

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

BEATRIZ DA CUNHA COSTA SOUZA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E
ANTITUMORAL DE NOVOS DERIVADOS 2-[(arilideno)amino]-
cicloalquil[*b*]tiofeno-3-carbonitrila**

RECIFE

2011

BEATRIZ DA CUNHA COSTA SOUZA

**Síntese e Avaliação das Atividades Antifúngica e
Antitumoral de Novos Derivados 2-[(arilideno)amino]-
cicloalquil[*b*]tiofeno-3-carbonitrila**

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade
Federal de Pernambuco, para a
obtenção do Título de Mestre em
Inovação Terapêutica**

**Orientador: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra
Mendonça Júnior**

Recife

2011

Souza, Beatriz da Cunha Costa

Síntese e avaliação das atividades antifúngica e antitumoral de novos derivados 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila / Beatriz da Cunha Costa Souza. – Recife: O Autor, 2011.

126 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Ivan da Rocha Pitta

Co-orientador: Francisco Jaime Bezerra Mendonça Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Farmacologia 2. Medicamentos – Pesquisa 3. Fungos 4. Câncer I. Título.

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-244

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: COSTA SOUZA, BEATRIZ C.

Título: Síntese e Avaliação das Atividades Antifúngica e Antitumoral de Novos Derivados 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Inovação Terapêutica, na área de concentração Fármacos, Insumos e Medicamentos para a Saúde.

Aprovada em: 14/10/11

Banca Examinadora

Prof(a). Dr. Ana Cristina de Lima Leite

Instituição: UFPE

Assinatura: _____

Prof(a). Dr. Thiago Mendonça Aquino

Instituição: UFPE

Assinatura: _____

Prof(a). Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior

Instituição: UEPB

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda a minha família, pais, avós, primos, tias e tios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Luiz Malheiros e Rozalha da Cunha Lucena pelo dom da vida e por ter dado vida aos meus sonhos. Ao meu irmão Hugo Neto, por todo carinho e amor.

Ao Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, meu orientador, pela colaboração e confiança na realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior, pela disposição e ajuda durante o desenvolvimento da dissertação.

A Prof^a. Dra. Suely Lins Galdino, que vem hasteando a bandeira do desenvolvimento científico regional com muito ímpeto e dedicação e ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) da Universidade Federal de Pernambuco.

Á Prof^a. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, pela sua paciência, sua presença, estímulo e dedicação para com os projetos e pessoas do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos.

Á Prof^a. Dra. Teresinha Gonçalves do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, pela colaboração na realização dos testes de citotoxicidade *in vitro*.

Á Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba, pela realização da avaliação da atividade antifúngica.

Agradeço também aos meus amigos do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos: Anekécia, Antônio Sérgio, Andreza, Cleiton, Michelle, Willams Leal, Jamerson, Talita, Nayara, Luiz Carlos, Aracelly, Sandra Sarinho, Sandra Alcântara.

Agradeço em especial a Sybelle Lacerda, Nathália Colaço e Tiago Bento pela ajuda, pelos conselhos, pelo conhecimento compartilhado, pela amizade gratuita e por fazer parte do meu crescimento profissional e pessoal.

A FACEPE e ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

O anel tiofênico é um heterociclo ao qual são atribuídas diversas atividades biológicas, com destaque para as atividades antifúngica e antitumoral. Estudos anteriores realizados pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos comprovaram que derivados 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila apresentam promissora atividade antifúngica e citotóxica *in vitro*, sendo os compostos ativos contra a maioria dos isolados de *Candida* e, especialmente, contra *Cryptococcus neoformans*. Diante disso, desenvolvemos novos compostos 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila e avaliamos suas atividades antifúngica e antitumoral. Os compostos foram obtidos através de uma rota sintética constituída por duas etapas. A primeira etapa de síntese utilizou a reação de Gewald e forneceu 2-amino-cicloalquil[b]tiofenos-3-carbonitrila. A segunda etapa consistiu em uma reação de condensação e forneceu os compostos finais 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil-tiofeno-3-carbonitrila com valores de rendimento que variaram entre 51 a 92% para a maioria dos compostos. Na avaliação da atividade antifúngica, 18 compostos tiveram suas CIM (Concentração Inibitória Mínima) determinadas frente a 2 cepas de *Cryptococcus neoformans* e 2 cepas de *Candida krusei*. 2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (SB-64) apresentou melhor atividade, com valores de CIM que variaram entre 64 a 128 µg/mL para as 2 cepas de *Cryptococcus neoformans*. Na avaliação da atividade antitumoral, 16 compostos tiveram suas citotoxicidades avaliadas através do ensaio do MTT frente às linhagens tumorais humanas HT29, HEP e NCI H-292. 2-[(1H-Indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (SB-44) apresentou maior percentual de inibição do crescimento (100% para HT29 e NCI H-292; 97,5% para HEP). Sendo assim, alguns compostos sintetizados demonstraram potencial para as atividades biológicas testadas.

Palavras-chave: 2-aminotiofenos, reação de Gewald, atividade antifúngica, atividade antitumoral.

ABSTRACT

The thiophene ring is a heterocycle which are assigned different biological activities, especially antifungal and antitumor activities. Previous studies conducted by the Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos found that 2-[(arylidene)amino]-cycloalkyl[*b*]thiophene-3-carbonitrile derivatives presented promising antifungal and cytotoxic activity *in vitro*, and these compounds were active against most isolates of *Candida* and, particularly, against *Cryptococcus neoformans*. Therefore, we developed new 2-[(arylidene)amino]-cycloalkyl[*b*]thiophene-3-carbonitrile derivatives and evaluate their antifungal and antitumor activities. These compounds were obtained by a synthetic route consists of two steps. The first step was the Gewald reaction and affording the 2-amino-cycloalkyl[*b*]thiophene-3-carbonitrile derivatives. The second step consisted of a condensation reaction and provided the final compounds 2-[(arylidene)amino]-cycloalkyl[*b*]thiophene-3-carbonitrile in yield values ranging from 51 to 92% for most of the compounds. In the evaluation of antifungal activity, 18 compounds had their MIC (Minimum Inhibitory Concentration) determined against two strains of *Cryptococcus neoformans* and two strains of *Candida krusei*. 2-[(Quinolin-8-yl-methylidene)amino]-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[*b*]thiophene-3-carbonitrile (SB-64) showed better activity with MIC values ranging between 64 to 128 mg/mL for the two strains of *Cryptococcus neoformans*. In the evaluation of antitumor activity, 16 compounds had their cytotoxicity analyzed by MTT assay against the human tumor lines HT29, HEP and NCI H-292. 2-[(1*H*-indol-2-yl-methylidene)amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-cyclohepta[*b*]thiophene-3-carbonitrile (SB-44) had a higher percentage of inhibition of growth (100% for HT29 and NCI H-292, 97.5% for HEP). Some synthesized compounds have shown potential for the biological activities tested.

Keywords: 2-amino-thiophenes, Gewald reaction, antifungal activity, antitumor activity.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Obtenção comercial do tiofeno	21
Esquema 2 Síntese de Paal-Knorr.....	22
Esquema 3 Síntese de Gewald.....	22
Esquema 4 Síntese realizada por Sridhar e colaboradores.....	23
Esquema 5 Síntese one-pot de Wang e colaboradores.....	24
Esquema 6 Formação de tiofeno 1,1-dióxidos.....	24
Esquema 7 Síntese de tiofenos acetilênicos	25
Esquema 8 Síntese de 3-aminobenzo[<i>b</i>]tiofenos	25
Esquema 9 Síntese dos derivados 2-[(arilideno)-amino]-4,5-cicloalquil- tiofeno-3-carbonitrila(LPSF/SB).....	41
Esquema 10 Mecanismo da Reação de Gewald.....	44
Esquema 11 Mecanismo de Condensação do 2-amino-cicloalqui[<i>b</i>]tio- fenos-3-carbonitrila aos aldeídos aromáticos.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura do tiofeno.....	21
Figura 2 Tiofenos como metabólitos.....	26
Figura 3 Eprosartan.....	27
Figura 4 Ácido tiaprofênico.....	27
Figura 5 Cefalotina.....	28
Figura 6 Sertaconazol.....	28
Figura 7 Pamoato de pirantel.....	28
Figura 8 Olanzapina.....	29
Figura 9 Estrôncio ranelato.....	29
Figura 10 Estrutura da Estrutura da carbohidrazina (4), semicarbazida (5) e carbonil-4-feniltiosemicarbazida (6)	31
Figura 11 5-tiofen-2-il-pentan-1-ol.....	32
Figura 12 Moléculas com ação alostérica no receptor adenosina A1	32
Figura 13 Estrutura do composto PD 146626.....	33
Figura 14 Estrutura dos compostos 2-amino-3(3',4',5'-trimetoxibenzoil)..	34
Figura 15 Composto 61.....	35
Figura 16 Compostos sintetizados por Arm e colaboradores.....	35
Figura 17 Compostos 19 e 20 sintetizados por Isloor e colaboradores.....	36
Figura 18 Compostos 21 e 22 sintetizados por Queiroz e colaboradores..	37
Figura 19 Diarilaminas derivadas de benzo[b]tiofenos sintetizadas por Ferreira	38
Figura 20 Estrutura do composto 6-cloro-4,7-dioxo-5-fenilamino-4,7-dihidro-benzo[b]tiofeno-2-ácido carboxílico metil ester.....	38
Figura 21 Estrutura dos compostos 23 e 24.....	39
Figura 22 Espectroscopia de RMN ¹ H do composto LPSF\SB-68.....	47
Figura 23 Espectroscopia de RMN ¹³ C do composto LPSF\SB-68.....	48
Figura 24 Espectroscopia de IV do composto LPSF\SB-68.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas frente a cepas de <i>C.neoformans</i> e <i>C.krusei</i> pela técnica de microdiluição.....	79
Tabela 2: Atividade Antiproliferativa dos Compostos Sintetizados.....	81

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AINE: Antiinflamatório não esteroideal
ASD: Ágar Sabouraud Dextrose
C. albicans: *Candida albicans*
CFM: Concentração Fungicida Mínima
C. glabrata: *Candida glabrata*
CIM: Concentração Inibitória Mínima
C. krusei: *Candida krusei*
CO₂: Gás carbônico
CSD: Caldo Sabouraud Dextrose
C. tropicalis: *Candida tropicalis*
DMF dimetilformamina
DMSO: dimetilsulfóxido
E. coli: *Escherichia coli*
H-292: Câncer de pulmão– humano
HCl: Ácido clorídrico
HEP: Carcinoma de laringe – humano
H₂S: Sulfeto de hidrogênio
HSV-1: Vírus do herpes simplex-1
HT29: Carcinoma de cólon – humano
Hz: Hertz
IC₅₀: Concentração Inibitória Cinquenta por cento
IV: Infravermelho
JNKs: c-Jun N-terminal
KBr: Brometo de potássio
LPSF: Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
MAP: Proteína ativadora de mitógenos
MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolio
NaCl: Cloreto de sódio
NCI: National Cancer Institute
OMS: Organização Mundial de Saúde

PdCl_2 : Cloreto de paládio

Rdt : Rendimento

Rf: Fator de retenção

RMN ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ^{13}C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

S. Aureus: Staphylococcus aureus

TBAB: Brometo de tetrabutilamônio

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1	A Química do Tiofeno.....	21
3.2	Ocorrência Natural do Tiofeno	26
3.3	Fármacos comerciais contendo o núcleo tiofeno	26
3.4	Potencial farmacológico do tiofeno	29
3.4.1	<i>Antiinflamatório e Analgésico</i>	30
3.4.2	<i>Antiviral</i>	32
3.4.3	<i>Antitumoral</i>	33
3.4.4	<i>Ação sobre o Sistema Nervoso Central</i>	34
3.4.5	<i>Antimicrobiano</i>	36
4	PARTE QUÍMICA	41
4.1	Metodologia	41
4.2	Resultados e Discussão.....	43
4.2.1	<i>Rota Sintética</i>	43
4.2.2	<i>Mecanismos reacionais e Reações</i>	43
4.2.3	<i>Caracterização Estrutural dos Compostos Sintetizados</i>	46
4.2.4	<i>Espectroscopia RMN ¹H</i>	46
4.2.5	<i>Espectroscopia RMN ¹³C</i>	47
4.2.6	<i>Espectroscopia de IV</i>	48
4.3	Procedimentos Experimentais.....	49
4.3.1	<i>Materiais e Métodos</i>	49
5	PARTE BIOLÓGICA	75

5.1	Metodologia	75
5.1.1	<i>Atividade Antifúngica</i>	75
5.1.2	<i>Atividade Antitumoral</i>	76
5.2	Procedimentos Experimentais	77
5.2.1	<i>Materiais e Procedimentos</i>	77
5.3	Resultados e Discussão	79
5.3.1	<i>Atividade Antifúngica</i>	79
5.3.2	<i>Atividade Antitumoral</i>	80
6	CONCLUSÕES	84
7	PERSPECTIVAS	86
	REFERÊNCIAS	88
	ANEXO A- Índice dos compostos sintetizados.....	95
	ANEXO B- Artigo submetido á Revista Acta Pharmaceutica.....	97



1 INTRODUÇÃO

Os compostos heterociclos representam um grande número de estruturas diversas que apresentam importante papel nos sistemas biológicos. O anel tiofênico, uma estrutura insaturada de cinco membros contendo o átomo de enxofre, é um composto fracamente aromático que sofre principalmente reações de substituição no carbono 2 do anel (SARKER E NAHAR, 2009).

A estrutura do anel tiofênico, em particular, tornou-se atrativa para a química medicinal a partir do momento em que várias atividades biológicas foram atribuídas a este núcleo. A literatura relata diversas propriedades entre as quais se destacam as atividades antifúngica (CHAN et al., 1975; RYU et al., 2005) e antitumoral (DALLEMAGNE et al., 2002).

Pesquisas no sentido de descobrir novos fármacos antifúngicos são impulsionadas pela crescente resistência encontrada aos medicamentos já disponíveis na terapêutica. Dados clínicos e laboratoriais têm demonstrado que *Candida krusei* apresentaria resistência ao fluconazol e *Cryptococcus neoformans* à caspofungina (ROGERS, 2006).

Mudanças na afinidade do citocromo P450 estão ligadas a resistência intrínseca da *C. krusei* ao fluconazol, onde o citocromo parece ser um alvo celular insensível a droga (OROZCO et al., 1998; LUPETTI et al., 2002). Já a resistência relacionada com a anfotericina B observada em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* relaciona-se com uma mutação na biossíntese do ergosterol, que geraria um defeito na enzima esterol delta⁸⁻⁷ isomerase (KELLY et al., 1994).

Estudos anteriores realizados pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF promoveram a síntese de derivados de tiofeno e a avaliação de suas atividades antifúngica e citotóxica *in vitro*. Através da determinação das Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) por meio do método de microdiluição em caldo, foram testados oito derivados 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila frente a quatro espécies de *Candida* (42 isolados - *C. albicans* - 20 isolados; *C. krusei* - 5 isolados; *C. parapsilosis* -12 isolados e *C. tropicalis* - 5

isolados) e duas amostras de *Cryptococcus neoformans* (OLIVEIRA, 2010). Os valores de CFM foram obtidos utilizando concentrações decrescentes de cada uma das drogas isoladamente (3.200 – 6,25 µg/mL). Esses valores foram comparados com os valores obtidos com as drogas referência fluconazol e anfotericina B, para o mesmo ensaio.

Os derivados apresentaram de maneira geral, uma atividade moderada ou fraca contra a maioria dos isolados de *Candida* e *Cryptococcus* testados, sendo que os isolados de *C. neoformans* mostraram-se mais sensíveis (menores valores de CFM). Os derivados contendo o anel ciclohexila foram mais eficientes para atividade antifúngica que os ciclopentila e cicloheptila, sendo que todos os 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila com atividade se mostram mais fungicidas que fungistáticos, diferentemente da maior parte das drogas comercialmente disponíveis.

Considerando isto, o presente trabalho procurou desenvolver novos derivados 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila, baseados em trabalhos anteriores do grupo, que também apresentassem atividade antifúngica frente a cepas de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*.

Por outro lado, compostos contendo o tiofeno em sua estrutura também apresentaram atividade antitumoral em estudos *in vitro* realizados por diversos pesquisadores. Os derivados do sistema ciclopenta[c]tiofeno, sintetizado por Dallemagne et al. (2002), tiveram sua atividade antitumoral avaliada contra 60 linhagens de células tumorais humanas. Entre os compostos testados, sete foram considerados ativos especialmente contra células de leucemia.

Romagnoli e colaboradores (2006; 2007), em estudos com derivados tiofênicos, constataram atividade antiproliferativa para derivados 2-amino-3-(3',4',5'-trimetoxibenzoil)5-fenil-tiofeno.

Tendo em vista que o câncer é o líder causador de mortes em todo mundo e que segundo dados da OMS, esta patologia foi causa de 7,9 milhões de mortes no mundo, em 2007, buscaram-se novos fármacos que sejam menos tóxicos, mais eficazes e específicos para o tratamento desta doença. Os tipos de câncer que causam maior número de mortes por ano são os de pulmão, estômago, fígado e de mama (WHO, 2011).

Com base nestas informações, buscamos sintetizar compostos 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila que apresentassem atividade antitumoral *in vitro* frente a linhagens tumorais de câncer de pulmão humano (NCI H-292), carcinoma de cólon humano (HT29) e carcinoma de laringe humano (HEP).



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver sinteticamente e avaliar as atividades biológicas de novas moléculas da série 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB) como potenciais agentes terapêuticos com atividades antifúngica e antitumoral e que possam se tornar novas alternativas terapêuticas.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar novas moléculas da série 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB);
- Determinar as características físico-químicas e comprovar estruturalmente a série sintetizada utilizando diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos derivados tiofênicos LPSF/SB através de ensaios de sensibilidade, frente a diferentes isolados clínicos de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* de forma a determinar as concentrações mínimas inibitórias;
- Verificar a citotoxicidade *in vitro* de derivados tiofênicos LPSF/SB em três linhagens de células tumorais, através de um *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral das amostras.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A Química do Tiofeno

O tiofeno é um heterociclo insaturado de cinco membros que contém o enxofre como heteroátomo e que se apresenta sob a forma de um líquido incolor, solúvel em água e com odor semelhante ao benzeno (FIGURA 1). O par de elétrons livres do enxofre encontra-se no orbital 3s e tem menor capacidade de interagir com os elétrons pi das ligações duplas. Isso faz com que o tiofeno seja considerado fracamente aromático (SARKER E NAHAR, 2009).

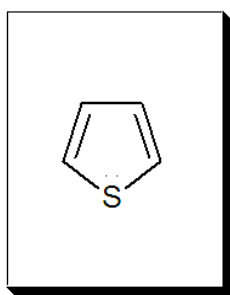
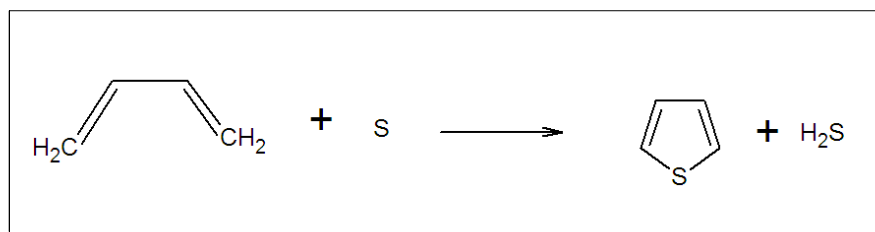


Figura 1 - Estrutura do tiofeno

Descoberto por Meyer, em 1882, este heterociclo é comercialmente preparado a partir da ciclização do butano ou butadieno com o enxofre a 600° C (SARKER E NAHAR, 2009) de acordo com o esquema abaixo:

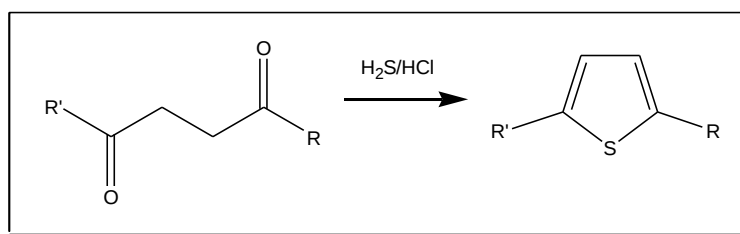


Esquema 1 - Obtenção comercial do tiofeno

O anel tiofeno pode se formar por diversos processos de síntese dentre os quais se destacam: a síntese de Paal-Knorr, de Fielsselmann, de Hinsberg e a

síntese de Gewald, sendo esta última a principal via de obtenção de derivados tiofênicos 2-aminados.

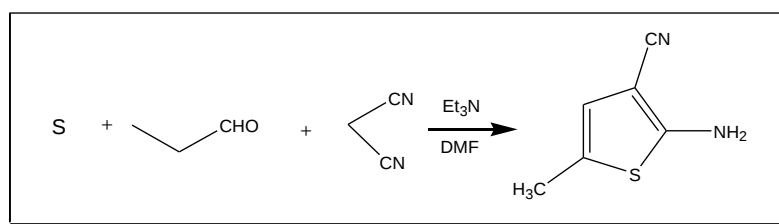
A Síntese de Paal-Knorr é eficiente no preparo de compostos heterociclos de cinco membros. Ela gera compostos tiofênicos através da condensação de composto 1,4-dicarbonílico em presença de um excesso de enxofre que pode ser dado pelo sulfeto de hidrogênio (H_2S) e ácido clorídrico (HCl) ou ainda por pentasulfito fostroso ou reagente de Lawesson (ESQUEMA 2).



Esquema 2 - Síntese de Paal-Knorr

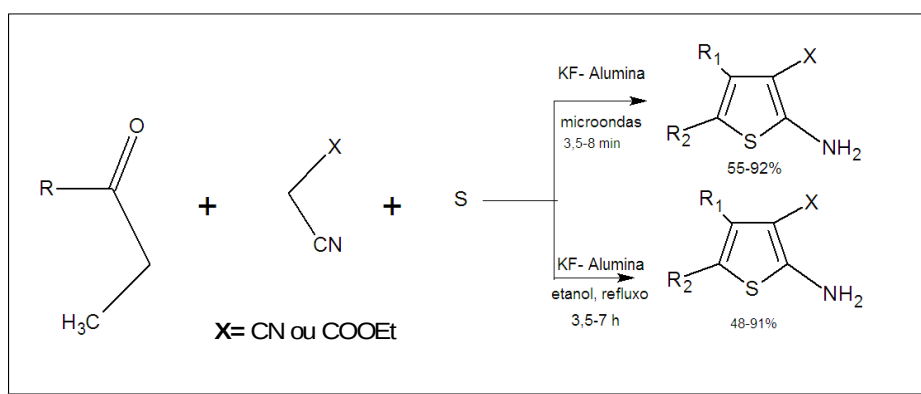
Em presença de piridina, compostos 1,3-dicarbonílicos ou aldeídos Beta-clorovinílicos reagem com tioglicolatos ou outros tióis. Isso constitui a síntese de Fielsselman, que forma tiofeno-2-carboxil ésteres (STEFANI, 2009).

A Síntese de Gewald envolve a condensação de uma cetona ou aldeído com um composto metileno ativo (α -cianoéster, etc) na presença de enxofre elementar e de uma base (triethylamina, morfolina), em etanol ou dimetilformamina (DMF). Este tipo de síntese origina 2-amino-tiofeno polissubstituídos (GEWALD, 1966) (ESQUEMA 3).



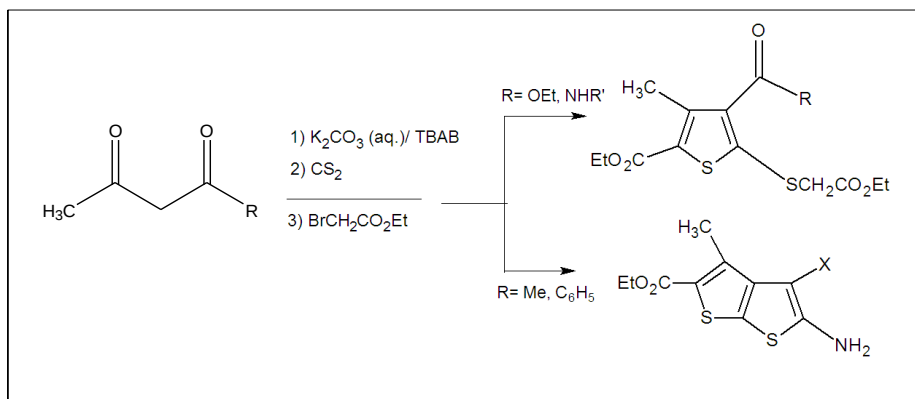
Esquema 3 - Síntese de Gewald.

A grande eficácia e a facilidade de isolamento do produto 2-amino-tiofeno gerado por meio da síntese de Gewald levaram Sridhar e colaboradores (2007) a realizar esta síntese substituindo a base orgânica por KF-alumina como catalisador e sob duas formas de aquecimento: utilizando a irradiação das microondas e sob condições convencionais de aquecimento por refluxo em etanol. Comparando ambos os casos, o estudo concluiu que a reação se processa de maneira satisfatória nas duas situações e que os derivados 2-amino-tiofenos são obtidos em rendimentos que variam de bons a moderados. (ESQUEMA 4).



