JW-16.2 (Figura 12). As formas promastigotas de *Leishmania infantum* tratadas com concentrações de 9,66 e 19,32 μ M do composto JW-16,2 apresentou alterações na topologia celular apresentando ondulações/rugas no corpo, variação morfológica de fusiforme a ovoide, bem como desintegração da membrana do parasita. Alterações morfológicas no flagelo, como retração, também foi observada. As alterações morfológicas foram mais visíveis nas concentrações mais alta do composto JW-16.2 (19,32 μ M).

Figura 12. Derivado 2-(4-bromo-fenoxi)-1-(4-metoxi-fenil)-etan-1-ona-tiossemicarbazona JW-16-2 com atividade antileishmania

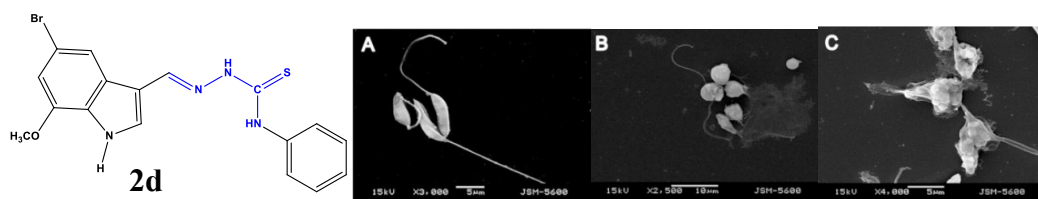


Legenda: **A.** controle negativo. **B.** AmB, controle positivo. **D.** Tratado com 19,32 μ M de JW-16.2.

Fonte: O próprio autor.

Silva *et al.*, (2019) ao avaliar a atividade leishmanicida verificou a eficácia de compostos indólicos-tiossemicarbazonas substituídas sobre as formas promastigotas de *Leishmania infantum*. Todos os compostos da série foram capazes de inibir as formas promastigotas com IC_{50} que variou de 5,60 – 23,25 μ M. Contudo, destacamos o composto 2d que apresentou melhor resultado com valor IC_{50} de 5,60 μ M (Figura 13).

Figura 13. Derivado (*E*)-2-((5-bromo-7-metoxi-1*H*-indol-3-il)-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida 2d com atividade antileishmania

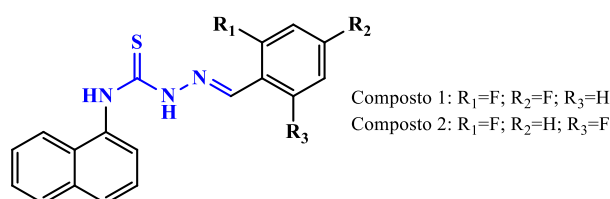


Legenda: A. controle negativo. B. Tratado com 5,60 μM de 2d. D. AmB, controle positivo
Fonte: O próprio autor.

2.2.4 Atividade antimicrobiana

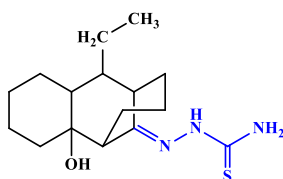
A atividade contra fungos associada a compostos tiossemicarbazônicos está sendo bastante explorada e demonstra bons resultados. Altıntope *et al.*, (2016) obtiveram sucesso na dois derivados 2-benzilideno-*N*-(naftalen-1-il)-tiossemicarbazonas substituídos, ambos apresentando CIM de 125 μg/ml contra *Candida glabrata* e 250 μg/ml contra outras espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *Fusarium* (Figura 14).

Figura 14. Tiossemicarbazonas substituídas com naftaleno



Atividade bacteriostática de tiossemicarbazonas também já foi observada no estudo de Pahonțu *et al.*, (2016) em que testou contra cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* com limites de CIM de 0,5–10 μg/mL (Figura 15).

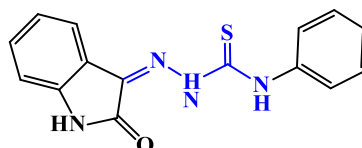
Figura 15. 2-(10-etil-4a-hidroxi-dodecahidro-5,9-metano-benzo[8]anuleno-11-ilideno)-hidrazino-carbotioamida (HL)



Zhang *et al.*, (2015) em seu trabalho com tiossemicarbazonas condensadas com Isatina avaliou seu espectro antibacteriano frente a cepas resistentes a meticilina de *Staphylococcus aureus* (MRSA) e cepas resistentes à vancomicina de *Enterococcus* (VRE). Os resultados

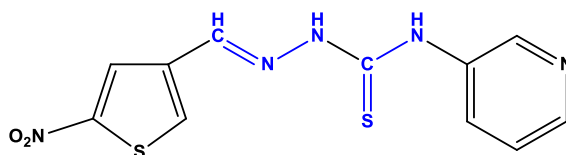
mostraram que o composto foi mais eficiente contra a cepa de *S. aureus* com MIC de 0,78 mg/L. Além disso, o mesmo composto apresentou MIC de 3,12 mg/L contra a cepa resistente a vancomicina de *Enterococcus* VRE-309. Esses dados mostram a importância de halogênios na estrutura para baixos valores de CMI quando comparados aos fármacos controle que foram de > 8,0 mg/L e 1,0 mg/L para vancomicina frente a VRE-309 e MRSA respectivamente (Figura 16).

Figura 16. Isatina-tiossemicarbazona



De Araújo *et al.*, (2017) Sintetizou doze derivados de 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazonas *N4*-substituídos (L1-12) que apresentaram uma atividade antifúngica promissora, especialmente contra *C. neoforman* (CMI = 0,06 µg/mL) para o compostos L-10 associada a uma citotoxicidade moderada (12,5–50,0 µg/mL) (Figura 17).

Figura 17. 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazona *N4*-(3-piridil) L-10



Podemos ainda citar outras de acordo relatos na literatura que atrelam esses compostos tiossemicarbazonas a atividades biológicas tais como: anticâncer (Barros *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2015, Ribeiro *et al.*, 2019), antiviral (Patel; Divatia; Clercq, 2013), antimalárica (Chellan *et al.*, 2010), antichagásica (Gonçalves *et al.*, 2017), esquistossomicida (Almeida Júnior *et al.*, 2019) Além de poderem agir como intercaladores de DNA e inibidores da topoisomerase IIa (Ribeiro *et al.*, 2019).

Desta forma, a proposta deste trabalho foi sintetizar e caracterizar diferentes compostos tiossemicarbazonas, avaliar as atividades antioxidantes, citotóxicas e a biodisponibilidade *in silico*, além de determinar o perfil de interação molecular com a albumina (BSA).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes utilizados para a síntese dos derivados quinolina-tiossemicarbazonas e tiazólicos foram 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), 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (CAS: 1898-66-4), 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) (CAS: 30931-67-0), dimetilsulfóxido (CAS: 67-68-5), persulfato de potássio (CAS: 7727-21-1), metanol (CAS: 67-56-1), ácido ascórbico (CAS: 50-81-7), butylated hydroxytoluene (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).

Todos os reagentes foram fornecidos pela Merck. Já os solventes utilizados foram diclorometano, etanol, ácido acético glacial e acetona foram fornecidos pela Dinâmica e Vetec.

3.2 Equipamentos

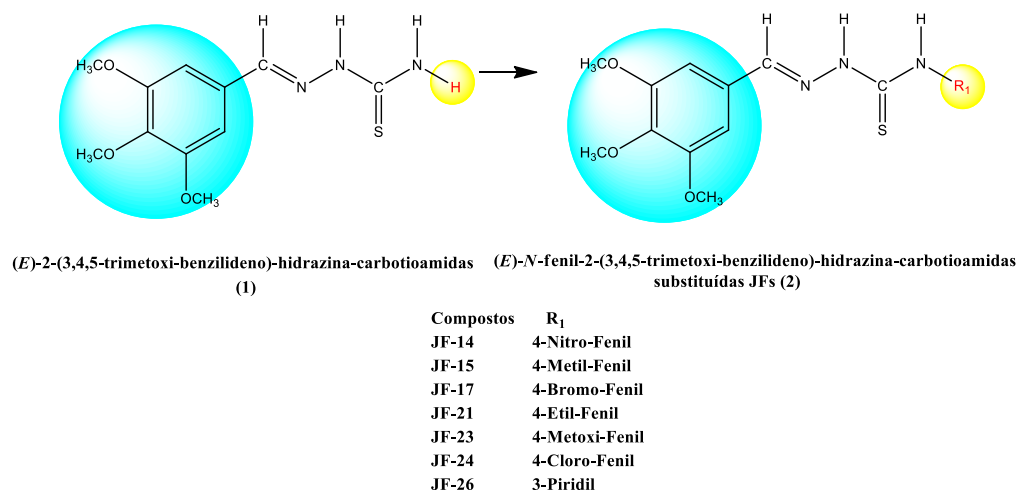
Para a caracterização físico-química, foi utilizado fusiometro Fisatom modelo 431D (Fisatom, São Paulo, Brasil). Os valores das razões de frente foram calculados com auxílio de cromatografia em camada delgada (CCD) com placas de sílica gel 60 F254 Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), de 0,25 mm de espessura, tamanho médio, 5x3cm e revelado na câmara UV (254 ou 366 nm) CN-15LC (Vilber Lourmat, Collégien, França).

Para a caracterização estrutural dos compostos sintetizados utilizamos, na espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), espectrofotômetro FTIR Bruker, modelo (Bruker Daltonics, Billerica, EUA), em pastilhas de KBr, com bandas de absorção expressas em cm^{-1} . Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C) foram realizados em espectrofotômetro MHz-Varian, modelo Unity plus-300 (Varian, Palo Alto, EUA), utilizando DMSO- d_6 como solvente. Para os estudos com albumina foram utilizados o UV-VIS, Espectrofotômetro Ultraspec 3000 PRO UV-Visible e na Fluorescência Jasco FP-6300.

4. METODOLOGIA

Na Figura 18 abaixo apresenta as (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas JFs substituídas obtidas.

Figura 18. (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs



4.1 Procedimentos experimentais

4.1.1 Síntese das (*E*)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1)

A obtenção das (*E*)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamida substituídas (1), foi realizada utilizando a metodologia aplicada por Liesen et al. (2010) e Ribeiro et al. (2019) com poucas modificações. A reação envolveu o mecanismo de adição nucleofílica entre 2 mols de solução de hidrazina e 1 mol de isotiocianatos substituídos em diclorometano, usado como solvente na temperatura 30 ± 0.5 °C sob agitação magnética por 60 minutos. Em todas as reações houve formação de precipitado e mudança da coloração logo após adição dos isotiocianato. As reações foram acompanhadas por CCD para verificar a formação do produto e sua finalização.

4.1.2 Síntese das (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2)

Para síntese das (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2) foi aplicada a metodologia utilizada por Ribeiro et al. (2019) e Jacob et al. (2021) com poucas modificações de com a Figura 13. O anel benzilidênico tri-substituído foi utilizado como núcleo principal juntamente com as (*E*)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1) para conduzir a formação dos compostos JFs (2). O reagente trimetoxi-benzaldeído foi primeiramente solubilizado com etanol, na presença de ácido acético glacial e deixado à temperatura 30 ± 0.5 °C e sob agitação por cerca de 10 minutos. Decorridos

10 minutos, as das (*E*)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1) foram adicionados ao sistema reacional para formação das (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2). A mistura reacional foi aquecida à temperatura de 78 ± 0.5 °C. As reações foram acompanhadas por CCD para verificar a formação do produto e sua finalização. Os produtos foram filtrados e lavados sucessivamente com etanol para sua purificação.

4.2 Avaliação *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos, toxicológicos e de biodisponibilidade oral

A avaliação *in silico* dos parâmetros de ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) e de biodisponibilidade oral é uma etapa importante para a descoberta de novos candidatos a fármacos (Daina et al. 2014; Daina et al. 2017; Pires; Blundell; Ascher et al. 2015). Esse estudo foi realizado utilizando as plataformas gratuitas pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>) (para a avaliação dos parâmetros de ADMET) e SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) (para a avaliação da biodisponibilidade oral através das regras de Lipinski e Veber) respectivamente.

4.3 Atividade antioxidante *in vitro*

O potencial de eliminação de radicais livres foi determinado utilizando os métodos de eliminação de radicais livres 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os ensaios foram realizados segundo metodologia proposta por Yildiz et al. (2022) e Yuldasheva et al. (2022) com modificações.

Para a análise de eliminação de radicais livres ABTS, inicialmente, foi produzido o radical ABTS⁺ a partir da reação da solução aquosa de ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (140 mM). A solução foi mantida na ausência luz, a 25 °C por 16 horas. Posteriormente, essa solução diluída em metanol e analisada em espectrofotômetro (Ultraspec 3000 PRO) com a finalidade de se obter uma absorbância de 0.75 ± 0.05 nm em 734 nm. Em seguida, os compostos foram diluídos em DMSO em concentrações que variaram de 0 a 1400 µM. Os ensaios foram constituídos por 100 µL dos respectivos compostos (nas diferentes concentrações) e 3.9 mL da solução de ABTS. Os ensaios foram mantidos na ausência de luz por 15 minutos e analisados em um espectrofotômetro UV-Vis (Ultraspec 3000 PRO) a 734 nm. O branco experimental foi o metanol absoluto (3.9 mL) contendo 100 µL de DMSO. Os padrões experimentais utilizados foram o ácido ascórbico e BHT nas mesmas concentrações dos compostos. Os resultados em

porcentagem de eliminação dos radicais foram calculados utilizando a Equação 1. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para o método de eliminação de radicais livres de DPPH, foi preparada a solução de DPPH em uma concentração de 60 µM. Em seguida, a solução foi diluída em metanol absoluto, e analisada em espectrofotômetro, a fim de se obter uma absorbância de 0.70 ± 0.01 em 515 nm. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições utilizadas nos ensaios de ABTS. Os resultados de atividade foram calculados pela Equação 1. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left(\frac{A_c - A_s}{A_c} \right) * 100\% \quad (1)$$

Onde A_c = Absorbância do controle; A_s = Absorbância da amostra

Com os resultados obtidos foi possível obter uma curva da atividade antioxidante em função da concentração dos compostos. O IC_{50} , (concentração que captura 50% dos radicais ABTS/DPPH) foi determinado por regressão não linear.

4.4 Atividade hemolítica *in vitro*

Os ensaios de hemólise *in vitro* tem por finalidade avaliar a toxicidade de um determinado composto (Jeswani *et al.*, 2015). Os experimentos foram realizados segundo Nehar *et al.*, (2020) e Queiroz *et al.*, (2020) 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 $CaCl_2$ a 10 mM, logo após receberam um volume de 50 µL dos compostos diluídos em DMSO 1% em concentrações que variaram de 900 a 28.12 µM. Em seguida, 100 µL de uma suspensão a 2% (v/v) de eritrócitos de hamster em solução salina contendo 10 mM de $CaCl_2$ foi adicionado. O controle consistiu de 100 µL de solução salina mais 100 µL de suspensão de eritrócitos. Após centrifugação por 1 h, seguida de incubação por 1 h a 27 °C, o sobrenadante foi descartado e a hemoglobina liberada foi determinada por absorbância a 540 nm em um leitor de placas Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Os resultados da atividade hemolítica foram expressos pela Equação 2. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O controle positivo foi o Triton-X, já o controle negativo foi apenas a solução de eritrócitos.

$$\text{Hemolysis (\%)} = \left[\left(\frac{\text{ABS sample} - \text{ABS blank}}{\text{ABS Triton X} - \text{ABS blank}} \right) \right] * 100 \quad (2)$$

Onde: ABS amostra = Absorbância da amostra; ABS branco = absorbância do controle negativo; ABS Triton X = absorbância controle positivo. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz número de protocolo 164/2020.

4.5 Atividade citotóxica frente a células de macrófagos J774-A1 e HepG2

A fim de avaliar os efeitos tóxicos 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 a metodologia proposta por Queiroz *et al.*, (2020) e Silva *et al.*, (2019) com modificações. As células utilizadas neste estudo foram macrófagos J774-A1 e HepG2. Inicialmente foram semeadas 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 (3.9 a 500 µg/mL) dissolvido em DMSO/água destilada por 72 horas. 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. A viabilidade celular foi calculada utilizando a Equação 3.

$$\text{Cellular viability (\%)} = \left(\frac{VC}{TC} \right) * 100\% \quad (3)$$

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

A concentração efetiva que promove 50% da viabilidade celular (IC₅₀) foi determinada. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

4.6 Estudos de interação dos compostos tiossemicarbazonas-BSA.

4.6.1 Preparo da solução da BSA e dos compostos-teste

Para a realização dos ensaios foi necessária a preparação da solução da albumina em uma concentração de 1 mM em tampão Tris-HCl (0.1 M e pH 7.6). Em seguida, a solução foi armazenada no freezer a -20 °C. Os compostos foram diluídos em DMSO 1% em uma concentração também de 1 mM e armazenados nas mesmas condições da BSA.

