

Larissa Sens

Síntese, caracterização e análises farmacológicas de novos derivados de tiossemicarbazonas e amidas: um estudo de correlação estrutura-atividade

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Co-orientadora: Dr.^a Alessandra Mascarello

FLORIANÓPOLIS
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sens, Larissa

Síntese, caracterização e análises farmacológicas
de novos derivados de tiossemicarbazonas e amidas:

um estudo de correlação estrutura-atividade /
Larissa Sens ; orientador, Ricardo José Nunes,
coorientador, Alessandra Mascarello, 2018.

293 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Química. 2. Química. 3. Química Medicinal. 4.
Síntese orgânica. I. Nunes, Ricardo José. II.
Mascarello, Alessandra. III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Química. IV. Título.

Larissa Sens

Síntese, caracterização e análises farmacológicas de novos derivados de tiossemicarbazonas e amidas: um estudo de correlação estrutura-atividade

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutora em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 08 de março de 2018.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Orientador
(QMC-UFSC)

Prof. Dr. Luiz Carlos Klein Junior
(UNIVALI)

Prof. Dr. Ricardo Ferreira Affeldt
(QMC-UFSC)

Prof. Dr. Rogério Correa
(UNIVALI, Relator)

*Este trabalho é dedicado à minha mãe
em retribuição ao apoio e amor
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

O Doutorado foi um período de muito aprendizado profissional e pessoal. Como em todo aprendizado passei por momentos difíceis, mas muitos momentos alegres e divertidos. Só foi possível chegar até aqui porque foram muitas as pessoas que me ajudaram profissionalmente, pessoalmente e mentalmente. Então, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

Á Deus e a minha fé, que sempre foram o meu suporte nos momentos difíceis.

Á minha mãe, que sempre foi o meu maior exemplo de mulher, que me inspira a ser uma mulher forte, determinada e independente, que está ao meu lado em todos os momentos, que é a minha base, que é minha melhor amiga, que é a melhor mãe do mundo. Obrigada por todo o seu amor e compreensão.

Ao Filipy, que sempre está ao meu lado, me auxiliando e me dando força nos momentos difíceis. Obrigada por trazer leveza aos meus dias. Obrigada por todo o amor, companheirismo e compreensão.

Á toda a minha família que sempre me apoiou e me deu força.

Ao meu orientador, Prof. Ricardo José Nunes, por todo o tempo de aprendizado, por todas as experiências, por todas as oportunidades que me foram dadas e me fizeram crescer muito profissionalmente e pessoalmente. O doutorado acaba, mas o carinho imenso que tenho por você ficará. Obrigada.

Ao Prof. Rosendo Augusto Yunes, pela parceria em trabalhos, pela compreensão e pelas oportunidades que me foram dadas.

Á minha coorientadora Alessandra Mascarello, por todo tempo dedicado, por todo auxílio, por sempre tirar todas as minhas dúvidas.

Ao LEAT: Lucas, Dalila Single, Dalila Venzke, Jéssica Berens, Luiz, Jéssica Toigo, Patrícia por todas as contribuições científicas, por todo auxílio, pelos bons papos, pelas boas risadas, pelo chamas, pela amizade. Vocês deixam meus dias mais divertidos. Obrigada pessoal. Em especial, quero agradecer ao Lucas, por ter sido além de um IC um amigo, por ter me dado à oportunidade de auxiliá-lo na sua jornada no laboratório, espero que tenha sido um período de grande aprendizado assim como foi para mim.

Ao Prof. Hernán Terenzi, por ter aberto as portas do CEBIME e me dado à oportunidade de trabalhar na bioquímica realizando os testes com os inibidores de fosfatases. Sem dúvida foi uma experiência muito valiosa e enriquecedora. Muito obrigada.

Á Ana, que me ensinou e me ensina tudo referente aos testes realizado no CEBIME. Sou muito grata por todo auxílio que me deu e pela amizade que construímos, te admiro pela pessoa que é. Muito Obrigada por tudo.

Ás meninas do CEBIME: Ruth, Vânia, Ângela, Natália pelas contribuições científicas e pelos bons papos. Sou muito grata.

Ao Prof. Aldo Sena pela parceria em trabalhos, pelo tempo dedicado, pelas contribuições científicas.

Ao Prof. Mario Steindel pela parceria em trabalhos. Agradeço também a aluna Daniela que me auxilia nas dúvidas.

Ao Departamento de Química da UFSC e a Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Por último, mas não menos importante. Quero agradecer a todos os meus amigos, que foram e são fundamentais no meu caminho. Graças á Deus eu tenho bons amigos, aqueles que não estão diretamente ligados a esta tese não irei citar, mas agradeço igualmente por sempre torcerem pelo meu sucesso e me apoiarem.