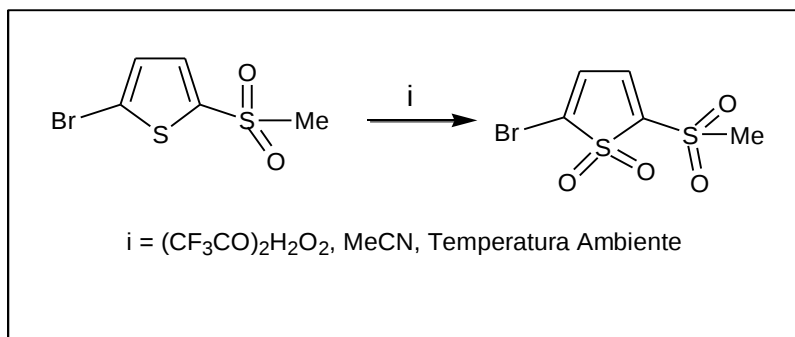
Esquema 4 - Síntese realizada por Sridhar e colaboradores (2007)

Com o objetivo de reduzir o tempo reacional da formação do tiofeno em relação à síntese de Gewald, Wang e colaboradores (2007) realizaram uma síntese *one-pot* para obter tiofenos polisubstituídos e tieno[2,3-*b*]tiofenos polisubstituídos baseada nas reações de compostos 1,3-dicarbonílicos com dissulfeto de carbono e 2-bromo-acetato de etila catalisada por TBAB (brometo de tetrabutilamônio) em presença de carbonato de potássio em meio aquoso. Esta síntese conduziu a altos rendimentos e mostra-se menos danosa para o meio ambiente (ESQUEMA 5).



Esquema 5 - Síntese *one-pot* de Wang e colaboradores (2007)

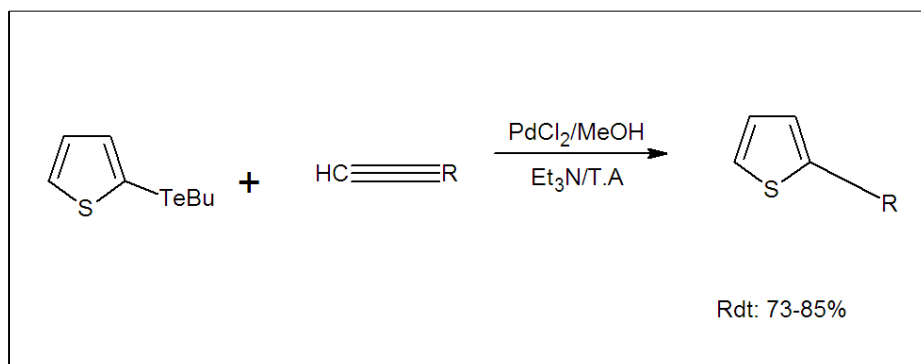
Reações de oxidação do enxofre do anel e ataque nucleofílico nos átomos do anel também são relatadas (RAJAPPA, 1984). A oxidação de tiofenos que apresentam grupos retiradores de elétrons pode ocorrer através da adição de ácido trifluoroperacético em acetonitrila anidra. Isso leva a formação de tiofeno 1,1-dióxidos (ESQUEMA 6) (NENAJDENKO; GAVRYUSHIN E BALENKOVA, 2001).



Esquema 6 - Formação de tiofeno 1,1-dióxidos

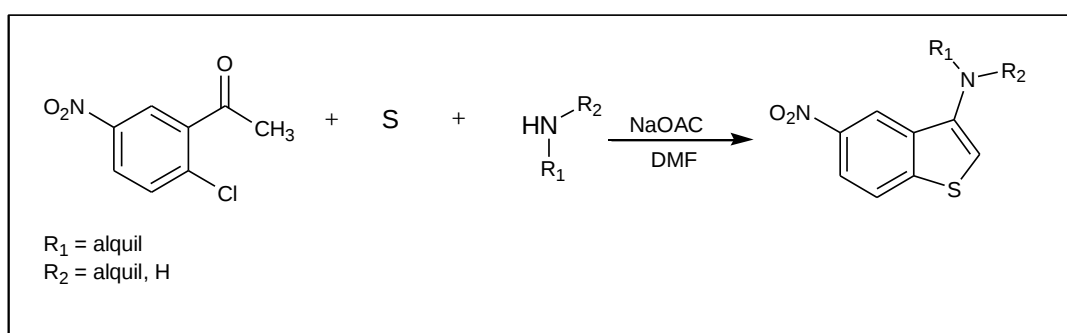
A síntese de derivados tiofênicos tem tido destaque na literatura e diversas rotas sintéticas estão associadas a estes produtos. Através de reações catalisadas por PdCl_2 , foi possível obter tiofenos acetilênicos em bons rendimentos. A reação catalisada por PdCl_2 envolvendo o intermediário 2-(butilteluro)tiofeno com alquinos terminais, utilizando metanol como solvente e trietilamina como base foi realizada

por Zeni e colaboradores (2001). Os pesquisadores conseguiram obter uma síntese rápida e que gerou produtos com rendimentos altos (ESQUEMA 7).



Esquema 7 - Síntese de tiofenos acetilênicos (ZENI et al., 2001).

A formação de 3-aminobenzo[b]tiofenos foi realizada por Androsov e colaboradores (2010) por meio da reação entre 1-(2-cloro-5-nitrofenil)etanona, enxofre e aminas primárias e secundárias sob condições de Willgerodt-Klinder conforme esquema abaixo. (ESQUEMA 8).



Esquema 8 - Síntese de 3-aminobenzo[b]tiofenos por Androsov e colaboradores (2010)

3.2 Ocorrência Natural do Tiofeno

O tiofeno está presente na estrutura do carvão (CRNKOVIC et al., 2004), e em algumas plantas da família *Asteraceae* onde é um dos metabólitos secundários. Nas raízes de *Pterocaulon virgatum* há ocorrência de tiofenos acetilados (HEEMANN et al., 2004). Em *Tagetes pátula L.*, já foram identificados vários derivados tiofenos como metabólitos secundários (MARGL et al., 2002). Também foram encontrados metabólitos contendo tiofeno a partir de fungos e plantas. O 5-pro-1-inil-tiofeno-2-carbaldeído e o 5-hexa-5-em-1-inil-[2,2']bitiofeno foram extraídos, respectivamente, do fungo *Juniperina daedelia* e das raízes da *Spaerocephalus echinops* (STEFANI, 2009)(FIGURA 2).

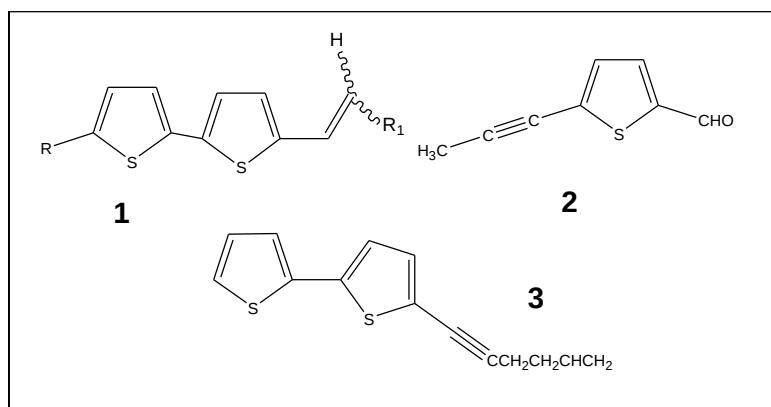


Figura 2 - Tiofenos como metabólitos secundários da *Tagetes pátula L.* (**1**), *Juniperina daedelia* (**2**) e das raízes da *Spaerocephalus echinops* (**3**)

3.3 Fármacos comerciais contendo o núcleo tiofeno

Alguns fármacos utilizados na terapêutica possuem em sua estrutura o anel tiofeno. Entre as diversas atividades farmacológicas estão as ações anti-hipertensiva, antiinflamatória e analgésica, antimicrobiana, anti-helmíntica, antidepressiva e antipsicótica.

O eprosartan é um anti-hipertensivo que atua como agonista do receptor da angiotensina II (FIGURA 3).

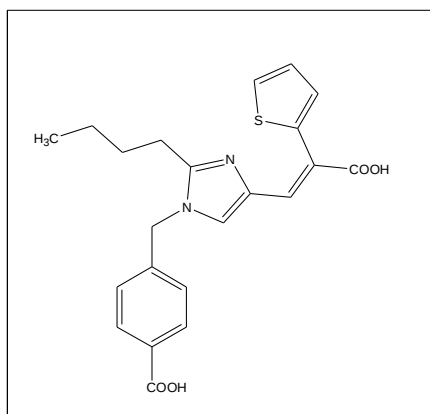


Figura 3 – Eprosartan

O suprofenó é utilizado como antiinflamatório e analgésico em problemas oculares durante ou após cirurgia (DRUGBANK, 2010, BYMASTER et al., 2003). O ácido tiaprofênico pertence à classe dos AINES sendo bastante eficaz no tratamento sintomático da artrite reumatóide, da osteoartrite e da artrite gotosa aguda (GOODMAN E GILMAN, 2005). (FIGURA 4)

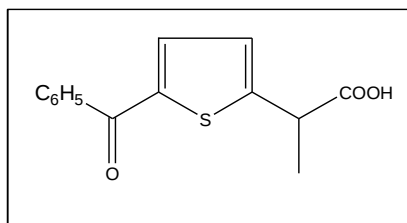


Figura 4 - Ácido tiaprofênico

Como membro do grupo das cefalosporinas de 1ª geração, a cefalotina é um antibiótico empregado na profilaxia ou tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas. Apresenta atividade moderada contra microorganismos Gram-negativos (SILVA, 2006) (FIGURA 5).

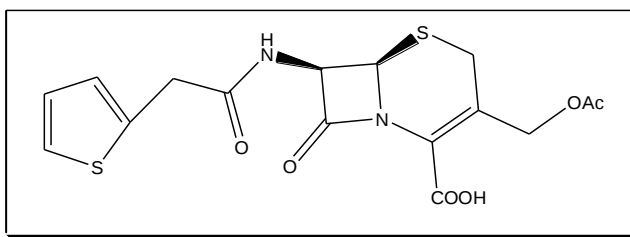


Figura 5 - Cefalotina

O sertaconazol, por exemplo, é um fármaco antifúngico de amplo espectro de ação contra dermatófitos e bactérias Gram positivas aplicado na dermatologia e na ginecologia (CANILO-MUFLOZ et al., 1996; PINTO et al., 2008). (FIGURA 6).

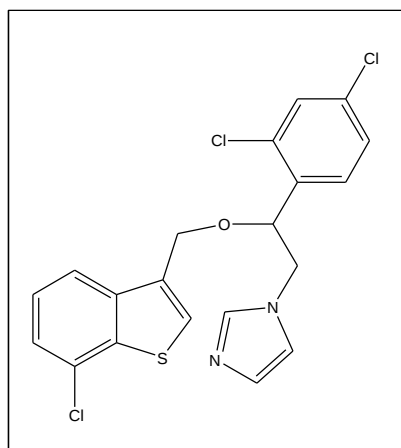


Figura 6 - Sertaconazol

O antiparasitário pamoato de pirantel é o fármaco de segunda escolha no tratamento de infecção por nematódeos da espécie *A. lumbricoides* (GOODMAN E GILMAN, 2005). (FIGURA 7).

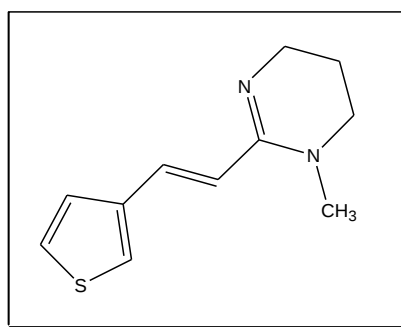


Figura 7- Pamoato de pirantel

Entre os medicamentos que apresentam em sua estrutura o tiofeno alguns são “blockbusters”, responsáveis pelo faturamento de bilhões de dólares para a indústria farmacêutica, como é o caso da olanzapina, um antipsicótico atípico (FIGURA 8). A empresa detentora de sua patente teve lucros líquidos estimados em 2,5 bilhões de dólares em 2002 (ANVISA, 2002) (FIGURA 8).

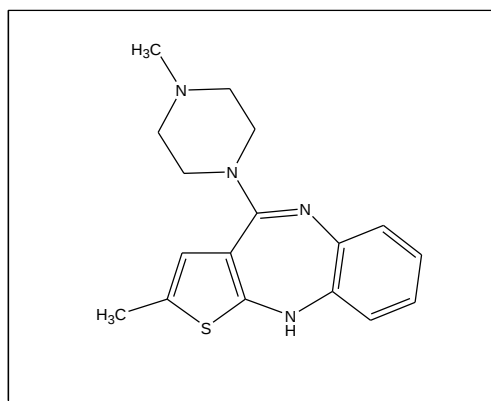


Figura 8- Olanzapina

Além dessas atividades, existem fármacos contendo o tiofeno empregados na oftalmologia e na geriatria. A dorlozamida, um inibidor da anidrase carbônica, e a ticlopidina são usados no tratamento glaucoma e da hipertensão ocular. O estrôncio ranelato é empregado no tratamento da osteoporose devido a sua ação anabólica e anti-reabsortiva óssea. (FIGURA 9).

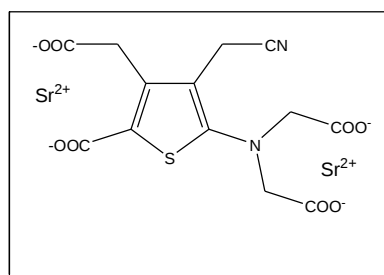


Figura 9 - Estrôncio ranelato

3.4 Potencial farmacológico do tiofeno

Os compostos pertencentes à classe dos heterociclos representam um grande número de estruturas diversas. Apresentam importante papel na medicina e

nos sistemas biológicos, à medida em que seus análogos sintéticos podem mimetizar substâncias endógenas. Sendo assim, a maioria dos fármacos de relevância terapêutica consistem em compostos heterocíclicos (DALVIE et al., 2002; SARKER E NAHAR, 2009).

A estrutura do anel tiofênico tornou-se atrativa para a química medicinal a partir do momento em que várias atividades biológicas foram atribuídas a este núcleo. A literatura relata diversas propriedades, entre elas: nematocida (BAKKER et al, 1979), inseticida (IYENGAR et al, 1987), antibacteriana (MATSUURA et al, 1996), antifúngica (CHAN et al, 1975), antiviral (HUDSON et al., 1989) e atividade antioxidante (MALMSTRÖM et al, 2001).

Em relação aos derivados benzo-tiofênicos, a literatura traz extensivas aplicações farmacológicas como antialérgico (CONNOR et al, 1992), analgésico (WARDAKHANI et al, 2008), antiinflamatório (MOHAMED et al, 2009), hipotensor ocular (GRAHAM et al., 1989) além da atividade antimicrobiana, com significativa relevância.

3.4.1 Antiinflamatório e Analgésico

Estudos envolvendo a avaliação farmacológica de novos derivados 2-benzotiofênicos substituídos têm demonstrado o potencial dos novos compostos como agentes antiinflamatórios e também analgésicos. Fakhr e colaboradores (2008) realizaram a síntese e avaliaram 5-nitrobenzo[*b*]tiofenos-2-substituídos quanto ao seu potencial antiinflamatório e analgésico comparado ao piroxicam. Os compostos que apresentavam substituição na posição 2 por carbohidrazina (4), semicarbazida (5) e carbonil-4-feniltiosemicarbazida (6) apresentaram atividade antiinflamatória e também analgésica nas doses de 25 ou 50 mg/Kg. No que diz respeito à atividade analgésica nestes compostos, esta foi superior a do piroxicam (FIGURA 10).

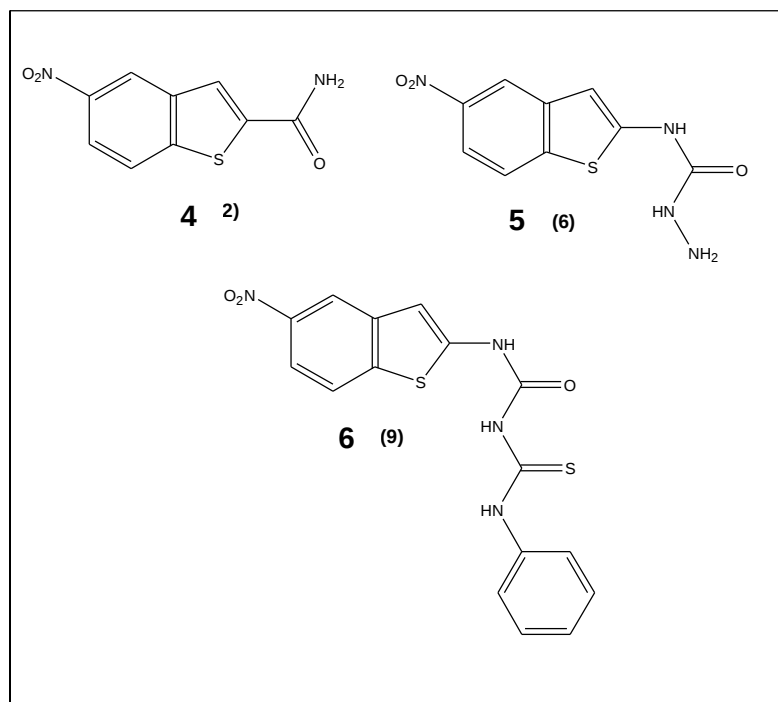


Figura 10 - Estrutura da carbohidrazina (4), semicarbazida (5) e carbonil-4-feniltiosemicarbazida (6)

Além disso, eles não se mostraram tóxicos quando avaliado seu potencial gastroulcerogênico. Também não alteraram significativamente o nível das aminotransferases no plasma de ratos, indicando baixo poder de lesão hepática (FAKHR et al., 2009). Diante do exposto, estes benzotiofenos-2-substituídos seriam uma possível alternativa ao tratamento da inflamação, tendo em vista que a literatura atribui aos AINEs efeitos colaterais gastrointestinais como sendo os mais comuns nesta classe de drogas (RICHY et al., 2009).

Meotti e colaboradores (2003) também investigaram o potencial antiinflamatório e antioxidante de tiofenos substituídos. Os compostos testados apresentaram atividade antiinflamatória satisfatória no estudo de edema de pata induzido por carragenina. O composto 5-tiofen-2-il-pentan-1-ol na dose de 250 mg/kg por via intraperitoneal inibiu 70% do edema de pata e foi efetivo na redução deste edema quando comparado ao grupo controle e do ácido acetilsalicílico. As substâncias também demonstraram papel importante como antioxidante, na proteção contra a peroxidação lipídica (FIGURA 11).

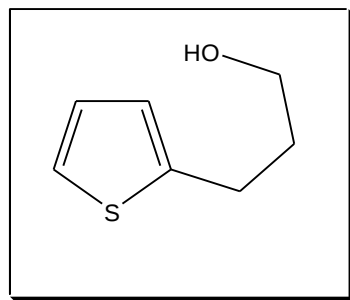


Figura 11- 5-tiofen-2-il-pentan-1-ol

Agonistas do receptor adenosina A1 e a própria adenosina estão relacionados com a redução da hipersensibilidade a inflamação (LEE E YAKSH 1996). A literatura relata que uma classe de derivados 2-amino-3-benzotiofenos no qual se destacou o composto, PD 81,723 possuíram acentuada ação alósterica no receptor adenosina A1. Com base nisto, Baraldi e colaboradores (2005) sintetizaram o composto 2-amino-4,5,6,7-tetraidrobenzo[*b*]tiofen-3-il-(4-clorofenil)-metanona (7). Este composto revelou propriedades biológicas semelhantes ao PD 81, 723. (FIGURA 12).

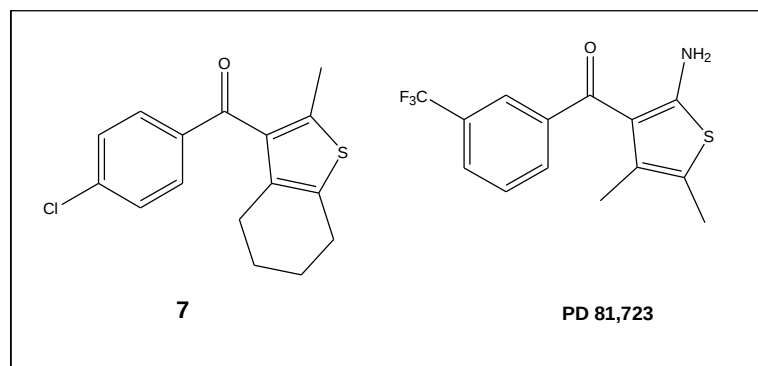


Figura 12 - Moléculas com ação alostérica no receptor adenosina A1

3.4.2 Antiviral

No estudo da atividade antiviral, um composto chamado PD146626, um derivado benzotiofênico se mostrou um inibidor potente da expressão gênica inicial imediata do vírus HSV-1, causador da herpes simples (BOULWARE et al., 2001) (FIGURA 13).

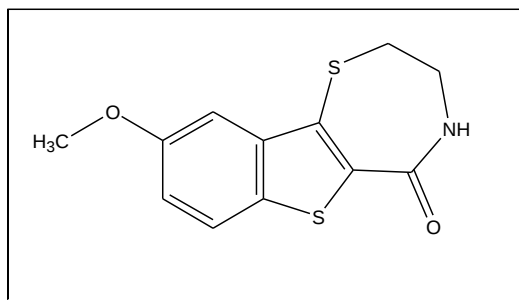


Figura 13 - Estrutura do composto PD 146626

3.4.3 Antitumoral

Derivados do tiofeno também vêm sendo testados como potenciais agentes antitumorais. O sistema ciclopenta[*c*]tiofeno sintetizado por Dallemagne e colaboradores (2002) avaliou a atividade de 22 compostos-testes contra 60 linhagens de células tumorais humanas. Entre os compostos testados, 7 foram considerados ativos especialmente contra células de leucemia. Benzo[*b*]tiofeno-2-carboxanilidas isopropilamidino-substituídos e tieno[*b*]tiofeno-2-carboxanilidas também apresentaram potente atividade antitumoral contra um painel de linhagens celulares tumorais (JARAK et al., 2007).

Compostos contendo o anel 2-amino-5-aryl foram sintetizados e avaliados com relação as atividades antiproliferativas e inibitórias da polimerização da tubulina. 2-amino-3(3',4',5'-trimetoxibenzoil)5-fenil-tiofeno (8) e derivados *p*-fluoro (9), *p*-metila (10) e *p*-metoxifenila (11) apresentaram alta atividade antiproliferativa (IC₅₀ 2,5 a 6,5 nM) frente à linhagens celulares L1210 e K562 (ROMAGNOLI et al., 2006) (FIGURA 14).

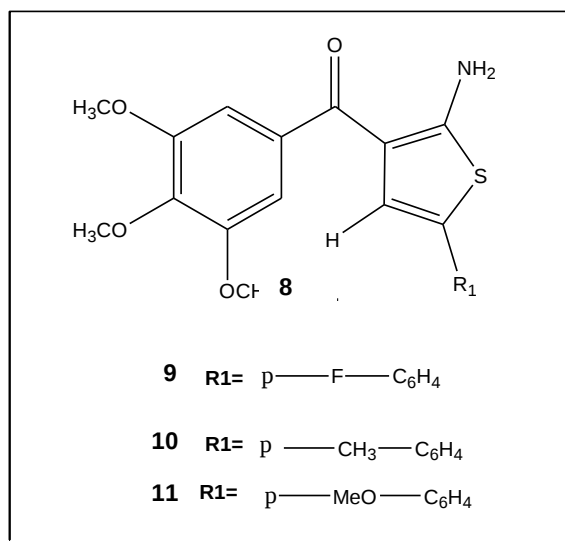


Figura 14 - Estrutura dos compostos 2-amino-3(3',4',5'-trimetoxibenzoil)-5-fenil-tiofeno (8) e derivados *p*-fluoro (9), *p*-metila (10) e *p*-metoxifenila (11)

Seguindo a mesma linha de pesquisa Romagnoli e colaboradores (2010) sintetizaram e testaram a atividade antitumoral de 2-(3'-4'-5'-trimetoxibenzoil)-3-benzo[*b*]tiofenos substituídos. O composto 2-(3',4',5'-trimetoxibenzoil)-3-(4'-etoxifenil)-benzo[*b*]tiofeno mostrou-se o mais ativo agente sintetizado, já que apresentou atividade antiproliferativa em concentrações submicromolares frente a células HeLa, HL-60, Jurkat, K562. Além disso, também mostrou potencial na indução da apoptose.

3.4.4 Ação sobre o Sistema Nervoso Central

Tiofenos dissustituídos também têm sido envolvidos na inibição de JNKs (c-Jun N-terminal) que são serina / treonina quinases ativadas por proteína ativadora de mitógenos (MAP). As JNKs, principalmente o tipo JNK3, tem importante papel em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. Hom e colaboradores (2010) sintetizaram o composto *N*-[4,4']Bitiazolil-5-il-2-isoquinolin-5-il-acetamida (12). Este composto se apresentou particularmente seletivo para o Sistema Nervoso Central, apresentando possível potencial de ação nessas patologias (FIGURA 15).

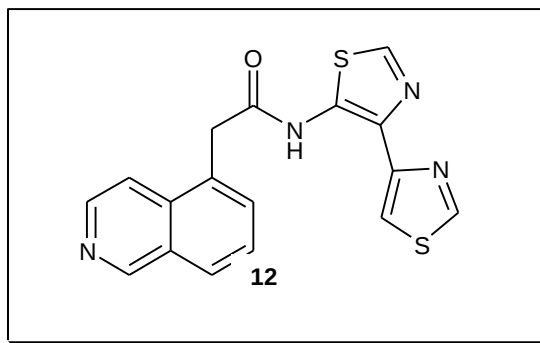


Figura 15 - Composto 12

Derivados substituídos do 2-amino-4,5,6,7-tetraidro-*N*-fenilbenzo [*b*]tiofeno-carboxiamida (13) e 2-amino-4,5,6,7-tetraidro-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (14) foram avaliados no que diz respeito a suas atividades de antagonistas serotoninérgicos e ansiolítico. Demonstraram alta atividade quando comparados aos controles positivos buspirona e diazepam, respectivamente. Os compostos 15, 16 e 17 apresentaram maior atividade como antagonista da serotonina enquanto que 17, 18, 15 e 16 mostraram um bom perfil de atividade como ansiolítico (AMR et al., 2010) (FIGURA 16).