4.6.2 Estudos de interação compostos com a BSA por espectrofotometria de UV/Vis

Os ensaios de interação dos compostos com a albumina foram realizados segundo metodologia proposta por Oliveira *et al.*, (2017) Ribeiro *et al.*, (2019) e Sousa *et al.*, 2022 com modificações. Para a avaliação da interação foi fixada a proteína na concentração de 10 µM (1.0 mL) e os compostos tiveram suas concentrações variadas de 5 a 40 µM (5µL), os quais foram analisados em triplicata após completa homogeneização e repouso por 10 minutos a 25 °C em um espectrofotômetro de absorção (Ultraspec 3000 PRO) com varredura entre 200 nm – 600 nm.

Esse estudo permitiu a obtenção de informações importantes a respeito do modo de interação composto-biomolécula, assim como, calcular os valores da constante de ligação aparente (Kb), a fim de verificar se há uma maior ou menor afinidade desse complexo tiossemicarbazona-BSA. Além disso, as alterações que surgirem nos espectros de absorção da BSA podem também evidenciar algum tipo de interação, uma vez que já é definido o comportamento padrão da BSA ao ser submetida por essa análise de absorção no UV-vis. A constante de ligação aparente (Kb) foi obtida através da Equação 4 utilizada previamente por Nafisi, Sadeghi e Panahyab, (2011) e Tarai *et al.*, (2022) respectivamente.

$$\frac{1}{(A-A_0)} = \frac{1}{(A_c-A_0)} * \frac{1}{[C]} + \frac{1}{Kb(A_c-A_0)} \quad (4)$$

Onde A₀ é a absorbância de BSA livre; A_c representa a absorbância quando a ligação do composto com a BSA, e Kb representa a constante de ligação. Para obter a constante de ligação 1/(A-A₀) versus 1/[C] foi plotado, onde [C] é a concentração do composto.

4.6.3 Espectroscopia de emissão de fluorescência dos compostos com a BSA

Os ensaios de interação dos compostos com a albumina foram realizados segundo metodologia proposta por Oliveira *et al.*, (2017) Ribeiro *et al.*, (2019) e Sousa *et al.*, 2022 com modificações. Esses experimentos foram realizados fixando a BSA na concentração de 10 µM (1.0 mL) e variando os compostos-teste em 8 concentrações entre 5 e 40 µM (5.0 µL). Todos os testes foram realizados em triplicata em 4 temperaturas distintas (298 K, 303 K, 310 K e 315 K) a fim de observar diferenças no comportamento cinético da proteína em estudo. Após a adição do composto à solução da BSA e a sua homogeneização esperou-se cerca de 10 minutos para a saturação da albumina e também, para que a amostra atingisse a temperatura em análise. Posteriormente, seguiu-se com as leituras dos compostos utilizando uma cubeta de quartzo retangular, com comprimento de percurso óptico de 1 cm, em um espectrofluorímetro Jasco FP-6300.

Os parâmetros pré-estabelecidos foram: varredura de 310 a 500 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 foi determinado através da equação de Stern-Volmer representada pela Equação 5 e 6 (Lakowicz, 2006).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad (5)$$

$$K_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0} \quad (6)$$

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 F/F_0 versus $[C]$ foi plotado, onde $[C]$ é a concentração do composto.

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 7.

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f K_a} * \frac{1}{[C]} + \frac{1}{f} \quad (7)$$

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 = intensidade de emissão de fluorescência sem supressor (só ASB); F = intensidade de emissão de fluorescência com supressor (composto). Para obter a constante de Stern-Volmer modificada $F_0/F_0 - F$ versus $[C]$ 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 8, 9 e 10.

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \log K_a + n \log [C] \quad (8)$$

$$\ln K_a = - \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (9)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \quad (10)$$

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

65 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. Um valor de $p < 0.05$ (5% de probabilidade, ou $p < 0.05$) indicou significância. Todas as análises de dados foram realizadas utilizando o software GraphPad Prim 5.

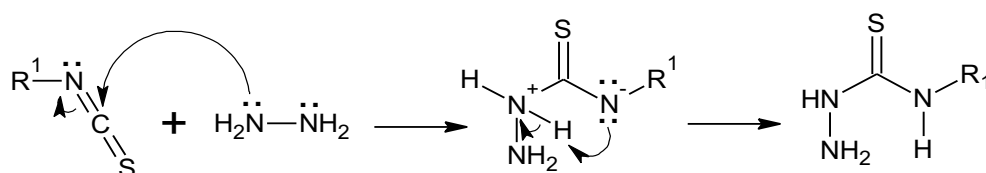
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Estudo Químico

6.1.1 Mecanismo reacional de síntese das (*E*)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1) *N*-4 substituídas (etapa 1)

O mecanismo da reação (Esquema 3) se desenvolveu inicialmente a partir do ataque nucleofílico do nitrogênio hidrazínico (portador de um par de elétrons isolados, portanto nucleófilo) à tiocarbonila do isotiocianato (eletrófilo), que se encontrava deficiente em elétrons como consequência do efeito indutivo retirador de elétrons exercido pelos átomos de nitrogênio e enxofre. Por conseguinte, foi desfeita a insaturação entre os átomos de carbono e nitrogênio, fazendo com que os elétrons π da ligação rompida fossem deslocados para o átomo de nitrogênio, em decorrência de sua maior eletronegatividade. O intermediário formado consistiu em uma espécie dipolar (zwitterion) que, após sofrer uma protonação-desprotonação intramolecular (prototropismo), levou à produção das (*E*)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1) *N*-4 substituídas.

Esquema 3. Mecanismo de reação para formação das (*E*)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1)



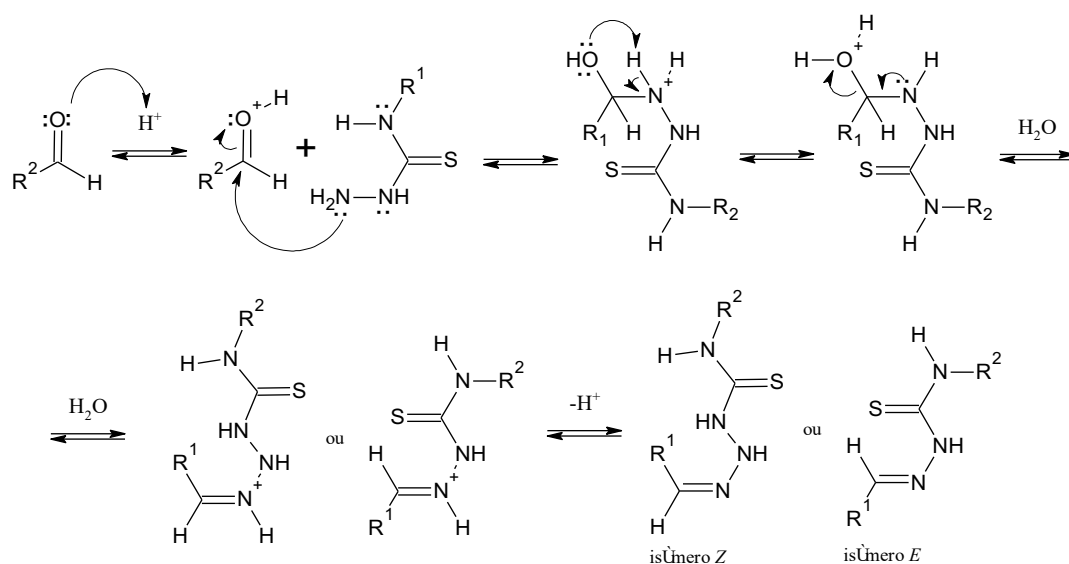
Fonte: o próprio autor.

Esta etapa possibilitou a obtenção das (*E*)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1) substituídas em rendimentos variando entre 70 a 94% como descritos na literatura por Neto *et al.*, (2017), Ribeiro *et al.*, (2019) e Jacob *et al.*, (2021).

6.1.2 Mecanismo reacional de síntese das (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2) (etapa b)

O mecanismo desta etapa é semelhante àquele previsto na síntese de iminas. A reação foi iniciada com a protonação da carbonila através da utilização do catalizador ácido. Uma vez protonada (ativada), a carbonila tornou-se mais eletrofílica, isto é, mais vulnerável a sofrer um ataque nucleofílico, no par de elétrons do nitrogênio da (*E*)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas (1). O intermediário aminoálcool formado, tinha o átomo de nitrogênio protonado, sofre ataque dos elétrons do oxigênio da hidroxila, conduzindo a formação de uma molécula de água, como grupo de saída, e adquirindo carga formal positiva. Em seguida, ocorreu a desidratação, ocasionada pela deslocalização do par isolado de elétrons do nitrogênio para estabelecimento de uma insaturação com o carbono (C=N), o que favoreceu a eliminação da molécula de água anteriormente formada. Após estabelecimento da ligação dupla com o átomo de carbono, o nitrogênio catiônico foi desprotonado por uma base presente no meio, o que resultou na formação da função imina, no caso deste trabalho, das *N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2), as quais puderam ser obtidas como produto único ou como mistura de diastereoisômeros *E/Z* (Esquema 4).

Esquema 4. Mecanismo de reação para formação das *N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2)



Fonte: o próprio autor

A presente etapa permitiu a obtenção de 7 compostos *N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2) de fácil obtenção. Os rendimentos de sua síntese variaram de 59,85 a 85,50%, estando em acordo com dados da literatura (Oliveira *et al.*, 2016; Jacob *et al.*, 2021).

Além dos rendimentos, os dados referentes às propriedades físico-químicas dos *N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2) (como pontos de fusão e fator de retenção - Rf) estão devidamente sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 Propriedades físico-químicas dos compostos (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2)

Composto	Rend. (%)	P.F. (°C)	Aspecto	Rf	SISTEMA n-hexano/AcoET
JF-14	85,50	185-187	Sólido amarelo	0,47	6:4
JF-15	73,00	176-178	Sólido branco	0,45	6:4
JF-17	78,00	174-175	Sólido branco	0,44	6:4
JF-21	59,85	185-187	Sólido branco	0,46	7:3
JF-23	62,25	177-179	Sólido branco	0,40	7:3
JF-24	68,11	165-167	Sólido branco	0,58	6:4
JF-26	80,00	208-209	Sólido branco	0,47	3:7

Fonte: o próprio autor.

6.1.3 Características Físico-químicas das *N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs (2).

Neste tipo de reação, é possível obter uma mistura de isômeros *E/Z* por conta da dupla ligação da imina (C=N), observando sinais duplicados desta porção nos espectros de RMN ¹H. Porém, em todos os derivados sintetizados, foi encontrado somente um único sinal singlete do grupo imínico HC=N. Segundo Cardoso *et al.*, (2014) e Oliveira *et al.*, (2017) a probabilidade de apenas um sinal conduz a uma única orientação, provavelmente sendo a isomeria *E* devido à preferência deste tipo de orientação pelas tiossemicarbazonas.

A caracterização estrutural dos derivados sintetizados sucedeu através de análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Carbono (RMN ¹³C), espectroscopia do infravermelho (IV) dos compostos obtidos. De maneira geral no RMN ¹H foram observados sinais característicos do hidrogênio presente no N4 da tiocarbonila (NH-C=S), evidenciado como um singlete na região de 9.96 a 10.40 ppm. Observou-se também a presença de um singlete com deslocamento químico na faixa entre 8.10 - 8.07 ppm característicos do hidrogênio imínico (HC=N-). Todos os espectros analisados apresentaram sinais de singlete (s), dubleto (d), tripleto

(t), na região característica de grupamentos aromáticos (7.17 - 8.01 ppm). Outros sinais também foram evidenciados em forma de singletos na região de 3.84 – 3.69 ppm referentes aos hidrogênios do grupamento (-OCH₃), e outros sinais na forma de singletos na região 9.97 - 12.03 ppm referente aos hidrogênios do (NH) E de acordo com Karabatsos *et al.*, (1964), Serda *et al.*, (2013) e Oliveira *et al.*, (2017) estes compostos possuindo uma configuração *E* uma vez que exibem o sinal entre a faixa descrita acima.

Nas Figuras 19 e 20 é possível observar de maneira mais detalhada a posição dos diferentes hidrogênios presentes no composto (*E*)-*N*-(4-nitro-fenil)-2-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)-hidrazina-1-carbotioamida JF-23.

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do composto JF-23

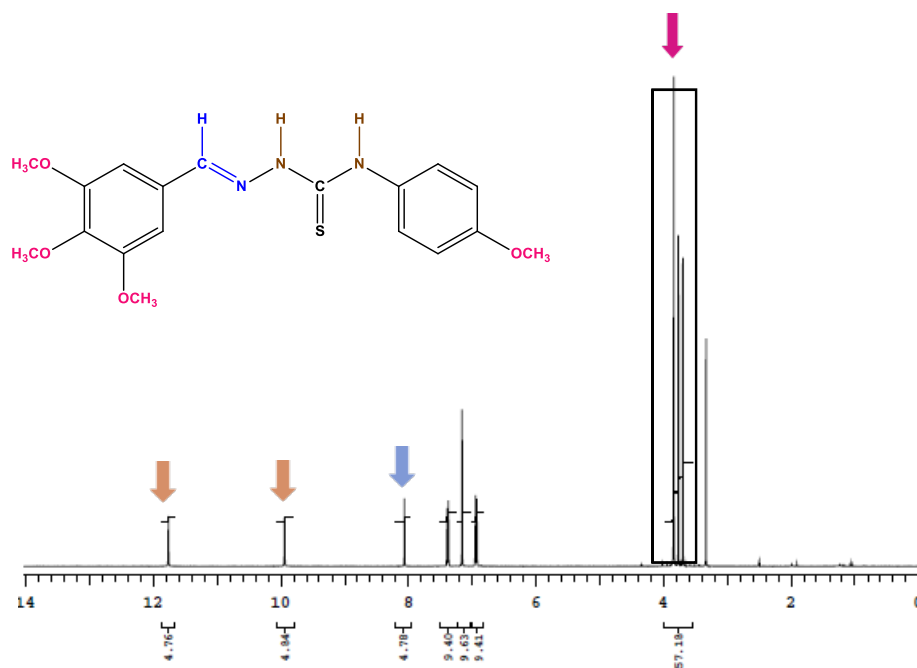
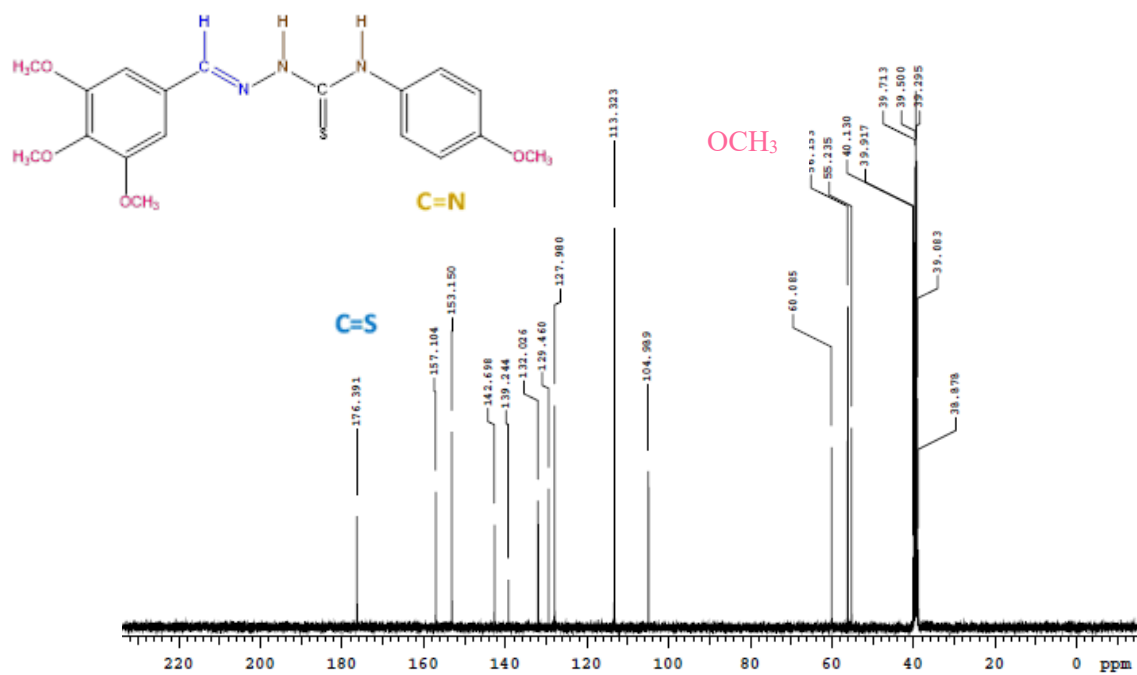


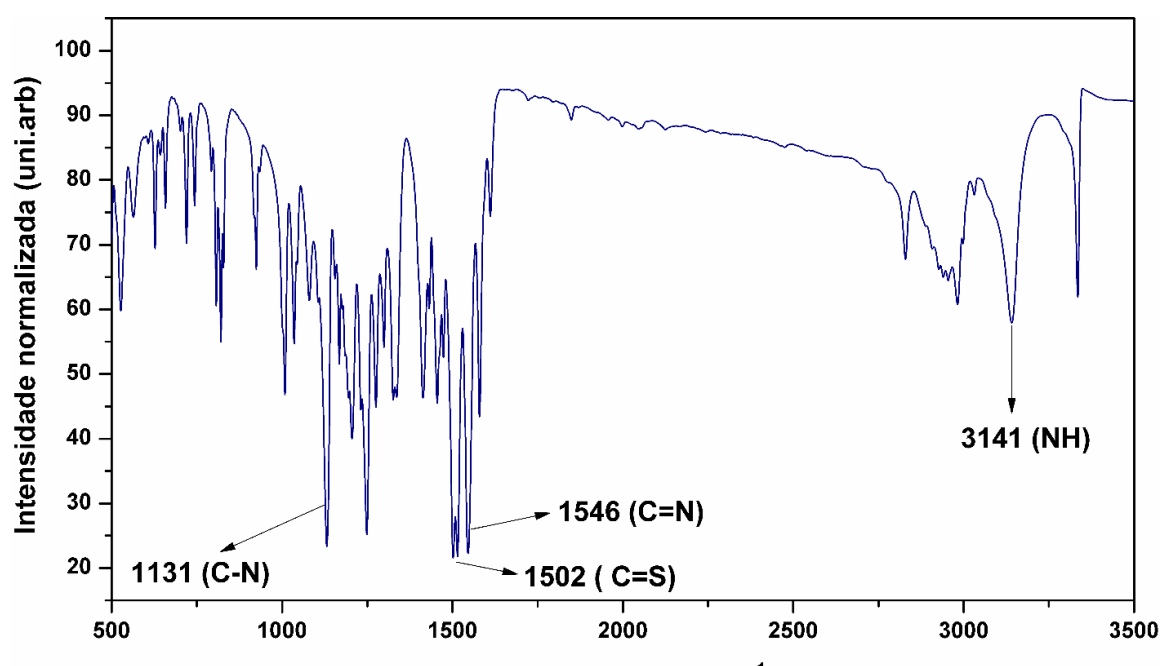
Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C do composto JF-23



O espectro de RMN ^{13}C evidencia as absorções dos átomos de carbono característicos dos compostos tiossemicarbazônicos. Sinais em 157.10 e 176.39 correspondem ao estiramento $\text{C}=\text{N}$ e $\text{C}=\text{S}$, respectivamente. Entre 104.91 – 132.02 ppm corresponde aos carbonos aromáticos do fenil (Figura 20).