O doutorado e Florianópolis me presentearam com alguns bons amigos e sou muito grata a isso. Primeiramente, quero agradecer a Laís e ao Tizzi, que juntamente com o Filipy, me proporcionaram boas horas na mesa do bar com muita conversa e muita risada, foi o começo de um ciclo de amizade que é muito importante para mim. Depois a esse grupo chegou o Leko, a Pri e o Nicolas que só vieram a acrescentar, a somar na amizade, no carinho, nas festas, nas histórias. A todos vocês minha enorme gratidão por terem sido como uma segunda família aqui em Floripa.

Continuando, nesse último ano tive a sorte de me aproximar e me tornar amiga da Daiane (mana) e da Venzke (mamis), conviver com vocês é gratificante, nosso dia-a-dia é leve, divertido. Vocês são muito especiais na minha vida, obrigada pela amizade, parceria, pelas conversas sérias e pelas não tão sérias assim. A vocês minha enorme gratidão por fazerem parte da minha história e da minha vida.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese.

"As nuvens sempre passam. Podem ser nuvens claras ou escuras, mas sempre passam. Talvez tenha que chover uma tempestade, mas ela também passa. Compreenda que você não é a nuvem, você é o céu." Sri Prem Baba

RESUMO

Esta tese apresenta o planejamento, síntese, caracterização e avaliação biológica de tiossemicarbazonas e amidas. Nesse trabalho são abordadas quatro diferentes patologias e são divididos em três capítulos de acordo com as doenças alvo: **Capítulo 1-** Tuberculose. **Capítulo 2-** Doença de Alzheimer e **Capítulo 3-** Doenças protozoárias (Doenças de Chagas e Leishmaniose). No **Capítulo 1**, partindo do conhecimento de que a *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose, secreta as proteínas tirosina fosfatases, PtpA e PtpB e a inibição destas enzimas atenua o crescimento de *M. tuberculosis*. Relatamos, pela primeira vez, as tiossemicarbazonas como uma nova classe de inibidores de PtpA. Os compostos foram sintetizados e avaliados biologicamente, revelando inibidores potentes e seletivos. Os ensaios cinéticos enzimáticos mostraram que o composto **34p** é o primeiro inibidor PtpA não competitivo a ser reportado e, portanto, uma molécula de grande interesse. Como não atua no local ativo da enzima, tem melhor seletividade em relação aos muitos homólogos de proteína tirosina-fosfatase. No **Capítulo 2**, é abordada a Doença de Alzheimer, e sabendo que existem diferentes hipóteses para explicar a doença, têm-se procurado moléculas com ações múltiplas capazes de atuar de forma complementar. Nesse sentido, tiossemicarbazonas foram analisadas quanto à potência de inibição de Acetilcolinesterase e à atividade antioxidante. O composto **35j** mostrou ação múltipla, uma propriedade que o torna um potencial agente terapêutico para Doença de Alzheimer. Além disso, estudos quânticos mostraram que os valores de EHOMO foram um indicador melhor da atividade antioxidante do que os valores de ELUMO, enquanto o ELUMO foi um indicador melhor da inibição de Acetilcolinesterase. No **Capítulo 3**, foram estudadas as doenças protozoárias, Doença de Chagas e Leishmaniose, para isso foram sintetizadas amidas baseadas na estrutura da piperlongumina, isso porque há relatos na literatura que esta amida não afeta células normais primárias o que a torna potencial candidato a drogas seletivas. Os compostos obtidos foram investigados quanto a sua ação inibitória *in vitro* frente aos protozoários *T. cruzi* e *L. amazonensis*. O composto mais potente e seletivo encontrado neste estudo foi o **81b** para ambas as doenças protozoárias aqui estudadas.

Palavras-chave: Tiossemicarbazonas. Tuberculose. Doença de Alzheimer. Amidas. Doença de Chagas. Leishmaniose.