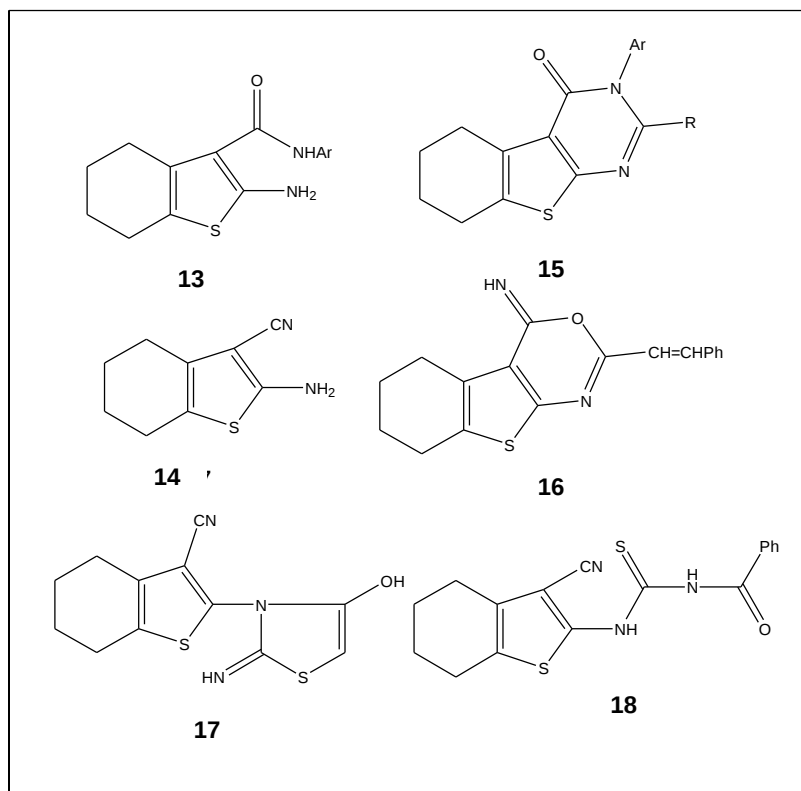


Figura 16 - Compostos sintetizados por Amr e colaboradores (2010)

3.4.5 Antimicrobiano

A avaliação da atividade antimicrobiana de derivados benzotiofênicos substituídos merece destaque. Com objetivo de obter fármacos antimicrobianos, diversos pesquisadores buscaram sintetizar estruturas contendo o sistema benzo[*b*]tiofeno. Esse sistema é frequentemente encontrado em compostos que apresentam a correspondente atividade.

Isloor e colaboradores (2010) sintetizaram derivados benzotiofênicos contendo os núcleos tiadiazóis, oxadiazóis, pirazolinícos e diaril-pirazóis partindo do 3-clorobenzo[*b*]tiofeno-2-cloreto de carboxil. Avaliaram sua atividade frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) e frente ao fungo *Candida albicans*. O estudo realizado através da Concentração Inibitória Mínima, tendo a furacina como padrão antibacteriano e fluconazol como padrão antifúngico, revelou que compostos contendo 5-nitro-tienil apresentaram atividade superior a droga padrão para *S. Aureus* ($MIC_{\text{compostos}} = 3 \mu\text{g/ml}$ / $MIC_{\text{furacina}} = 12,5 \mu\text{g/ml}$). Compostos contendo os núcleos fenil e *p*-anisil mostraram atividade relevante contra *Candida albicans*. (FIGURA 17).

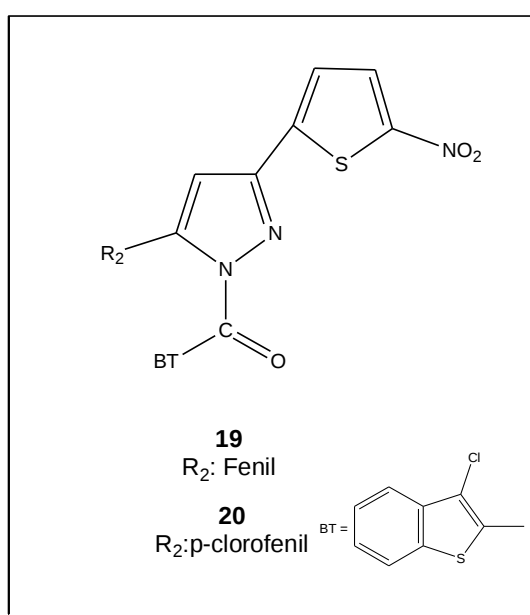


Figura 17 - Compostos 19 e 20 sintetizados por Isloor e colaboradores

Após sintetizarem 2,3,7-trimetilbenzo[b]tiofenos derivados de orto-clorodiarilamina, Queiroz e colaboradores (2006) avaliaram a atividade de sete compostos frente a cepas de duas bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), duas Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) e também frente ao fungo *Candida albicans*. A Concentração Inibitória Mínima foi determinada utilizando método baseado na difusão radial. Os padrões foram: ampicilina (antibacteriano) e cicloheximida (anfifúngico). O composto 21 apresentou MIC menor que da ampicilina para *E. coli* ($MIC_{ampicilina} = 12,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ – $MIC_{21} = 6,25 \text{ } \mu\text{g/ml}$) e o composto 22, um derivado tienocarbazol metilado destacou-se por apresentar MIC menor que a ampicilina e cicloheximida para *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans* (FIGURA 18).

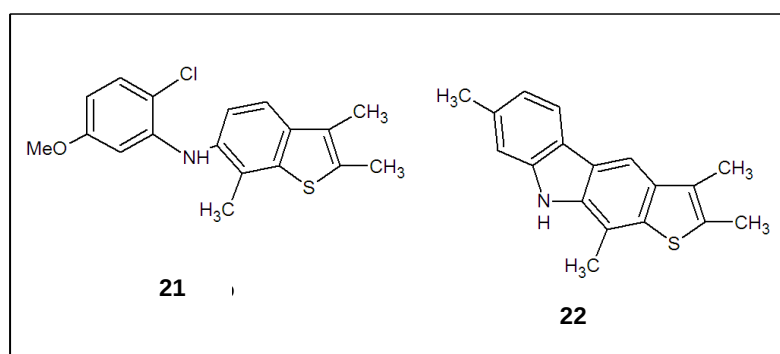


Figura 18 - Compostos 21 e 22 sintetizados por Queiroz e colaboradores

Diarilaminas derivadas de benzo[b]tiofenos tem sido sintetizadas a fim de se avaliar sua atividade antifúngica. O composto (4-Metoxi-fenil)-(2,3,5-trimetilbenzo[b]tiofen-6-il)amino, demonstrou atividade semelhante ao padrão cicloheximida ($CIM_{composto} = CIM_{cicloheximida} = 12.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$) na inibição do crescimento do fungo *Candida albicans* (FERREIRA et al., 2004) (FIGURA 19).

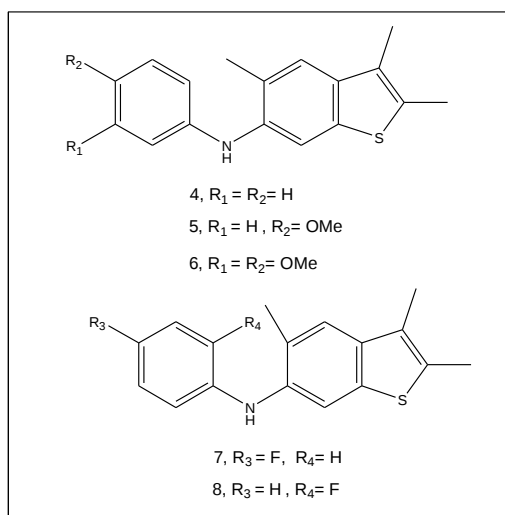


Figura 19 - Diarilaminas derivadas de benzo[b]tiofenos sintetizadas por Ferreira

Ainda no que concerne a atividade antifúngica, derivados do 4,7-dioxobenzo[b]tiofeno mostraram atividade promissora. Destacou-se entre os compostos o 6-cloro-4,7-dioxo-5-fenilamino-4,7-dihidro-benzo[b]tiofeno-2-ácido carboxílico metil éster, o qual mostrou boa atividade contra espécies de *Candida* (*albicans*, *tropicalis* e *krusei*) e *Aspergillus niger* (RYU et al., 2005) (FIGURA 20).

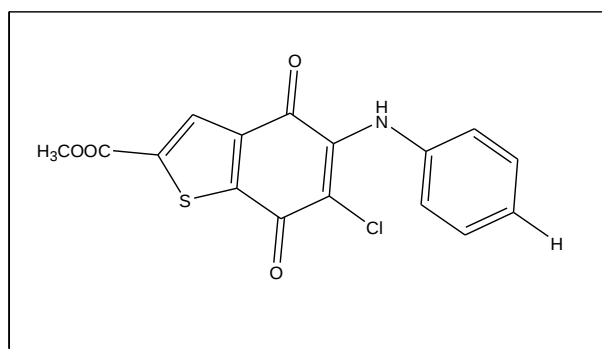


Figura 20 - Estrutura do composto 6-cloro-4,7-dioxo-5-fenilamino-4,7-dihidro-benzo[b]tiofeno-2-ácido carboxílico metil éster

Pinto e colaboradores (2008) testaram o potencial de inibição do crescimento dos novos compostos di(hetero)arilamina derivados de benzo[b]tiofenos frente as principais espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*), de *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, and *A. flavus*) e alguns dermatofitos (*Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton*

mentagrophytes, *Thichophyton rubrum* e *Epidermophyton floccosum*). A maioria dos compostos mostrou-se ativo, especialmente os compostos 23 e 24, onde o composto 23 atuou como antidermatófito. O composto 24 contém um anel de piridina e foi eficaz contra todos os fungos testados, especialmente contra as espécies de *Aspergillus* resistentes ao fluconazol (FIGURA 21).

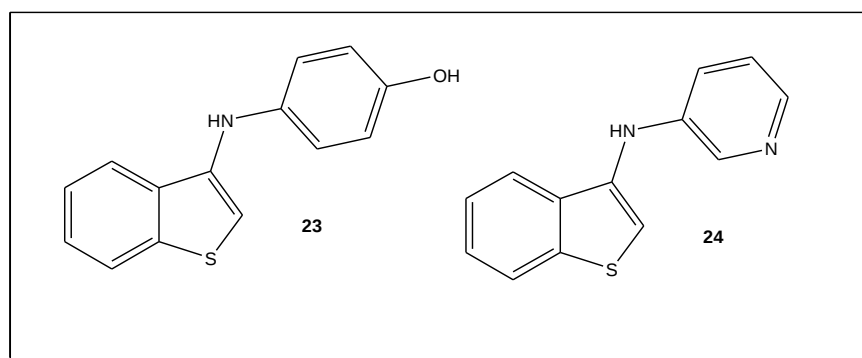


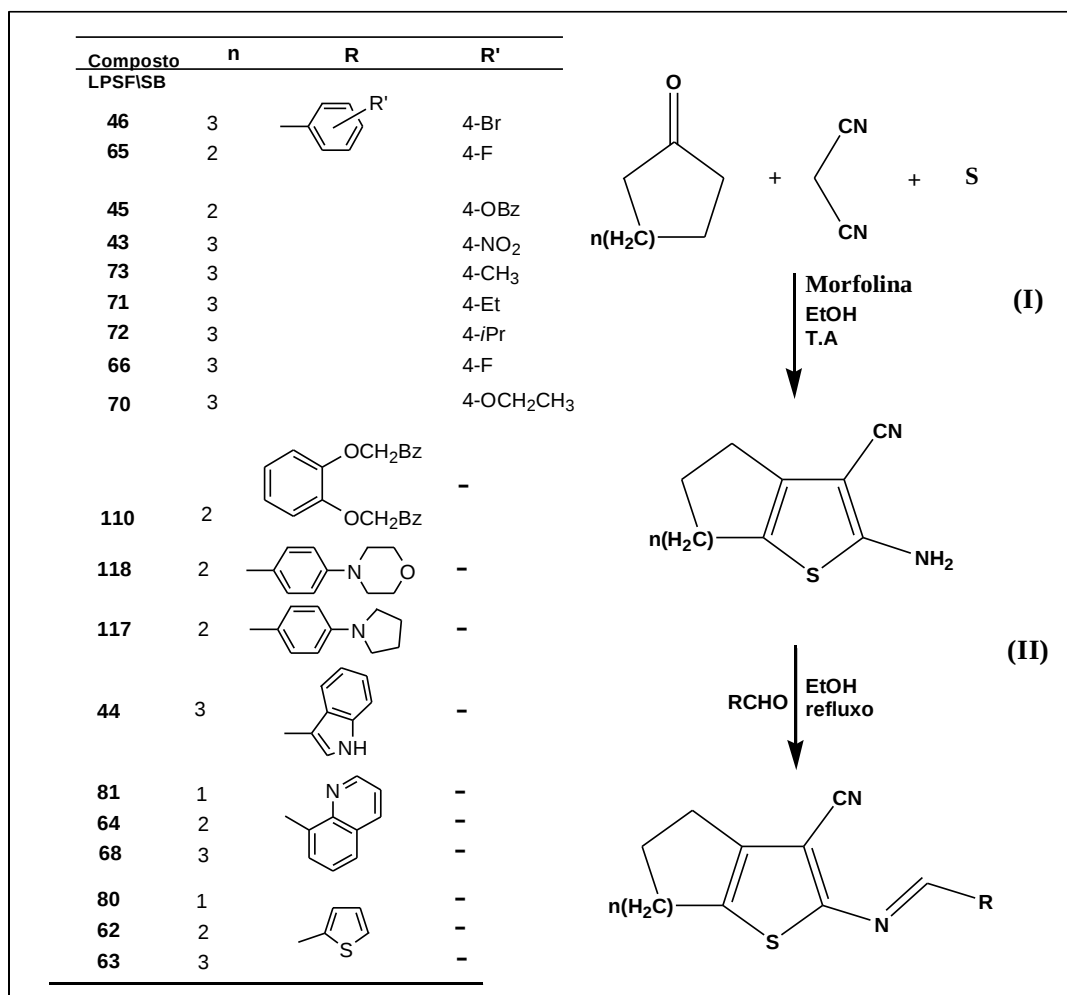
Figura 21 - Estrutura dos compostos 23 e 24 sintetizados por Pinto e colaboradores

4 PARTE QUÍMICA

4.1 Metodologia

Rota Sintética Utilizada para Obtenção dos derivados 2-[(arilideno)-amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB)

Os derivados tiofênicos propostos nesse trabalho foram obtidos por meio de uma rota sintética linear composta por duas etapas de acordo com o Esquema 9.



Esquema 9 - Diagrama de síntese dos derivados 2-[(arilideno)-amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB).

Os primeiros intermediários, com anéis cíclicos laterais de cinco, seis e sete membros fundidos ao anel tiofeno (LPSF/SB-1, SB-50, SB-2, respectivamente) foram obtidos através da reação de Gewald (GEWALD, 1965; GEWALD et al., 1966). A reação em questão caracteriza-se por uma condensação multicomponente de uma cetona com um composto metileno ativo (no caso, a malonitrila) em presença de enxofre elementar e de uma base orgânica **(I)**.

Em seguida os 2-amino-cicloalqui[b]tiofenos-3-carbonitrila foram condensados a aldeídos aromáticos por meio de uma substituição nucleofílica á carbonila, catalisada por um ácido, o que resultou na formação dos compostos finais 2-[(arilideno)-amino]-4,5-cicloalquil[b]tiofenos-3-carbonitrila **(II)**.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Rota Sintética

A rota sintética de obtenção dos compostos LPSF/SB mostrou-se eficiente e viável, pois a maioria dos produtos foi obtida com rendimentos que variaram entre 51 a 92%, com exceção do composto LPSF/SB-117 (18%). Estes valores de rendimento apresentam-se dentro do previsto para uma rota sintética que utiliza a segunda versão da síntese de Gewald, onde normalmente se obtém valores de rendimento que variam entre 45 a 95% (PUTEROVÁ et al., 2010).

Os compostos, em sua maioria, foram obtidos puros após etapas de lavagem com água destilada, não havendo a necessidade de purificação por cromatografia em coluna. Aqueles que apresentaram impurezas foram submetidos a uma recristalização em meio metanólico, a qual foi eficiente na purificação. Portanto, trata-se de uma via sintética rápida e eficaz na formação dos 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofenos-3-carbonitrila.

4.2.2 Mecanismos reacionais e Reações

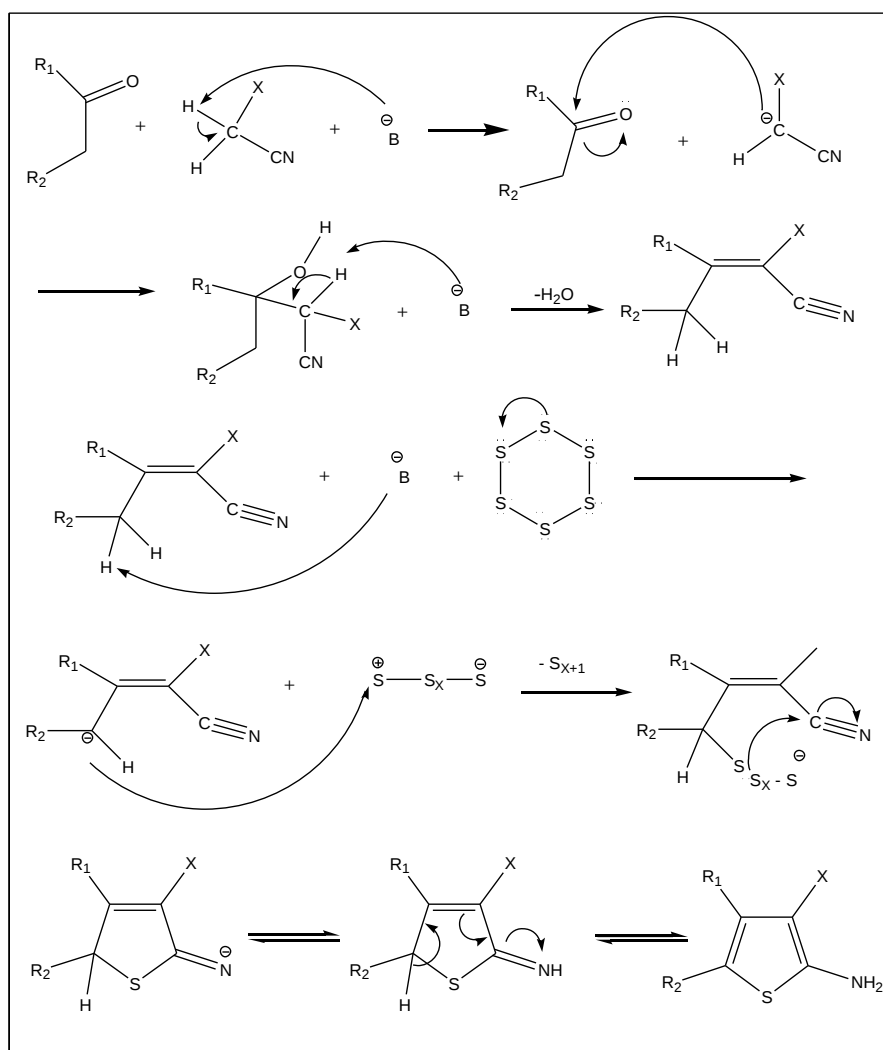
Reação de Gewald – 1ª etapa

A primeira etapa da síntese correspondeu a uma reação de Gewald que é o método mais simples e utilizado para preparação de derivados 2-amino-tiofenos. Inicialmente a base (morfolina) ataca o carbono metilênico da acetonitrila, retirando um próton do mesmo e tornando este um nucleófilo. O carbânion formado ataca a função carbonila. Ocorre uma deslocalização dos elétrons π para o oxigênio, tornando o oxigênio apto para captar o próton que estava ligado à base.

Em seguida, há formação de água e sua posterior saída gerando uma nitrila α - β -insaturada, chegando-se ao final da primeira etapa. Esta primeira etapa da síntese é, na verdade uma condensação de Knoevenagel entre uma cetona ou um aldeído e o composto metileno ativo que vem a produzir o éster de Cope.

A segunda etapa da síntese em questão ainda não possui o mecanismo totalmente elucidado, mas é caracterizada pela adição do enxofre elementar ao composto intermediário. Após ciclização e tautomerização é formado o tiofeno desejado (STEFANI, 2009; OLIVEIRA, 2010). O mecanismo reacional mais provável

se inicia com o ataque da base ao próton mais ácido que estava anteriormente na posição α à carbonila. Com isso, o carbânion formado ataca um dos átomos de enxofre (S_8) e ocorre a ciclização, pois o átomo de enxofre ataca o carbono da nitrila formando o ciclo. Através de sucessivas transferências de prótons e tautomerização são gerados os compostos 2-amino-cicloalqui[b]tiofenos-3-carbonitrila, conforme mecanismo abaixo (ESQUEMA 10).

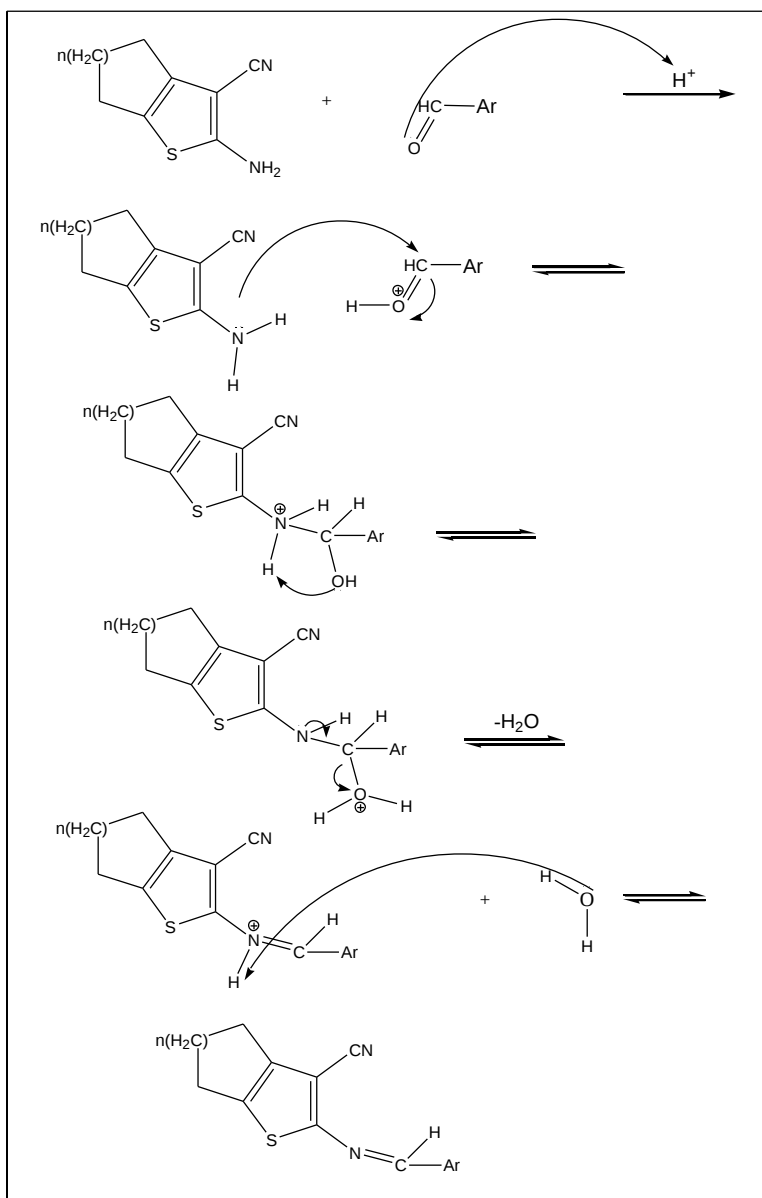


Esquema 10 - Mecanismo da Reação de Gewald

Reação de Condensação –2ª etapa

A etapa da síntese para obtenção do composto final caracteriza-se por uma reação de condensação. Ocorre uma ativação, por meio de um ácido, da função aldeído do composto aromático de escolha. O par de elétrons livres, presente no

nitrogênio da função amino do derivado tiofeno, ataca o carbono que está mais positivo. Assim, ocorre a deslocalização dos elétrons com formação e posterior eliminação de água. O nitrogênio que está positivo protona a água e finalmente forma-se o composto final, esquematizado abaixo.



Esquema 11 - Mecanismo de condensação do 2-amino-cicloalqui[b]tiofenos-3-carbonitrila aos aldeídos aromáticos.

4.2.3 Caracterização Estrutural dos Compostos Sintetizados

Os compostos obtidos tiveram suas estruturas comprovadas por meio da interpretação e análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H), Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C), Absorção no Infravermelho (IV) e Espectrometria de Massas (LC/MS). Os resultados dessas análises confirmaram as estruturas propostas. A seguir são apresentados alguns exemplos representativos de espectros de compostos referentes a cada uma das etapas reacionais.

4.2.4 Espectroscopia RMN ^1H

Nos espectros de RMN ^1H dos compostos sintetizados, podemos observar que os prótons $\text{CH}=\text{N}$ foram observados na região entre 8.02-9.80. Não foram observados os sinais referentes aos prótons 2-amino-tiofenos.

2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-68)

Analisando o espectro de RMN ^1H de *LPSF/SB-68*, podemos observar que os hidrogênios que obtiveram deslocamentos químicos em campo alto são aqueles pertencentes ao cicloheptila, que se apresentam como 3 multipletos com valores de deslocamento químico aparecendo entre 1,60-2,75 ppm. O hidrogênio ligado ao carbono da imina está entre aqueles que apresentam maior deslocamento químico. O sinal em 8,9 ppm indica a presença de um hidrogênio ligado ao grupamento imina, o que é importante na caracterização do sucesso reacional, pois indica a ligação entre o 2-amino-tiofeno substituído e o aldeído aromático (FIGURA 22).