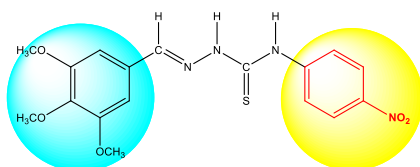
Já a análise dos espectros de infravermelho, os compostos tiossemicarbazônicos apresentam bandas vibracionais características dos grupos funcionais N-H , $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{N}$ e $\text{C}=\text{C}$. As bandas referentes aos 2 N-H presente na molécula aparecem entre $3185 - 3143\text{ cm}^{-1}$. Bandas em 1502 e 1565 cm^{-1} referem-se aos grupamentos $\text{C}=\text{S}$ e $\text{C}=\text{N}$ respectivamente. Estes dados estão de acordo com a literatura (Jacob *et al.*, 2021) (Figura 21).

Figura 21 Espectro de Infravermelho do JF-23



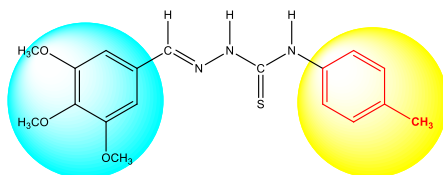
6.1.3.1 Descrição dos Compostos (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-1-carbotioamida JFs

Composto: (*E*)-*N*-(4-nitro-fenil)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-1-carbotioamida JF-14



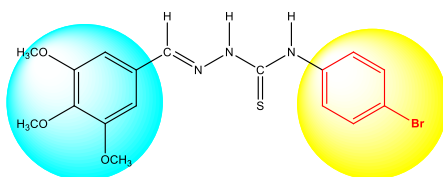
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 12.20 (s, 1H, NH), 10.41 (s, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, CH=N), 8.24 (d, 2H, J = 9.2 Hz, CH fenil), 8.08 (d, 2H, J = 9.6 Hz, CH fenil), 7.19 (s, 2H, CH fenil), 3.84 (s, 6H, OCH_3), 3.70 (s, 3H, OCH_3). RMN C^{13} (400 MHz, DMSO- d_6): 174.75, 161.55, 159.03, 146.38, 146.14, 145.99, 143.62, 142.72, 129.18, 124.91, 124.18, 124.08, 122.61, 111.95, 108.38, 102.83, 60.08, 56.52. IV (KBr, cm^{-1}): 3276 e 3143 (NH), 1562 (C=N), 1505(C=S), 1132 (C-N).

Composto: (E)-N-(p-tolil-fenil)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-1-carbotioamida JF-15



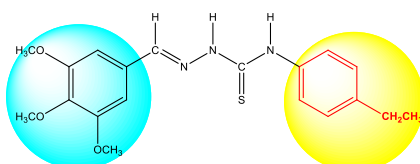
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.79 (s, 1H, NH), 9.97 (s, 1H, NH), 8.08 (s, 1H, CH=N), 7.41 (d, 2H, J = 2.96 Hz, CH fenil), 7.17 (2, 2H, J = 2.89 Hz, CH fenil), 7.16 (s, 2H, CH fenil), 3.84 (s, 6H, OCH_3), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 2.32 (s, 3H, CH_3). RMN C^{13} (400 MHz, DMSO- d_6): 176.05, 153.14, 142.79, 139.28, 136.56, 134.67, 129.42, 128.56, 126.23, 105.01, 60.08, 56.15, 20.57. IV (KBr, cm^{-1}): 3145 (NH), 1551 (C=N), 1502(C=S), 1130 (C-N).

Composto: (E)-N-(4-bromo-fenil)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-1-carbotioamida JF-17



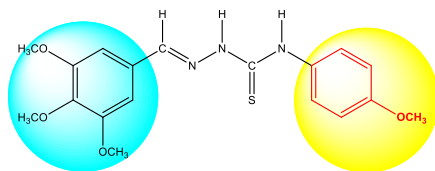
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.93 (s, 1H, NH), 10.07 (s, 1H, NH), 8.09 (s, 1H, CH=N), 7.56 (s, 4H, CH fenil), 7.17 (s, 2H, CH fenil), 3.84 (s, 6H, OCH_3), 3.70 (s, 3H, OCH_3). RMN C^{13} (400 MHz, DMSO- d_6): 175.80, 153.14, 143.28, 139.39, 138.53, 130.91, 129.26, 128.05, 117.67, 105.13, 60.09, 56.15. IV (KBr, cm^{-1}): 3148 (NH), 1547 (C=N), 1504 (C=S), 1133 (C-N).

Composto: (E)-N-(4-etil-fenil)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-1-carbotioamida JF-21



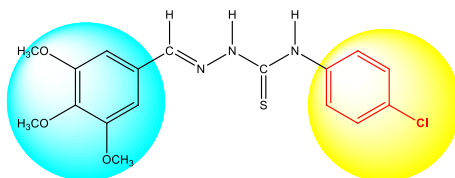
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.79 (s, 1H, NH), 9.97 (s, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, CH=N), 7.43 (d, 2H, J = 8.4 Hz, CH fenil), 7.21 (d, 2H, J = 8.4 Hz, CH fenil), 7.16 (s, 2H, CH fenil), 3.84 (s, 6H, OCH_3), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 2.61 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH_2), 2.50 (d, 3H, J = 7.6, CH_3). RMN C^{13} (400 MHz, DMSO- d_6): 176.00, 153.14, 142.77, 141.08, 139.27, 136.74, 129.40, 127.38, 126.28, 104.99, 60.07, 56.13, 27.71, 15.72. IV (KBr, cm^{-1}): 3185 (NH), 1538 (C=N), 1504 (C=S), 1125 (C-N).

Composto: (E)-N-(4-metoxi-fenil)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-1-carbotioamida JF-23



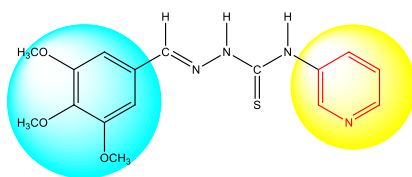
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.77 (s, 1H, NH), 9.94 (s, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, CH=N), 7.38 (d, 2H, J = 8.8 Hz, CH fenil), 7.16 (s, 2H, CH fenil), 6.94 (2, 2H, J = 8.8 Hz, CH fenil), 3.84 (s, 6H, OCH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.69 (s, 3H, OCH_3). RMN C^{13} (400 MHz, DMSO- d_6): 176.39, 157.10, 153.15, 142.69, 139.24, 132.03, 129.46, 127.98, 113.32, 104.99, 60.08, 56.15, 55.24. IV (KBr, cm^{-1}): 3141 (NH), 1546 (C=N), 1502(C=S), 1131 (C-N).

Composto: (E)-N-(4-cloro-fenil)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-1-carbotioamida JF-24



RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.92 (s, 1H, NH), 10.08 (s, 1H, NH), 8.08 (s, 1H, CH=N), 7.62 (d, 2H, J = 8.8 Hz, CH fenil), 7.17 (s, 2H, CH fenil), 7.43 (s, 2H, J = 8.8 Hz, CH fenil), 3.85 (s, 6H, OCH_3), 3.70 (s, 3H, OCH_3). RMN C^{13} (400 MHz, DMSO- d_6): 175.89, 153.14, 143.26, 138.11, 129.45, 129.27, 127.98, 127.75, 105.12, 60.09, 56.15. IV (KBr, cm^{-1}): 3152 (NH), 1546 (C=N), 1502(C=S), 1134 (C-N).

Composto: (E)-N-(3-piridil)-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-1-carbotioamida JF-26



RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 12.03 (s, 1H, NH), 10.14 (s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, CH=N), 8.69 (d, 1H, J = 3.6 Hz, CH piridil), 8.41 (dd, 1H, J = 8.0 e 4.0 Hz, CH piridil), 8.01-7.98 (m, 1H, CH piridil), 7.42 (ddd, 1H, J = 0.8, 4.0 e 8.4 Hz, CH piridil), 3.84 (s, 6H, OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃). RMN C^{13} (400 MHz, DMSO- d_6): 176.49, 154.15, 147.57, 146.24, 143.52, 139.45, 135.92, 133.81, 129.23, 122.96, 105.17, 60.11, 56.17. IV (KBr, cm^{-1}): 3147 (NH), 1561 (C=N), 1505 (C=S), 1125 (C-N).

8. Avaliação *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos, toxicológicos e de biodisponibilidade oral

Os estudos *in silico* apresentam grande importância na busca de novos compostos candidatos a fármacos, isto porque, é possível prever diferentes parâmetros farmacocinéticos, toxicológicos e de biodisponibilidade oral (daina *et al.*, 2014; daina *et al.*, 2017; pires; blundell; Ascher *et al.*, 2015). A Tabela 2 apresenta dos resultados de ADMET e de biodisponibilidade oral para os compostos (E)-N-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-1-carbotioamida-JFs avaliados.

Tabela 2. parâmetros de ADMET e avaliação da biodisponibilidade oral para os compostos JFs

	JF-14	JF-15	JF-17	JF-21	JF-23	JF-24	JF-26	Unit
Absorption								
Water solubility	-5.22	-4.82	-5.23	-5.17	-4.35	-5.15	-4.19	Numeric (log mol/L)
Caco2 permeability	1.02	1.11	1.08	1.32	1.3	1.08	1.33	Numeric (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)
Intestinal absorption	74.02	90.46	88.94	91.49	91.67	89.00	93.22	Numeric (%Absorbed)
Skin Permeability	-2.75	-2.93	-2.91	-3.16	-3.04	-2.91	-3.24	Numeric (log Kp)
P-glycoprotein substrate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Categorical (Yes/No)
P-glycoprotein I inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Categorical (Yes/No)
P-glycoprotein II inhibitor	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Categorical (Yes/No)
Distribution								
VD _{ss}	-0.26	-0.15	-0.20	0.07	-0.19	-0.21	-0.51	Numeric (log L/kg)
Fraction unbound	0	0.02	0	0.08	0.09	0.00	0.19	Numeric (Fu)
BBB permeability	-0.75	0.14	0.13	0.27	-0.64	0.13	-0.93	Numeric (log BB)
CNS permeability	-2.53	-2.23	-2.17	-2.31	-2.54	-2.19	-2.94	Numeric (log PS)
Metabolism								
CYP2D6 substrate	No	No	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
CYP3A4 substrate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Categorical (Yes/No)
CYP1A2 inhibitor	No	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Categorical (Yes/No)
CYP2C19 inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Categorical (Yes/No)
CYP2C9 inhibitor	Yes	Yes	Yes	yes	Yes	Yes	No	Categorical (Yes/No)
CYP2D6 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
CYP3A4 inhibitor	Yes	No	No	Yes	Yes	No	No	Categorical (Yes/No)
Excretion								
Total clearance	0.30	0.22	0.13	0.20	0.32	0.15	0.43	Numeric (log mL/min/kg)
Renal OCT2 substrate	No	No	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity								
AMES toxicity	Yes	No	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
Maximum tolerated dose	0.02	0.29	0.26	0.83	0.78	0.27	0.57	Numeric (log mg/kg/day)
hERG I inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
hERG II inhibitor	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Categorical (Yes/No)
Oral rat acute Toxicity	2.49	2.50	2.55	2.46	2.28	2.54	2.78	Numeric (mol/kg)
Oral rat chronic Toxicity	1.64	1.03	1.07	1.11	1.14	1.08	0.69	Numeric (log mg/kg_bw/day)
Hepatotoxicity	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Categorical (Yes/No)
Skin Sensitization	No	No	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
<i>T. Pyriformis</i> toxicity	0.78	1.31	1.33	1.08	0.69	1.32	0.64	Numeric (log µg/L)
Minnow toxicity	0.64	-0.44	-0.81	1.08	0.90	-0.66	0.69	Numeric (log mM)
Biodisponibilidade oral								
Regra de Lipinski	0	0	0	0	0	0	0	Violation (numeric)
Regra de Veber	1	0	0	0	0	0	0	Violation (numeric)

Os resultados apresentados na Tabela 2 de previsão dos parâmetros farmacocinéticos, toxicológicos e de biodisponibilidade por via oral para cada um dos compostos avaliados. Sendo assim, foi inicialmente avaliado o perfil de absorção dos compostos. O primeiro parâmetro a ser avaliado foi a solubilidade em água representada por LogS. Para que um composto apresente boa absorção é necessário que esteja solúvel ou parcialmente solúvel (Pires; Blundell; Ascher, 2015;

Kar; Leszczynski, 2020). Com isto, 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 foi avaliada frente a células de Caco-2 (células de adenocarcinoma colorretal humano) a fim de verificar se esses compostos apresentaria a capacidade de permear células do intestino. Para isto, foi utilizada a escala de permeabilidade, compostos pouco permeáveis apresentam valores < $1.10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, moderadamente permeáveis valores entre 1 e $10.10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ e permeáveis com valores > $10.10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ (Pires; Blundell; Ascher, 2015). Os compostos podem apresentar permeabilidade moderada. Além de serem altamente absorvidos pelo intestino com valores > que 74%. Em relação a permeabilidade na pele os compostos podem apresentar alta permeabilidade ($\log k_p > -2.5$) (pires; blundell; ascher, 2015).

O último parâmetro de absorção avaliado foi em relação as glicoproteínas-p estas macromoléculas funcionam como bomba de efluxo protegendo o organismo da ação de diferentes fármacos. Os compostos JF-14, JF-17, JF-21, JF-23 e JF-24 podem atuar como substrato e inibidores das glicoproteínas-p avaliadas. O composto JF-15 foi classificado como inibidor da glicoproteína-p I e não inibidor da glicoproteína-p II. Por fim o composto JF-26 não é substrato e nem inibidor das proteínas avaliadas.

O segundo perfil a ser avaliado é o de distribuição, isto é, como os compostos podem ser distribuídos em diferentes regiões do organismo (Kar; Leszczynski, 2020). Sendo assim, o primeiro parâmetro a ser avaliado foi o volume de distribuição (VDss). Compostos que apresentarem valores de ($\log \text{VDss}$) < -0.15 são mais facilmente distribuídos no plasma e os que apresentarem valores de VDss ($\log \text{VDss}$) > 0.45 são distribuídos nos tecidos. Sendo assim os compostos JF-14, JF-15, JF-17, JF-23, JF-24, JF-26 podem ser facilmente distribuídos no plasma e o composto JF-21 apresenta maior tendencia de ser distribuído nos tecidos. Todos os compostos se ligam fortemente a proteínas apresentando baixa fração não ligada.