ABSTRACT

This thesis presents the planning, synthesis, characterization, and biological evaluation of thiosemicarbazones and amides. This work focuses on four diseases grouped according to their molecular targets into three chapters: **Chapter 1**, “Tuberculosis”; **Chapter 2**, “Alzheimer’s disease”; and **Chapter 3**, “Protozoal diseases (Chagas disease and Leishmaniasis)”. **Chapter 1** is written based on the knowledge that *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis, secretes two protein tyrosine phosphatases, PtpA and PtpB, and that the inhibition of these enzymes attenuates the growth of this microorganism. We report, for the first time, thiosemicarbazones as a novel class of PtpA inhibitors. Compounds were synthesized and biologically evaluated, revealing potent and selective inhibitors. Enzyme kinetic assays showed that compound **34p** is the first non-competitive PtpA inhibitor reported and, therefore, a molecule of great interest. As compound **34p** does not act within the enzyme’s active site, it has a high selectivity over its many protein tyrosine phosphatase homologues. **Chapter 2** focuses on Alzheimer’s disease. Knowing that there are different hypotheses to explain the cause of this disease, we searched for molecules with multiple actions, capable of acting in a complementary way. Accordingly, we evaluated the potency of thiosemicarbazones as acetylcholinesterase inhibitors as well as their antioxidant activity. Compound **35j** was shown to exert multiple actions, a property that makes it a potential therapeutic agent for treatment of Alzheimer’s disease. In addition, quantum studies showed that EHOMO values were a better indicator of antioxidant activity than ELUMO values, whereas ELUMO was a better indicator of acetylcholinesterase inhibitory activity. In **Chapter 3**, two protozoal diseases, Chagas disease and leishmaniasis, are investigated. Amides based on the structure of piperlongumine were synthesized on the basis of literature reports showing that this amide does not affect normal primary cells; this property makes piperlongumine a potential candidate for selective drugs. The synthesized compounds were investigated for their inhibitory action *in vitro* against the protozoa *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. Compound **81b** was the most potent and selective amide against the two protozoa studied.

Keywords: Thiosemicarbazones. Tuberculosis. Alzheimer’s disease. Amides. Chagas disease. Leishmaniasis.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismo da formação de tiossemicarbazonas (a) íon oxônio, (b) tiossemicarbazida, (c) hemiaminal protonado, (d) isômero <i>E</i> , (e) isômero <i>Z</i>	87
Esquema 2. Representação esquemática da clivagem do substrato <i>p</i> NPP realizada pelas fosfatases.	93
Esquema 3. Esquema com o K_i de alguns derivados de benzanilida relatados na literatura.	96
Esquema 4. Síntese das amidas 81a-c , 82a-c e 83a-c	135
Esquema 5. Mecanismo da reação das amidas utilizando EDC (a) ácido carboxílico, (b) carbodiimida, (c) derivado de ureia <i>O</i> -acilado, (d) DMAP, (e) ureia, (f) intermediário reativo, (g) amina e (h) amida.	144

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da Salicina (1) e do Ácido acetil-salicílico (2).....	37
Figura 2. Etapas envolvidas no desenvolvimento de um fármaco.	38
Figura 3. Fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento da tuberculose.	48
Figura 4. Fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento da tuberculose.	49
Figura 5. Inibidores de PtpA e PtpB descritos na literatura.	51
Figura 6. Inibidores de PtpA e PtpB estudados pelo nosso grupo de pesquisa.	52
Figura 7. Inibidores potentes e seletivos de PtpA e PtpB.....	52
Figura 8. Estrutura química geral das tiossemicarbazonas.....	53
Figura 9. Conformações (a) <i>anti</i> (b) <i>sin</i>	53
Figura 10. Equilíbrio tautomérico das tiossemicarbazonas (a) forma tiureia (b) forma tiol.....	54
Figura 11. Análise retrossintética das tiossemicarbazonas (a) tiossemicarbazonas, (b) aldeídos ou cetonas, (c) tiossemicarbazida, (d) hidrazina, (e) ácidos tiocarbamoiltioglicólicos, (f) dissulfeto de carbono, (g) azidas ou aminas primárias, (h) ditiocarbamatos, (i) isotiocianatos.....	55
Figura 12. Estrutura química geral das 2-acetilpiridina-tiossemicarbazonas.....	55
Figura 13. Estrutura química de tiossemicarbazonas promissoras.	56
Figura 14. Inibidor de tirosinase 26 e Inibidor de urease 27	57
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 32	85
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 32	86
Figura 17. Isômeros <i>E</i> e <i>Z</i> das tiossemicarbazonas.	90
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35I	91
Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35I	91
Figura 20. Espectro de HETCOR do composto 35I	92
Figura 21. Expansão do espectro de HETCOR do composto 35I	93
Figura 22. Estruturas das tiossemicarbazonas mais ativas neste trabalho.	95
Figura 23. Gráfico de Michaelis-Menten do composto 34p frente à PtpA.	98