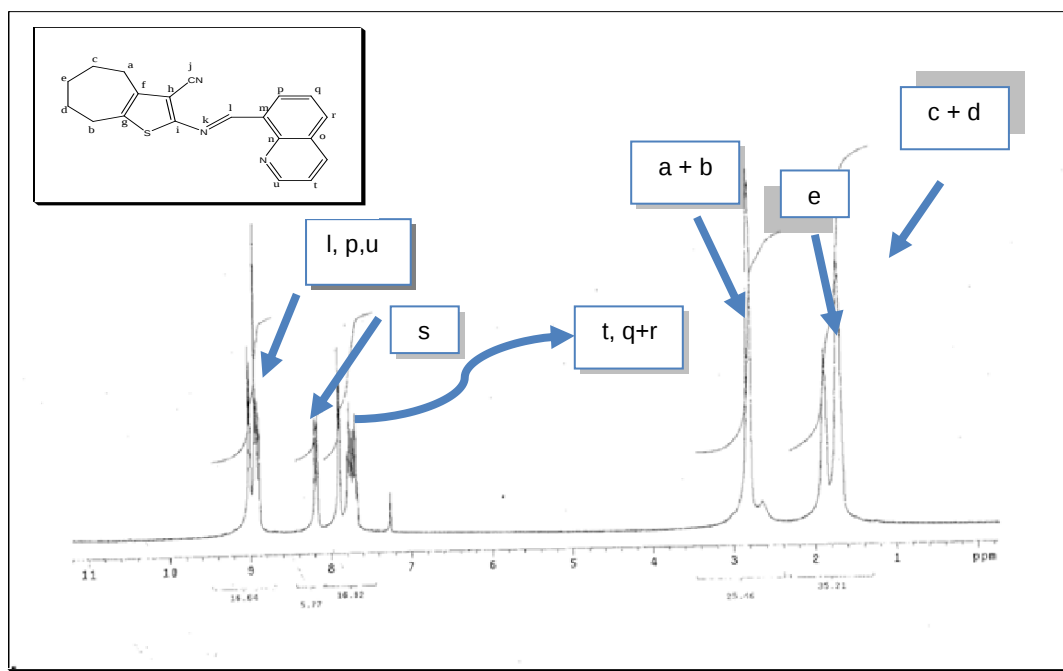


Figura 22 - Espectroscopia de RMN ^1H do composto LPSF/SB-68

4.2.5 Espectroscopia RMN ^{13}C

Os espectros de RMN ^{13}C dos compostos sintetizados exibiram sinais de deslocamento químico entre 114.0 e 115.9 ppm, característicos do grupamento C=N.

2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-68)

Em relação ao espectro de RMN ^{13}C , os carbonos que constituem o ciclo de sete membros apresentam deslocamentos entre 20 e 40 ppm, característicos de carbonos saturados (sp^3). O carbono do radical nitrila é confirmado pela presença de sinal em torno de 115 ppm. Os carbonos aromáticos dos anéis tiofeno e quinolina mostraram deslocamentos químicos em campo baixo, entre 120 e 160 ppm.

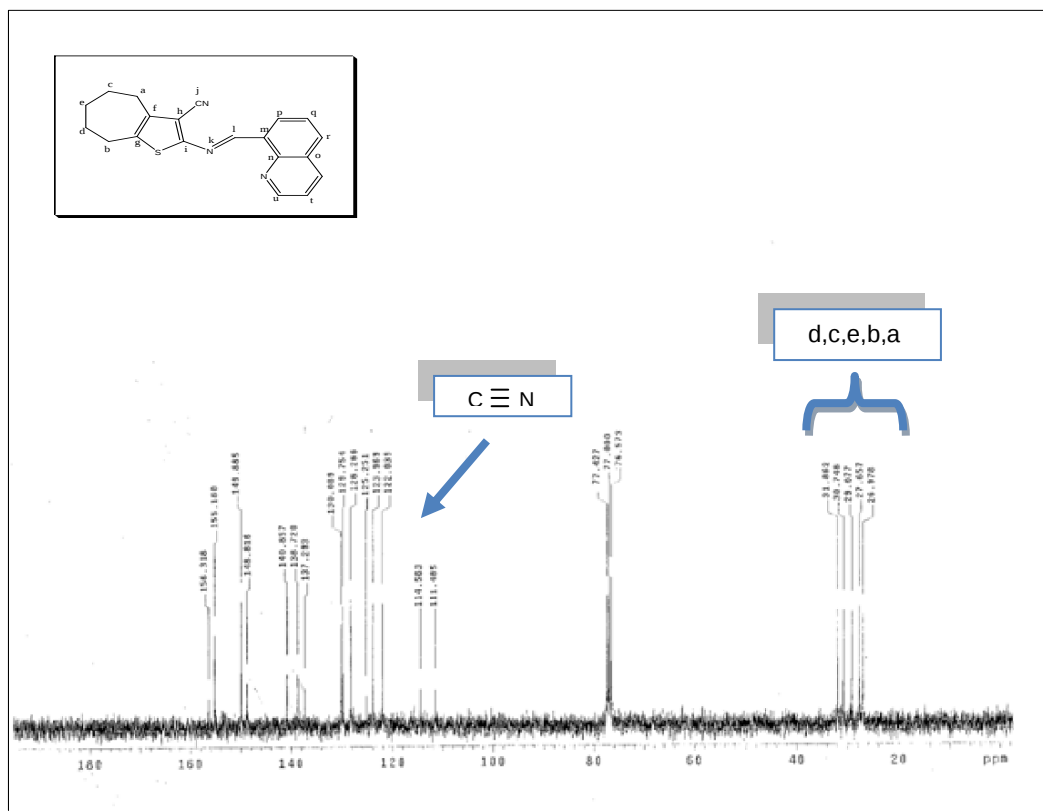


Figura 23 - Espectro de RMN ^{13}C do composto LPSF/SB-68

4.2.6 Espectroscopia de IV

Nos espectros de Infravermelho dos compostos LPSF/SB podemos observar bandas de absorção entre 2960-2911 e 2223-2212 cm^{-1} características de estiramento C-H e C=N, respectivamente.

2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-68)

No espectro de Infravermelho do composto LPSF/ SB-68, o estiramento referente ao carbono tipo sp^2 ocorreu em 3042 cm^{-1} . A absorção aguda e de intensidade média na frequência entre 2219 cm^{-1} é característica de nitrila. Esta absorção está deslocada para uma frequência mais baixa que 2250 cm^{-1} devido a

conjugação da nitrila com o anel aromático tiofeno. A absorção de intensidade fraca próxima a 1690 cm^{-1} é compatível com estiramento da $\text{C}=\text{N}$ da imina.

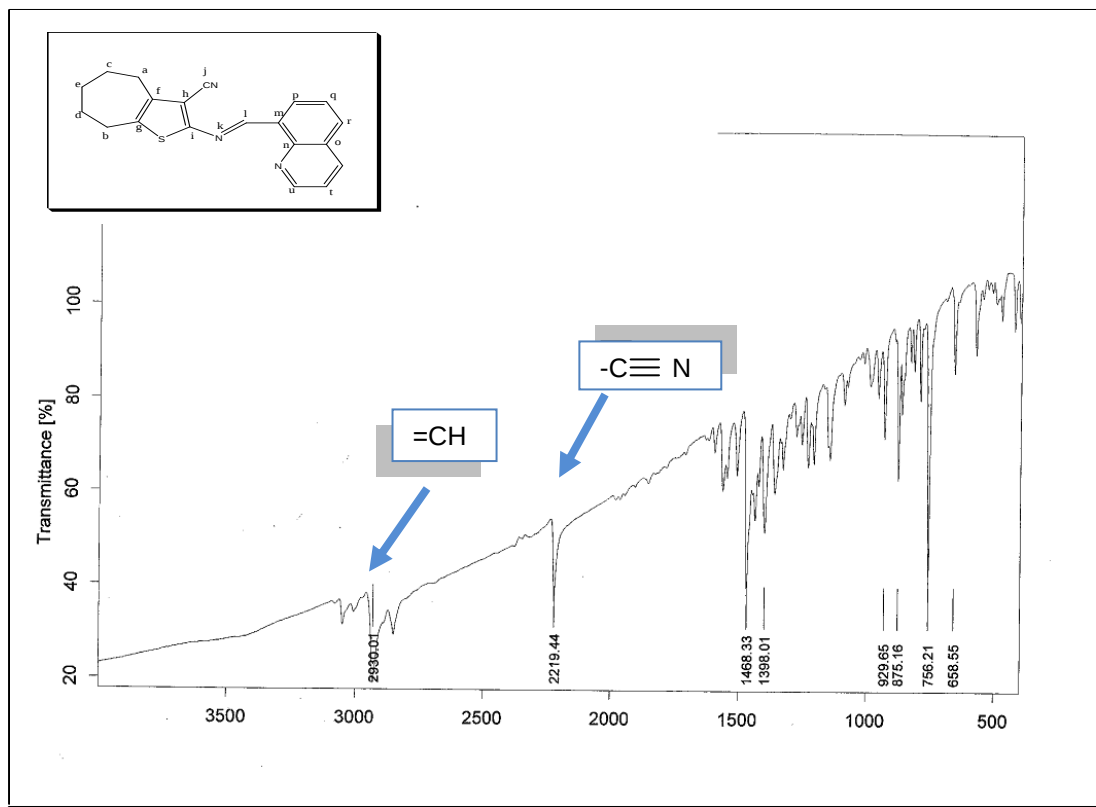


Figura 24 - Espectroscopia de IV do composto LPSF/SB-68

4.3 Procedimentos Experimentais

4.3.1 Materiais e Métodos

4.3.1.1 Reagentes e solventes

Os seguintes reagentes e solventes foram utilizados para obtenção dos compostos: aldeídos aromáticos substituídos (2-furaldeído, 4-quinolinacarboxialdeído, 4-fluorbenzaldeído, 4-etoxibenzaldeído, 4-isopropilbenzaldeído, 4-metilbenzaldeído, 4-etilbenzaldeído, 4-(1-pirrolidino)-benzaldeído, 4-(4-morfolinil)-benzaldeído, 3,4-dibenziloxi-benzaldeído), enxofre elementar, malononitrila, morfolina, ciclopentanona, ciclohexanona, cicloheptanona, etanol absoluto, ácido acético glacial, metanol, piperidina, acetato de etila.

Estes reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos ou para suas análises pertencem às marcas Sigma-Aldrich, Acros, Merck, Vetec ou Quimis e foram utilizados sem purificação.

4.3.1.2 Comprovação das Estruturas dos Compostos Sintetizados

A caracterização estrutural foi realizada através da espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), em espectrofotômetro FTIR Bruker Modelo IFS 66, pastilhas de KBr. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e de carbono (RMN ¹³C) foram efetuados em espectrofotômetros Varian Modelo Plus de 200MHz, 300MHz ou 400MHz. A espectrometria de massa (EM) foi realizada em aparelho Delsi-Nermag R1010C com impacto eletrônico de 70eV. Todas as análises foram realizadas pelo Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

Nos espectros de ressonância magnética nuclear, os deslocamentos químicos estão expressos em ppm. A multiplicidade dos sinais está representada por: simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd), tripleto (t) e multiplete (m) e as constantes de acoplamento (J) estão expressas em Hz (Hertz).

4.3.1.3 Caracterização Físico-Química dos Compostos Sintetizados

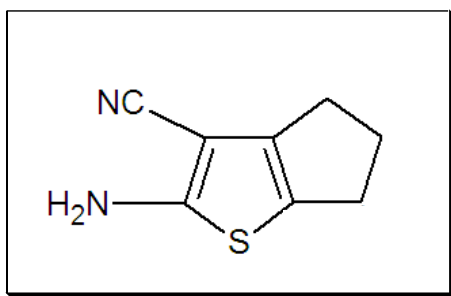
Os compostos tiveram suas características físico-químicas tais como fator de retenção (R_f), Ponto de fusão (°C), solubilidade, aparência e rendimento reacional determinadas. Para determinação dos pontos de fusão utilizou-se o aparelho Quimis Modelo 340.27. Na realização da cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 Merck F₂₅₄, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366 nm).

4.3.1.4 Procedimento Geral de Síntese dos derivados 2-amino-tiofeno (LPSF\SB-1, SB-50 E SB-2)

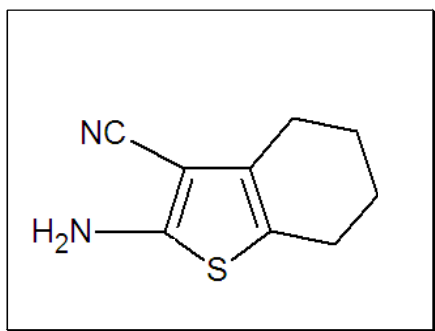
Em um balão de fundo redondo sob banho de gelo foi preparada uma solução etanólica e adicionados quantidades equimolares da cetona cíclica (pentanona, hexanona ou heptanona), malononitrila e enxofre elementar, diferentemente da morfolina que foi adicionada na proporção de 0,6 mols em presença de etanol absoluto. A morfolina foi adicionada gota a gota durante 30 minutos e a mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente por cerca de 4 horas. A mistura reacional foi filtrada e lavada com etanol gelado. Em seguida, a água mãe foi levada ao freezer over-night. Após esse período o precipitado formado novamente foi filtrado e lavado com etanol gelado. O produto final foi purificado através de cristalizações sucessivas. Dessa maneira, foram obtidos os derivados 2-amino-tiofeno LPSF\SB-1, SB-50 e SB-2.

4.3.1.5 Procedimento Geral de Síntese dos derivados 2-[(arilideno)-amino]-4,5-cicloalquil-tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB)

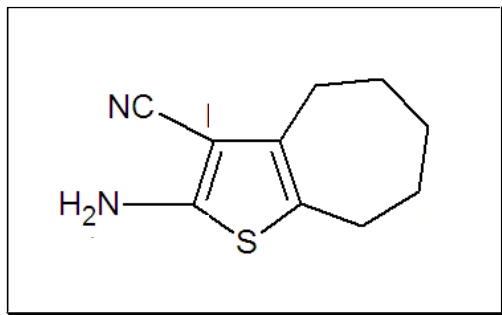
Quantidades equimolares do 2-amino-tiofeno e do aldeído aromático de escolha foram postos a reagir à temperatura ambiente em meio etanólico tendo como catalisador ácido acético glacial. Após constatado o término da reação por cromatografia em camada delgada, o sólido obtido precipitado pela adição de água destilada, filtrado e lavado sucessivas vezes com água destilada. O produto final foi purificado através de cristalizações sucessivas em etanol.

2-amino-5,6-dihidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/ SB-1)

Fórmula Molecular: C₈H₈N₂S; **Massa Molecular:** 164.0408 ; **Sólido de cor marron claro;** **Ponto de Fusão:** 148-150°C; **Rendimento:** 51%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,45 (*n*-Hex./AcOEt. 7,5/2,5); **RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz) δ:** 2,29-2,41 (m, 2H, CH₂); 2,63-2,78 (m, 4H,CH₂); 4,62 (s, 2H, NH₂).

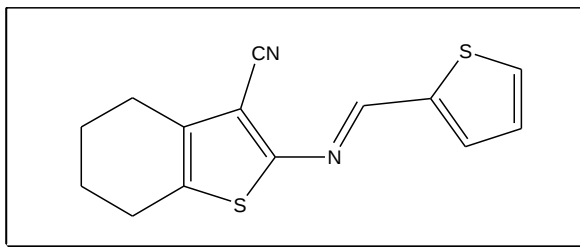
2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-50)

Fórmula Molecular: C₉H₁₀N₂S; **Massa Molecular:** 178,0565 ; **Sólido de cor amarelo ouro;** **Ponto de Fusão:** 131-133°C; **Rendimento:** 62%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,50 (*n*-Hex./AcOEt. 7,5/2,5); **RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz)** 1,74-1,80 (m, 4H,CH₂); 2,44-2,50 (m, 4H,CH₂); 4,63 (s, 2H, NH₂).

2-amino-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-2)

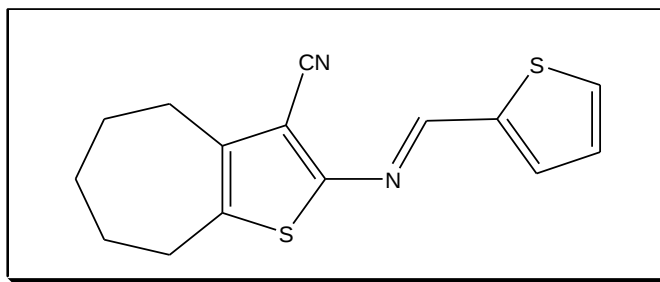
Fórmula Molecular: C₁₀H₁₂N₂S; **Massa Molecular:** 192,0721; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 108-110 °C; **Rendimento:** 58%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,50 (*n*-Hex./AcOEt. 7,5/2,5). **RMN ¹H (CDCl₃, 200MHz)** 1,59-1,66 (m, 4H,CH₂); 1,74-1,83 (m, 2H,CH₂); 2,52-2,62 (m, 4H,CH₂); 4,46 (s, 2H, NH₂).

2-[(Tiofen-3-il-metilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-62)



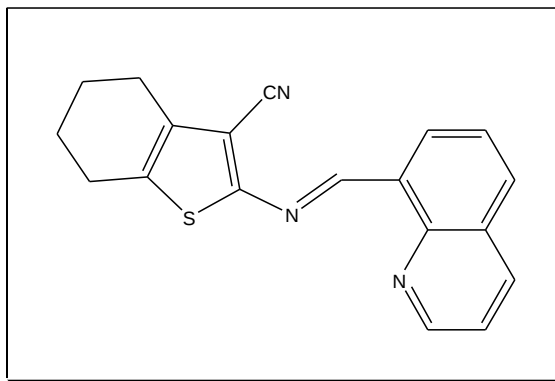
Fórmula Molecular: C₁₄H₁₂N₂S₂; **Massa Molecular:** 272.0441; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 123-125°C; **Rendimento:** 88%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,5 (*n*-Hex./AcOEt. 7:3). **RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) δ:** 1.82-1.91 (m, 4H, CH₂), 2.63-2.69 (m, 4H, CH₂), 6.58 (dd, 1H, *J* = 1.5, 3.3 Hz, Ar-H), 7.11 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, Ar-H), 7.65 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, Ar-H), 8.23 (s, 1H, CH=N). **RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ:** 159.7, 151.3, 146.9, 146.3, 135.3, 132.3, 117.8, 114.3, 112.9, 106.1, 25.1, 24.2, 22.9, 21.9. **IV (KBr, cm⁻¹):** CH (2936), CN (2213). **MS *m/z* (ES⁺):** 273.0399 [M + H]⁺.

2-[(Tiofen-2-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-63)



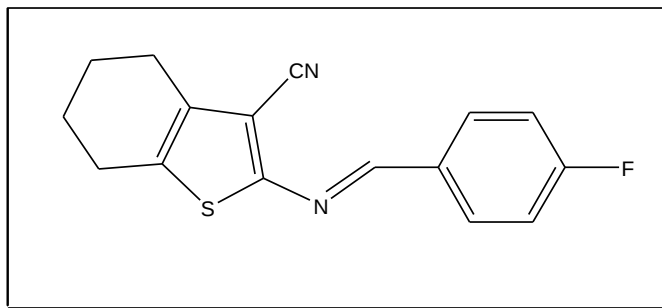
Fórmula Molecular: $C_{15}H_{14}N_2S_2$; **Massa Molecular:** 286.0598; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 115-117°C; **Rendimento:** 76%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,4 (*n*-Hex./AcOEt. 9:1). **RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ :** 1.62-1.72 (m, 4H, CH_2), 1.82-1.86 (m, 2H, CH_2), 2.74-2.79 (m, 4H, CH_2), 6.57 (dd, 1H, $J = 1.5, 3.6$ Hz, Ar-H), 7.10 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, Ar-H), 7.64 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, Ar-H), 8.23 (s, 1H, $CH=N$). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ :** 157.7, 151.2, 146.8, 146.1, 140.3, 136.0, 117.7, 114.9, 112.8, 108.4, 31.9, 30.4, 29.1, 27.7, 27.0. **IV (KBr, cm^{-1}):** CH (2929), CN (2215). **MS m/z (ES^+):** 309.0227 $[M + Na]^+$.

2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-64)



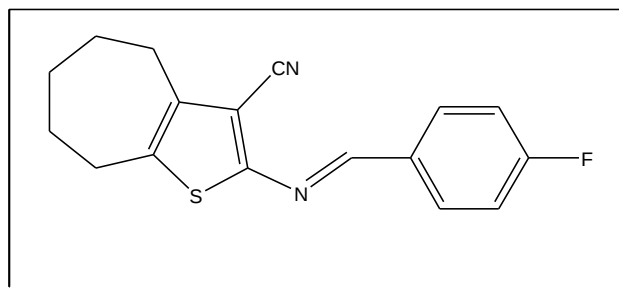
Fórmula Molecular: C₁₉H₁₅N₃S; **Massa Molecular:** 317.0986; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 175-177 °C; **Rendimento:** 53%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,66 (*n*-Hex./AcOEt. 8:2). **RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) δ:** 1.82-1.88 (m, 4H, CH₂), 2.65-2.74 (m, 4H, CH₂), 7.91 (d, 2H, *J* = 6 Hz, Ar-H), 8.90 (t, 2H, *J* = 11.2 Hz, Ar-H), 8.95 (s, 1H, CH=N), 9.02 (d, 2H, *J* = 6 Hz, Ar-H). **RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ:** 158.4, 155.5, 150.0, 149.0, 137.1, 135.8, 134.8, 130.2, 129.7, 128.2, 125.2, 123.9, 122.1, 114.0, 109.2, 25.3, 24.2, 22.9, 21.8. **IV (KBr, cm⁻¹):** CH (2937), CN (2217). **MS *m/z* (ES⁺):** 318.1099 [M + H]⁺.

2-[(4-Fluoro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-65)



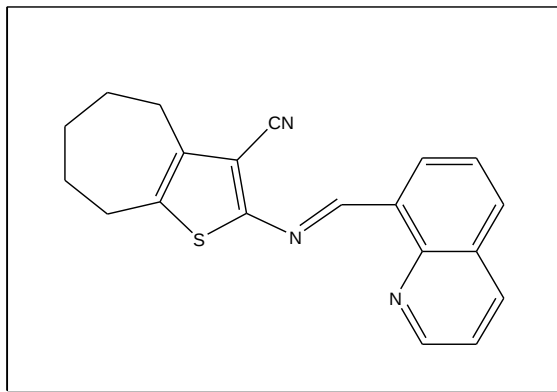
Fórmula Molecular: C₁₆H₁₃FN₂S; **Massa Molecular:** 284.0783; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 93-95°C; **Rendimento:** 65%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,47 (*n*-Hex./AcOEt. 9:1). **RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) δ:** 1.84-1.90 (m, 4H, CH₂), 2.63-2.70 (m, 4H, CH₂), 7.12 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, Ar-H), 7.91 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, Ar-H), 8.36 (s, 1H, CH=N). **RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ:** 166.8, 163.5, 159.4, 157.3, 135.1, 132.5, 131.5, 131.4, 116.2, 115.9, 114.4, 107.0, 25.1, 24.2, 23.0, 21.9. **IV (KBr, cm⁻¹):** CH (2940), CN (2222). **MS *m/z* (ES⁺):** 285.0903 [M + H]⁺.

2-[(4-Fluoro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-66)



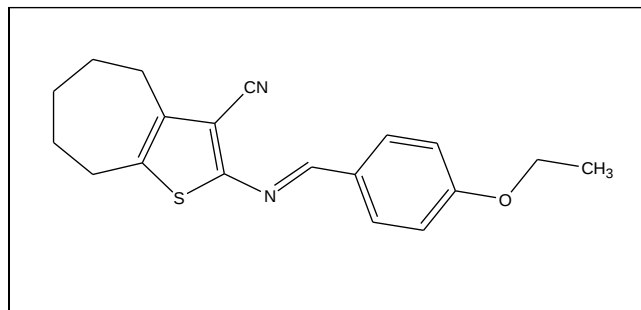
Fórmula Molecular: C₁₇H₁₅FN₂S; **Massa Molecular:** 298.0940; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 140-142°C; **Rendimento:** 88%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,5 (*n*-Hex./AcOEt. 9:1). **RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) δ:** 1.60-1.70 (m, 4H, CH₂), 1.80-1.90 (m, 2H, CH₂), 2.76-2.81 (m, 4H, CH₂), 7.14 (d, *J*= 9Hz, 1H, Ar-H), 7.92 (d, *J*= 9Hz, 1H, Ar-H), 8.37 (s, 1H, CH=N). **RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ:** 166.8, 163.4, 157.1, 140.1, 136.2, 131.3, 116.2, 115.9, 114.9, 31.9, 30.5, 29.1, 27.7, 27.0. **IV (KBr, cm⁻¹):** CH (2940), CN (2217). **MS *m/z* (ES⁺):** 299.1051 [M + H]⁺.

2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-68)



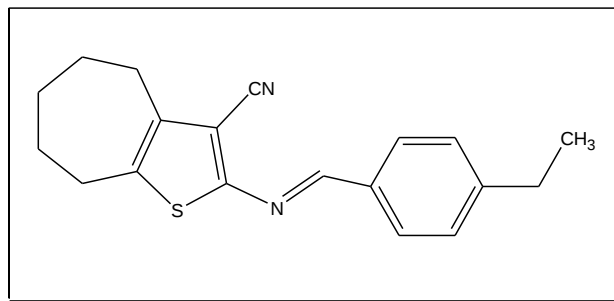
Fórmula Molecular: C₂₀H₁₇N₃S; **Massa Molecular:** 331.1143; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 204-206°C; **Rendimento:** 79%; **Rendimento global:** 46,09%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,6 (*n*-Hex./AcOEt. 8:2). **RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) δ:** 1.69-1.72 (m, 4H, CH₂), 1.88 (m, 2H, CH₂), 2.79-2.82 (m, 4H, CH₂), 7.66-7.79 (m, 2H, Ar-H), 7.84 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar-H), 8.17 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, Ar-H), 8.90 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, Ar-H), 8.93 (s, 1H, CH=N), 9.00 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, Ar-H). **RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ:** 156.3, 155.1, 149.8, 148.8, 140.8, 138.7, 137.2, 130.0, 129.7, 128.2, 125.2, 123.9, 122.0, 114.5, 111.4, 31.8, 30.7, 29.0, 27.6, 26.9. **IV (KBr, cm⁻¹):** CH (2930), CN (2219). **MS *m/z* (ES⁺):** 332.1270 [M + H]⁺.