Em relação a permeabilidade frente a barreira hematoencefálica compostos que apresentam $\log \text{BB} > 0.3$ apresentam-se com alta capacidade de atravessa a barreira hematoencefálica enquanto compostos com $\log \text{BB} < -1$ podem apresentar baixa. Os compostos apresentam capacidade moderada de atravessar a hematoencefálica. Em relação a capacidade de penetrar o sistema nervoso central os compostos que apresentam $\log \text{PS} > -2$ são penetrantes e os que apresentam $\log \text{PS} < -3$ não são capazes de penetrar. Os resultados mostraram que todos os compostos avaliados são classificados como não 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 JFs poderiam atuar como substrato ou inibidor dessas proteínas. Os compostos JFs foram classificados como não substratos de CYP2D6 e substratos de CYP3A4. Em seguida foi avaliado se os compostos poderiam atuar como inibidores. Em relação a CYP1A2 apenas os compostos JF-15, JF-17 e JF-24 foram considerados como inibidores. Já em CYP2C19 e CYP2C9 apenas o composto JF-26 foi considerado como não inibidor. Nenhum dos compostos foram classificados como inibidor frente a CYP2D6 e por fim apenas os compostos JF-14, JF-21 e JF-23 foram classificados como inibidores de CYP3A4.

O quarto perfil a ser avaliado foi a excreção. A nível de excreção os compostos apresentaram baixos valores de Total clearance e não foram substratos do transportador de cátions orgânicos 2 um transportador de captação renal que desempenha um papel importante na disposição e depuração renal de drogas e compostos endógenos (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 JF-14 apresentou resultado positivo indicando que este composto pode apresentar potencial mutagênico. A dose máxima tolerada recomendada (MRTD) é estimada como uma dose limiar toxica 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 os compostos JF-21, JF-23 e JF-26 foram considerados como alto. Em relação a hERG I os compostos foram classificados como não inibidores. Já para hERG II apenas os compostos JF-17, JF-21, JF-23 e JF-24 foram classificados como inibidores.

A toxicidade aguda oral em ratos (LD_{50}) variou de 2.28 a 2.78 mol/kg. A toxicidade oral crônica apresentou valores que variaram de 0.69 a 1.64 $\log \text{mg/kg}_{\text{bw/day}}$. Em relação a toxicidade a nível hepático apenas os compostos JF-14 e JF-23 foram considerados como não hepatóxicos. Além disso, nenhum dos compostos são capazes de promover aumento da irritabilidade da pele. Foi verificado que os compostos foram capazes de apresentar toxicidade frente a *T. Pyriformis* ($\log \mu\text{g/L} > -0.5$). Além disso, foi observado que os compostos JF-14, JF-21, JF-23 e JF-26 eram capazes de promover baixa toxicidade.

Os resultados de previsão de biodisponibilidade oral mostraram que todos os compostos apresentaram boa disponibilidade, obedecendo as regras de Lipinski e Veber, apresentando apenas uma violação para o composto JF-14. Vale a pena salientar que o estudo *in silico* é uma

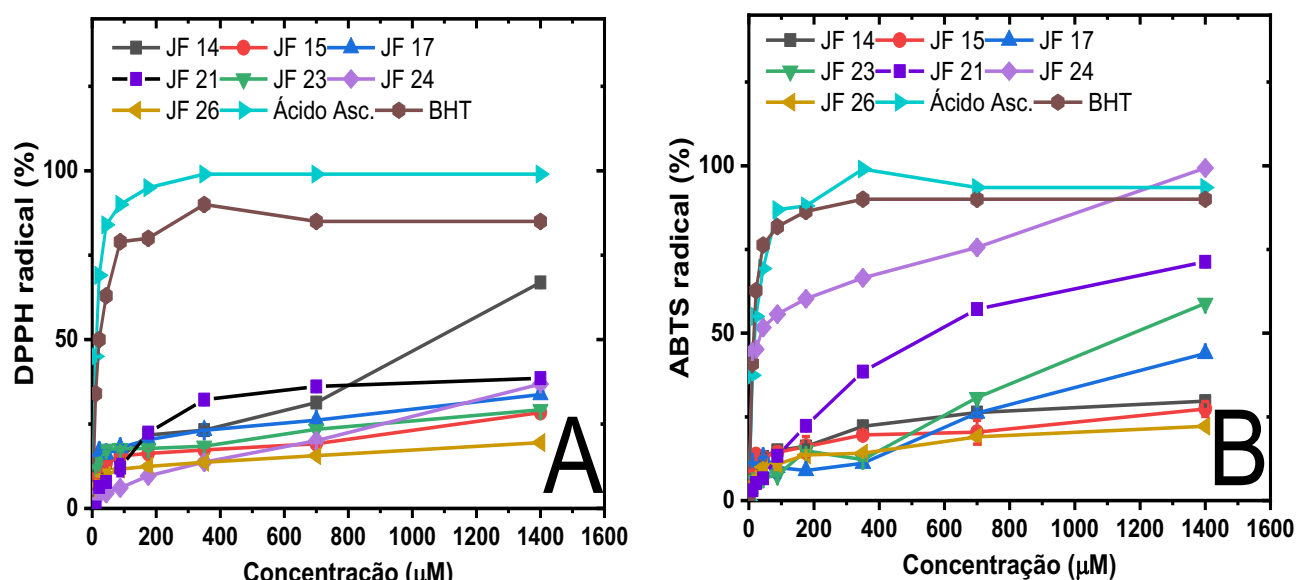
previsão em muitos casos os compostos podem se comportar diferente a depender da concentração avaliada em ensaios *in vitro* e em *vivo*.

6.2. Atividade antioxidante *in vitro*

As tiossemicarbazonas são bases de Schiff descritas na literatura por promoverem diferentes atividades biológicas (Doğan *et al.*, 2022). Dentre as diferentes atividades destacamos aqui a atividade antioxidante, as tiossemicarbazonas apresentam a capacidade de promover a inibição e/ou a diminuição de espécies reativas tanto de nitrogênio como de oxigênio (Yang *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2022).

O mecanismo de atividade antioxidante promovida pelas tiossemicarbazonas não está totalmente elucidado. Entretanto, sabe-se que estes compostos podem atuar como doador de pares de elétrons (agente redutor) sendo esta característica atribuída a presença de átomos de nitrogênio, principalmente na forma de base de Schiff, e de enxofre como tiocarbonila (Sonmez *et al.*, 2019; Siddiqui *et al.*, 2019). Vale a pena ressaltar que além da presença da base de Schiff deve-se levar em consideração o efeito dos substituintes presentes nas tiossemicarbazonas estes em conjunto pode modular o aumento ou a diminuição da atividade antioxidante (Sonmez *et al.*, 2019; Siddiqui *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2022). A Figura 22 apresenta as curvas de atividade antioxidante promovida pelos compostos para os ensaios de DPPH e ABTS respectivamente.

Figura 22. Atividade antioxidante *in vitro* promovida pelos compostos JFs nos ensaios de DPPH(A) e ABTS (B).



As curvas apresentadas na Figura 22 mostram que os compostos são capazes de promover baixa atividade para o ensaio de DPPH e de moderada a baixa para os ensaios de ABTS. Através das curvas obtidas em cada ensaio foi possível obter informações de porcentagem de captura de radicais na maior concentração e valores de IC_{50} (concentração capaz de capturar os radicais em 50%). Os resultados obtidos para cada um dos compostos estão apresentados na Tabela 3

Tabela 3. Resultados de atividade antioxidante *in vitro* promovida pelos compostos JFs para os ensaios de DPPH e ABTS respectivamente.

Compostos	Ensaio DPPH•		Ensaio ABTS	
	% Captura do radical em em 1400µM	EC ₅₀ (µM)	% Captura do radical em 1400µM	EC ₅₀ (µM)
JF-14	66.93 ± 0.23	1015.0 ± 0.23	29.72 ± 0.11	>14000
JF-15	28.38 ± 0.36	>14000	27.36 ± 2.2	>14000
JF-17	33.74 ± 0.72	>14000	43.96 ± 0.16	>14000
JF-21	38.56 ± 0.36	>14000	71.29 ± 0.84	564.88 ± 0.80
JF-23	29.20 ± 0.18	>14000	58.91 ± 0.12	1138 ± 9.3
JF-24	36.84 ± 0.37	>14000	99.33 ± 0.02	94.11 ± 0.02
JF-26	19.47 ± 0.32	>14000	22.19 ± 0.1	>14000
Ácido ascórbico	99.8	9.98 ± 1.1	99.0	28.90 ± 0.1
BHT	99.1	23.74 ± 0.1	100	30.21 ± 1.3

Média ± Desvio padrão; Hidroxitolueno butilado (BHT)

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que na maior concentração avaliada (1400µM) os compostos foram capazes de promover captura variando de 19.47 a 66.93% e que apenas o composto JF-14 apresentou IC_{50} (1015.0 µM). Em relação ao ensaio de ABTS os

compostos apresentaram porcentagens de captura nas maiores concentrações variando de 22.19 a 99.33%, estes resultados foram maiores quando comparado ao DPPH. Além disso um número maior de compostos apresentou IC₅₀ sendo estes JF-21 (564.88 µM), JF-23 (1138 µM), JF-24 (94.11 µM). Estas diferenças entre os resultados dos ensaios DDPH comparado aos ensaios de ABTS pode estar relacionada além da estrutura química a natureza do ensaio. Os ensaios de captura pelo método de ABTS são mais versáteis, isto é, apresenta bons resultados tanto para compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, em contra partida os ensaios pelo método de DPPH apresentam melhores resultados para compostos caráter hidrofílico.

Os resultados de atividade antioxidante *in vitro* estão diretamente relacionados a estrutura química das tiossemicarbazonas. Bingol *et al.*, (2019) verificaram que os compostos *bis*-tiossemicarbazonas à base de carbazol destacando o composto 4c ((2E,2'E) -2,2'-((9-etil-9H-carbazol-3,6-diil) *bis*-(metanililideno)) *bis* (N,N-dimetil-hidrazina-1-carbotioamida)) que foi capaz de capturar radicais DPPH em todas as concentrações. Os autores obtiveram o valor de inibição de 45%, obtido na concentração mais baixa de 10 µM, foi o dado mais importante para refletir sua potencialidade em comparação com todos os padrões. O composto apresentou mais de 60 e 80% de inibição nas concentrações de 25 µM e 50%, enquanto os valores de inibição de 30% e cerca de 55% foram obtidos no caso do BHT nas mesmas concentrações. Em relação aos ensaios de ABTS os compostos 4a, 4b, 4c e 4d apresentaram atividade antioxidante promissora com resultados próximos ao padrão e novamente se destacou o composto 4c.

Zhang *et al.*, (2020) avaliando três derivados isoméricos de tiossemicarbazona N-substituídos sintetizados foram estudados quanto ao seu potencial antioxidante usando o ensaio de captura de DPPH, verificaram que a capacidade de eliminação de todos os derivados foi aumentada com o aumento da concentração. Além disso, observaram que quase todos os compostos não apresentaram alterações significativas quando a concentração aumentou para 300 µg/mL. Em particular, todos os compostos de tiossemicarbazona sintetizados indicam a maior taxa de depuração de DPPH em 500 µg/mL.

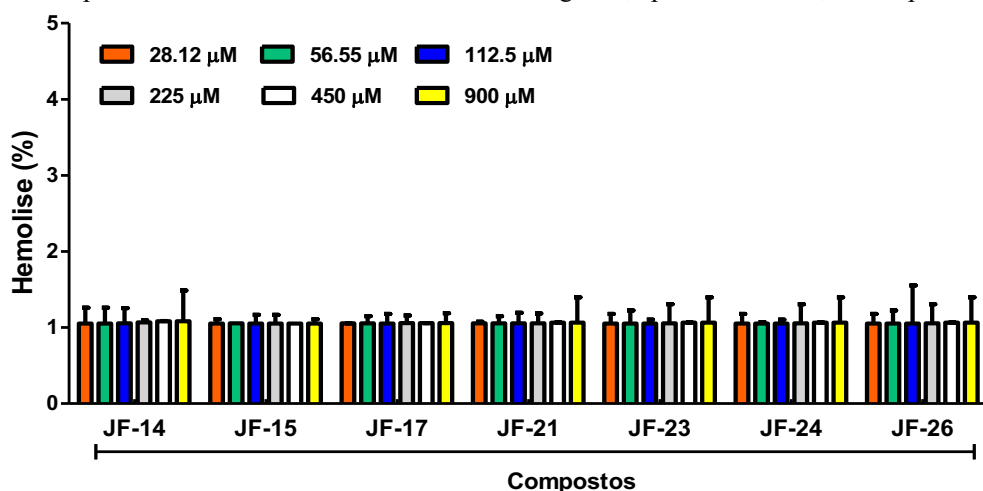
Yildiz *et al.*, (2022) avaliando a atividade antioxidante de uma série de compostos tiossemicarbazonas à base de dimetoxi-indoles verificaram que estes obtiveram resultados de atividade antioxidante *in vitro* variando de 17.38 a 96.10 µM para o ensaio de ABTS e valores de 26.88 a 119.75 µM para o ensaio de DPPH. Esses achados indicam que as tiossemicarbazonas são potenciais agentes antioxidantes.

6.3 Atividade citotóxica frente a células de mamíferos

6.3.1 Atividade hemolítica *in vitro*

A atividade hemolítica é um teste preliminar, simples, rápido e com bons resultados que objetiva avaliar danos promovidos por diferentes compostos na membrana plasmática principalmente dos eritrócitos (Yu *et al.*, 2017). O sangue tem a função de transportar oxigênio, água e nutrientes para todos os tecidos do corpo (Amin; Dannenfelser, 2006). Além disso, muitos fármacos são transportados pelas albuminas presentes no plasma sanguíneo até determinado alvo biológico (Oliveira *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2022). Sendo assim, compostos tóxicos frente a células sanguíneas podem promover perda de função do organismo (Amin; Dannenfelser, 2006; Yu *et al.*, 2017; Queiroz *et al.*, 2020). A Figura 23 apresenta os resultados em porcentagem de atividade hemolítica promovida pelos compostos JFs em diferentes concentrações.

Figura 23. Resultados de porcentagem de hemólise promovida pelos compostos JFs. Para este ensaio o controle positivo Triton X promoveu 100% de hemólise e o controle negativo, apenas as células, 0% respectivamente.



Os resultados mostraram que todos os compostos JFs avaliados promoveram percentual de hemólise menores que 5%. Segundo Queiroz *et al.*, (2020) compostos são considerados hemolíticos quando apresentam porcentagem de hemólise maior que 10%. Sendo assim pode-se concluir que os compostos não são hemolíticos. A atividade hemolítica está relacionada a estrutura química dos compostos, no entanto algumas tiossemicarbazonas apresentaram resultados próximos aos obtidos pelos compostos JFs. Dentre estes trabalhos podem ser citados os realizados por Queiroz *et al.*, (2020) e Zhao *et al.*, (2021) que avaliando tiossemicarbazonas verificaram que os compostos promoviam percentual de hemólise variando de 4 a 5%. Resultados semelhantes foram obtidos por Yousef e El-Reash, (2020) que avaliando complexos baseados no

ligante tiossemicarbazonas obtiveram percentual de hemólise de 4.08%. Esses resultados indicam que estes compostos apresentam baixa citotoxicidade frente a eritrócitos.

6.4 Atividade citotóxica *in vitro* frente a macrófagos J774-A1 e HepG2

Todos os compostos foram avaliados *in vitro* quanto a sua citotoxicidade frente a células normais como apresentados na Tabela 4. Inicialmente foram avaliados os resultados promovidos pelos compostos frente as células macrófagos J774-A1 e HepG2 (mesmo sendo um hepatoma apresenta as mesmas funções fisiológicas de um hepatócito). Este é o primeiro ensaio a ser realizado, quando se busca um potencial agente antitumoral, isto porque, espera-se que o composto seja menos tóxico para células normais e mais tóxicos frente a células tumorais (Prabhakaran *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2019).

Os valores de CC₅₀ apresentados na Tabela 4 para os macrófagos mostraram que os compostos JFs (JF-14; JF-15; JF-17; JF-21; JF-23; JF-24 e JF-26) apresentaram valores que variaram que variaram de $82,90 \pm 1.19$ a 231.49 ± 1.96 μM . Dentre esta faixa é possível destacar os compostos JF-23 > JF-26 > JF-17 > 15 > JF-24 > JF-21, que apresentaram CC₅₀ maior do que $82,90 \pm 1.19$ μM (JF-14), sugerindo baixa toxicidade frente células de macrófagos. Em relação as células HepG2 os compostos apresentaram CC₅₀ variando de 91.19 ± 1.09 a 254.64 ± 3.96 μM , dentre estes resultados podemos destacar compostos JF-14 (91.19 ± 1.09 μM), JF-23 > JF-26 > JF-17 > 15 > JF-24 > JF-21 maior CC₅₀ maior que 91.19 ± 1.09 μM . Esses resultados confirmam ainda mais a baixa toxicidade desses compostos frente as duas células avaliadas. Além de confirmar o observado no estudo de perfil do ADMET, onde os compostos não apresentam hepatotoxicidade *in vitro*.

Foi também observado que os compostos apresentaram menor citotoxicidade quando comparado aos padrões Doxo, *m*-AMSA e Azul que obtiveram valores de CC₅₀ 1.22 ± 0.09 μM e 3.1 ± 2.8 μM e 3.0 ± 1.8 μM , para macrófagos J774-A1, e para HepG2 CC₅₀ 1.46 ± 0.1 μM , 3.72 ± 0.09 μM e 3.6 ± 0.07 μM , respectivamente.