Figura 24. Estrutura química dos medicamentos utilizados para a DA.	104
Figura 25. Tiossemicarbazonas derivadas (a) do 5-metoxisalicilaldeído e (b) do 2-hidroxi-1-naftaldeído.	106
Figura 26. <i>N</i> -(tetra- <i>O</i> -acetil- β - <i>D</i> -galactopiranosila) tiossemicarbazonas.	106
Figura 27. Tiossemicarbazonas derivadas da cumarina.	107
Figura 28. (a) Estrutura geral das 4-(1-benzilpiperidina-4-il)tiossemicarbazona (b) PBPT.	107
Figura 29. Reação de Griess.	112
Figura 30. Reação da enzima acetilcolinesterase no teste.	114
Figura 31. Band gap para o composto 35j .	116
Figura 32. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .	126
Figura 33. Estrutura química dos fármacos utilizados para tratamento da Doença de Chagas.	127
Figura 34. Ciclo biológico da <i>Leishmania spp.</i>	129
Figura 35. Fármacos para o tratamento da Leishmaniose.	130
Figura 36. Fármacos com o grupo funcional amida em sua estrutura.	132
Figura 37. Amidas derivadas da quinoxalina.	132
Figura 38. Amidas baseadas 3-Nitro-1H-1,2,4-triazol	133
Figura 39. Amida diterpenoide do tipo abietano.	133
Figura 40. Amidas derivadas da quinoxalina 1,4-di- <i>N</i> -óxido.	134
Figura 41. Piperlongumina.	134
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CCl_3) do composto 81a .	145
Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 81a .	146
Figura 44. Estrutura química dos compostos mais ativos para <i>T. cruzi</i> .	147
Figura 45. Estrutura química dos compostos mais ativos para <i>L. amazonensis</i> .	149
Figura 46. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) do composto 31 .	175
Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) do composto 31 .	175
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 32 .	176
Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 32 .	176

Figura 50. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 33 .	177
Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 33 .	177
Figura 52. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 34a .	178
Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 34a .	178
Figura 54. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 34b .	179
Figura 55. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34b .	179
Figura 56. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 34c .	180
Figura 57. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34c .	180
Figura 58. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 34d .	181
Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34d .	181
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 34e .	182
Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 34e .	182
Figura 62. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 34f .	183
Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34f .	183
Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 34g .	184
Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34g .	184
Figura 66. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, pyridine- d_5) do composto 34h .	185
Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34h .	185
Figura 68. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 34i .	186
Figura 69. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34i .	186

Figura 70. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 34j	187
Figura 71. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34j	187
Figura 72. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 34k	188
Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 34k	188
Figura 74. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 34l	189
Figura 75. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34l	189
Figura 76. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 34m	190
Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34m	190
Figura 78. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 34n	191
Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34n	191
Figura 80. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 34o	192
Figura 81. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34o	192
Figura 82. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 34p	193
Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 34p	193
Figura 84. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 34q	194
Figura 85. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 34q	194
Figura 86. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35a	195
Figura 87. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35a	195
Figura 88. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35b	196
Figura 89. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35b	196

Figura 90. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35c.....	197
Figura 91. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMOS- d_6) do composto 35c.....	197
Figura 92. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35d.....	198
Figura 93. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35d.....	198
Figura 94. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35e.....	199
Figura 95. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35e.....	199
Figura 96. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMOS- d_6) do composto 35f.....	200
Figura 97. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMOS- d_6) do composto 35f.....	200
Figura 98. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35g.....	201
Figura 99. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35g.....	201
Figura 100. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35h.....	202
Figura 101. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35h.....	202
Figura 102. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35i.....	203
Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35i.....	203
Figura 104. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35j.....	204
Figura 105. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35j.....	204
Figura 106. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35k.....	205
Figura 107. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35k.....	205
Figura 108. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35l.....	206
Figura 109. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35l.....	206

Figura 110. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35m .	207
Figura 111. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35m .	207
Figura 112. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35n .	208
Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35n .	208
Figura 114. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35o .	209
Figura 115. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35o .	209
Figura 116. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35p .	210
Figura 117. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto 35p .	210
Figura 118. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 35q .	211
Figura 119. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 35q .	211
Figura 120. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36a .	212
Figura 121. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 36a .	212
Figura 122. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36b .	213
Figura 123. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 36b .	213
Figura 124. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) do composto 36c .	214
Figura 125. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto 36c .	214
Figura 126. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36d .	215
Figura 127. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 36d .	215
Figura 128. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36e .	216
Figura 129. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 36e .	216

Figura 130. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 36f	217
Figura 131. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 36f	217
Figura 132. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36g	218
Figura 133. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 36g	218
Figura 134. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetone- d_6) do composto 36h	219
Figura 135. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, acetone- d_6) do composto 36h	219
Figura 136. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36i	220
Figura 137. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 36i	220
Figura 138. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36j	221
Figura 139. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 36j	221
Figura 140. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto 36k	222
Figura 141. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 36k	222
Figura 142. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36l	223
Figura 143. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 36l	223
Figura 144. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36m	224
Figura 145. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 36m	224
Figura 146. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36n	225
Figura 147. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 36n	225
Figura 148. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36o	226
Figura 149. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto 36o	226