2-[(4-Etoxi-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-70)



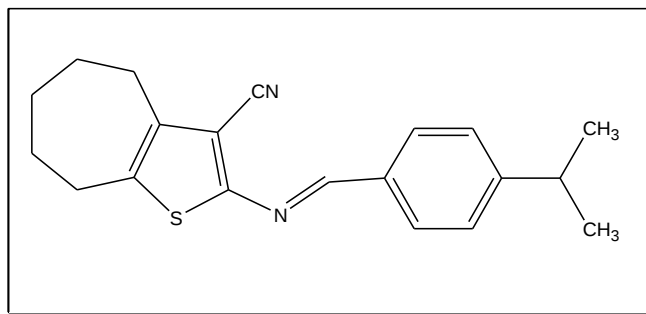
Fórmula Molecular: C₁₉H₂₀N₂OS; **Massa Molecular:** 324.1296; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 113-115°C; **Rendimento:** 86%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,5 (*n*-Hex./AcOEt. 9:1). **RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) δ:** 1.43 (t, *J*= 7,2 Hz, 3H, CH₃), 1.66-1.72 (m, 4H, CH₂), 1.82-1.86 (m, 2H, CH₂), 2.76 (m, 4H, CH₂), 4.05 (q, *J*= 7,2Hz, 2H, CH₂), 6.93 (d, *J*= 8,7 Hz, 2H, CH), 7.84 (d, *J*= 8,7 Hz, 2H, CH₂), 8.30 (s, 1H, CH=N). **RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ:** 162.42, 158.60, 158.26, 139.72, 135.05, 131.22, 127.80, 115.23, 114.72, 108.10, 63.69, 31.93, 30.48, 29.06, 27.78, 27.08, 14.63. **IV (KBr, cm⁻¹):** 2931 (CH), 2216 (CN). **MS *m/z* (ES⁺):** 325.1419 [M + H]⁺.

2-[(4-Etil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-71)



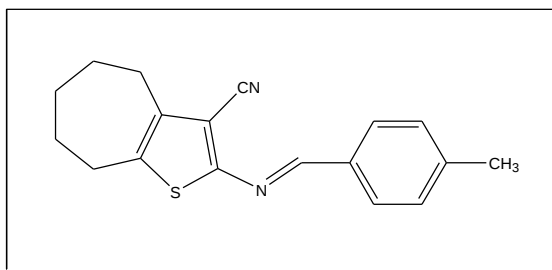
Fórmula Molecular: $C_{19}H_{20}N_2S$; **Massa Molecular:** 308.1347; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 94-95°C; **Rendimento:** 84%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,55 (*tolueno*). **RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ :** 1.26 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH_3), 1.64-1.74 (m, 4H, CH_2), 1.84-1.88 (m, 2H, CH_2), 2.73 (q, 2H, J = 7.5 Hz, CH_2), 2.75-2.81 (m, 4H, CH_2), 7.28 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.84 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 8.39 (s, 1H, CH=N). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75MHz) δ :** 158.8, 158.1, 149.3, 139.9, 135.7, 132.7, 129.5, 128.4, 115.0, 108.7, 31.9, 30.5, 29.1 29.0, 27.8, 27.1, 15.2. **IV (KBr, cm^{-1}):** CH (2928), CN (2216). **MS m/z (ES^+):** 309.1455 $[M + H]^+$.

2-[(4-Isopropil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-72)



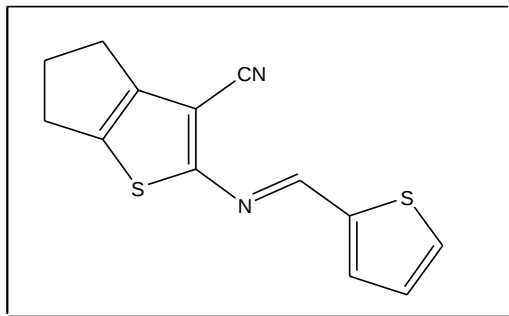
Fórmula Molecular: $C_{20}H_{22}N_2S$; **Massa Molecular:** 322.1503; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 93-95 °C; **Rendimento:** 70%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,6 (clorofórmio). **RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ :** 1.72 (d, 6H, J = 6.9 Hz, CH_3), 1.63-1.73 (m, 4H, CH_2), 1.83-1.91 (m, 2H, CH_2), 2.75-2.81 (m, 4H, CH_2), 2.96 (d, 1H, J = 6.9 Hz, CH), 7.31 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.84 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 8.38 (s, 1H, CH=N). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75MHz) δ :** 158.7, 158.1, 153.8, 139.9, 135.6, 132.8, 129.4, 126.9, 115.0, 108.7, 34.2, 31.9, 30.5, 29.0, 27.7, 27.0, 23.6. **IV (KBr, cm^{-1}):** CH (2927), CN (2216). **MS m/z (ES^+):** 323.1641 $[M + H]^+$.

2-[(4-Metil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-73)



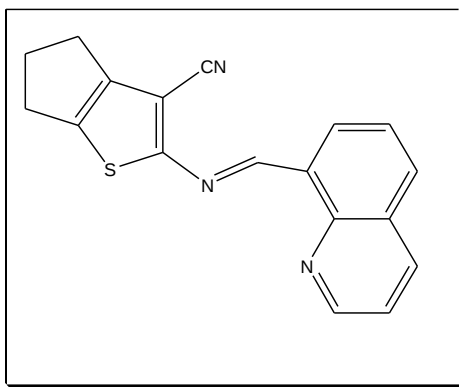
Fórmula Molecular: $C_{18}H_{18}N_2S$; **Massa Molecular:** 294.1190; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 88-90°C; **Rendimento:** 92%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,52 (*tolueno*). **RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ :** 1.69 (m, 4H, CH_2), 1.86 (m, 2H, CH_2), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.78 (m, 4H, CH_2), 7.25 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, Ar-H), 7.81 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, Ar-H), 8.38 (s, 1H, $CH=N$). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75MHz) δ :** 158.8, 158.1, 143.0, 139.9, 135.7, 132.5, 129.5, 129.3, 115.0, 108.7, 31.9, 30.5, 29.1, 27.7, 27.1, 21.7. **IV (KBr , cm^{-1}):** CH (2912), CN (2222). **MS m/z (ES^+):** 295.1067 $[M + H]^+$.

2-[(4-Tiofen-3-il-metilideno)-amino]-5,6-dihidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-80)



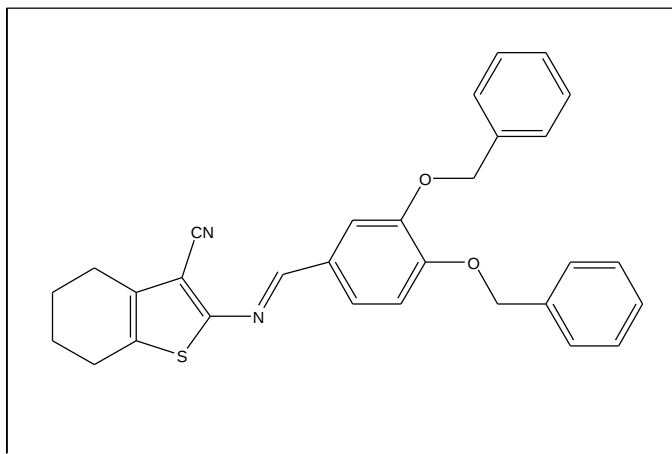
Fórmula Molecular: C₁₃H₁₀N₂S₂; **Massa Molecular:** 258.0285; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 174-175 °C; **Rendimento:** 81%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,55 (*n*-Hex./AcOEt. 7:3). **RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) δ:** 2.36-2.45 (m, 2H, CH₂), 2.80-2.92 (m, 4H, CH₂), 6.81 (dd, 1H, *J* = 1.5, 3.6 Hz, Ar-H), 7.11 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz, Ar-H), 7.64 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, Ar-H), 8.25 (s, 1H, CH=N). **RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ:** 164.9, 151.2, 146.9, 145.2, 144.8, 137.4, 118.0, 114.7, 112.9, 101.6, 30.1, 28.1, 27.2. **MS *m/z* (ES⁺):** 281.0148 [M+Na]⁺.

2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6-dihidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-81)



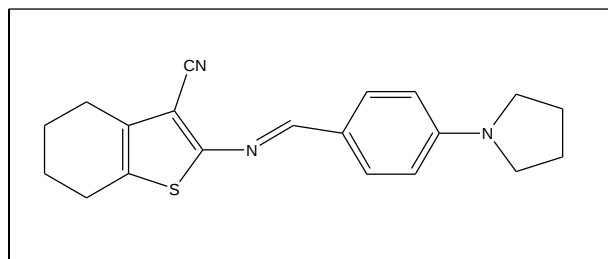
Fórmula Molecular: $C_{18}H_{13}N_3S$; **Massa Molecular:** 302.0767; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 200-202°C; **Rendimento:** 67%; **Razão de Frente Sistema:** 0,65 (benzeno/AcOEt 7:3). **RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ :** 2.48 (q, 2H, J = 7.6 Hz, CH_2), 2.91 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH_2), 2.99 (t, 2H, J = 7.6 Hz, CH_2), 7.79 (t, 1H, J = 7.6 Hz, Ar-H), 7.87 (t, 1H, J = 7.6 Hz, Ar-H), 8.08 (d, 1H, J = 4.8 Hz, Ar-H), 8.40 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 8.95 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 8.02 (s, 1H, $CH=N$), 9.03 (d, 1H, J = 4.8 Hz, Ar-H). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ :** 163.5, 154.3, 150.0, 149.0, 145.3, 140.1, 137.1, 130.2, 129.7, 128.3, 125.2, 123.9, 122.1, 114.3, 104.7, 30.2, 28.0, 27.3. **IV (KBr) cm^{-1} :** CH (2924), CN (2220). **MS m/z (ES^+):** 303.0830 $[M + H]^+$.

2-[(3,4-Bis-benziloxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro- benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-110)



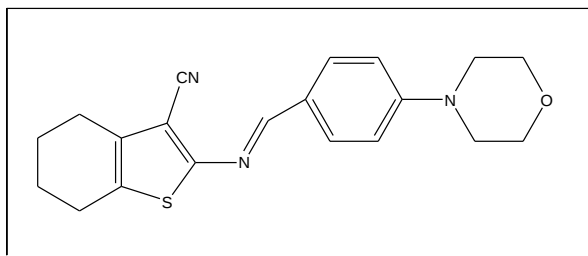
Fórmula Molecular: $C_{30}H_{26}N_2O_2S$; **Massa Molecular:** 478,1715; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 80-81°C; **Rendimento:** 78%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,5 (*n*-hexano/AcOEt 7:3). **RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ :** 1.85-1.86 (m, 4H, CH_2), 2.65-2.67 (m, 4H, CH_2), 5.21 (s, 4H, CH_2), 6.92 (d, J = 8,4Hz, 1H, Ar-H), 7.26-7.55 (m, 10H, Ar-H), 7.70 (d, J = 2,1Hz 1H, Ar-H), 8.25 (s, 1H, Ar-H), 9.80 (s, 1H, $CH=N$). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ :** 160.3, 158.2, 152.6, 149.0, 136.4, 134.8, 131.5, 128.5, 128.5, 127.8, 127.5, 127.2, 127.0, 125.3, 114.6, 113.3, 112.6, 105.9, 70.9, 70.7, 25.1, 24.2, 23.0, 21.9. **IV (KBr) cm^{-1} :** CH (2925), CN (2220).

2-[(4-Pirrolidin-1-il-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-117)



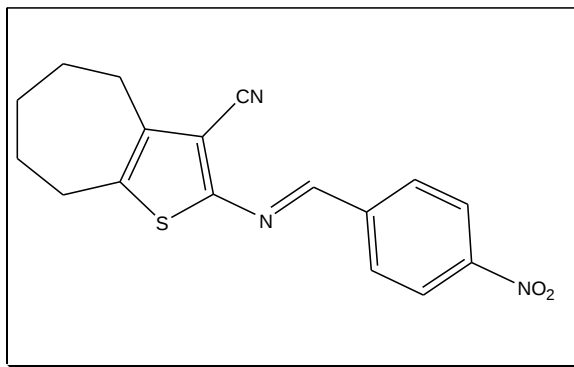
Fórmula Molecular: C₂₀H₂₁N₃S; **Massa Molecular:** 335.1456; **Sólido de cor laranja;** **Ponto de Fusão:** 211°C; **Rendimento:** 18%; **Razão de Frente/ Sistema:** 0,62 (*n*-hexano/AcOEt 7:3). **RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) δ:** 1.85 (m, 4H, CH₂), 2.07 (m, 4H, CH₂), 2.66 (m, 4H, CH₂), 3.43 (m, 4H, CH₂), 6.62 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 7.94 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar-H), 8.30 (s, 1H, CH=N). **RMN ¹³C (CDCl₃, 100MHz) δ:** 198.3, 190.2, 158.3, 151.6, 134.5, 133.1, 115.0, 112.3, 111.2, 102.8, 48.0, 47.6, 25.4, 25.3, 24.9, 24.3, 23.1, 22.0. **IR (KBr, cm⁻¹):** CH (2928), CN (2212). **MS m/z (ES⁺):** 336.1291 [M + H]⁺.

2-[(4-Morfolin-4-il-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-118)



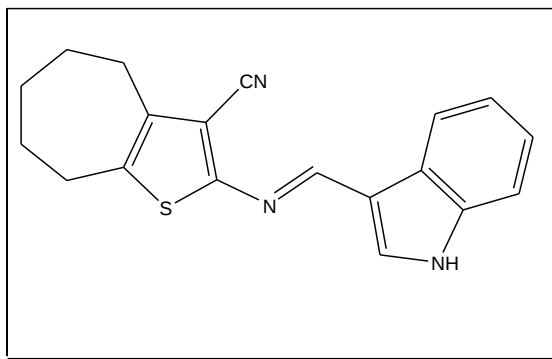
Fórmula Molecular: C₂₀H₂₁N₃OS; **Massa Molecular:** 351.1405; **Sólido de cor amarelo;** **Ponto de Fusão:** 159-160°C; **Rendimento:** 74%; **Razão de Frente/Sistema:** 0,65 (*n*-hexano/AcOEt 8:2). **RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) δ:** 1.80-1.88 (m, 4H, CH₂), 2.61-2.67 (m, 4H, CH₂), 3.30 (t, 4H, *J* = 4.8 Hz, NCH₂), 3.84 (t, 4H, *J* = 4.8 Hz, OCH₂), 6.88 (d, 2H, *J* = 9 Hz, Ar-H), 7.80 (d, 2H, *J* = 9 Hz, Ar-H), 8.26 (s, 1H, CH=N). **RMN ¹³C (CDCl₃, 100MHz) δ:** 161.1, 158.3, 153.7, 134.5, 131.1, 130.8, 125.6, 114.9, 113.9, 105.0, 66.4, 47.4, 25.0, 24.2, 23.0, 21.9. **IR (KBr, cm⁻¹):** CH (2945), CN (2213). **MS *m/z* (ES⁺):** 352.121 [M + H]⁺.

2-[(4-Nitro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-43)



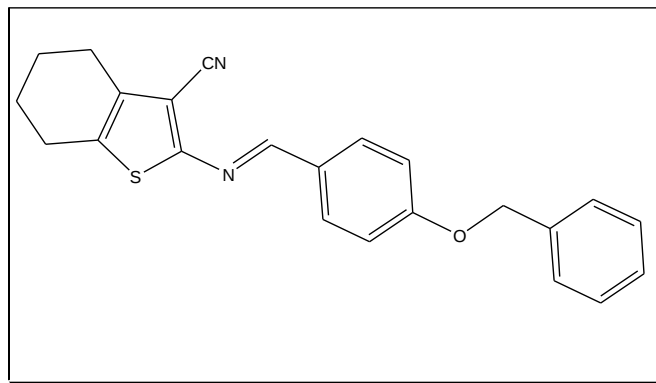
Fórmula Molecular: $C_{17}H_{15}N_3O_2S$; **Massa Molecular:** 325.0884; **Ponto de Fusão:** 126°C; **Rendimento:** 90%; **RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ :** 1.66-1.75 (m, 4H, CH_2), 1.85-1.89 (m, 2H, CH_2), 2.79-2.82 (m, 4H, CH_2), 8.06 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 8.28 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 8.43 (s, 1H, $CH=N$). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75MHz) δ :** 155.8, 155.0, 149.3, 140.9, 140.4, 138.6, 129.6, 123.9, 114.5, 111.4, 31.8, 30.7, 29.0, 27.6, 26.9. **IV (KBr, cm^{-1}):** CH (2929), CN (2220). **MS m/z (ES^+):** 326.0718 $[M + H]^+$. Sintetizado por **TIAGO B. DE OLIVEIRA, 2010.**

2-[(1H-Indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-44)



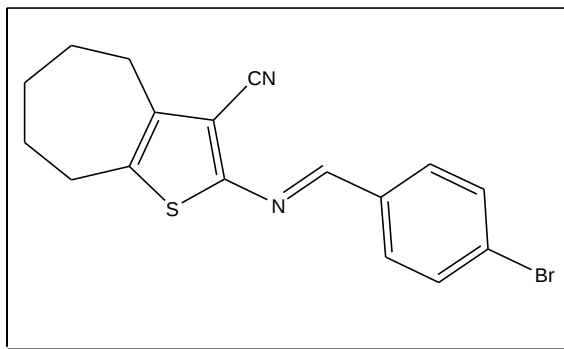
Fórmula Molecular: C₁₉H₁₇N₃S; **Massa Molecular:** 319.1143; **Ponto de Fusão:** 180-182°C; **Rendimento:** 90%; **RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) δ:** 1.65-1.72 (m, 4H, CH₂), 1.84-1.88 (m, 2H, CH₂), 2.75-2.82 (m, 4H, CH₂), 7.29-7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.67 (d, 1H, J = 3 Hz, Ar-H), 8.60 (s, 1H, CH=N). **RMN ¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ:** 160.5, 153.4, 139.3, 136.9, 133.5, 132.1, 124.8, 124.2, 123.0, 122.7, 116.0, 115.7, 111.3, 106.7, 32.0, 30.5, 29.1, 27.9, 27.2. **IV (KBr, cm⁻¹):** CH (2911), CN (2220). **MS m/z (ES⁺):** 320.1003 [M + H]⁺. Sintetizado por **TIAGO B. DE OLIVEIRA, 2010.**

2-[(4-Benziloxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-45)



Fórmula Molecular: $C_{23}H_{20}N_2OS$; **Massa Molecular:** 372.1296; **Ponto de Fusão:** 140-142°C; **Rendimento:** 92%; **RMN 1H ($CDCl_3$, 300MHz) δ :** 1.73-1.89 (m, 4H, CH_2), 2.62-2.69 (m, 4H, CH_2), 5.12 (s, 2H, OCH_2), 7.03 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.34-7.46 (m, 5H, Ar-H), 7.87 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 8.32 (s, 1H, $CH=N$). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75MHz) δ :** 162.1, 160.4, 158.2, 136.0, 134.7, 131.5, 131.3, 128.6, 128.1, 128.1, 127.4, 115.1, 114.6, 105.8, 70.0, 25.0, 24.2, 23.0, 21.9. **IV (KBr , cm^{-1}):** CH (2938), CN (2218). **MS m/z (ES^+):** 373.1119 $[M + H]^+$. Sintetizado por **TIAGO B. DE OLIVEIRA, 2010.**

2-[(4-Bromo-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-46)



Fórmula Molecular: C₁₇H₁₅BrN₂S; **Massa Molecular:** 358.0139; **Ponto de Fusão:** 144°C; **Rendimento:** 87%; **RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz) δ:** 1.64-1.74 (m, 4H, CH₂), 1.84-1.88 (m, 2H, CH₂), 2.76-2.81 (m, 4H, CH₂), 7.58 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.78 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-H), 8.34 (s, 1H, CH=N). **RMN ¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ:** 157.1, 140.3, 136.7, 133.9, 132.1, 130.5, 126.8, 114.9, 109.7, 31.9, 30.6, 29.1, 27.7, 27.0. **IV (KBr, cm⁻¹):** CH (2916), CN (2223). **MS m/z (ES⁺):** 360.0940 [M + H]⁺. Sintetizado por **TIAGO B. DE OLIVEIRA, 2010.**



5 PARTE BIOLÓGICA

5.1 Metodologia

5.1.1 Atividade Antifúngica

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antifúngica dos derivados 2-[(arilideno)amino]-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila foram realizados no Laboratório Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

5.1.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM dos produtos testados foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” e em duplicata. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido CSD duplamente concentrado. Posteriormente, 100 µL da solução dos produtos, também duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 1 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontrou a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo das espécies nas cavidades, onde cada coluna da placa referiu-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada cepa. As placas foram seladas e incubadas a 35°C por 24-72 h. A CIM para os produtos testados foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nas cavidades, quando comparado com o crescimento controle. Os ensaios foram realizados em duplicata e

o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos dois ensaios (ELOFF, 1998; SOUZA et al., 2007).

5.1.2 Atividade Antitumoral

5.1.2.1 Análise da Citotoxicidade pelo método do MTT

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL. As substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas em série no meio DMEN para obtenção das concentrações finais (25µg/mL) e adicionadas em placa de 96 poços (100µL/ poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolio), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

5.2 Procedimentos Experimentais

5.2.1 Materiais e Procedimentos

5.2.1.1 Atividade Antifúngica

5.2.1.1.1 Microrganismos

Os microrganismos, utilizados no ensaio para a avaliação de atividade antifúngica, corresponderam a 2 cepas de *Candida krusei* (LM 13 e LM 08) e 2 cepas de *Cryptococcus neoformans* (LM 0310 e ICB 59). As mesmas foram fornecidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. As cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud Dextrose (ASD) inclinado, sob refrigeração (4°C) e a temperatura ambiente (28-30°C).

5.2.1.1.2 Meios de Cultura

O meio de cultura utilizado nos ensaios foi o meio líquido caldo Sabouraud Dextrose (CSD), adquiridos da Difco® e preparados de acordo com as instruções do fabricante. Os meios foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C, por 15 minutos.

5.2.1.1.3 Inóculo

Na preparação do inóculo dos fungos, primeiramente os isolados foram cultivados em meio ASD inclinado a 35°C por 24-72 hs (*overnight*). Inicialmente foram preparadas suspensões dos microrganismos em tubos contendo 5 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,85% p/v). Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala McFarland, a qual corresponde

a um inóculo de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) (ELOFF, 1998; SOUZA et al., 2007).

5.2.1.1.4 Compostos testados

Foram testadas 18 substâncias (LPSF/SB-43, LPSF/SB-44, LPSF/SB-45, LPSF/SB-46, LPSF/SB-62, LPSF/SB-63, LPSF/SB-64, LPSF/SB-65, LPSF/SB-68, LPSF/SB-70, LPSF/SB-71, LPSF/SB-72, LPSF/SB-73, LPSF/SB-80, LPSF/SB-81, LPSF/SB-110 LPSF/SB-117, LPSF/SB-118) nas concentrações de **10.000, 5.000, 2.500, 1.250, 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8** µg/mL, as quais foram solubilizadas em DMSO, numa proporção até 10 %.

5.3.1 *Atividade Antitumoral*

5.3.1.1 *Células*

As linhagens tumorais utilizadas, HT29 (carcinoma de cólon - humano), HEP (carcinoma de laringe - humano) e NCI H-292 (câncer de pulmão– humano) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro.

5.3.1.1.2 Meios de Cultura

As linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

5.3.1.2 *Compostos testados*

As amostras foram primeiramente dissolvidas em DMSO puro estéril e posteriormente foram diluídas em série no meio DMEN para obtenção das concentrações finais (**25µg/mL**) para os 16 compostos testados (**LPSF/SB-43, LPSF/SB-44, LPSF/SB-46, LPSF/SB-62, LPSF/SB-63, LPSF/SB-64, LPSF/SB-65, LPSF/SB-68, LPSF/SB-70, LPSF/SB-71, LPSF/SB-72, LPSF/SB-73, LPSF/SB-80, LPSF/SB-81, LPSF/SB-117, LPSF/SB-118**).

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Atividade Antifúngica

Os compostos LPSF\SB-44, SB-64, SB-72 e SB-80 mostraram atividade antifúngica significativa contra as cepas de *C. neoformans* testadas. Os valores de CIM para estas moléculas variaram de excelentes (100 a 500 µg/mL) a moderados (600 a 1500 µg/mL), dentro dos limites estabelecidos (**excelente atividade:** de 100 a 500 µg/mL, **Inibição moderada:** de 600 a 1500 µg/mL, **inativo ou fraca atividade:** acima de 1000 ou 1500 µg/mL) (MITSCHER et al., 1972; HOLETZ et al., 2002; HOUGHTON et al., 2007)(TABELA 1).

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas frente a cepas de *C.neoformans* e *C.krusei* pela técnica de microdiluição

Compostos LPSF-SB	Concentração Inibitória Mínima-CIM (µg/mL)			
	<i>C. neoformans</i> LM 0310	<i>C. neoformans</i> ICB 59	<i>C. krusei</i> LM 13	<i>C. krusei</i> LM 08
43	----	2500	5000	512
44	128	256	2500	1024
45	----	----	----	----
46	----	2500	1250	5000
62	2500	2500	2500	----
63	2500	10000	5000	----
64	128	64	----	512
65	128	5000	----	512
68	2500	64	----	2500
70	5000	128	2500	2500
71	2500	2500	2500	2500
72	128	128	2500	5000
73	----	128	----	----
80	128	128	2500	5000
81	128	2500	5000	1250
110	----	----	----	----
117	2500	256	10000	----
118	2500	256	5000	----

- Legenda ---- = Cepa resistente aos compostos

Com relação ao estudo da atividade antifúngica sobre *Candida krusei*, apenas os compostos SB-64 e SB-65 apresentaram atividade moderada com valores de Concentração Inibitória Mínima igual a 512 µg/mL.