Oliveira *et al.*, (2017) testaram os derivados tiossemicarbazônicos em linhagem de células HaCat (queratinócitos humanos) e em macrófagos J774-A1 constataram baixa e moderada citotoxicidade. Ribeiro *et al.*, (2019) ao estudar quinolinas-tiossemicarbazonas também comprovam a baixa e moderada toxicidade. Silva *et al.*, (2019) ao estudar derivados indólicos-tiossemicarbazonas substituídos no núcleo indólico pelo átomo de bromo e grupamento metila comprovaram a baixa toxicidade tiossemicarbazonas.

Tabela 4. Atividade citotóxica *in vitro* frente a macrófagos J77-A1 e linhagem de hepatoma humano promovida pelos compostos (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxi-benzilideno)-hidrazina-carbotioamidas JFs

Compostos	R ₁	Macrófagos (J774-A1)	Hepatoma (HepG2)
		(CC50) μM ± SEM	(CC50) μM ± SEM
JF 14	4-Nitro-Fenil	82,90 ± 1.19	91.19 ± 1.09
JF 15	4-Metil-Fenil	147.15 ± 3.0	161.87 ± 2.0
JF 17	4-Bromo-Fenil	155.32 ± 1.22	170.85 ± 1.20
JF 21	4-Etil-Fenil	104.60 ± 2.80	115.06 ± 1.80
JF 23	4-Metoxi-Fenil	231.49 ± 1.96	254.64 ± 3.96
JF 24	4-Cloro-Fenil	145.63 ± 1.50	160.20 ± 1.98
JF 26	3-Piridil	160.85 ± 1.06	176.94 ± 1.76
Doxo	-	1.22 ± 0.09	1.46 ± 0.1
<i>m</i> -AMSA	-	3.1 ± 2.8	3.72 ± 0.09
Asul	-	3,0 ± 1.8	3.6 ± 0.07
Média ± Desvio padrão			

6.5 Estudo de interação dos compostos tiossemicarbazonas e albumina

6.5.1 Espectroscopia no UV/Vis interação dos compostos tiossemicarbazonas e albumina

O estudo de interação de compostos por espectroscopia no UV-Vis é uma abordagem rápida e simples que objetiva avaliar mudanças estruturais promovidas por diferentes compostos quando interagem com albuminas (Nafisi; Sadeghi; Panahyab, 2011; Tarai *et al.*, 2022). A Figura 24 apresenta os espectros de absorção para a interação dos compostos com BSA. A Tabela 5 apresenta os parâmetros de interação assim como os valores de constante de interação para cada um dos compostos calculados pela Equação 4.

Sabe-se que, a albumina do soro bovino absorve na região do UV-VIS formando um pico de absorção característico em torno de 280 nm. Esse comportamento, porém, pode sofrer influência de outros compostos que tenham afinidade por essa biomolécula, seja ela fraca, moderada ou forte. Isso ocorre devido a presença de alguns aminoácidos aromáticos, como triptofano, tirosina e fenilalanina, que quando submetidos a uma exposição com os compostos JFs podem interagir por meio de ligações não covalentes ou hidrofóbicas ocasionando em um

aumento da transição eletrônica ($\pi \rightarrow \pi^*$) de um orbital de maior energia (HOMO) para um orbital de menor energia (LUMO) e, conseqüentemente no aumento da absorção da BSA.

Diante do exposto acima, observou-se que, a BSA quando submetida a análise com todos os derivados tiossemicarbazônicos em diferentes concentrações (5-40 μM) apresentou um aumento de sua absorção na região de 278 nm, apresentando desvios à direita do espectro para a região do vermelho (efeito batocrômico) com variações entre 1-6 nm, assim como, observou-se um hipercromismo (aumento do pico de absorção), que já era esperado, quando ocorre interação entre o ligante e a albumina. O aumento do pico de absorção da BSA em 278 nm após a adição dos compostos indica que mais resíduos de ácidos aromáticos foram deslocados para o ambiente aquoso. Logo, pode-se afirmar que os resíduos de Trp-213 na BSA, que estão naturalmente localizados em bolsões hidrofóbicos foram exibidos de certa forma ao meio aquoso. Portanto, os resultados demonstrados nos gráficos (Figura 24) dispostos abaixo indicam que o microambiente dos três resíduos de ácidos aromáticos foi modificado e, conseqüentemente, a estrutura terciária da BSA foi desarranjada. Tais resultados mostram que a principal interação ocorrida entre os complexos BSA-JFs foi por meio do processo de extinção estática.

De acordo com os dados expostos na Tabela 5 abaixo, pode-se dizer que os compostos que apresentaram maior perfil de hipercromismo foram JF-23 (metóxi-fenil), JF-15 (metil-fenil), JF-26 (piridil), JF-21 (etil-fenil), seguidos do JF-17 (bromo-fenil), JF-24 (cloro-fenil), JF-14 (nitro-fenil).

Essas variações na intensidade (extensão do hipercromismo) e na posição (desvios para a região do azul ou do vermelho) do pico de absorção no espectro são comumente utilizadas para verificar a força de interação do ligante-proteína, ou seja, de acordo com essas alterações pode-se avaliar se realmente existe a formação de um complexo BSA-JF.

Para avaliar o composto que obteve um alta capacidade de ligação e formação do complexo BSA-JF é necessário obter os valores da constante de ligação K_b . Com relação ao K_b observa-se que, os valores variaram na ordem de 10^3 a 10^4 M^{-1} indicando que as interações apresentam caráter moderado.

Figura 24. Espectros de absorção no UV/Vis para a interação dos compostos JF-14 (A), JF- 15(B), JF-17 (C), JF-21 (D) JF- 23 (E), JF-24 (F) e JF-26 (G) com a albumina respectivamente.

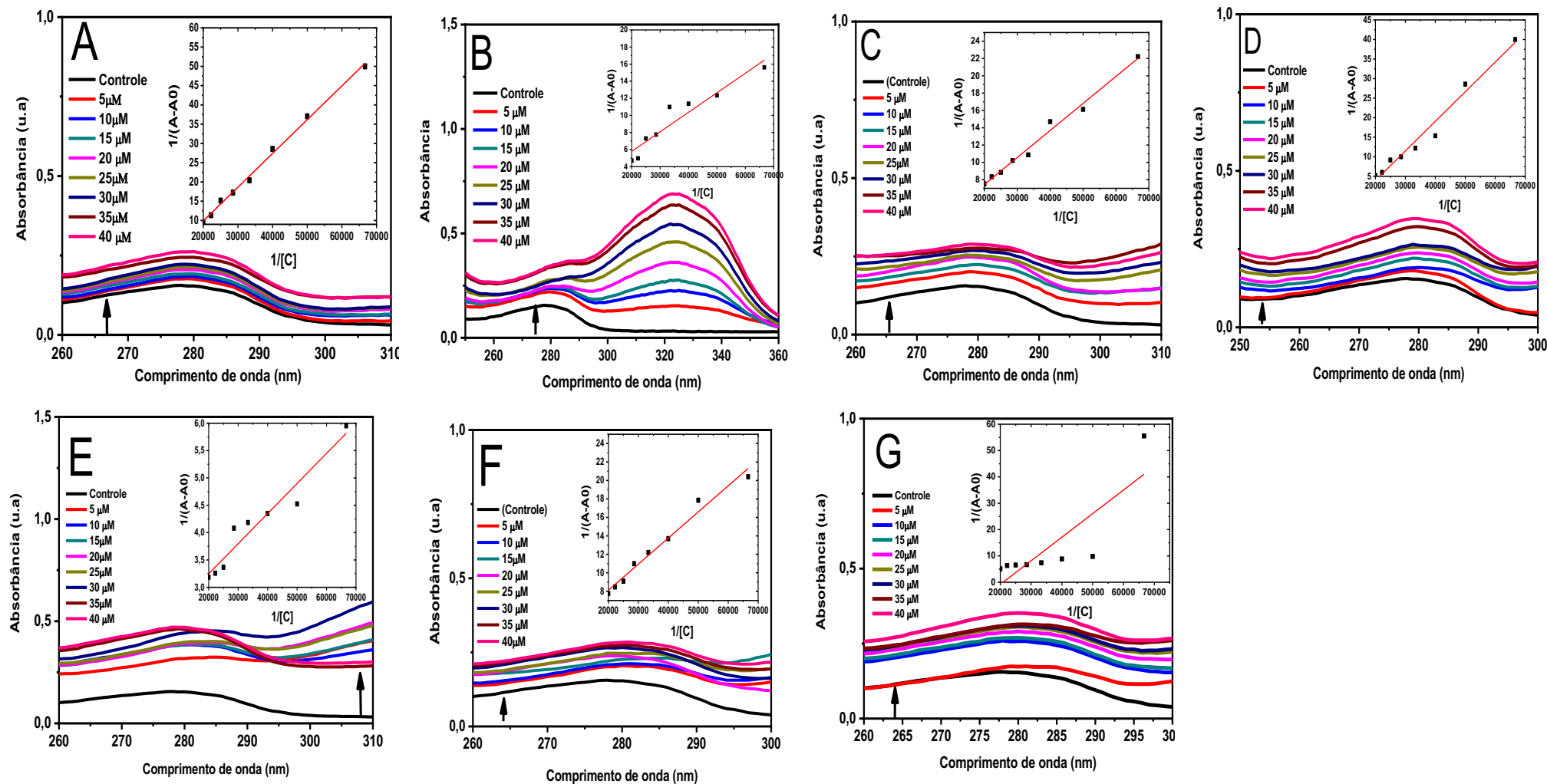


Tabela 5. Dados da absorção da albumina do soro bovino na presença dos compostos JFs.

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm) ^a	$\Delta\lambda$ (nm) ^a	Hipercromaticidad (%) ^b	Equação da reta	R ²	Kb (M ⁻¹) ^c
JF-14	278	280	2	67.94	$y = 0.0009x - 7.6345$	0.9962	$8.54 \cdot 10^3$
JF-15	278	284	6	100	$y = 0.0002x + 1.22$	0.9077	$3.84 \cdot 10^4$
JF-17	278	279	1	100	$y = 0.0003x + 1.1988$	0.9877	$2.56 \cdot 10^4$
JF-21	278	280	2	100	$y = 0.0008x - 11.229$	0.9757	$9.61 \cdot 10^3$
JF-23	278	279	1	100	$y = 0.0006 + 2.1466$	0.9355	$1.53 \cdot 10^4$
JF-24	278	281	3	82.69	$y = 0.0003x + 2.4603$	0.9787	$2.56 \cdot 10^4$
JF-26	278	280	2	100	$y = 0.0009x - 18.726$	0.6947	$8.54 \cdot 10^3$

^a Dados sobre a absorbância da BSA na presença e ausência de diferentes concentrações dos derivados LQIT/JF (2-40 μM), a 298 K.

6.6. Espectroscopia de fluorescência determinação do mecanismo de interação

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). Sendo assim, 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).

Após a obtenção experimental dos espectros de emissão de fluorescência da albumina nas diferentes concentrações dos compostos JFs e temperatura foram plotados os gráficos da Figura 25. Os parâmetros de supressão foram estimados por regressão linear através das Equações 5 e 6 respectivamente e apresentados na Tabela 6.

Figura 25. Espectros de fluorescência para a interação dos compostos JF-14 (A), JF- 15(B), JF-17 (C), JF-21 (D) JF- 23 (E), JF-24 (F) e JF-26 (G) com a albumina em diferentes temperaturas 298, 303, 310 e 315 K respectivamente.

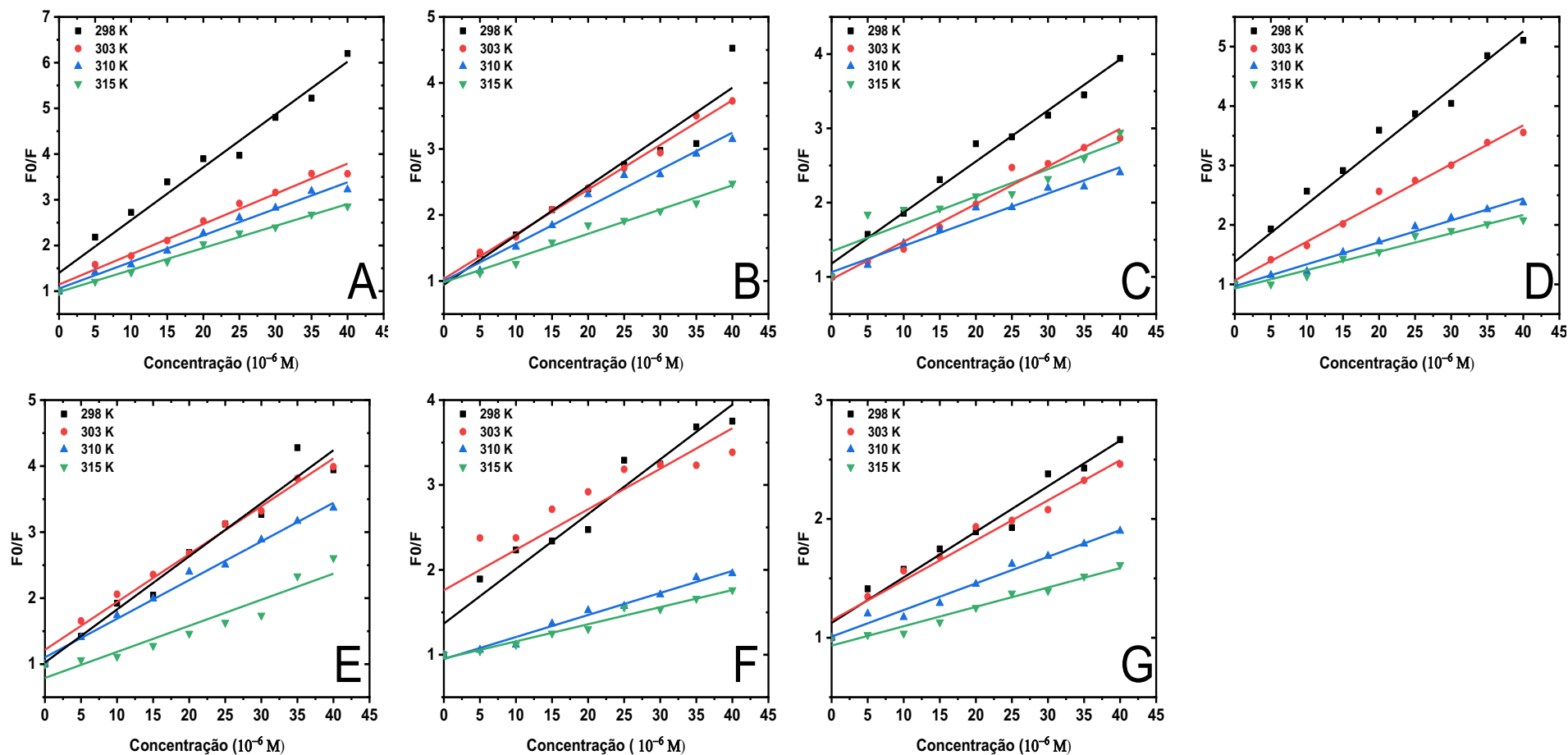


Tabela 6. Resultados espectroscópicos da interação dos compostos JFs com albumina obtidos pela Equação linear de Stern-Volmer.