Figura 150. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 36p .	227
Figura 151. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 36p .	227
Figura 152. Espectro de massas de alta resolução do composto 31 ...	231
Figura 153. Espectro de massas de alta resolução do composto 32 ...	231
Figura 154. Espectro de massas de alta resolução do composto 33 ...	232
Figura 155. Espectro de massas de alta resolução do composto 34a .	232
Figura 156. Espectro de massas de alta resolução do composto 34b .	233
Figura 157. Espectro de massas de alta resolução do composto 34c .	233
Figura 158. Espectro de massas de alta resolução do composto 34d .	234
Figura 159. Espectro de massas de alta resolução do composto 34e .	234
Figura 160. Espectro de massas de alta resolução do composto 34f .	235
Figura 161. Espectro de massas de alta resolução do composto 34g .	235
Figura 162. Espectro de massas de alta resolução do composto 34h .	236
Figura 163. Espectro de massas de alta resolução do composto 34i .	236
Figura 164. Espectro de massas de alta resolução do composto 34j .	237
Figura 165. Espectro de massas de alta resolução do composto 34k .	237
Figura 166. Espectro de massas de alta resolução do composto 34l .	238
Figura 167. Espectro de massas de alta resolução do composto 34m .	238
Figura 168. Espectro de massas de alta resolução do composto 34n .	239
Figura 169. Espectro de massas de alta resolução do composto 34o .	239
Figura 170. Espectro de massas de alta resolução do composto 34p .	240
Figura 171. Espectro de massas de alta resolução do composto 34q .	240
Figura 172. Espectro de massas de alta resolução do composto 35a .	241
Figura 173. Espectro de massas de alta resolução do composto 35b .	241
Figura 174. Espectro de massas de alta resolução do composto 35c .	242
Figura 175. Espectro de massas de alta resolução do composto 35d .	242
Figura 176. Espectro de massas de alta resolução do composto 35e .	243
Figura 177. Espectro de massas de alta resolução do composto 35f .	243
Figura 178. Espectro de massas de alta resolução do composto 35g .	244
Figura 179. Espectro de massas de alta resolução do composto 35h .	244
Figura 180. Espectro de massas de alta resolução do composto 35i .	245
Figura 181. Espectro de massas de alta resolução do composto 35j .	245
Figura 182. Espectro de massas de alta resolução do composto 35k .	246
Figura 183. Espectro de massas de alta resolução do composto 35l .	246
Figura 184. Espectro de massas de alta resolução do composto 35m .	247
Figura 185. Espectro de massas de alta resolução do composto 35n .	247
Figura 186. Espectro de massas de alta resolução do composto 35o .	248
Figura 187. Espectro de massas de alta resolução do composto 35p .	248
Figura 188. Espectro de massas de alta resolução do composto 35q .	249

Figura 189. Espectro de massas de alta resolução do composto 36a.	249
Figura 190. Espectro de massas de alta resolução do composto 36b.	250
Figura 191. Espectro de massas de alta resolução do composto 36c.	250
Figura 192. Espectro de massas de alta resolução do composto 36d.	251
Figura 193. Espectro de massas de alta resolução do composto 36e.	251
Figura 194. Espectro de massas de alta resolução do composto 36f.	252
Figura 195. Espectro de massas de alta resolução do composto 36g.	252
Figura 196. Espectro de massas de alta resolução do composto 36h.	253
Figura 197. Espectro de massas de alta resolução do composto 36i.	253
Figura 198. Espectro de massas de alta resolução do composto 36j.	254
Figura 199. Espectro de massas de alta resolução do composto 36k.	254
Figura 200. Espectro de massas de alta resolução do composto 36l.	255
Figura 201. Espectro de massas de alta resolução do composto 36m.	255
Figura 202. Espectro de massas de alta resolução do composto 36n.	256
Figura 203. Espectro de massas de alta resolução do composto 36o.	256
Figura 204. Espectro de massas de alta resolução do composto 36p.	257
Figura 205. LUMO do composto 35a.	261
Figura 206. HOMO do composto 35a.	261
Figura 207. LUMO do composto 35b.	261
Figura 208. HOMO do composto 35b.	261
Figura 209. LUMO do composto 35c.	262
Figura 210. HOMO do composto 35c.	262
Figura 211. LUMO do composto 35d.	262
Figura 212. HOMO do composto 35d.	262
Figura 213. LUMO do composto 35e.	263
Figura 214. HOMO do composto 35e.	263
Figura 215. LUMO do composto 35f.	263
Figura 216. HOMO do composto 35f.	263
Figura 217. LUMO do composto 35g.	264
Figura 218. HOMO do composto 35g.	264
Figura 219. LUMO do composto 35h.	264
Figura 220. HOMO do composto 35h.	264
Figura 221. LUMO do composto 35i.	265
Figura 222. HOMO do composto 35i.	265
Figura 223. LUMO do composto 35j.	265
Figura 224. HOMO do composto 35j.	265
Figura 225. LUMO do composto 35k.	266
Figura 226. HOMO do composto 35k.	266
Figura 227. LUMO do composto 35l.	266
Figura 228. HOMO do composto 35l.	266
Figura 229. LUMO do composto 35m.	267