O composto que mais se destacou com ação antifúngica contra *C. neoformans* foi o SB-64, que apresentou CIM igual a 128 µg/mL (para a cepa *C. neoformans* LM 0310) e 64 µg/mL (para cepa *C. neoformans* ICB 59). A presença do grupamento quinolina ligado ao 2-amino parece ser relevante ao desenvolvimento da atividade em questão. Boateng e colaboradores (2011) sintetizaram compostos tetracíclicos benzo[tieno[3,2-b]quinolina e também testaram sua potência *in vitro* contra *C. neoformans*. Os resultados, assim como para o LPSF/SB-64, foram valores de CIM moderados.

No que diz respeito a uma avaliação da relação estrutura química-atividade biológica, o tamanho do anel ciclopentila e ciclohexila acoplado às posições 4 e 5 do anel de tiofeno parece exercer pouca influência na atividade antifúngica, uma vez que não foi observado diferenças significativas das atividades entre os compostos pertencentes a estas séries. Entretanto, os compostos LPSF/SB com melhor perfil de atividade foram derivados benzo[b]tiofênicos.

Mendonça Júnior e colaboradores (2011) avaliou também a atividade antifúngica, através das CFM, de quinze derivados 2-[(benzilideno)-amino]-5-metil-tiofeno-3-carbonitrila substituídos e 2-[(benzilideno)-amino]-4,5-cicloalquil-tiofeno-3-carbonitrila substituídos. Constatou que os derivados contendo o anel ciclohexila exibiam maior potencial de inibição do crescimento fúngico que os derivados ciclopentila e cicloheptila, o que respalda a melhor atividade do composto SB-64, que contém o anel ciclohexila.

5.4.2 Atividade Antitumoral

Os compostos que apresentaram maior percentual de inibição foram: SB-44 (100% para HT29, 100% para NCI H-292 e 97,5% para HEP) e SB-65 (95,4% para HEP). (TABELA 2).

Foi verificado que nenhum dos compostos contendo o ciclo de cinco membros apresentou atividade antitumoral frente às linhagens tumorais do teste. Entretanto, os derivados ciclohepta-tiofenos demonstraram maior potencial antitumoral entre todos os testados, pois todos os compostos com anel de sete membros apresentaram valores de percentual de inibição do crescimento de fraco a moderados.

Tabela 2: Atividade Antiproliferativa dos Compostos Sintetizados

Compostos	Inibição (%) (25 µg/mL) ^a		
LPSF\SB	HT29	NCI H-292	HEP
43	53.7 ± 1.9	50.9 ± 4.0	95.4 ± 0.0
44	100.0 ± 0.5	100.0 ± 0.0	97.5 ± 2.5
46	11.3 ± 4.8	23.5 ± 1.2	11.3 ± 0.4
62	34.7 ± 0.7	33.9 ± 3.8	24.1 ± 2.7
63	25.0 ± 2.0	27.9 ± 2.7	52.6 ± 2.9
64	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
65	53.7 ± 1.9	50.9 ± 4.0	95.4 ± 0.0
68	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
70	0.0 ± 0.0	14.3 ± 1.2	29.1 ± 17.2
71	61.6 ± 2.0	42.5 ± 2.7	57.3 ± 5.0
72	28.9 ± 1,5	45.7 ± 3.3	71.0 ± 3.9
73	28.9 ± 1,5	45.7 ± 3.3	71.0 ± 3.9
80	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
81	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
117	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
118	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

^a Valores expressos pela média ± desvio padrão de perfis dose-resposta obtidos por meio de 3 experimentos independentes

O composto SB-44 apresentou maior percentual de inibição do crescimento entre todos os testados. Ele possui em sua estrutura o radical 1*H*-Indol-3-il-metileno, que provavelmente também está relacionado com a atividade antitumoral. Haider e

colaboradores (2007) sintetizaram, por meio de catálise com paládio, uma série de novos derivados 3-(indol-1-il)prop-1-in-1-il- ftalazinas substituídas e também avaliaram sua citotoxicidade pelo método de MTT. Dez compostos foram testados frente a um painel de linhagens tumorais KB (Carcinoma cervical) SF-268 (Câncer do Sistema Nervoso Central), RKOP27 (adenocarcinoma de cólon), SK OV-3 (carcinoma de ovário); NCI H-460 (carcinoma de pulmão).

Este trabalho conclui que a maioria dos compostos apresentava percentual de inibição do crescimento significativo para as linhagens tumorais RKOP27 e KB, onde o composto 1-[2-(5-Metoxi-indol-1-il)vinil]-4-fenil-ftalazina, foi o que mais se destacou (100% para RKOP27 e 99% para KB).

A presença do radical *flúor* no SB-65 parece ser relevante para o desenvolvimento da atividade antitumoral. Romagnoli e colaboradores (2007) em estudos com derivados 2-amino-3(3',4',5'-trimetoxibenzoil)5-fenil-tiofeno e derivados substituídos na posição 2 do anel tiofênico constatou que o substituinte p-fluor apresentou significativa atividade antiproliferativa frente à linhagens tumorais L1210 e K562.

O tamanho da cadeia do radical substituído em *para* parece contribuir para a ação antitumoral dos compostos ciclohepta-tiofenos. Supõe-se que cadeias menores constituídas de até dois carbonos (-CH₂-CH₃) influenciariam na atividade antitumoral dos compostos. Neste contexto, temos que a troca do substituinte *iso-propil* (SB-72) por *etil* (SB-71) resulta em uma pequena redução na atividade antitumoral e a substituição do *etil* (SB-71) pelo grupamento *metil* (SB-73) conduz a uma menor perda de atividade.

6 CONCLUSÕES

Foram sintetizados 19 derivados tiofênicos (LPSF\SB) divididos em 3 diferentes séries (ciclopentila, ciclohexila e cicloheptila). Os compostos foram obtidos com rendimentos que se apresentam dentro do previsto para rota sintética utilizada.

Quanto à atividade antifúngica *in vitro*, os derivados tiofênicos se mostraram eficientes em inibir o crescimento fúngico para as cepas de *Criptococcus neoformans*, com valores de CIM variando de excelentes a fracos (64 a 2500 µg/mL). Entretanto, demonstraram baixo potencial de inibição para as cepas de *Candida krusei*.

A relevante atividade antitumoral obtida pelos derivados cicloheptila SB-44 e SB-65 torna-se um grande atrativo para pesquisas futuras, pois estes foram especialmente ativos contra a linhagem tumoral HEP (carcinoma de laringe humano). Este fato direciona a síntese de novos análogos para testes nesta linhagem tumoral. Os demais compostos contendo o anel de sete membros apresentou percentual de inibição do crescimento de fraco a moderado (24 a 71%).

A atividade antitumoral do composto SB-44 pode relacionar-se à presença do grupamento indol. Já a atividade desenvolvida pelo composto LPSF/SB-65 pode ser dada em parte a presença do substituinte *p-fluor*, que já foi relacionado à atividade antiproliferativa em alguns compostos descritos na literatura.



7 PERSPECTIVAS

- Desenvolver novas séries de derivados tiofênicos, auxiliados por técnicas de modelagem molecular que permitam a obtenção de novos derivados ainda mais potentes e avaliar sua atividade antifúngica e antitumoral;
- Testar todos os compostos tiofênicos frente a um maior número de cepas fúngicas de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*;
- Realizar um screening dos compostos contendo o anel cicloheptila em um maior número de linhagens celulares de câncer;
- Realizar estudos *in vivo* utilizando modelos animais para avaliação da atividade antitumoral dos derivados cicloheptila LPSF\SB.



REFERÊNCIAS

AMR, A.E.G.E.; SHERIF, M.H.; ASSY, M.G.; AL-OMAR, M.A.; RAGA, I. Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives synthesized from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro- N-phenylbenzo[b]thiophene-3-carboxamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p.5935-5942, 2010.

ANDROSOV, D.A.; SOLOVYEV, A.Y.; PETROV, M.L.; BUTCHER, R.J.; JASINSKI, J.P. A convenient approach towards 2- and 3- aminobenzo[b]thiophenes. **Tetrahedron**, v. 66, p. 2474–2485, 2006.

BAKKER, J., GOMMERS, F.J., NIEUWENHUIS, I., WYNBERG, H. Photoactivation of the nematocidal compound alpha-terthienyl from roots of marigolds (tagetes species)* possible singlet oxygen role. **J. Biol. Chem.** 254, 1841_ 1844, 1979.

BARALDI, P.G.; PAVANI, M.G.; LEUNG, E.; MOORMAN, A.R.; VARANI, K.; VINCENZI, F.; BOREAC, P.A.; ROMAGNOLI, A.R. Synthesis and biological characterization of [3H](2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophen-3-yl)-(4-chlorophenyl)-methanone, the first radiolabelled adenosine A1 allosteric enhancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p. 1402-1404, 2006.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4: 14-19, 1996.

BOATENG, C.A.; EYUNNI S.V.K.; ZHU, X.Y.; ETUKALA J.R.; BRICKER, B.A.; ASHFAQ, M. K.; JACOB, M.R.; KHAN, S.I.; WALKER, L.A.; ABLORDEPPEY, S.Y. Synthesis and evaluation against opportunistic fungal pathogens. **Bioorg. Med. Chem**, v. 19, p 458–470, 2011.

BOULWARE, S.L.; BRONSTEIN, J.C.; NORDBY, E.C.; WEBER, P.C. Identification and characterization of a benzothiophene inhibitor of herpes simplex virus type 1 replication which acts at the immediate early stage of infection. **Antiviral Research**, v. 51, p.111–125, 2001.

BYMASTER, F.P., BEEDLE, E.E., FINDLAY, J., GALLAGHER, P.T., KRUSHINSKI, J.H., MITCHELL, S., ROBERTSON, D.W., THOMPSON, D.C., WALLACE L., WONGA. D.T. Duloxetine (Cymbalta™), a Dual Inhibitor of Serotonin and Norepinephrine Reuptake. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 4477–4480, 2003

CANILO-MUFLOZ, A.J.; TUR, C.; TORRES, J. In-vitro antifungal activity of sertaconazole, bifonazole, ketoconazole, and miconazole against yeasts of the *Candida* genus. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, p. 815-819, 1996.

CHAN, G.F.Q., TOWERS, G.H.N., MITCHELL, J.C. Ultraviolet-mediated antibiotic activity of thiophene compounds of Tagetes. **Phytochemistry** 14, 2295-2296, 1975.

CRNKOVIC, P.M.; POLITO, L.M.; FILHO, C.G.S.; MILIOLI, F.E.; PAGLIUSO, J.D. O efeito da granulometria na decrepitação durante a decomposição térmica de calcários e carvão. **Quím. Nova** vol.27 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2004.

DALEMAGNE, P.; KHANH, L.P.; ALSAÏDI, A.; VARLET, I.; COLLOT, V.; PAILLET, M. BUREAU, R.; RAULT, S. Synthesis and Biological Evaluation of Five-Membered Heterocycles Fused to Cyclopenta[c]thiophene as New Antitumor Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1161–1167, 2003.

DALVIE, D.K., KALGUTKAR, A.S., KHOJASTEH-BAKHT, C.S., SCOTT OBACH, R., O'DONNELL, P.O. Biotransformation reactions of five-membered aromatic heterocyclic rings. **Chem. Res. Toxicol.** 15, 269-299, 2002.

DAVID W. Denning. Aspergillosis: diagnosis and treatment. *International Journal of Antimicrobial Agents* 6 (1996) 161-168.

DRUGBANK. Suprofeno. Disponível em: < [http:// www.drugbank.com](http://www.drugbank.com)>. Acesso em: 5 ago 2010.

ELOFF, J. N. A sensitive and Quick Microplate Method to determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1978.

FAKHR, I.M.I.; RADWAN, M.A.A.; EL-BATRAN, S.; OMAR M.E.; EL-SALAM, A.; EL-SHENAWY, S.M. Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted benzo[b]thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1718-1725, 2009.

FERREIRA, I.C.F.R.; CALHELHA, R. C.; ESTEVINHO, L.M.; QUEIROZ, M.J.R.P. Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[b]thiophene series: a structure–activity evaluation study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 5831–5833, 2004.

GEWALD, K.; SCHINKE, E.; BOTTCHE, H. 2-Amino-thiophene aus methylenaktiven nitrilen, Carbonylverbindungen und schwefel. **Chem. Ber**, v. 99, p. 99-100, 1966.

GOODMAN e GILMAN. Fármacos usados na Quimioterapia das Helminthíases, Antimicrobianos Penicilinas, Cefalosporinas e outros Antibióticos beta-Lactâmicos. In: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10. Ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2005. p.517-550, 290-334.

GUARRO J, GENE J. Opportunistic fusarial infections in humans. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** ,14:741–54, 1995.

HAIDER, N.; KABICHER, T.; KÄFERBÖCK, J.; PLENK, A. Synthesis and *In-vitro* Antitumor Activity of 1-[3-(Indol-1-yl)prop-1-yn-1-yl]phthalazines and Related Compounds. **Molecules**, v. 12, p. 1900-1909, 2007.

HEEMANN, A. C. W.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. REVISÃO DO GÊNERO *Pterocaulon* - Aspectos fitoquímicos e Atividades Biológicas. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 53-60, Jan.- Jun./2004.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk for the treatment of infectious diseases. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 7, p. 102701031, 2007.

HOM, R.K.; BOWERS, S.; SEALY, J.M.; TRUONG, A.; PROBST, G.D.; NEITZEL, M.; NEITZ, R.J.; FANG, L.; BROGLEY, L.; WU, J.; KONRADI, A.W.; SHAM, H.L.; TÓTH, G.; PAN, H.; YAO, N.; ARTIS, D.R.; QUINN, K.; SAUER, J.M.; POWELL, K.; REN, Z.; BARD, F.; YEDNOCK, T.A.; GRISWOLD-PRENNER, I. Design and Synthesis of Disubstituted Thiophene and Thiazole Based Inhibitors of JNK. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2010.

HOUGHTON, P. J.; HOWEA, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 391-400, 2007.

HUDSON, J.B., GRAHAM, E.A., MIKI, N., TOWERS, G.H.N., HUDSON, L.L., ROSSI, R., CARPITA, A., NERI, D. Photoactive antiviral and cytotoxic activities of synthetic thiophenes and their acetylenic derivatives. **Chemosphere** 19, 1329-1343, 1989.

ISLOOR, A.M., KALLURAYA, B., PAI, K.S. Synthesis, characterization and biological activities of some new benzo[b]thiophene derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.45, p. 825–830, 2010.

IYENGAR, S., ARNASON, J.T., PHILOGENE, B.J.R., MURAND, P., WERSTINK, N.H., TIMMINS, G., Toxicokinetics of the phototoxic allelochemical alpha-terthienyl in 3 herbivorous Lepidoptera. **Pestic. Biochem. Phys.**, v. 29 (1), p. 1-9, 1987.

JARAK, I.; PAVLOVIĆ, G.; KARMINSKI-ZAMOLA, G. Potentially biologically active new substituted anilides of benzo[2,3-*b*]thiophene series. **Struct Chem** , v. 18, p.103–111, 2007.

JAYASELLI, J.; CHEEMALA, J.M.S.; RANI D. P. G.; PAL, S. Derivatization of Enolic OH of Piroxicam: a Comparative Study on Esters and Sulfonates. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 3, p. 509-515, 2008.

KELLY S.L. *et al.* Resistance to amphotericin B associated with defective sterol $\Delta 8-7$ isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 122, p. 39–42, 1994.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M.; KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 8, n.2, 2002.

MALMSTRÖM, J., JONSSON, M., COTGREAVE, I.A., HAMMARSTRÖM, L., SJÖDIN, M., ENGMANN, L. The antioxidant profile of 2,3-dihydrobenzo[b]furan-5-ol and its 1-thio, 1-seleno and 1-telluro analogues. **J. Am. Chem. Soc.** 123, 3434-3440, 2001.

MARGL, L., TEI, A., GYURJÁN, I., WINK, Z.M. GLC and GLC-MS Analysis of Thiophene Derivatives in Plants and in vitro cultures of tagetes patula L. (Asteraceae). **Naturforsch.** v. 57, p. 63, 2002.

MATSUURA, H., SAXENA, G., FARMER, S.W., HANCOCK, R.E.W., TOWERS, G.H.N., 1996. Antibacterial and antifungal polvine compounds from *Glehnia littoralis* ssp. leiocarpa. **Planta Med.** 62 (3), 256-259, 1996.

MENDONÇA JÚNIOR, F. J. B.; LIMA-NETO R.G.; OLIVEIRA, T.B.; LIMA, M.C.A; PITTA, I.R; GALDINO, S.L.; CRUZ, R.M.D; ARAÚJO, R.S.A; NEVES, R.P. Synthesis and Evaluation of the Antifungal Activity of 2-(Substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile Derivatives. **Acta Pharm**, *in press proof*, 2011.

MEOTTI, F.C, SILVA, D.O, SANTOS, A.R.S, ZENI, G, ROCHA, J.B.T, NOGUEIRA, C.W. Thiophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 37 (2003) 37_ 44.

MISTCHER, L. A.; LEU, R. P.; BATHALA, M. S.; WU, N. W.; BEAL, J. L.; WHITW, R. Antimicrobial agents from higher plants I: Introduction, Rationale and Methodology. **Llodya**, v. 35, n. 2, p. 157-166, 1972.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63, 1983.

NENAJDENKO V.G.; GAVRYUSHIN A.E.; BALENKOVA E.S. A facile route to thiophene-1,1-dioxides bearing electron-withdrawing groups. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n° 26, p. 4397-4399(3), 2001.

OROZCO, A.S. *et al.* Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 42, p. 2645–2649, 1998.

OLIVEIRA, TIAGO BENTO DE. **Síntese, Elucidação Estrutural e Avaliação Biológica de Novos Derivados Tiazolidínicos e Cicloalquil-tiofênicos**. Dissertação de Mestrado, UFPE, 2010.

PERES, N.T.A; MARANHÃO, F.C.A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **An Bras Dermatol.** 2010;85(5):657-67.

PINTO, E.; QUEIROZ, M.J.R.P., VALE-SILVA, L.A., João F. OLIVEIRA, J.F., BEGOUIN, A., BEGOUIN, J.M., KIRSCH, G. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.16, p. 8172–8177, 2008.

PUTEROVÁ Z.; KRUTOŠÍKOVÁ, A.; VÉGH, D. Gewald reaction: synthesis, properties and applications of substituted 2-aminothiophenes. **ARKIVOC**, Special Issue Reviews and Accounts (i), p.209-246, 2010.

QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R.; CAETANO, Y.; KIRSCH, G.; CALHELHA, R.C.; ESTEVINHO, L.M. Synthesis and antimicrobial activity studies of orthochlorodiarilamines and heteroaromatic tetracyclic systems in the

benzo[b]thiophene series. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 6827–6831, 2006.

RAJAPPA, S. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, A. R. Katritzky and C. W. Rees, **Eds.**; **Pergamon**, Oxford, v. 4, p. 741, 1984.

RICHY, F.; SCARPIGNATO, C.; LANAS, A.; REGINSTER, J.Y. Efficacy and safety of piroxicam revisited. A global meta-analysis of randomised clinical trials. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 254–263, 2009.

ROGERS, T.R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact?. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27S, p.S7–S11, 2006.

ROMAGNOLI R.; BARALDI P.G.; CARRION M.D.; LOPEZ CARA C.; PRETI D.; FRUTTAROLO F.; PAVANI M.G.; TABRIZI M.A.; TOLOMEO M.; GRIMAUDE S.; DI CRISTINA A.; BALZARINI J.; HADFIELD J.A.; BRANCALE A.; HAMEL E. Synthesis and biological evaluation of 2- and 3-aminobenzo[b]thiophene derivatives as antimitotic agents and inhibitors of tubulin polymerization. **J Med Chem.**, v.9, p. 2273-2277, 2007.

ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P.G.; PAVANI, M.G.; TABRIZI, M.A.; PRETI, D.; FRUTTAROLO, F.; PICCAGLI, L.; JUNG, M.K.; HAMEL, E.; BORGATTI, M.; GAMBARI, R. Synthesis and biological evaluation of 2-amino-3-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-5-aryl thiophenes as a new class of potent antitubulin agents. **J. Med.Chem.**, v.13, p.3906-3915, 2006.

ROMAGNOLI R.; BARALDI P.G.; CARRION M.D.; CRUZ-LOPEZ O.; TOLOMEO M.; GRIMAUDE S.; DI CRISTINA A.; PIPITONE M.R.; BALZARINI J.; BRANCALE A.; HAMEL E. Substituted 2-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-benzo[b]thiophene derivatives as potent tubulin polymerization inhibitors. **Bioorg Med Chem.**, v. 14, p. 5114-5122, 2010.

RYU, C.K., LEE, S.K., HAN, J.Y., JUNG, O.J., LEE, J.Y., JEONG, S.H. Synthesis and antifungal activity of 5-arylamino-4,7-dioxobenzo[b]thiophenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p. 2617–2620, 2005.

SAKER, S.D.; NAHAR, L. Compostos heterocíclicos e seus derivados. In: **Química para Estudantes de Farmácia: química geral, orgânica e de produtos naturais**, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2009, p.121-129.

SEEBACHER C., BOUCHARA JP, MIGNON B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, 2008;166:335-52.

SILVA, P. **Cefalosporinas**. In: *Farmacologia*, 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18 n. 5, p. 409–413, 2007.

SKEHAN , P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82(13): 1107-1112, 1990.

STEFANI, H.A. Introdução à Química de compostos heterocíclicos, Rio de Janeiro, **Ed. Guanabara Koogan**, p. 66-74, 2009.

SRIDHAR, M., RAO, R.M., BABA, N.H.K., KUMBHARE, R. M. Microwave accelerated Gewald reaction: synthesis of 2-aminothiophenes. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 3171-3172, 2007

WANG, Y.; DONG, D.; YANG, Y.; HUANG, J.; OUYANG, Y.; LIU, Q. A facile and convenient one-pot synthesis of polysubstituted thiophenes from 1,3-dicarbonyl compounds in water. **Tetrahedron**, v. 63, p. 2724–2728, 2007.

WHO. Cancer. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/index.html>. Acesso em: 05 junho 2011.

ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W.; PANATIERI, R.B.;SILVA, D.O.; MENEZES, P.H.;BRAGA, P.L.; SILVEIRA,C.C.; STEFANIC, H.A.; ROCHA, J.B.T. **Synthesis and anti-inflammatory activity of acetylenic thiophenes**. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 7921–7923, 2001.



ANEXO A - Índice de Compostos Sintetizados

- **LPSF/ SB-1:** 2-amino-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3- carbonitrila;
- **LPSF/SB-50:** 2-amino-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-2:** 2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-43:** 2-[(4-Nitro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-44:** 2-[(1H-Indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-45:** 2-[(4-Benziloxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-46:** 2-[(4-Bromo-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-62:** 2-[(Tiofen-3-il-metilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-63:** 2-[(Tiofen-2-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-64:** 2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-65:** 2-[(4-Fluoro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-66:** 2-[(4-Fluoro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-68:** 2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-70:** 2-[(4-Etoxi-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-71:** 2-[(4-Etil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta [b]tiofeno-3-carbonitrila;

- **LPSF/SB-72:** 2-[(4-Isopropil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-73:** 2-[(4-Metil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-80:** 2-[(4-Tiofen-3-il-metilideno)-amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-81:** 2-[(Quinolin-8-il-metilideno)-amino]-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-110:** 2-[(3,4-Bis-benziloxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-117:** 2-[(4-Pirrolidin-1-il-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila;
- **LPSF/SB-118:** 2-[(4-Morfolin-4-il-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila;

ANEXO B - Artigo submetido á Revista Acta Pharmaceutica:

Antifungal and cytotoxic evaluation with PLS analysis of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives

Beatriz C. C. SOUZA¹, Tiago B. de OLIVEIRA¹, Thiago M. AQUINO¹, Maria C. A. de LIMA¹, Ivan R. PITTA¹, Suely L. GALDINO¹, Edeltrudes O. LIMA², Teresinha GONÇALVES-SILVA¹, Gardênia C. G. MILITÃO¹, Luciana SCOTTI², Marcus T. SCOTTI³, Francisco J. B. MENDONÇA JUNIOR⁴

¹ *Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50670-910, Brazil*

² *Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 58051-970, Brazil.*

³ *Departamento de Engenharia e Meio Ambiente, Universidade Federal da Paraíba, Campus IV; Rio Tinto-PB 58297-000, Brazil.*

⁴ *Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, CCBSA, João Pessoa-PB 58070-450, Brazil.*

ABSTRACT

A series of 2-[(arylidene)amino]-cycloalkyl[b]thiophene-3-carbonitrile (**2a-x**) was synthesized by incorporation of substituted aromatic aldehydes in Gewald adducts (**1a-c**). Title compounds were screened for their antifungal activity against *Candida krusei* and

Cryptococcus neoformans and for their antiproliferative activity against a panel of 3 human cancer cell lines (HT29, NCI H-292 and HEP). Concerning the antiproliferative activity, partial least squares (PLS) methodology was carried out by Pentacle approach. Some of the prepared compounds revealed promising antifungal and proliferative activities. The most active compounds for the antifungal activity were cyclohexyl[b]thiophene derivatives, and for the antiproliferative activity were cycloheptyl[b]thiophene derivatives, especially 2-[(1*H*-indol-2-yl-methylidene)amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-cyclohepta[b]thiophene-3-carbonitrile (**2r**) which inhibited more than 97% the growth of the 3-cell lines evaluated. The chemometric tool applied generated good exploratory and predictive results and showed that the descriptors having shape characteristics were strongly correlated with the biological data.

KEY WORDS: antifungal activity, antiproliferative activity, cycloalkyl[b]thiophene derivatives, PLS, pentacle program.