Compostos	T (K)	$\lambda_{\text{máx}}$ livre (nm) ^a	$\lambda_{\text{máx}}$ ligado (nm) ^a	$\Delta\lambda$ (nm) ^a	Hipo (%) ^b	Equação da reta ^c	R ² ^d	Ksv (M ⁻¹) ^e	Kq (M ⁻¹ s ⁻¹) ^f
JF-14	298	343	342	1.0	16.13	y = 0.1069x + 1.6435	0.9788	1.06 x 10 ⁵	1.77 x 10 ¹³
	303	334	343	9.0	28.01	y = 0.0063x + 1.2346	0.9807	6.30 x 10 ⁴	1.04 x 10 ¹³
	310	334	345	11.0	31.02	y = 0.0569x + 1.0937	0.9842	5.69 x 10 ⁴	9.40 x 10 ¹²
	315	350	355	5.0	34.98	y = 0.0484x + 0.9706	0.9904	4.84 x 10 ⁴	8.00 x 10 ¹²
JF-15	298	343	358	15.0	22.09	y = 0.0757x + 0.913	0.9044	7.57 x 10 ⁴	1.25 x 10 ¹³
	303	334	359	25.0	26.82	y = 0.0669x + 1.0541	0.9932	6.69 x 10 ⁴	1.11 x 10 ¹³
	310	334	360	26.0	31.77	y = 0.0561x + 1.002	0.9683	5.61 x 10 ⁴	9.30 x 10 ¹²
	315	350	368	18.0	40.37	y = 0.0371x + 0.9706	0.9737	3.71 x 10 ⁴	6.10 x 10 ¹²
JF-17	298	343	351	8.0	25.36	y = 0.0649x + 1.2879	0.9839	6.49 x 10 ⁴	1.07 x 10 ¹³
	303	334	351	17.0	34.85	y = 0.0513x + 0.9497	0.9696	5.13 x 10 ⁴	8.5 x 10 ¹²
	310	334	351	17.0	41.56	y = 0.0339x + 1.1034	0.9596	3.39 x 10 ⁴	5.6 x 10 ¹²
	315	350	351	1.0	44.36	y = 0.0295x + 1.5527	0.8839	2.95 x 10 ⁴	4.84 x 10 ¹²
JF-21	298	343	347	4.0	19.59	y = 0.0888x + 1.612	0.9837	8.88 x 10 ⁴	1.47 x 10 ¹³
	303	334	357	23.0	28.12	y = 0.0638x + 1.1058	0.9865	6.38 x 10 ⁴	1.05 x 10 ¹³
	310	334	357	23.0	42.10	y = 0.0375x + 0.9505	0.9815	3.75 x 10 ⁴	6.02 x 10 ¹²
	315	350	356	6.0	48.01	y = 0.0325x + 0.886	0.9661	3.25 x 10 ⁴	5.30 x 10 ¹²
JF-23	298	343	371	28.0	25.35	y = 0.0798x + 1.0408	0.9484	7.98 x 10 ⁴	1.32 x 10 ¹³
	303	334	360	26.0	25.06	y = 0.0678x + 1.3505	0.9945	6.78 x 10 ⁴	1.12 x 10 ¹³
	310	334	370	36.0	29.69	y = 0.0563x + 1.2346	0.9933	5.63 x 10 ⁴	9.30 x 10 ¹²
	315	350	360	10.0	38.31	y = 0.0439x + 0.6654	0.9227	4.39 x 10 ⁴	7.20 x 10 ¹²
JF-24	298	343	360	17.0	26.65	y = 0.0566x + 1.5895	0.948	5.66 x 10 ⁴	9.40 x 10 ¹²
	303	334	358	24.0	29.54	y = 0.0314x + 2.2221	0.9241	3.14 x 10 ⁴	5.20 x 10 ¹²
	310	334	356	22.0	51.06	y = 0.027x + 0.9185	0.9799	2.70 x 10 ⁴	4.40 x 10 ¹²
	315	350	364	14.0	56.76	y = 0.0211x + 0.9301	0.9698	2.11 x 10 ⁴	3.50 x 10 ¹²
JF-26	298	343	356	13.0	37.48	y = 0.0357x + 1.2013	0.9688	3.57 x 10 ⁴	5.90 x 10 ¹²
	303	334	365	31.0	40.64	y = 0.0306x + 1.2337	0.9841	3.06 x 10 ⁴	5.08 x 10 ¹²
	310	334	357	23.0	52.66	y = 0.0222x + 1.0155	0.9829	2.22 x 10 ⁴	3.60 x 10 ¹²
	315	350	357	7.0	61.98	y = 0.0177x + 0.8945	0.9909	1.77 x 10 ⁴	2.90 x 10 ¹²

^aDados relativos ao perfil de emissão de fluorescência da BSA na presença e ausência de diferentes concentrações dos derivados JF (5–40 μ M), em diferentes temperaturas. ^b Hipocromismo resultante da interação entre BSA com derivados JF (5–40 μ M) em comparação com BSA livre, em diferentes temperaturas. ^cEquações da lineares de Stern-Volmer (Ksv). ^d Coeficiente de correlação. ^e Constante de supressão de Stern-Volmer (Ksv) obtida com base na fluorescência de BSA na presença de diferentes concentrações dos derivados de JF (5-40 μ M), em temperaturas diferentes. ^fConstante de taxa bimolecular (Kq) obtida com base na fluorescência de BSA na presença de diferentes concentrações dos derivados JF (5-40 μ M) em diferentes temperaturas.

A Tabela 6 apresenta os resultados de interação promovida pelos compostos frente a albumina. inicialmente tem-se os valores de entre o comprimento de onda de excitação e emissão ($\Delta\lambda = \lambda_{\text{emi}} - \lambda_{\text{ex}}$) os quais apresentaram deslocamentos que variam de 1.0 a 36.0 nm. Associado a este deslocamento foi observado que os compostos eram capazes de promover a

diminuição da intensidade da fluorescência (supressão) com o aumento da concentração dos compostos sugere que a interação provavelmente ocorra via região hidrofóbica localizada na BSA (Ruankham *et al.*, 2021; Sreedharannair *et al.*, 2022; Avdović *et al.*, 2022; Szymaszek *et al.*, 2022). Além disso, todos compostos JFs testados apresentaram hipocromismo em uma faixa de 16.13 a 61.98 % nas diferentes temperaturas avaliadas.

Os valores de Ksv foram classificados, a nível de interação como albumina, como capazes de promover interação fraca (1×10^3 a 1×10^4 M⁻¹), moderada (1×10^4 a 1×10^5 M⁻¹) e alta (1×10^5 a 1×10^6 M⁻¹) (Silva Filho *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021; Szymaszek *et al.*, 2022). As interações para os compostos foram classificadas de moderada a alta para o composto JF-14 e moderada para os demais compostos nas diferentes temperaturas.

Todos os compostos apresentaram diminuição do Ksv com o aumento da temperatura, este fato indica que o mecanismo de supressão promovida pelos compostos frente a albumina é de natureza estática. Além disso, foi observado que a constante de taxa de extinção bimolecular (K_q) obtida nas temperaturas de 298, 303, 310 e 315 K são da ordem de 10¹² ou 10¹³ M⁻¹·s⁻¹ isto é, são maiores que a constante de extinção de dispersão de colisão máxima das biomoléculas 2.0×10^{10} M⁻¹·s⁻¹ este fato também sugere que o mecanismo de supressão é estático e está envolvido na formação do complexo não fluorescente (Wang *et al.*, 2021; Szymaszek *et al.*, 2022).

Perfil semelhante de supressão foi obtido por Chaves *et al.*, (2017), Chaves *et al.*, (2018) e Chaves *et al.*, (2019) avaliando diferentes compostos tiossemicarbazidas e/ou tiossemicarbazonas. O mecanismo de supressão foi confirmado pela Equação de Stern-Volmer modificada (Equação 7). A Figura 26 apresenta os gráficos obtidos pelo ajuste a Equação 7 e a Tabela 7 apresenta os parâmetros de interação.

Figura 26. Espectros de fluorescência para a interação dos compostos JF-14 (A), JF- 15(B), JF-17 (C), JF-21 (D) JF- 23 (E), JF-24 (F) e JF-26 (G) com a albumina em diferentes temperaturas 298, 303, 310 e 315 K respectivamente.

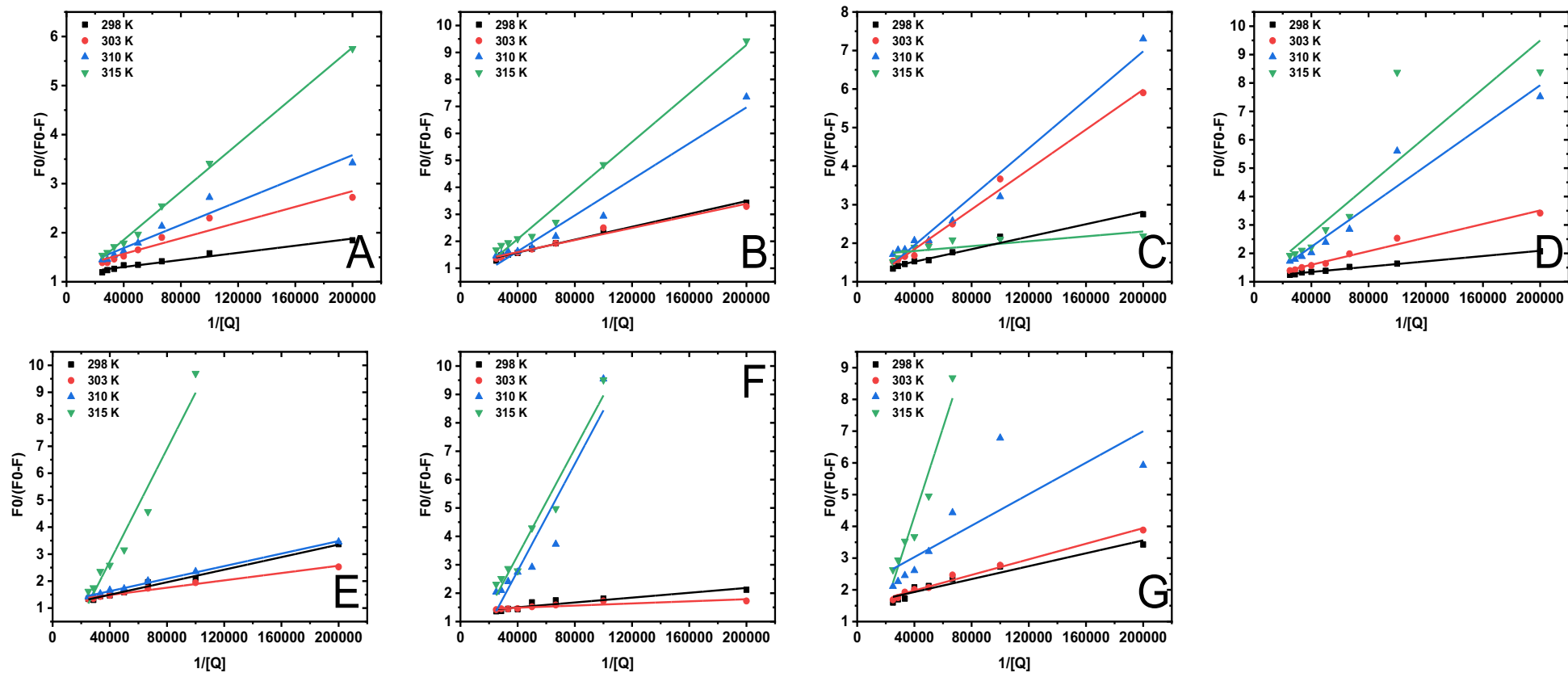


Tabela 7. Resultados espectroscópicos da interação dos compostos JFs com albumina na obtidos pela Equação linear de Stern-Volmer modificada.

Compostos	T (K)	Equação da reta ^a	R ^{2b}	Ka (M ⁻¹) ^c	f ^d
JF-14	298	$y = 4 \cdot 10^{-6}x + 1.1562$	0.9683	$2.9 \cdot 10^5$	0.86
	303	$y = 2 \cdot 10^{-5}x + 0.8827$	0.9531	$4.4 \cdot 10^4$	1.13
	310	$y = 2 \cdot 10^{-5}x + 0.8129$	0.9337	$4.0 \cdot 10^4$	1.23
	315	$y = 3 \cdot 10^{-5}x + 0.8364$	0.9976	$2.7 \cdot 10^4$	1.20
JF-15	298	$y = 6 \cdot 10^{-5}x + 1.2003$	0.9886	$6.0 \cdot 10^4$	0.83
	303	$y = 2 \cdot 10^{-5}x + 0.6913$	0.998	$3.5 \cdot 10^4$	1.44
	310	$y = 3 \cdot 10^{-5}x + 0.7185$	0.977	$2.3 \cdot 10^4$	1.4
	315	$y = 1 \cdot 10^{-4}x - 1.1582$	0.9785	$1.16 \cdot 10^4$	0.86
JF-17	298	$y = 2.0 \cdot 10^{-5}x + 0.8625$	0.9772	$4.3 \cdot 10^4$	1.16
	303	$y = 3 \cdot 10^{-5}x + 0.8509$	0.9925	$2.8 \cdot 10^4$	1.17
	310	$y = 3 \cdot 10^{-5}x + 0.8287$	0.9712	$2.7 \cdot 10^4$	0.82
	315	$y = 3 \cdot 10^{-5}x + 0.792$	0.9986	$2.6 \cdot 10^4$	1.26
JF-21	298	$y = 1 \cdot 10^{-5}x + 1.1576$	0.9897	$9.0 \cdot 10^4$	1.01
	303	$y = 2 \cdot 10^{-5}x + 0.7754$	0.9799	$3.9 \cdot 10^4$	1.28
	310	$y = 3 \cdot 10^{-5}x + 0.9789$	0.9416	$3.2 \cdot 10^4$	1.02
	315	$y = 4 \cdot 10^{-5}x + 0.8094$	0.9416	$2.0 \cdot 10^4$	1.23
JF-23	298	$y = 2 \cdot 10^{-5}x + 0.9765$	0.9965	$4.8 \cdot 10^4$	0.96
	303	$y = 2 \cdot 10^{-5}x + 0.9036$	0.9878	$4.5 \cdot 10^4$	1.11
	310	$y = 2 \cdot 10^{-5}x + 0.7016$	0.9878	$3.5 \cdot 10^4$	1.42
	315	$y = 2 \cdot 10^{-5}x + 0.9765$	0.9878	$3.4 \cdot 10^4$	0.41
JF-24	298	$y = 1 \cdot 10^{-5}x + 0.7104$	0.8821	$7.1 \cdot 10^4$	1.40
	303	$y = 4 \cdot 10^{-5}x + 1.901$	0.9869	$4.7 \cdot 10^4$	2.12
	310	$y = 1 \cdot 10^{-4}x + 1.1582$	0.9785	$1.16 \cdot 10^4$	0.86
	315	$y = 7 \cdot 10^{-5}x + 0.6267$	0.9594	$0.8 \cdot 10^4$	1.61
JF-26	298	$y = 2 \cdot 10^{-5}x + 1.2562$	0.9374	$6.25 \cdot 10^4$	0.80
	303	$y = 2 \cdot 10^{-5}x + 1.193$	0.985	$5.93 \cdot 10^4$	0.65
	310	$y = 4 \cdot 10^{-5}x + 1.901$	0.9869	$4.7 \cdot 10^4$	2.12
	315	$y = 0.0003x - 8.2346$	0.8811	$2.7 \cdot 10^4$	0.12

^aEquações da lineares de Stern-Volmer (Ksv) modificada.

^bCoefficiente de correlação

^cConstante de supressão de Stern-Volmer (Ksv) modificada obtida com base na fluorescência de BSA na presença de diferentes concentrações dos derivados de JF (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 JF (5-40 µM) em diferentes temperaturas.

^ef = intensidade de fluorescência máxima fracional da proteína ou fração da fluorescência inicial que é acessível ao supressor (composto)

Os valores de Ka constante de supressão efetivas para os fluoróforos acessíveis, ou constante de ligação de Stern-Volmer modificadas (Ka), apresentaram diminuição com o aumento da temperatura. Esses resultados confirmam que o mecanismo de supressão para todos os compostos avaliados é de natureza estática. Perfil semelhante também foi obtido por Chaves

et al., (2017) avaliando compostos tiossemicarbazonas com potencial antiparasitário, Chaves *et al.*, (2018) avaliando derivados de β -enamino tiossemicarbazida por Chaves *et al.*, (2019) avaliando compostos metoxi-estiril-tiossemicarbazona.

6.7. Espectroscopia de fluorescência determinação das constantes de ligação

A constante de ligação (K_b) é um dos parâmetros mais importantes quando se quer avaliar a interação de diferentes compostos com albumina. No geral a afinidade de formação do complexo albumina-composto aumenta com o valor de K_b . Considerando que o complexo não é fluorescente e assumindo que a albumina apresenta sítios de ligações independentes. Podem ser obtidos os valores da constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n), através da equação logarítmica dupla modificada (Equação 8).

A Figura 27 apresenta os gráficos linearizados e a Tabela 8 apresenta os parâmetros de ligação para cada um dos compostos em diferentes temperaturas.

Através dos gráficos $\log((F_0-F)/F)$ vs $\log[Q]$ apresentados na Figura 27 é possível obter parâmetros como a constante de ligação e o número de sítios de ligação. Os valores de K_a (constante de ligação) e n (número de sítios de ligação) em diferentes temperaturas foram estimados e os resultados apresentados na Tabela 8. Através dos resultados apresentados na Tabela 8 pode se observar que os valores de n para todos os compostos é de aproximadamente a 1.0 indicando que existe um sítio de ligação na BSA para os compostos. Outro parâmetro importante a ser avaliado foi a constante de ligação (K_a) esse está relacionado 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. Os compostos apresentaram diminuição da constante de ligação com o aumento da temperatura, com valores que variaram de 10^4 a 10^2 M^{-1} indicando que os compostos estão mais fortemente ligados em temperaturas mais baixas obedecendo a um mecanismo estático.

A literatura apresenta diferentes resultados de constante de ligação para as tiossemicarbazonas. Chaves *et al.*, (2020) avaliando compostos 3,4-metilenodióxido-6-iodo-benzaldeído-tiossemicarbazona, Ganorkar *et al.*, (2021) avaliando diferentes tiossemicarbazonas, verificaram que estas apresentaram constante de ligação moderada.

Figura 27. Espectros de fluorescência para a interação dos compostos JF-14 (A), JF- 15(B), JF-17 (C), JF-21 (D) JF- 23 (E), JF-24 (F) e JF-26 (G) com a albumina em diferentes temperaturas 298, 303, 308 e 313K respectivamente.