Figura 230. HOMO do composto 35m	267
Figura 231. LUMO do composto 35n	267
Figura 232. HOMO do composto 35n	267
Figura 233. LUMO do composto 35o	268
Figura 234. HOMO do composto 35o	268
Figura 235. LUMO do composto 35p	268
Figura 236. HOMO do composto 35p	269
Figura 237. LUMO do composto 35q	269
Figura 238. HOMO do composto 35q	269
Figura 239. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 81a	273
Figura 240. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 81a	273
Figura 241. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 81b	274
Figura 242. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 81b	274
Figura 243. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 81c	275
Figura 244. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto 81c	275
Figura 245. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 82a	276
Figura 246. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 82a	276
Figura 247. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 82b	277
Figura 248. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 82b	277
Figura 249. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 82c	278
Figura 250. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 82c	278
Figura 251. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 83a	279
Figura 252. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 83a	279
Figura 253. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 83b	280
Figura 254. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 83b	280

Figura 255. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto 83c	281
Figura 256. Espectro de massas de alta resolução do composto 81a .	285
Figura 257. Espectro de massas de alta resolução do composto 81b .	285
Figura 258. Espectro de massas de alta resolução do composto 81c .	286
Figura 259. Espectro de massas de alta resolução do composto 82a .	286
Figura 260. Espectro de massas de alta resolução do composto 82b .	287
Figura 261. Espectro de massas de alta resolução do composto 82c .	287
Figura 262. Espectro de massas de alta resolução do composto 83a .	288
Figura 263. Espectro de massas de alta resolução do composto 83b .	288
Figura 264. Espectro de massas de alta resolução do composto 83c .	289
Figura 265. Artigo aceito e publicado na revista JBCS.....	293
Figura 266. Artigo em fase de submissão.	293

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação da síntese das tiossemicarbazonas.	61
Tabela 2. Ponto de fusão (experimental e reportado na literatura) e número de registro CAS das tiossemicarbazonas.	88
Tabela 3. Porcentagem de inibição de PtpA na concentração de 25 μ M e IC ₅₀ dos compostos ativos. ^a	94
Tabela 4. Índice de seletividade (IS) dos compostos 34c , 34g , 34p e 35p nas PTPs representativas. ^a	97
Tabela 5. EC ₅₀ dos ensaios antioxidantes das tiossemicarbazonas 35a-q	113
Tabela 6. IC ₅₀ do ensaio de inibição da AChE das tiossemicarbazonas 35a-q	115
Tabela 7. Valores energéticos do HOMO, LUMO e band gap das tiossemicarbazonas 35a-q	117
Tabela 8. Propriedades químicas das tiossemicarbazonas 35a-q	119
Tabela 9. Ponto de fusão (experimental e reportado na literatura) e número de registro CAS das amidas.	144
Tabela 10. Porcentagem de inibição de <i>T. cruzi</i> na concentração de 50 μ M, CI ₅₀ , CC ₅₀ e IS dos compostos mais ativos. ^a	147
Tabela 11. Porcentagem de inibição de <i>L. amazonensis</i> na concentração de 50 μ M, CI ₅₀ , CC ₅₀ e IS dos compostos mais ativos. ^a	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
Acetona-d ₆	Acetona deuterada
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AE	Afinidade eletrônica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BChE	Butirilcolinesterase
CC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CI ₅₀	Concentração que inibe 50% dos parasitos
CPRG	Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo
D	Dupleto
DA	Doença de Alzheimer
DCM	Diclorometano
Dd	Duplo dupleto
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
DNA	do inglês “ <i>deoxyribonucleic acid</i> ”
D.O.	Densidade óptica
DPPH	do inglês “ <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> ”
DTN	Doença Tropical Negligenciada
DTT	Ditiotreitól
EC ₅₀	Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
EDC	cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbo-diimida
EDTA	Do inglês “ <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ”
EHOMO	Energia do HOMO
ELUMO	Energia do LUMO
ESI-MS	Do inglês “ <i>Electrospray ionazation-mass spectrometry</i> ”
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
HETCOR	Experimento de correlação de deslocamento químico heteronuclear
HOMO	do inglês “ <i>highest occupied molecular orbital</i> ”
HRMS	Espectro de Massa de Alta Resolução