*Correspondence; e-mail: franciscojbmendonca@yahoo.com.br

INTRODUCTION

2-Aminothiophenes derivatives are an important class of heterocycles found in several biologically active and natural compounds (1,2). This class of compound have demonstrated a broad spectrum of activities and applications, including pharmaceuticals and agrochemicals, dyes, biodiagnostics, electronic and optoelectronic devices (3-6).

Substituted 2-aminothiophenes represent a class of heterocycles compounds which have attracted a great deal of research interest, due to its great utility as precursors of molecules with pharmaceutical properties. They have been described to present antitubercular (7,8), anti-inflammatory (9-11), antimicrobial (12-14) and antianxiety (15) activities. A literature survey also revealed that substituted 2-aminothiophenes are potent and selective inhibitors of human leukocyte elastase (16,17), kinesin spindle protein (KPS) inhibitors (18), adenosine A1 receptor allosteric enhancers (19-21). Antifungal (22-25) and antitumor (26-28) activities are also extensively described including resulting in marketed antifungal agent such as sertaconazole.

In the light of these considerations this prompted us to synthesize a new series of 2-[[arylidene)amino]-cycloalkyl[*b*]thiophene-3-carbonitrile derivatives by incorporation of different substituted aromatic aldehydes at the 2-amino position of the thiophene ring affording Schiff bases. The chemical structures of all synthesized compounds were confirmed by IR, HRMS, ¹H- and ¹³C-NMR. The synthesized compounds were screened for their *in vitro* antifungal activity against *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* using the microdilution broth method, and for their antiproliferative activity by cytotoxic analysis based on National Cancer Institute (NCI) screening program against a 3-cell line panel consisting of human colon carcinoma (HT29), human lung cancer (NCI H-292) and human laryngeal carcinoma (HEP). Finally, Partial Least Squares regression (PLS) methodology was applied, using Pentacle approach, to the antiproliferative activity of cycloalkyl[*b*]thiophene derivatives.

EXPERIMENTAL

All melting points were measured on Quimis-340.27 apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded as potassium bromide pellets on BRUKER IFS-66 IR

spectrophotometer. NMR were recorded on UNITY PLUS-300 MHz-VARIAN spectrometer by using tetramethylsilane as internal standard. The chemical shifts are reported in δ units, and coupling constants (J) are reported in Hertz. HRMS were recorded on Delsi-Nermag R1010C mass spectrometer 70 eV electron impact. All reactions were monitored by TLC on 0.25 mm silica gel plates (60F₂₅₄, Merck).

Synthesis

2-[(arylidene)amino]-cycloalkyl[*b*]thiophene-3-carbonitrile (**2h,i,k-x**). – A equimolar mixture of **1a-c** and substituted aromatic aldehyde in ethanol with 0.5 mL of acetic acid was stirred under reflux for 2 h and then cooled to room temperature. Water was added and the solid which precipitated out was filtered under vacuum filtration, washed with water, dried and recrystallized from absolute ethanol (Scheme 1).

Insert here scheme 1.

Antifungal activity

The *in vitro* antifungal activity of the synthesized compounds **2a-o**, **2r-x** was investigated against two species of pathogenic fungi: *Candida krusei* LM08 and *Cryptococcus neoformans* ICB59. These strains were supplied by the URM Culture Collection of the Department of Mycology, Department of Pharmaceutical Sciences of the Federal University of Paraíba, Brazil. MIC values were determined by the microdilution broth method using microdilution plates according to the guidelines of the National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS) (29). The test was done in the manner identical to that of Nascente *et al.* (30).

All the strains were stocked in mineral oil at 18 °C. The viability test and subsequent taxonomic confirmation were carried out according to Barnett *et al.* (31). In order to obtain an inoculum of 2.5×10^3 cells/mL, each strain was cultured in a tube containing 20 mL of Sabouraud Dextrose Agar plus yeast extract at 35 °C for two days. After this time suspensions were prepared in sterile physiological solution (0.85 %) and mixed in a rotator shaker. The inoculum was adjusted to 90 % transmittance at 530 nm, measured in a spectrophotometer. Stock solutions of tested compounds were freshly prepared and dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO), aliquoted, and stored at –20 °C in stock solution at a final concentration of 1,024 µg/mL. Decimal dilutions of thiophenes stock solutions were prepared in RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO) and buffered to pH 7.0 with 0.165 M of morpholinopropanesulphonic acid (MOPS, Sigma). Microdilution plates containing serial dilutions (from 1,024 µg/mL to 1 µg/mL) of each compound were inoculated with each organism; each plate included positive controls (fungi without a compound) and a negative control (medium only). The microdilution plates were incubated at 35 °C and were read visually after 24 and 72 h of incubation. The MIC for all strains was defined at the lowest concentration of antifungal agent that completely inhibited the growth of organism, as detected by the unaided eye when compared to control group. All tests were performed in duplicate and the results were expressed as the geometric mean of MIC values obtained in the two trials (32, 33).

Antiproliferative activity

All synthesized compounds were selected by the Nacional Cancer Institute (NCI) Developmental Therapeutic Program (www.dtp.nci.nih.gov) for the *in vitro* cell line screening to investigate their antiproliferative activity. Antiproliferative assays were performed according the US NCI protocol as described elsewhere (34,35). The compounds were evaluated at one primary dose (25 µL/mL) toward a panel of three human cancer cell lines:

colon carcinoma (HT29), lung cancer (NCI H-292) and laryngeal carcinoma (HEP) cells. These cells lines were supplied by the Rio de Janeiro Cell Bank of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil.

The cytotoxicity/survival of cells in the presence or absence of the experimental agent was determined using the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) method, as described previously (36). Cells harvested in the log phase of growth were counted and seeded in triplicates (10^5 cells/100 μ L per well) in 96-well microculture plates in complete DMEM media. After 24 h incubation at 37 °C and 5 % CO₂, cultures were treated with the tested compounds in a single concentration of 25 μ g/mL in DMSO (100 μ L per well). After 72 h exposure to the compounds, 25 μ L of MTT was added to each well. After 4 h at 37 °C, the reaction was stopped and the formazan crystals formed by MTT metabolism were solubilized by the addition of 50 μ L of DMSO to each well. The cellular metabolism of MTT was quantified by reading the absorbance of the solubilized product at 595 nm with a 96-well plate reader coupled to a spectrophotometer. Results for each tested compound were reported as the percent growth of the treated cells when compared to the untreated control cells. The mean $\pm$ SD of three independent experiments for each compound was presented.

Computational Methods

The compounds 2D were drawn using the program ChemDram 8.0. Later they were imported by the Spartan program for Windows 8.0. The molecules were converted into 3D. The models were minimized employing the MM+ method (37) and atomic partial charges were assigned using the AM1 semiempirical method (38,39). The conformational search was applied and the E_{MIN} conformer were selected and saved in .mol format (40,41). The compounds were imported by Pentacle program and PLS methodology was carried out. The Pentacle software is a computational tool for computing alignment-free molecular descriptors, also called GRid-INDependent descriptors or GRIND. The software is based on

Molecular Interaction Fields, describe the ability of the molecules to interact with other molecules and do not require to superimpose the compounds. The probes used were: N1, DRY and O (42).

We calculate a binary PLS for the three cell lines investigated: HT29, NCI H-292 and HEP. The compounds that showed cytotoxicity bigger than 20%, were considered active = 1. The compounds that did not reach 20%, were considered inactive = 0.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry

Initially, 2-amino-cycloalkyl[*b*]thiophene-3-carbonitrile (**1a-c**) were synthesized by the reaction of malononitrile with a cyclic ketone and elemental sulfur in the presence of morpholine following the Gewald procedure (24,43). Treatment of **1a-c** with substituted aromatic aldehydes afforded 2-[(arylidene)amino]-cycloalkyl[*b*]thiophene-3-carbonitrile (**2h,i,k-x**). The Schiff bases were prepared with satisfactory yield (except for **2q**), and characterized based on their physical, analytical and spectral data (Tables I and II). Compounds **2a-g** and **2j** are previously described in the literature (24,44). The IR showed absorption bands at about 2960-2911 and 2223-2212 cm⁻¹ characteristic for C-H and C≡N stretching vibrations, respectively. Further support was obtained from the ¹H NMR spectra, where it did not display signs of the 2-aminothiophene protons (NH₂), and the CH=N protons were observed in the 8.02–8.95 ppm region. Moreover the ¹³C NMR spectra exhibited resonance at 114.0-115.9 ppm, assigned for C≡N group.

Insert here Table I.

Insert here Table II.

Antifungal activity

All synthesized compounds (only exceptions **2p** and **2q**) were evaluated for their *in vitro* antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* and *Candida krusei*. The data presented in Table III showed that the tested compounds inhibited more significantly the growth of *C. neoformans* than the *C. krusei* strain, result that confirms our preliminary results found in previous studies (24). The MIC values found for these molecules ranged from excellent (50-500 µg/mL) to moderate (600-1500 µg/mL), within the limits established (excellent activity: from 50 to 500 µg/mL, moderate activity: from 600 to 1000 µg/mL, inactive or poor activity: greater than 1000 µg/mL) (45,46).

Against *Cryptococcus neoformans* compounds **2t** and **2u** with MIC values at 64 µg/mL, and **2d**, **2g**, **2j**, **2k**, **2m**, **2o** and **2v** (with MIC values at 128 µg/mL) possess a significant antifungal activity. The other tested compounds were inactive in the tested dose, or presents moderate activity (**2a**). The most active compounds (**2t** and **2u**) presents the quinoline moiety linked to 2-amino position. These results corroborate the data of Boateng and collaborators for a series of benzothieno[3,2-*b*]quinoline derivatives (47).

For the anti-*Candida* activity the compounds presents moderate activity. Compounds **2i**, **2k** and **2t** are the most active (MIC values at 512 µg/mL), followed by compounds **2a**, **2g**, **2j**, **2r** and **2s** (MIC values at 1024 µg/mL). All other compounds were inactive in the tested dose.

The present study also confirmed that the presence of the cyclohexyl ring linked to the C-4 and C-5 position of the thiophene ring increased the antifungal activity, as noted in previous studies (24).

Insert here Table III.

Antiproliferative activity

Table IV summarizes the *in vitro* antiproliferative effect of cycloalkyl[*b*]thiophene derivatives **2a-x** against a panel of three human cancer cell lines. Compounds **2a**, **2c**, **2f-g**, **2k-l**, **2p-q** and **2s-v** were not listed in Table IV, since they did not present any antiproliferative activity below the tested concentration (25 µg/mL).

Several derivatives demonstrated substantial inhibitory effects on the growth of human colon carcinoma (HT29), human lung cancer (NCI H-292) and human laryngeal carcinoma (HEP) cells. In general, the antiproliferative activity of the compounds was greater against the HEP cells compared with the other two cell lines.

The results also indicated that the size of the cycloalkyl ring coupled at C-4, and C-5 position of the thiophene ring is essential for the antiproliferative activity. Increasing the size of the cycloalkyl ring, contributes to increase the capacity to inhibit cell growth, so that, the ciclohepta[*b*]thiophenes derivatives (**2r**, **2n**, **2o** and **2x**) were the most active compounds, while those cyclopenta[*b*]thiophenes derivatives (**2a**, **2c**, **2f**, **2s**, **2v**) were all inactive compounds. The most active cycloalkyl[*b*]thiophene compound identified in this study was **2r**, which inhibited the growth of HT29, NCI H-292 and HEP cancer cell lines in 100 %, 100 % and 97.5 %, respectively.

Cyclopenta[*b*]thiophenes derivatives also demonstrated that the size of the alkyl group at the *para* position in the benzylidene moiety seems to be important for antiproliferative activity. In this context, a comparison of substituent effects revealed that the replacement of the *iso*-propyl (**2o**) by ethyl (**2n**) group resulted in a slight reduction in antitumor activity, and the replacement of the ethyl (**2n**) by methyl (**2m**) group resulted in a substantial less of activity.

Another structural feature that can be associated with complete loss of activity in these derivatives is the presence of bulky or too large arylidenes linked to the 2-amino position, as can be seen in compounds **2s**, **2t** and **2u** that presents the quinoline moiety, and in the compounds **2k**, **2p** and **2q** that presents the groups 4-benzyloxy-benzylidene, 4-morpholinyl-benzylidene and 4-pyrrolidinyl-benzylidene, respectively.

Insert here Table IV.

Computational Methods

The results obtained with the computational methods, in the study of antiproliferative activity against the 3-cell lines, were similar to each other. The models presented the following statistical indices: $Q^2 \sim 0.60$; $R^2 \sim 0.80$ and $SDEP \sim 0.70$. We observed good separation between actives and inactives compounds in the three cell lines (Fig. 1).

Insert here figure 1.

The variables highlighted in the studies with the three cell lines differ only in angstroms, but showed that hydrogen bonds acceptors regions are characteristic for the

active compounds. The plot weight, obtained in the study with the NCI H-292 cell line reflects the behavior observed in all investigations (Fig. 2). Active compounds have greater interaction DRY-DRY (Fig. 3), N1-N1 (Fig. 4) and DRY-N1.

Insert here figure 2.

Insert here figure 3.

Insert here figure 4.

The most active compound (**2r**) was the only one that shows O-N1 interaction (represented by the variable VAR246). In Figure 5 this variable corresponds to an interaction between 4.40 and 4.80 Å.

Insert here figure 5.

CONCLUSIONS

In summary, novel thiophene derivatives substituted with arylidene moiety were synthesized, characterized based on their physical, analytical, and spectral data, and evaluated for their *in vitro* antifungal and antiproliferative activities.

The antifungal studies have revealed that the cycloalkyl[*b*]thiophene derivatives showed moderate antifungal activity, and among them, the most promising compounds are those who have cyclohexyl ring linked to the thiophene ring.

The results of antiproliferative activity indicate that the most active compounds are cycloheptyl[*b*]thiophene derivatives, especially 2-[(1*H*-indol-2-yl-methylidene)amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-cyclohepta[*b*]thiophene-3-carbonitrile (**2r**).

The chemometric tool (PLS) applied in this study generated good exploratory and predictive results. The behavior of the binary PLS was similar in the three human cancer cell lines studied. The descriptors having shape characteristics were strongly correlated with the biological data. The greater weight variables highlight the interactions between the probes DRY-DRY N1-N1, DRY-N1. Hydrogen bonds acceptors regions are characteristic for active compounds and the presence of O-N1 interaction, as found in **2r**, increased the antitumor activity.

It can be concluded that these cycloalkyl[*b*]thiophene derivatives might be considered promising compounds for the discovery of analogues with more potent antifungal and antitumor properties, and the derivatives that showed better antitumor profile can be submitted to *in vivo* anticancer studies as a future perspective.

Acknowledgements

We are indebted to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and UEPB, through the Programa de Incentivo à Pós-Graduação e Pesquisa/PRPGP for financial support. The authors wish to thank the CNPQ and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for the scholarship of Luciana Scotti and Beatriz C. C. Souza.

REFERENCES

1. C. Heyde, I. Zug and H. Hartmann, A simple route to *N,N*-dialkyl derivatives of 2-amino-5-thiophenecarboxylates, *Eur. J. Org. Chem.* **19** (2000) 3273-3278; DOI: 10.1002/1099-0690.
2. T. S. Jagodzinshi, [Thioamides as useful synthons in the synthesis of heterocycles](#), *Chem. Rev.* **103** (2003) 197-228; DOI: 10.1021/cr0200015.
3. K. Doré, S. Dubus, H. A. Ho, I. Lévesque, M. Brunette, G. Corbeil, M. Boissinot, G. Boivin, M. G. Bergeron, D. Boudreau and M. Leclerc, [Fluorescent polymeric transducer for the rapid, simple, and specific detection of nucleic acids at the zeptomole level](#), *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 4240-4244; DOI: 10.1021/ja038900d.
4. Z. Puterová, A. Krutošíková and D. Végh, Applications substituted 2-aminothiophenes in drug design, *Nova Biotechnologica* **9** (2009) 167-173.
5. D. M. Barnes, A. R. Haight, T. Hameury, M. A. McLaughlin, J. Mei, J. S. Tedrowy and J. D. R. Toma, New conditions for the synthesis of thiophenes via the Knoevenagel/Gewald reaction sequence. Application to the synthesis of a multitargeted kinase inhibitor, *Tetrahedron* **62** (2006) 11311–11319; DOI:10.1016/j.tet.2006.07.008.
6. Z. Puterová, A. Krutošíková and D. Végh, Gewald reactions: synthesis, properties and applications of substituted 2-aminothiophenes, *Arkivoc.* **i** (2010) 209-246.
7. M. K. Parai, G. Panda, V. Chaturvedi, Y. K. Manju and S. Sinha, Thiophene containing triarylmethanes as antitubercular agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** (2008) 289–292; DOI:10.1016/j.bmcl.2007.10.083.
8. K. Balamurugan, S. Perumal, A. S. K. Reddy, P. Yogeewari and D. Sriram, A facile domino protocol for the regioselective and discovery of novel 2-amino-5-arylthieno-[2,3-

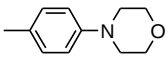
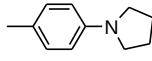
- b*]thiophenes as antimycobacterial agents, *Tetrahedron Lett.* **50** (2009) 6191-6195; DOI: 10.1016/j.tetlet.2009.08.085.
9. I. M. I. Fakhr, M. A. A. Radwan, S. El-Batran, M. E. Omar, A. El-Salam and S. M. El-Shenawy, Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted benzo[*b*]thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 1718-1725; DOI: 10.1016/j.ejmech.2008.02.034.
 10. P. G. Baraldi, M. G. Pavani, E. Leung, A. R. Moorman, K. Varani, F. Vincenzi, P. A. Boreac and A. R. Romagnoli, Synthesis and biological characterization of [³H](2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophen-3-yl)-(4-chlorophenyl)-methanone, the first radiolabelled adenosine A1 allosteric enhancer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 1402-1404; DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.11.037.
 11. S. M. I. Badr, Synthesis and anti-inflammatory activity of novel 2,5-disubstituted thiophene derivatives, *Turk. J. Chem.* **35** (2011) 131-143; DOI: 10.3906/kim-1001-473.
 12. A. M. Isloor, B. Kalluraya and K. S. Pai, Synthesis, characterization and biological activities of some new benzo[*b*]thiophene derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 825–830; DOI: 10.1016/j.ejmech.2009.11.015.
 13. M. J. R. P. Queiroz, I. C. F. R. Ferreira, Y. Caetano, G. Kirsch, R. C. Calhelha and L. M. Estevinho, Synthesis and antimicrobial activity studies of orthochlorodiarylamines and heteroaromatic tetracyclic systems in the benzo[*b*]thiophene series, *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2006) 6827–6831; DOI: [10.1016/j.bmc.2006.06.035](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.06.035).
 14. F. Arhin, O. Bélanger, S. Ciblat, M. Dehbi, D. Delorme, E. Dietrich, D. Dixit, Y. Lafontaine, D. Lehoux, J. Liu, G. A. McKay, G. Moeck, R. Reddy, Y. Rose, R. Srikumar, K. S. E. Tanaka, D. M. Williams, P. Gros, J. Pelletier, T. R. Parr and A. R. Fara, A new class of small molecule RNA polymerase inhibitors with activity against Rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2006) 5812–5832; DOI:10.1016/j.bmc.2006.05.035.
 15. A. E. G. E. Amr, M. H. Sherif, M. G. Assy, M. A. Al-Omar and I. Raga, Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives

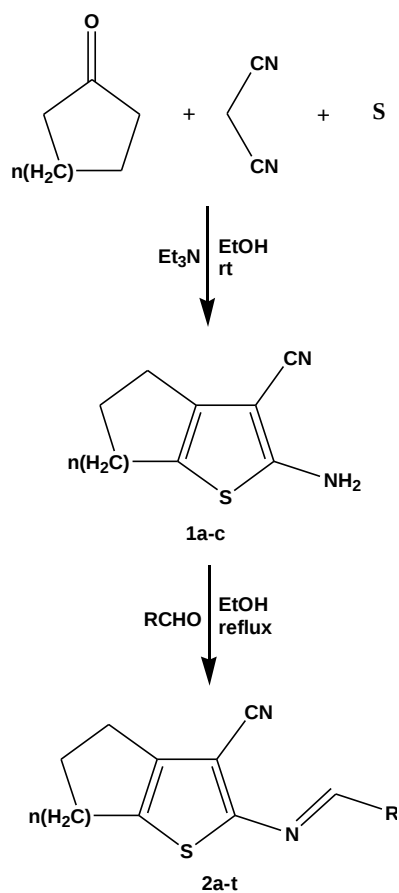
- synthesized from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-*N*-phenylbenzo[*b*]thiophene-3-carboxamide, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 5935-5942; DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.09.059.
16. M. Gütschow, L. Kuerschner, U. Neumann, M. Pietsch, R. Löser, N. Koglin and K. Eger, 2-(Diethylamino)thieno[1,3]oxazin-4-ones as stable inhibitors of human leukocyte elastase, *J. Med. Chem.* **42** (1999) 5437-5447; DOI: 10.1021/jm991108w.
 17. M. Gütschow and U. Neumann, Novel thieno[2,3-*d*][1,3]oxazin-4-ones as inhibitors of human leukocyte elastase. *J. Med. Chem.* **41** (1998) 1729-1740; DOI: 10.1021/jm9708341.
 18. A. B. Pinkerton, T. T. Lee, T. Z. Hoffman, Y. Wang, M. Kahraman, T. G. Cook, D. Severance, T. C. Gahman, S. A. Noble, A. K. Shiau and R. I. Davis, Synthesis and SAR of thiophene containing kinesin spindle protein (KSP) inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17** (2007) 3562-3569; DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.04.076.
 19. G. Nikolakopoulos, H. Figler, J. Linden and P. J. Scammells, 2-aminothiophene-3-carboxylates and carboxamides as adenosine A1 receptor allosteric enhancers, *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2006) 2358-2365; DOI: 10.1016/j.bmc.2005.11.018.
 20. L. Aurelio, C. Valant, H. Figler, B. L. Flynn, J. Linden, P. M. Sexton, A. Christopoulos and P. J. Scammells, 3- and 6-Substituted 2-amino-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-*c*]pyridines as A1 adenosine receptor allosteric modulators and antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 7353--7361; DOI: 10.1016/j.bmc.2009.08.024.
 21. G. N. Fergusson, C. Valant, J. Horne, M. Figler, B. L. Flynn., J. Linden, D. K. Chalmers, P. M. Sseton., A. Christopoulos and P. J. Scammells, 2-Aminothienopyridazines as novel adenosine A1 receptor allosteric modulators and antagonists. *J. Med. Chem.* **51** (2008) 6165-6172; DOI: 10.1021/jm800557d.
 22. E. Pinto, M. J. R. P. Queiroz, L. A. Vale-Silva, J. F. Oliveira, A. Begouin, J. M. Begouin and G. Kirsch, Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[*b*]thiophene moiety. *Bioorg. Med. Chem.* **16** (2008) 8172–8177; DOI: 10.1016/j.bmc.2008.07.042.

23. I. C. F. R. Ferreira, R. C. Calhelha, L. M. Estevinho and M. J. R. P. Queiroz, Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[*b*]thiophene series: a structure–activity evaluation study. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14** (2004) 5831–5833; DOI: 10.1016/j.bmc.2008.07.042.
24. F. J. B. Mendonça Junior, R. G. Lima-Neto, T. B. Oliveira, M. C. A. Lima, I. R. Pitta, S. L. Galdino, R. M. D. Cruz, R. S. A. Araújo and R. P. Neves, Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives, *Lat. Am. J. Pharm.* **30** (2011) *in press*.
25. C. K. Ryu, S. K. Lee, J. Y. Han, O. J. Jung, J. Y. Lee and S. H. Jeong, Synthesis and antifungal activity of 5-arylamino-4,7-dioxobenzo[*b*]thiophenes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15** (2005) 2617–2620; DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.03.042.
26. R. Romagnoli, P. G. Baraldi, M. D. Carrion, C. L. Cara, D. Preti, F. Fruttarolo, M. G. Pavani, M. A. Tabrizi, M. Tolemeo, S. Grimaudo, A. Cristina, J. Balzarini, J. A. Hadfield and A. Brancale, E. Hamel, Synthesis and biological evaluation of 2- and 3-aminobenzo[*b*]thiophene derivatives as antimitotic agents and inhibitors of tubulin polymerization. *J. Med. Chem.* **50** (2007) 2273–2277; DOI: 10.1021/jm070050f.
27. P. Dalemagne, L. P. Khanh, A. Alsai-Di, I. Varlet, V. Collot, M. Paillet, R. Bureau and S. Rault, Synthesis and biological evaluation of five-membered heterocycles fused to cyclopenta[*c*]thiophene as new antitumor agents, *Bioorg. Med. Chem.* **11** (2003) 1161–1167; DOI: 10.1016/S0968-0896(02)00654-5.
28. I. Jarak, G. Pavlović and G. Karminski-Zamola, Potentially biologically active new substituted anilides of benzo[2,3-*b*]thiophene series, *Struct. Chem.* **18** (2007) 103–111; DOI: 10.1007/s11224-006-9135-9.
29. NCCLS, National Committee for Clinical and Laboratory Standards: *Method M27-A2*, Wayne 2002, pp. 1-29.
30. P. S. Nascente, A. R. M. Meinerz, R. O. Faria, L. F. D. Schuch, M. C. A. Meireles and J. R. B. de Mello, CLSI broth microdilution method for testing susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to thiabendazole, *Braz. J. Microbiol.* **40** (2009) 222–226.