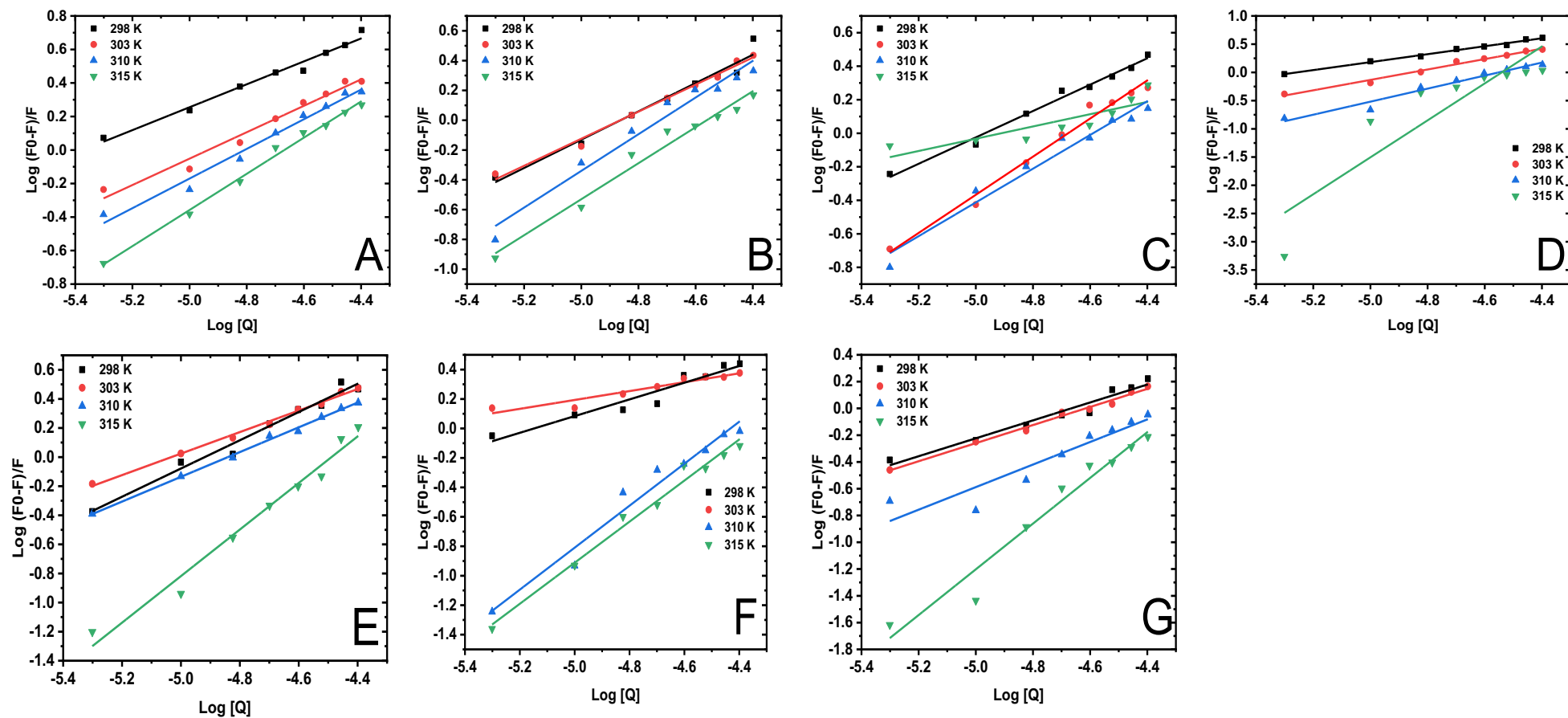


Tabela 8. Os parâmetros de ligação para as interações entre BSA e compostos LQIT/JFs em diferentes temperaturas.

Compostos	T (K)	Equação da reta ^a	R ^{2b}	Ka (M ⁻¹) ^c	n ^c
JF-14	298	y= 0.7878x + 3.88878	0.9799	7.74·10 ³	0.7878
	303	y= 0.6852x + 3.6689	0.9752	4.66·10 ³	0.6852
	310	y= 0.7025x + 3.4487	0.9801	2.80·10 ³	0.7025
	315	y= 0.5307x + 2.546	0.9935	3.51·10 ²	0.5307
JF-15	298	y= 0.95x + 4.6194	0.9698	4.16·10 ⁴	0.95
	303	y= 0.9078x + 4.415	0.9899	2.60·10 ⁴	0.907
	310	y= 0.8814x + 4.2191	0.9679	1.65·10 ⁴	0.8814
	315	y= 0.8467x + 3.8684	0.9747	7.38·10 ³	0.8467
JF-17	298	y= 0.832x + 4.1165	0.9883	1.30·10 ⁴	0.832
	303	y= 0.8688x + 4.1114	0.9846	1.29·10 ⁴	0.8688
	310	y= 0.8048x + 3.695	0.9646	4.95·10 ³	0.8048
	315	y= 0.5276x + 2.381	0.7637	2.40·10 ²	0.5276
JF-21	298	y= 0.7044x + 3.7035	0.9914	5.05·10 ³	0.7044
	303	y= 0.7452x + 3.6848	0.9878	4.83·10 ³	0.7452
	310	y= 0.7420x + 3.4042	0.966	2.53·10 ³	0.7420
	315	y= 0.6101x + 2.7199	0.8073	5.24·10 ²	0.6101
JF-23	298	y= 0.9708 x + 4.7754	0.9771	5.96·10 ⁴	0.9708
	303	y= 0.7396 x + 3.722	0.9947	5.27·10 ³	0.7396
	310	y= 0.7945x + 3.6712	0.9964	4.69·10 ³	0.7945
	315	y= 0.8723x + 3.467	0.9767	2.93·10 ³	0.8723
JF-24	298	y= 0.841x + 4.162	0.9287	1.45·10 ⁴	0.841
	303	y= 0.3869x + 4.0922	0.9172	1.23·10 ⁴	0.3869
	310	y= 0.7563x + 3.4158	0.9674	2.60·10 ³	0.7563
	315	y= 0.70621x + 3.368	0.9838	2.33·10 ³	0.70621
JF-26	298	y= 0.6994x + 3.1235	0.9585	1.32·10 ³	0.6994
	303	y= 0.6758x + 3.1198	0.9897	1.31·10 ³	0.6758
	310	y= 0.7127x + 3.069	0.8747	1.17·10 ³	0.7127
	315	y= 0.6641x + 2.7393	0.9577	5.48·10 ²	0.6641

^aEquações da lineares para o cálculo de energia e sítios de ligação.

^b Coeficiente de correlação

^cKa e n são a constante de ligação e o número de sítios de ligação

6.8. Espectroscopia de fluorescência determinação dos parâmetros termodinâmicos

As forças de atuação intermoleculares entre diferentes compostos e a albumina (Khalili *et al.*, 2022). Para obter informações detalhadas sobre as interações moleculares e forças atuantes entre os compostos BSA, os parâmetros termodinâmicos (entalpia (ΔH), variação de entropia (ΔS) e variação de energia livre (ΔG)). A Figura 28 apresenta os gráficos linearizados

para a determinação dos parâmetros e a Tabela 9 apresenta os resultados em diferentes temperaturas calculados utilizando as Equações 9 e 10 respectivamente.

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que todos os compostos apresentaram valores negativos de ΔH e ΔS e estes estão associados a interações de *Van der Waals* e ligações de hidrogênio. Portanto, a ligação entre os compostos e BSA pode envolver interações de *Van der Waals* e ligações de hidrogênio, como as principais forças de interação entre os compostos aqui avaliados e BSA. Os valores de ΔG aumentam com o aumento da temperatura o que indica que o processo de ligação entre os compostos e BSA é espontâneo essa espontaneidade diminui com o aumento da temperatura.

As interações de tiossemicarbazonas e albumina podem ser diversas e estão relacionadas a estrutura química dos compostos. Chaves *et al.*, (2020) avaliando a interação dos compostos 3,4-metilenodióxido-6-iodo-benzaldeído-tiossemicarbazona com albumina verificaram que os valores de ΔH negativos e ΔS positivos indicam que as ligações de hidrogênio e/ou forças eletrostáticas e que os valores de ΔG eram negativos indicando que o processo é espontâneo. Chaves *et al.*, (2018) avaliando as interações dos compostos β -enamino tiossemicarbazida verificaram que as interações eram do tipo hidrofóbica. Ganorkar *et al.*, (2021) avaliando diferentes tiossemicarbazonas obtiveram valores positivos de ΔH e ΔS indicam que a interação hidrofóbica.

Figura 28. Gráfico de *Van't Hoff* para a ligação dos compostos JF-14 (A), JF- 15(B), JF-17 (C), JF-21 (D), JF- 23 (E), JF-24 (F) e JF-26 (G) com a albumina respectivamente.

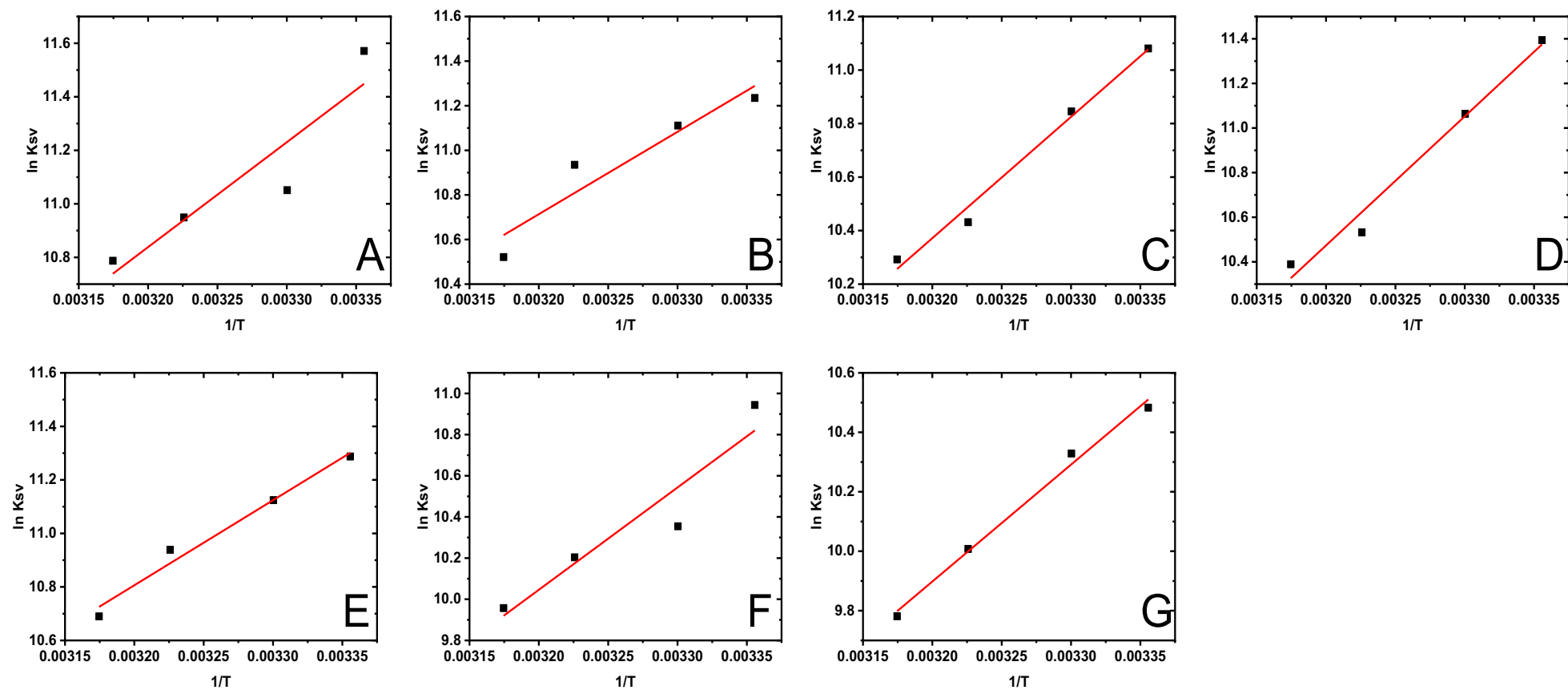


Tabela 9. Valores dos parâmetros termodinâmicos ΔH , ΔS e ΔG para as interações entre BSA e compostos JFs em diferentes temperaturas.

Compostos	T (K)	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol·K]	ΔG [kJ/mol]	Equação da reta	R^2
JF-14	298	-32.57	-14.13	-28.36	$y = 3918.4x - 1.7004$	0.8546
	303			-28.29		
	310			-28.19		
	315			-28.12		
JF-15	298	-30.70	-9.18	-27.96	$y = 3693.2x - 1.1045$	0.8996
	303			-27.92		
	310			-27.85		
	315			-27.81		
JF-17	298	-37.68	-34.35	-27.44	$y = 4532.4x - 4.132$	0.9876
	303			-27.27		
	310			-27.03		
	315			-26.86		
JF-21	298	-48.12	-66.91	-28.18	$y = 5788x - 8.0479$	0.9808
	303			-27.84		
	310			-27.37		
	315			-27.04		
JF-23	298	-27.80	-0.85	-27.55	$y = 3345.6x - 0.1028$	0.9798
	303			-27.54		
	310			-27.53		
	315			-27.62		
JF-24	298	- 41.32	-48.71	-26.80	$y = 4970.4x - 5.8591$	0.8982
	303			-26.56		
	310			-26.22		
	315			-25.97		
JF-26	298	-32.68	-22.30	-26.03	$y = 3931.7x - 2.6834$	0.9919
	303			-25.92		
	310			-25.77		
	315			-25.66		

7. CONCLUSÕES

Foram sintetizados e caracterizados 08 compostos (*E*)-*N*-fenil-2-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)-hidrazina-carbotioamidas substituídas JFs, Estes compostos possuem uma configuração *E* uma vez que exibem o sinal na mesma faixa descrita na literatura. Os resultados de previsão de biodisponibilidade oral mostraram que todos os compostos apresentaram boa disponibilidade, obedecendo as regras de Lipinski e Veber, apresentando apenas uma violação para o composto JF-14. Destacamos na atividade antioxidante que apenas o JF-14 apresentou IC₅₀ (1015.0 µM) para o DHPP, e ABTS os compostos apresentaram porcentagens de captura nas maiores quando comparados ao DPPH. Os compostos não apresentaram citotoxicidade. A principal interação ocorrida entre os complexos BSA-JFs foi por meio do processo de extinção estática, e apresentam caráter moderado. Estes resultados indicam uma necessidade de continuação, devendo ser explorados outros estudos adicionais para corroborar com os resultados já obtidos, e determinar seu mecanismo de ação.

13. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar a espectroscopia de massas dos compostos;
- ✓ Avaliar a atividade de tóxica aguda e análise hematológica, bioquímica e histológica para avaliar a nível de órgão os prováveis danos, principalmente a nível de fígado, baço e rins;
- ✓ Realizar as análises de dicroísmo e viscosidade;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos novos derivados obtidos frente a cepas microbianas de *Candida spp*;

14. REFERENCIAS

ABDELHAMEED, Ali S., et al. Biophysical and in silico studies of the interaction between the anti-viral agents acyclovir and penciclovir, and human serum albumin. **Molecules** v. 1906, p.22-11, 2017.

ABDI, K. et al. Interaction of 5-Fluorouracil and its derivatives with bovine serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 107, p. 20-26, 2012.

ALMEIDA JÚNIOR, A.S.A. In vitro activity, ultrastructural studies and in silico pharmacokinetic properties of indol-3-yl-thiosemicarbazones derivatives and analogues against juvenile and adult worms of *S. mansoni*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 138, p. 104985, 2019.

ANRAKU M, CHUANG VT, MARUYAMA T, OTAGIRI M. Redox properties of serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1830(12):5465-72. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.036. Epub 2013 May 3. PMID: 23644037.

BHARTI, S. K.; Nath, G.; Tilak, R.; Singh, S. K. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2010, 45: 651–660.

BRITTA, E. A.; Scariot, D. B.; Falzirolli, H.; Ueda-Nakamura, T.; Silva, C. C.; Filho, B. P.; Borsali, R.; Nakamura, C. V. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, 2014, 14: 236-248.

ALMEIDA, S. M. V. *et al.* Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazones Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, p. 13023-13042, 2015.

ALTINTOP, M. D.; Atlı, Ö.; Ilgın, S.; Demirel, R.; Özdemir, A.; Kaplancıklı, Z. A. Synthesis and biological evaluation of new naphthalene substituted thiosemicarbazone derivatives as potent antifungal and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016, 108: 406-414.

AMIN, Ketan; DANNENFELSER, Rose-Marie. In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 95, n. 6, p. 1173-1176, 2006.

ANRAKU, Makoto, et al. Redox properties of serum albumin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects** 1830.12 (2013): 5465-5472.

ANRAKU, Makoto, et al. Stabilizing mechanisms in commercial albumin preparations: octanoate and N-acetyl-L-tryptophanate protect human serum albumin against heat and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics** 1702.1 (2004): 9-17.

ATTIA, S.; Kolesar, J.; Mahoney, M. R.; Pitot, H. C.; Laheru, D.; Heun, J.; Holen, K. D. A phase 2 consortium (P2C) trial of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) for advanced adenocarcinoma of the pancreas. **Investigational new drugs**. 2008, 4: 369-379.