Hz	Hertz
I	Inibição
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50 %
IFPMA	do inglês, “ <i>International Federation of Pharmaceutical Manufactures & Associations</i> ”
IMAC	do inglês “ <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> ”
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
IS	Índice de Seletividade
IUPAC	do inglês “ <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ”
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K _i	Constante de dissociação do complexo enzima-inibidor
K _m	Constante de Michaelis
LB	Meio Luria- Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucocutânea
LUMO	do inglês “ <i>lowest unoccupied molecular orbital</i> ”
LV	Leishmaniose visceral
m	Multiplete
M	Molar (mol.L ⁻¹)
MDR	do inglês “ <i>multidrug resistance</i> ”
mL	Mililitro
mM	Milimolar
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NP-40	Nonidet P-40
PBS	Tampão salino fosfato
p.f.	Ponto de fusão
Ph	Fenila
PI	Potencial de ionização
Piridina-d ₅	Piridina deuterada
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenilfostato
ppm	Parte por milhão
PTP	Proteína Tirosina Fosfatase
PTP1B	Proteína tirosina fosfatase 1B

PtpA	Proteína tirosina fosfatase A (de <i>Mtb</i>)
PtpB	Proteína tirosina fosfatase B (de <i>Mtb</i>)
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i> 1650
s	Simpleto
S	Moleza
SBF	Soro bovino fetal
SDS-PAGE	do inglês “ <i>Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ”
SOD	Superóxido dismutase
t.a.	Temperatura ambiente
TB	Tuberculose
TMS	Tetrametilsilano
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Trp	Triptofano
V _{max}	Velocidade máxima
YopH	PTP de <i>Yersinia spp.</i>
δ	Deslocamento químico
μ	Eletronegatividade
μL	Microlitro
μM	Micromolar
η	Dureza

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	37
2	OBJETIVOS	43
2.1	OBJETIVO GERAL.....	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
	CAPÍTULO 1	45
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	47
3.1	TUBERCULOSE E PROTÉINAS TIROSINA FOSFATASE A E B	47
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	59
4.1	SÍNTESE DAS TIOSSEMICARBAZIDAS	60
4.2	SÍNTESE DAS TIOSSEMICARBAZONAS.....	62
4.3	PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DAS BACTÉRIAS COMPETENTES.....	79
4.4	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	80
4.5	TRIAGEM DOS INIBIDORES	82
4.6	DETERMINAÇÃO DO IC ₅₀	82
4.7	TESTE DE SELETIVIDADE	82
4.8	TESTE DE CINÉTICA ENZIMÁTICA	83
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	85
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO.....	85
5.2	ATIVIDADE BIOLÓGICA	93
6	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	99
	CAPÍTULO 2	101
7	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	103
7.1	DOENÇA DE ALZHEIMER.....	103
7.2	TIOSSEMICARBAZONAS.....	105
8	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	109
8.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	109
8.1.1	Atividade de sequestro de óxido nítrico	109
8.1.2	Atividade de sequestro de peróxido de hidrogênio	109
8.2	ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE	110
8.3	ESTUDOS QUÂNTICOS	110
9	RESULTADOS E DISCUSSÕES	111
9.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	111
9.2	ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE	113
9.3	ESTUDOS QUÂNTICOS	116

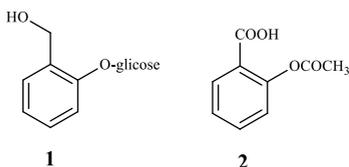
10	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	121
	CAPÍTULO 3	123
11	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	125
11.1	DOENÇA DE CHAGAS	125
11.2	LEISHMANIOSE	128
11.3	AMIDAS	131
12	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	135
12.1	SÍNTESE DAS AMIDAS	135
12.2	ATIVIDADE BIOLÓGICA	139
	12.2.1 Ensaio colorimétrico para triagem de compostos tripanocida.....	139
	12.2.2 Ensaio colorimétrico para triagem de compostos leishmanicidas	140
	12.2.3 Ensaio de citotoxicidade	141
13	RESULTADOS E DISCUSSÕES	143
13.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO	143
13.2	ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	146
14	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	151
15	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	153
16	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
	APÊNDICE I- Espectros de RMN de ¹H e ¹³C das tiossemicarbazonas.	173
	APÊNDICE II- Espectros de massas de alta resolução das tiossemicarbazonas.	229
	APÊNDICE III- Superfície do HOMO e LUMO das tiossemicarbazonas 35a-q.	259
	APÊNDICE IV- Espectros de RMN de ¹H e ¹³C das amidas.	271
	APÊNDICE V- Espectros de massas de alta resolução das amidas.	283
	APÊNDICE VI- Artigos publicados e em fase de submissão relacionados à tese.	291

1 INTRODUÇÃO

A química medicinal, segundo a IUPAC (do inglês “*International Union of Pure and Applied Chemistry*”), consiste na invenção e/ou descoberta, desenvolvimento, identificação, estudo sobre o modo de ação dos compostos biologicamente ativos e a construção de relações estrutura-atividade.^{1, 2} Além disso, a química medicinal é uma ciência inter e multidisciplinar do conhecimento, baseada na química, mas que envolve as áreas biológicas, médicas e farmacêuticas. Basicamente a química medicinal envolve o planejamento e desenho de novos compostos que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis, sendo capazes de tornarem-se novos fármacos.^{2, 3}