31. J. A. Barnett, R. W. Paire and D. Yarrow, "*Yeasts: Characteristics and Identification*", Cambridge University Press, Cambridge 2000.
32. J. N. Eloff, A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria, *Planta Med.* **64** (1978) 711-713; DOI: 10.1055/s-2006-957563.
33. E. L. Souza, T. L. M. Stamford, E. O. Lima and V. N. Trajano, Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts, *Food Control* **18** (2007) 409 – 413; DOI: [10.1016/j.foodcont.2005.11.008](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.008).
34. M. C. Alley, D. A. Scudiero, P. A. Monks, M. L. Hursey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbott, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker and M. R. Boyd, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res.* **48** (1988) 589-601.
35. M. R. Boyd and K. D. Paull, Some practical considerations and applications of the national cancer institute *in vitro* anticancer discovery screen, *Drug Develop. Res.* **34** (1995) 91-109; DOI: 10.1002/ddr.430340203.
36. M. Kožurková, D. Sabolová, L. Janovec, J. Mikeš, J. Koval, J. Ungvarský, M. Štefanišinová, P. Federočko, P. Kristian and J. Imrich, Cytotoxic activity of proflavine diureas: synthesis, antitumor, evaluation and DNA binding properties of 1',1''-(acridin-3,6-diyl)-3',3''-dialkyldiureas, *Bioorg. Med. Chem.* **16** (2008) 3976-3984; DOI: 10.1016/j.bmc.2008.01.026.
37. N. L. Allinger, A hydrocarbon force-field utilizing V1 and V2 torsional terms, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 8127-8134; DOI: 10.1021/ja00467a001.
38. Spartan Model Homepage for Windows, available at: http://www.wavefun.com/products/windows/SpartanModel/win_model.html access on 10/02/2011.
39. M. J. S. E. Dewar, G. Zoebisch, E. F. Healy and J. J. P. Stewart, AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model, *J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985) 3902-3909; DOI: 10.1021/ja00299a024.

40. N. C. Cohen, *Guidebook on molecular modeling in drug design*, Academic Press, San Diego 1996, p. 361.
41. A. R. Leach, *Molecular Modeling: Principles and Applications*, Prentice Hall, England 2001, pp. 26-558.
42. Pentacle, available at: http://www.moldiscovery.com/soft_pentacle.php access on 10/01/2001.
43. A. A. Abu-Hashem, M. F. El-Shehry and F. A. Badria, Design and synthesis of novel thiophenecarbohydrazide, thienopyrazole and thienopyrimidine derivatives as antioxidant and antitumor agents, *Acta Pharm.* **60** (2010) 311-323; DOI: 10.2478/v10007-010-0030-y.
44. J. D. Ramanathan, D. G. Namboothiri, G. F. Shah, A. V. Radhakrishnan, H. J. Mehta and A. C. Padhya, Biological activity of some 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]thiophenes and their derivatives, *J. Indian Chem. Soc.* **55** (1978) 822-825.
45. F. B. Holetz, G. L. Pessini, N. R. Sanches, D. A. G. Cortez, C. V. Nakamura and B. P. Dias-Filho, Screening of some plants used in the brazilian folk for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **7** (2007) 1027-1031.
46. P. J. Houghton, M. J. Howea, C. C. Lee and G. Steventon, Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant, *J. Ethnopharmacol.* **110** (2007) 391-400; DOI: [10.1016/j.jep.2007.01.032](https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.032).
47. C. A. Boateng, S. V. K. Eyunni, X, Y. Zhu, J. R. Etukala, B. A. Bricker, M. K. Ashfaq, M. R. Jacob, S. I. Khan, L. A. Walker and S. Y. Ablordeppey, Synthesis and evaluation against opportunistic fungal pathogens, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 458–470; DOI: 10.1016/j.bmc.2010.11.008.

Compound	n	R	R'
1a	1	-	-
1b	2	-	-
1c	3	-	-
2a	1	-	H
2b	3	-	H
2c	1	-	4-Cl
2d	2	-	4-Cl
2e	3	-	4-Cl
2f	1	-	4-Br
2g	2	-	4-Br
2h	3	-	4-Br
2i	2	-	4-F
2j	2	-	4-OCH ₃
2k	2	-	4-OBz
2l	3	-	4-NO ₂
2m	3	-	4-CH ₃
2n	3	-	4-Et
2o	3	-	4- <i>i</i> Pr
2p	2		-
2q	2		-
2r	3		-
2s	1		-
2t	2		-
2u	3		-
2v	1		-
2w	2		-
2x	3		-



Scheme 1

Table I. Physical and HRMS data of **2h,i,k-x**

Compd.	Yield (%)	M. p. (°C)	Molecular formula (Exact mass)	HRMS m/z (ES+) [M+H] ⁺
2h	87	144	C ₁₇ H ₁₅ BrN ₂ S (358.0139)	360.0940
2i	65	93-95	C ₁₆ H ₁₃ FN ₂ S (284.0783)	285.0903
2k	92	140-142	C ₂₃ H ₂₀ N ₂ OS (372.1296)	373.1119
2l	90	126	C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₂ S (325.0884)	326.0718
2m	92	88-90	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ S (294.1190)	295.1067
2n	84	94-95	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ S (308.1347)	309.1455
2o	70	93-95	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ S (322.1503)	323.1641
2p	74	159-160	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ OS (351.1405)	352.1217
2q	18	211	C ₂₀ H ₂₁ N ₃ S (335.1456)	336.1291
2r	90	180-182	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ S (319.1143)	320.1003
2s	67	200-202	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ S (303.0830)	302.0767
2t	53	175-177	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ S (317.0986)	318.1099
2u	79	204-206	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ S (331.1143)	332.1270
2v	81	174-175	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ S ₂ (258.0285)	281.0148 ^a
2w	88	123-125	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ S ₂ (272.0441)	273.0399
2x	76	115-117	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ S ₂ (286.0598)	309.0227 ^a

^a [M+Na]⁺.Table II. Spectral data of **2h,i,k-x**

Comp d.	IR (KBr) ($\nu_{\max}$, cm^{-1})	^1H NMR (δ ppm) ^a	^{13}C NMR (δ ppm) ^a
2h	CH (2916) CN (2223)	1.64-1.74 (m, 4H, CH ₂), 1.84-1.88 (m, 2H, CH ₂), 2.76-2.81 (m, 4H, CH ₂), 7.58 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.78 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-H), 8.34 (s, 1H, CH=N)	157.1, 140.3, 136.7, 133.9, 132.1, 130.5, 126.8, 114.9, 109.7, 31.9, 30.6, 29.1, 27.7, 27.0
2i	CH (2940) CN (2222)	1.84-1.90 (m, 4H, CH ₂), 2.63-2.70 (m, 4H, CH ₂), 7.12 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.91 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-H), 8.36 (s, 1H, CH=N)	166.8, 163.5, 159.4, 157.3, 135.1, 132.5, 131.5, 131.4, 116.2, 115.9, 114.4, 107.0, 25.1, 24.2, 23.0, 21.9
2k	CH (2938) CN (2218)	1.73-1.89 (m, 4H, CH ₂), 2.62-2.69 (m, 4H, CH ₂), 5.12 (s, 2H, OCH ₂), 7.03 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar- H), 7.34-7.46 (m, 5H, Ar-H), 7.87 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-H), 8.32 (s, 1H, CH=N)	162.1, 160.4, 158.2, 136.0, 134.7, 131.5, 131.3, 128.6, 128.1, 128.1, 127.4, 115.1, 114.6, 105.8, 70.0, 25.0, 24.2, 23.0, 21.9
2l	CH (2929) CN (2220)	1.66-1.75 (m, 4H, CH ₂), 1.85-1.89 (m, 2H, CH ₂), 2.79-2.82 (m, 4H, CH ₂), 8.06 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-H), 8.28 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-H), 8.43 (s, 1H, CH=N)	155.8, 155.0, 149.3, 140.9, 140.4, 138.6, 129.6, 123.9, 114.5, 111.4, 31.8, 30.7, 29.0, 27.6, 26.9
2m	CH (2912) CN (2222)	1.69 (m, 4H, CH ₂), 1.86 (m, 2H, CH ₂), 2.41 (s, 3H, CH ₃), 2.78 (m, 4H, CH ₂), 7.25 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.81 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 8.38 (s, 1H, CH=N)	158.8, 158.1, 143.0, 139.9, 135.7, 132.5, 129.5, 129.3, 115.0, 108.7, 31.9, 30.5, 29.1, 27.7, 27.1, 21.7
2n	CH (2928) CN (2216)	1.26 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH ₃), 1.64-1.74 (m, 4H, CH ₂), 1.84-1.88 (m, 2H, CH ₂), 2.73 (q, 2H, J = 7.5 Hz, CH ₂), 2.75-2.81 (m, 4H, CH ₂), 7.28 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.84 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 8.39 (s, 1H, CH=N)	158.8, 158.1, 149.3, 139.9, 135.7, 132.7, 129.5, 128.4, 115.0, 108.7, 31.9, 30.5, 29.1, 29.0, 27.8, 27.1, 15.2
2o	CH (2927) CN (2216)	1.72 (d, 6H, J = 6.9 Hz, CH ₃), 1.63-1.73 (m, 4H, CH ₂), 1.83-1.91 (m, 2H, CH ₂), 2.75-2.81 (m, 4H, CH ₂), 2.96 (h, 1H, J = 6.9 Hz, CH), 7.31 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.84 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H), 8.38 (s, 1H, CH=N)	158.7, 158.1, 153.8, 139.9, 135.6, 132.8, 129.4, 126.9, 115.0, 108.7, 34.2, 31.9, 30.5, 29.0, 27.7, 27.0, 23.6
2p	CH (2945) CN (2213)	1.80-1.88 (m, 4H, CH ₂), 2.61-2.67 (m, 4H, CH ₂), 3.30 (t, 4H, J = 4.8 Hz, NCH ₂), 3.84 (t, 4H, J = 4.8 Hz, OCH ₂), 6.88 (d, 2H, J = 9 Hz, Ar-H), 7.80	161.1, 158.3, 153.7, 134.5, 131.1, 130.8, 125.6, 114.9, 113.9, 105.0, 66.4, 47.4, 25.0,

		(d, 2H, $J = 9$ Hz, Ar-H), 8.26 (s, 1H, CH=N)	24.2, 23.0, 21.9				
2q	CH (2928)	1.85 (m, 4H, CH ₂), 2.07 (m, 4H, CH ₂), 2.66 (m, 4H, CH ₂), 3.43 (m, 4H, CH ₂), 6.62 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 7.94 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 8.30 (s, 1H, CH=N)	198.3, 134.5, 111.2, 25.3, 24.9, 24.3, 23.1, 22.0	190.2, 133.1, 115.0, 47.6, 25.4,	158.3, 112.3,	151.6, 112.3,	
	CN (2212)						
2r	CH (2911)	1.65-1.72 (m, 4H, CH ₂), 1.84-1.88 (m, 2H, CH ₂), 2.75-2.82 (m, 4H, CH ₂), 7.29-7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.67 (d, 1H, $J = 3$ Hz, Ar-H), 8.60 (s, 1H, CH=N)	160.5, 133.5, 123.0, 111.3, 27.9, 27.2	153.4, 132.1, 122.7, 106.7, 32.0, 30.5, 29.1,	139.3, 124.8, 116.0, 115.7,	136.9, 124.2,	
	CN (2220)						
2s	CH (2924)	2.48 (q, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH ₂), 2.91 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH ₂), 2.99 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH ₂), 7.79 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, Ar-H), 7.87 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, Ar-H), 8.08 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, Ar-H), 8.40 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 8.95 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 8.02 (s, 1H, CH=N), 9.03 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, Ar-H)	163.5, 145.3, 129.7, 122.1, 27.3	154.3, 140.1, 128.3, 114.3, 104.7, 30.2, 28.0,	150.0, 137.1, 125.2, 123.9,	149.0, 130.2,	
	CN (2220)						
2t	CH (2937)	1.82-1.88 (m, 4H, CH ₂), 2.65-2.74 (m, 4H, CH ₂), 7.91 (d, 2H, $J = 6$ Hz, Ar-H), 8.90 (t, 2H, $J = 11.2$ Hz, Ar-H), 8.95 (s, 1H, CH=N), 9.02 (d, 2H, $J = 6$ Hz, Ar-H)	158.4, 137.1, 129.7, 122.1, 22.9, 21.8	155.5, 135.8, 128.2, 114.0, 109.2, 25.3, 24.2,	150.0, 134.8, 125.2, 123.9,	149.0, 130.2,	
	CN (2217)						
2u	CH (2930)	1.69-1.72 (m, 4H, CH ₂), 1.88 (m, 2H, CH ₂), 2.79-2.82 (m, 4H, CH ₂), 7.66-7.79 (m, 2H, Ar-H), 7.84 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 8.17 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, Ar-H), 8.90 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 8.93 (s, 1H, CH=N), 9.00 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, Ar-H)	156.3, 140.8, 129.7, 122.0, 29.0, 27.6, 26.9	155.1, 138.7, 128.2, 114.5, 111.4, 31.8, 30.7,	149.8, 137.2, 125.2, 123.9,	148.8, 130.0,	
	CN (2219)						
2v	CH (2960)	2.36-2.45 (m, 2H, CH ₂), 2.80-2.92 (m, 4H, CH ₂), 6.81 (dd, 1H, $J = 1.5, 3.6$ Hz, Ar-H), 7.11 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, Ar-H), 7.64 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, Ar-H), 8.25 (s, 1H, CH=N)	164.9, 144.8, 112.9, 101.6, 30.1, 28.1, 27.2	151.2, 137.4, 118.0, 114.7,	146.9, 145.2,		
	CN (2220)						
2w	CH (2936)	1.82-1.91 (m, 4H, CH ₂), 2.63-2.69 (m, 4H, CH ₂), 6.58 (dd, 1H, $J = 1.5, 3.3$ Hz, Ar-H), 7.11 (d, 1H, $J = 3.3$ Hz, Ar-H), 7.65 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, Ar-H), 8.23 (s, 1H, CH=N)	159.7, 135.3, 112.9, 106.1, 25.1, 24.2, 22.9, 21.9	151.3, 132.3, 117.8, 114.3,	146.9, 146.3,		
	CN (2213)						

2x	CH (2929)	1.62-1.72 (m, 4H, CH ₂), 1.82-1.86 (m, 2H, CH ₂), 2.74-2.79 (m, 4H, CH ₂), 6.57 (dd, 1H, J = 1.5, 3.6 Hz, Ar-H), 7.10 (d, 1H, J = 3.6 Hz, Ar-H),	157.7, 151.2, 146.8, 146.1, 140.3, 136.0, 117.7, 114.9,
	CN (2215)	7.64 (d, 1H, J = 1.5 Hz, Ar-H), 8.23 (s, 1H, CH=N)	112.8, 108.4, 31.9, 30.4, 29.1, 27.7, 27.0

^a CDCl₃.

Table III. Antifungal activity of the synthesized compounds

Compd.	MIC (μg/mL)	
	<i>C. neoformans</i>	<i>C. krusei</i>
2a	512	1024
2b	-	-
2c	-	-
2d	128	-
2e	-	-
2f	-	-
2g	128	1024
2h	-	-
2i	-	512
2j	128	1024
2k	128	512
2l	-	512
2m	128	-
2n	-	-
2o	128	-

2r	256	1024
2s	-	1024
2t	64	512
2u	64	-
2v	128	-
2w	-	-
2x	-	-

- No inhibition.

Table IV. Antiproliferative activity of the synthesized compounds

Compd.	Inhibition (%) (25 µg/mL) ^a		
	HT29	NCI H-292	HEP
2b	11.1 ± 2.7	30.4 ± 1.1	20.8 ± 6.4
2d	24.9 ± 3.8	24.2 ± 5.5	1.6 ± 1.0
2e	0.0 ± 0.0	29.5 ± 3.4	0.0 ± 3.1
2h	11.3 ± 4.8	23.5 ± 1.2	11.3 ± 0.4
2i	53.7 ± 1.9	50.9 ± 4.0	95.4 ± 0.0
2j	4.9 ± 0.6	18.4 ± 0.2	3.7 ± 4.8
2m	11.0 ± 0.6	25.8 ± 1.1	22.1 ± 0.5
2n	61.6 ± 2.0	42.5 ± 2.7	57.3 ± 5.0
2o	28.9 ± 1.5	45.7 ± 3.3	71.0 ± 3.9
2r	100.0 ± 0.5	100.0 ± 0.0	97.5 ± 2.5

2w	34.7 ± 0.7	33.9 ± 3.8	24.1 ± 2.7
2x	25.0 ± 2.0	27.9 ± 2.7	52.6 ± 2.9

^a Data are expressed as the mean $\pm$ SE from the dose-response profile of three independent experiments.

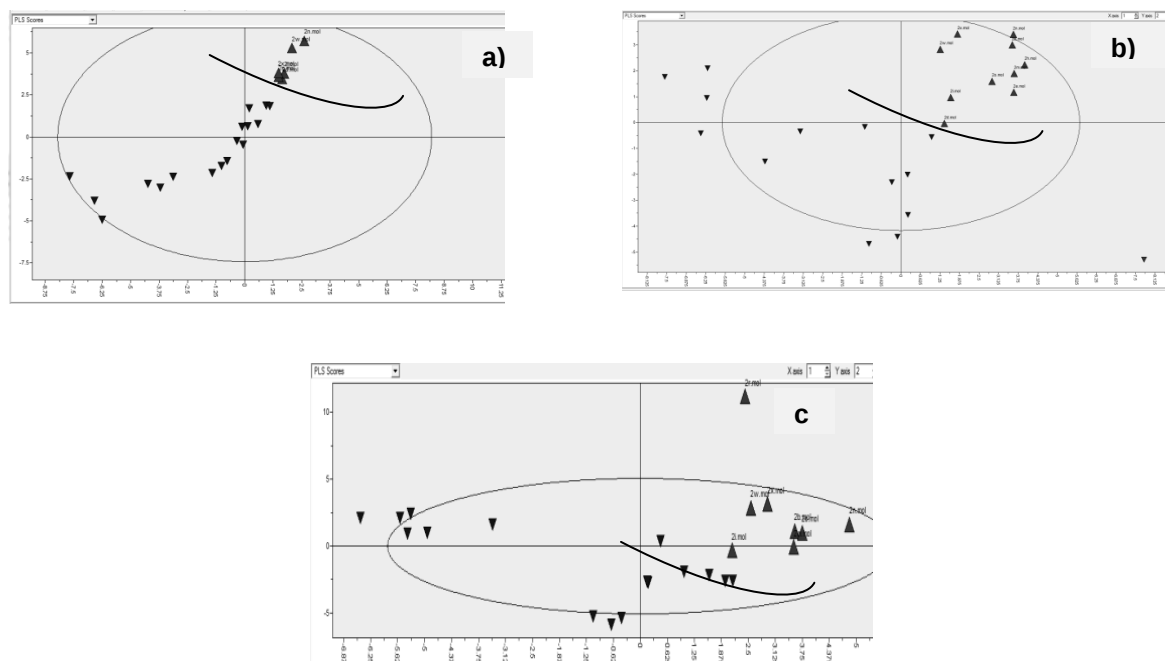


Fig. 1. Distribution and separation between actives (triangle up) and inactive (triangle down) compounds against the investigated cell lines. a) HT 29 cell line b) NCI H-292 cell line and c) HEP cell line.

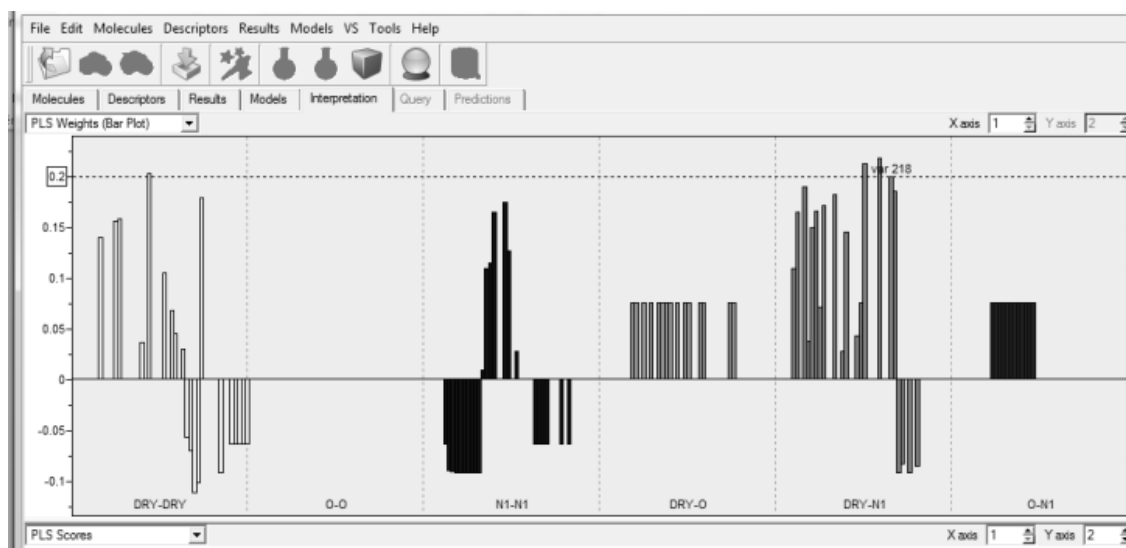


Fig. 2. Behavior of the weight of the blocks of variables observed in the three cell lines.

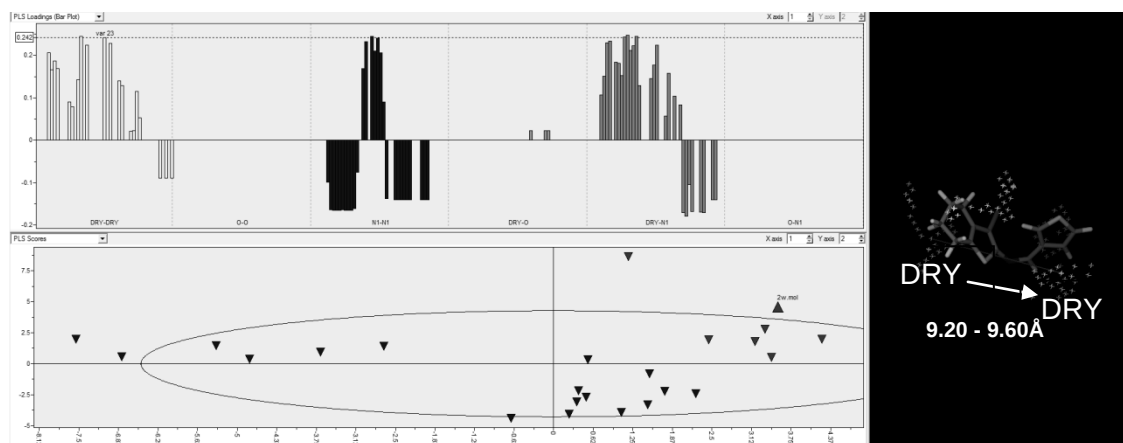


Fig. 3. Representation of active compound **2w** emphasizing and representing the interaction DRY-DRY, VAR23.

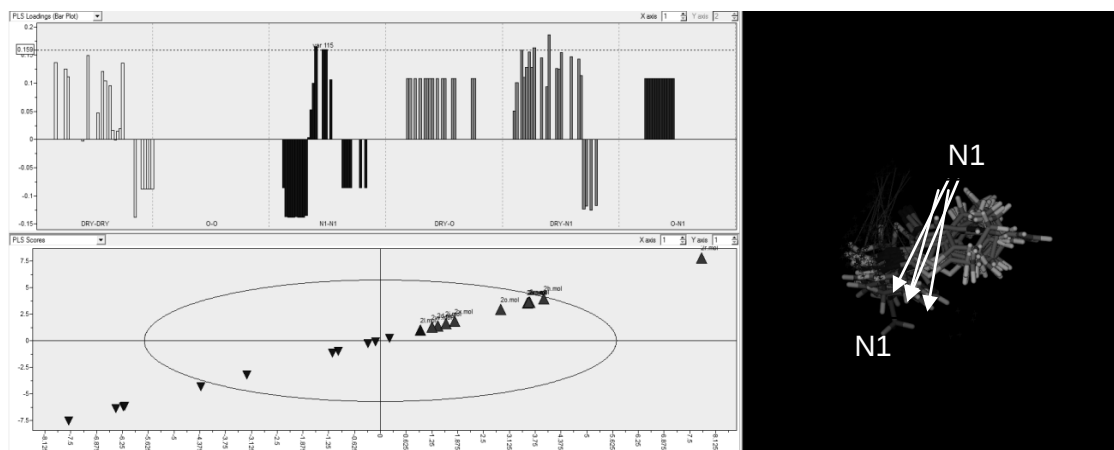


Fig. 4. Alignment of active compounds, and N1-N1 interactions observed in all active compounds.

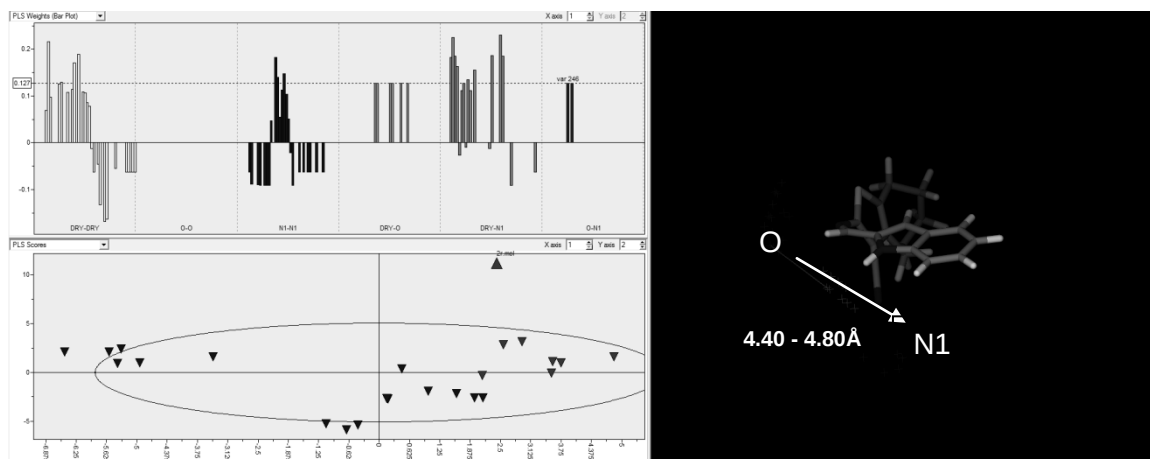


Fig. 5. Disclosure of O-N1 interaction, VAR 246, in the most active compound (**2r**).