AVDOVIĆ, Edina H. et al. Synthesis, characterization and investigating the binding mechanism of novel coumarin derivatives with human serum albumin: Spectroscopic and computational approach. **Journal of Molecular Structure**, v. 1254, p. 132366, 2022.

BARROS, Francisco WA, et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry** 20.11 (2012): 3533-3539.

BELATIK, A. et al. Binding sites of retinol and retinoic acid with serum albumins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 114-123, 2012.

BERNA, Malin, et al. O papel dos receptores de albumina na regulação da homeostase da albumina: Implicações para a entrega de drogas. **Journal of Controlado Release** 211 (2015): 144-162.

BHARTI, S. K.; Nath, G.; Tilak, R.; Singh, S. K. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2010, 45: 651–660.

BINGUL, Murat et al. Synthesis, photophysical and antioxidant properties of carbazole-based bis-thiosemicarbazones. **Research on Chemical Intermediates**, v. 45, n. 9, p. 4487-4499, 2019.

BISWAS, Niladri, et al. Example of two novel thiocyanato bridged copper (II) complexes derived from substituted thiosemicarbazone ligand: Structural elucidation, DNA/albumin binding, biological profile analysis, and molecular docking study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics** 37.11 (2019): 2801-2822.

BLAU, L. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazones as antichagasic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 67, p. 142-151, 2013.

CARDOSO, M. V. O. *et al.* 2-Pyridil thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 30, p. 48-59, 2014.

CASAS, J. S.; GARCÍA-TASENDE, M. S.; SORDO, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structure review. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 209, p. 197-261, 2002.

CHAVES, Otavio Augusto et al. Investigation of interaction between human plasmatic albumin and potential fluorinated anti-trypanosomal drugs. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 199, p. 103-112, 2017.

CHAVES, Otávio Augusto et al. Synthesis, tyrosinase inhibition and transportation behavior of novel β -enamino thiosemicarbazide derivatives by human serum albumin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 254, p. 280-290, 2018.

CHAVES, Otávio Augusto et al. In vitro and in vivo cytotoxic activity and human serum albumin interaction for a methoxy-styryl-thiosemicarbazone. **Investigational New Drugs**, v. 37, n. 5, p. 994-1005, 2019.

CHAVES, Otavio Augusto et al. Elucidation of the interaction between human serum albumin (HSA) and 3, 4-methylenedioxyde-6-iodo-benzaldehyde-thiosemicarbazone, a potential drug for *Leishmania amazonensis*: Multiple spectroscopic and dynamics simulation approach. **Journal of Molecular Liquids**, v. 310, p. 113117, 2020.

CHELLAN, P. *et al.* Cyclopallated complexes containing tridentate thiosemicarbazone ligands of biological significance: Synthesis, structure and antimalarial activity. **Journal of Organometallic Chemistry**. v. 695, p. 2225-2232, 2010.

ĆOĆIĆ, Dušan, et al. New monofunctional platinum (II) and palladium (II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interaction, and cytotoxic activity. **Journal of Inorganic Biochemistry** 189 (2018): 91-102.

DA SILVA FILHO, Francivaldo Araújo, et al. Topoisomerase inhibition and albumin interaction studies of acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International journal of biological macromolecules** 138 (2019): 582-589.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. iLOGP: a simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 12, p. 3284-3301, 2014.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

DE ARAÚJO NETO, Luiz Nascimento et al. Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. **Chemico-biological interactions**, v. 272, p. 172-181, 2017.

DOĞAN, Murat et al. Synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazone derivatives. **Medical Oncology**, v. 39, n. 10, p. 1-7, 2022.

DOMAGK, G.; Behnisch, R.; Mietzsch, F.; Schmidt, H. S. Über eine neue, gegen Tuberkelbazillen in vitro wirksame Verbindungsklasse. **Naturwissenschaften**. 1946, 10: 315-315.

EBRAHIMIPOUR, S. Yousef, 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** 140 (2017): 172-186.

EL-SHARIEF, M. A. M. S.; Abbas, S. Y.; El-Bayouki, K. A. M.; El-Gammal, E. W. Synthesis of thiosemicarbazones derived from N-(4-hippuric acid) thiosemicarbazide and different carbonyl compounds as antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2013, 67: 263-268.

ESWARAN, R. et al. Synthesis, crystal structure, DNA and protein binding studies of novel binuclear Pd (II) complex of 6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde-4(N,N)-dimethylthiosemicarbazone. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 155, p. 1-8, 2016.

FASANO, Mauro, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. **IUBMB life** 57.12 (2005): 787-796.

FINCH, R. A.; Liu, M. C.; Grill, S. P.; Rose, W. C.; Loomis, R.; Vasquez, K. M.; Sartorelli, A. C. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): a potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. **Biochemical pharmacology**. 2000, 8: 983-991.

GANORKAR, Kapil 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.

GONÇALVES, A. C. R. *et al.* Pt^{II}, Pd^{II} and Au^{III} complexes with a thiosemicarbazone derived from diacetylmonooxime: Structural analysis, trypanocidal activity, cytotoxicity and first insight into the antiparasitic mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 141, p. 615-631, 2017.

GLISONI, Romina J., et al. Self-aggregation behaviour of novel thiosemicarbazone drug candidates with potential antiviral activity. **New Journal of Chemistry** 34.9 (2010): 2047-2058.

GUPTA, Sakshi et al. Thiosemicarbazone derivatives of transition metals as multi-target drugs: A Review. **Results in Chemistry**, p. 100459, 2022.

HEBIA, C. et al. Trypsin inhibitor complexes with human and bovine serum albumins: TEM and spectroscopic analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 130, p. 254-259, 2014.

HU, Y.-J. et al. Studies on the interaction between 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil and bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 738, p. 143-147, 2005.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. *Compêndio de Terminologia Química* (IUPAC Gold Book). 2ª ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993. Disponível em: <https://goldbook.iupac.org> . Acesso em: 27 fev. 2022.

JACOB, Íris TT, et al. Anti-inflammatory activity of novel thiosemicarbazone compounds indole-based as COX inhibitors. **Pharmacological Reports** 73.3 (2021): 907-925.

JESWANI, Gunjan et al. Recent approaches for reducing hemolytic activity of chemotherapeutic agents. **Journal of Controlled Release**, v. 211, p. 10-21, 2015.

KALAIIVANI, P. et al. Synthesis, spectral, X-ray crystallography, electrochemistry, DNA/protein binding and radical scavenging activity of new palladium (II) complexes containing triphenylarsine. **Inorganica Chimica Acta**. v. 405, p. 415–426, 2013.

KALHOR, Nassim Fattahian, et al. Interaction, cytotoxicity and sustained release assessment of a novel anti-tumor agent using bovine serum albumin nanocarrier. **Journal of biomolecular structure & dynamics** 38.9 (2020): 2546-2558.

KAR, Supratik; LESZCZYNSKI, Jerzy. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 12, p. 1473-1487, 2020.

KARABATSOS, Gerasimos J., et al. Structural studies by nuclear magnetic resonance. VIII. Ring-substituted phenylhydrazones, semicarbazones, and thiosemicarbazones. **Journal of the American Chemical Society** 86.16 (1964): 3351-3357.

KHALILI, Leila et al. In vitro and in silico insights into the molecular interaction mechanism of acetylshikonin with bovine serum albumin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 365, p. 120191, 2022.

KRAGH-HANSEN, Ulrich, Victor Tuan Giam Chuang, and Masaki Otagiri. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 25.6 (2002): 695-704.

KRAGH-HANSEN, Ulrich. Human serum albumin: a multifunctional protein. **Albumin in medicine**. Springer, Singapore, 2016. 1-24.

KUNOS, C. A.; Radivoyevitch, T.; Waggoner, S.; Debernardo, R.; Zanotti, K.; Resnick, K.; Dowlati, A. Radiochemotherapy plus 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, NSC[#] 663249) in advanced-stage cervical and vaginal cancers. **Gynecologic oncology**. 2013, 1: 75-80.

LAKOWICZ, Joseph R. (Ed.). **Principles of fluorescence spectroscopy**. Boston, MA: springer US, 2006.

LI, Mei-Mei, et al. Recent advances of N-heterocyclic carbenes in the applications of constructing carbo-and heterocyclic frameworks with potential biological activity. **RSC advances** 11.60 (2021): 38060-38078.

LI, M. X. *et al.* Synthesis, crystal structures, and biological activities of 2-thiophene N(4)-methylthiosemicarbazone and its unusual hexanuclear silver(I) cluster. **Inorganic Chemistry Communications**. New York, v. 13, p. 1268-1271, 2010.

LIESEN, A. P. 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

LIU, Jianming, et al. Study of interaction between human serum albumin and three phenanthridine derivatives: fluorescence spectroscopy and computational approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 145 (2015): 473-481.

LYNDEM, Sona et al. Coumarin derivatives: biomedical properties and interactions with carrier proteins. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 73, p. 173-220, 2022.

MONTAZERI, Ahmad, Ali Salehzadeh, and Hojjatollah Zamani. Effect of silver nanoparticles conjugated to thiosemicarbazide on biofilm formation and expression of intercellular adhesion molecule genes, *icaAD*, in *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiologica** 65.1 (2020): 153-160.

MISHRA, M. et al. Synthesis, structural investigation, DNA and protein binding study of some 3d-metal complexes with N'-(phenyl-pyridin-2-yl-methylene)-thiophene-2-carboxylic acid hydrazide. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 452-464, 2014.

MOREIRA, D. R. M. *et al.* Conformational restriction aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 75, p. 467-478, 2014.

MOREIRA, M. B. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2015.

NAFISI, Shohreh; SADEGHI, Golshan Bagheri; PANAHYAB, Ataollah. Interaction of aspirin and vitamin C with bovine serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 105, n. 3, p. 198-202, 2011.

NAGATI, Veerababu, et al. Forskolin-loaded human serum albumin nanoparticles and its biological importance. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics** 38.5 (2020): 1539-1550.

NEHAR, Oussama Kheireddine et al. New thiosemicarbazone Schiff base ligands: Synthesis, characterization, catecholase study and hemolytic activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1204, p. 127566, 2020.

NGUYEN, D. T.; Le, T. H.; Bui, T. T. T. Antioxidant activities of thiosemicarbazones from substituted benzaldehydes and N-(tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl) thiosemicarbazide. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2013, 60: 199-207.

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

OLIVEIRA, Jamerson Ferreira et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 305-314, 2017.

PAHONTU, E.; Paraschivescu, C.; Ilies, D. C.; Poirier, D.; Oprean, C.; Paunescu, V.; Gulea, A.; Rosu, T.; Bratu, O. Synthesis and Characterization of Novel Cu(II), Pd(II) and Pt(II) Complexes with 8-Ethyl-2-hydroxytricyclo(7.3.1.0^{2,7})tridecan-13-one thiosemicarbazone: Antimicrobial and *in Vitro* Antiproliferative Activity. **Molecules**. 2016, 21: 674-681.

PATEL, H. D.; DIVATIA, S. M.; CLERCQ, E. Synthesis of some novel thiosemicarbazone derivatives having anti-cancer, anti-HIV as well as anti-bacterial activity. **Indian Journal of Chemistry**. v. 52B, p. 535-545, 2013.

PETERS Jr, Theodore. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. **Academic press**, 1995.

PIRES, Douglas EV; BLUNDELL, Tom L.; 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.

PRABHAKARAN, R. et al. Synthesis, DNA/protein binding and *in vitro* cytotoxic studies of new palladium metallathiosemicarbazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 6742–6752, 2013.

QUEIROZ, Camila Marques 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.

RÀFOLS, Clara, Silvia Zarza, and Elisabeth Bosch. Molecular interactions between some non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID' s) and bovine (BSA) or human (HSA) serum albumin estimated by means of isothermal titration calorimetry (ITC) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE). **Talanta** 130 (2014): 241-250.

RAJA, D. S.; BHUVANESH, N. S. P.; NATARAJAN K. DNA binding, protein interaction, radical scavenging and cytotoxic activity of 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde(20 - hydroxybenzoyl)hydrazone and its Cu(II) complexes: A structure activity relationship study. **Inorganica Chimica Acta**, v. 385, p. 81-93, 2012.

RIBEIRO, Amelia Galdino et al. Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: Synthesis, antiproliferative activity, in vitro and in silico biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, p. 111592, 2019.

RIBEIRO, Amélia Galdino, et al. Albumin roles in developing anticancer compounds. **Medicinal Chemistry Research** 30.8 (2021): 1469-1495.

RUANKHAM, Waralee et al. In silico and multi-spectroscopic analyses on the interaction of 5-amino-8-hydroxyquinoline and bovine serum albumin as a potential anticancer agent. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021.

SIDDIQUI, Eram Jamal et al. Thiosemicarbazone complexes as versatile medicinal chemistry agents: a review. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 689-703, 2019.

SILVA FILHO, Francivaldo Araújo et al. Topoisomerase inhibition and albumin interaction studies of acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International journal of biological macromolecules**, v. 138, p. 582-589, 2019.

SINGH, S. S.; MEHTA, J. Measurement of drug–protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration. **Journal Chromatography B**, v. 834, p. 108-116, 2006.

SINGLA, P.; LUXAMI, V.; PAUL, K. Synthesis and *in vitro* evaluation of novel triazine analogues as anticancer agents and their interaction studies with bovine serum albumin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 117, p. 59-69, 2016.

SONMEZ, Fatih et al. Synthesis, antioxidant activity and SAR study of novel spiro-isatin-based Schiff bases. **Molecular diversity**, v. 23, n. 4, p. 829-844, 2019.

SOUSA, Gleyton et al. Synthesis and Evaluation of Antiproliferative Activity, Topoisomerase II α Inhibition, DNA Binding and Non-Clinical Toxicity of New Acridine–Thiosemicarbazone Derivatives. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 9, p. 1098, 2022.

SREEDHARANNAIR, Sreedhanya et al. Bio-physical and computational studies on serum albumin/target protein binding of a potential anti-cancer agent. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 172, p. 106141, 2022.

SURYAWANSHI, V. D. et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 56-63, 2016.

SZYMASZEK, Patryk et al. Molecular interactions of bovine serum albumin (BSA) with pyridine derivatives as candidates for non-covalent protein probes: a spectroscopic investigation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 347, p. 118262, 2022.

TARAI, Swarup Kumar et al. Anticancer property and normal cell toxicity profile of pyrrolidine based Platinum (II) complexes: Their DNA, BSA interaction and molecular docking. **Applied Organometallic Chemistry**, p. e6859, 2022.

TENÓRIO, R. P. Tiossemicarbanonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**. São Paulo, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

VARANKO, ANASTASIA, SOUMEN SAHA, AND ASHUTOSH CHILKOTI. "Recent trends in protein and peptide-based biomaterials for advanced drug delivery." *Advanced drug delivery reviews* 156 (2020): 133-187.

VIJAYAN, S. R; SANTHIYAGU, P.; SINGAMUTHU, M.; AHILA, N. K.; JAYARAMAN, R.; ETHIRAJ, K. Synthesis and Characterization of Silver and Gold Nanoparticles Using Aqueous Extract of Seaweed, *Turbinaria conoides*, and Their Antimicrofouling Activity. *Journal of Nanoscience, India*, v. 2014, n. 938272, p. 10, Fevereiro de 2014. e ano da publicação.

WANG, Wenliang et al. Interactions of isoorientin and its Semi-synthetic analogs with human serum albumin. **Bioorganic Chemistry**, v. 116, p. 105319, 2021.

WEBER, C., et al. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. **International journal of pharmaceutics** 194.1 (2000): 91-102.

YAMASAKI, K. et al. Albumin–drug interaction and its clinical implication. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 5435-5443, 2013.

YANG, Lijuan et al. Antioxidant properties of camphene-based thiosemicarbazones: Experimental and theoretical evaluation. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1192, 2020.

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

YOUSEF, T. A.; EL-REASH, GM Abu. Synthesis, and biological evaluation of complexes based on thiosemicarbazone ligand. **Journal of Molecular Structure**, v. 1201, p. 127180, 2020.

YU, Hai et al. A review of hemolysis prediction models for computational fluid dynamics. **Artificial organs**, v. 41, n. 7, p. 603-621, 2017.

YULDASHEVA, Nilufar et al. The Synthesis of Schiff bases and new secondary amine derivatives of p-vanillin and evaluation of their neuroprotective, antidiabetic, antidepressant and antioxidant potentials. **Journal of Molecular Structure**, v. 1270, p. 133883, 2022.

ZHANG, X. M.; Guo, H.; Li, Z. S.; Song, F. H.; Wang, W. M.; Dai, H. Q.; Zhang, L. X.; Wang, J. G. Synthesis and evaluation of isatin- β -thiosemicarbazones as novel agents against antibiotic-resistant Gram-positive bacterial species. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2015, 101: 419-430.

ZHANG, Xing et al. Synthesis, structure, in silico ADME evaluation and in vitro antioxidant of (E)-N-(4-ethylphenyl)-2-(isomeric methylbenzylidene) thiosemicarbazone derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1199, p. 126972, 2020.

ZHAO, Bing et al. Discovery of thiosemicarbazone derivatives as effective New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1) inhibitors against NDM-1 producing clinical isolates. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 1, p. 203-221, 2021.