Muitas moléculas com propriedades biológicas são ou foram planejadas a partir de produtos naturais. Os produtos naturais são utilizados há anos pela população para o alívio ou cura de algumas doenças. A princípio, os químicos identificavam e isolavam substâncias ativas de plantas com atividades biológicas, popularmente conhecidas. Com o avanço da ciência, inúmeros pesquisadores estudaram formas de melhorar o rendimento e os efeitos terapêuticos de muitos produtos naturais. Um exemplo disso é a salicilina **1**, princípio ativo da *Salix alba*, que serviu como base para síntese do ácido acetil-salicílico **2** (Aspirina[®] - Figura 1), produto esse, que manteve a propriedade analgésica desejada. A aspirina foi o primeiro fármaco sintético, marcando um novo período de grande importância para a indústria farmacêutica.⁴ Os fármacos disponíveis na terapêutica moderna são na maioria de origem sintética (cerca de 85%), representando uma parcela significativa no mercado farmacêutico.⁵

Figura 1. Estrutura química da Salicina (**1**) e do Ácido acetil-salicílico (**2**).

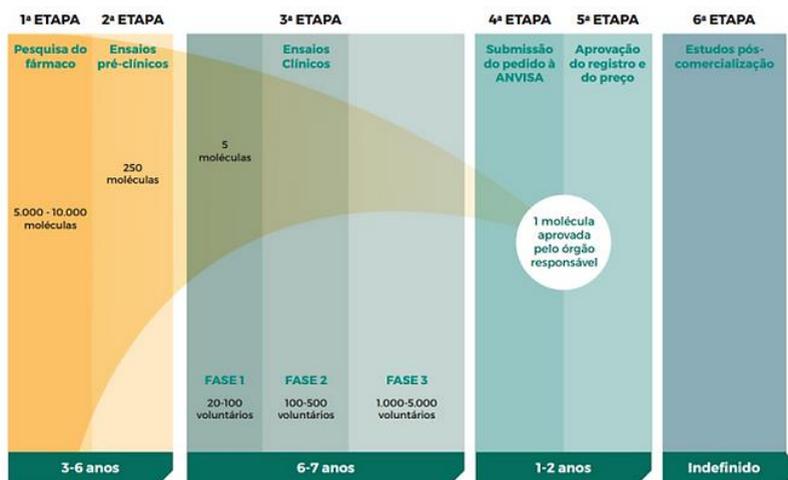


Segundo a IFPMA (do inglês, “*International Federation of Pharmaceutical Manufactures & Associations*”), a indústria farmacêutica investiu cerca de 150 bilhões de dólares em pesquisa e desenvolvimento no ano de 2015. Atualmente, mais de 7000 medicamentos estão em diferentes fases de desenvolvimento em todo

mundo. O processo de desenvolvimento de um medicamento envolve algumas etapas (Figura 2), estima-se que são necessários de 10 a 15 anos até uma molécula ser aprovada com um fármaco.⁶

A primeira etapa de desenvolvimento é a pesquisa de compostos candidatos a fármacos, neste período investiga-se um grande número de moléculas (de 5000 a 10000). Na segunda etapa, o número de compostos é mais restrito e são realizados os ensaios pré-clínicos. A terceira etapa é composta pelos ensaios clínicos, que são divididos em três fases (Fase 1, Fase 2 e Fase 3). A quarta etapa consiste na submissão do pedido a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e na quinta etapa apenas uma molécula é aprovada pelo órgão responsável e comercializada. Após a comercialização ainda são realizados estudos por um período indefinido (Figura 2).^{6,7}

Figura 2. Etapas envolvidas no desenvolvimento de um fármaco.



Fonte: **Guia 2017: Saúde se faz com ética e inovação.** Disponível em: <<https://www.interfarma.org.br/guia/guia-2017/dados-do-setor>>. Acesso em 30 dez. 2017.

A busca de novos fármacos mais eficientes e com menores efeitos colaterais do que os disponíveis no mercado representa o maior desafio de centros de pesquisas e de indústrias farmacêuticas. Nesta perspectiva a química medicinal tem auxiliado com o desenvolvimento de muitos trabalhos de pesquisa com o intuito de identificar compostos protótipos.⁸

Uma molécula ativa e com eficácia elevada é reflexo das propriedades farmacodinâmicas (interação fármaco-receptor) e farmacocinéticas (fatores de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco), além de possuir baixa toxicidade. Na busca por compostos protótipos com melhores resultados, faz-se necessário modificações moleculares capazes de ajustar suas propriedades farmacocinéticas sem comprometer suas características farmacodinâmicas essenciais à promoção da resposta terapêutica desejada.⁵

Para tanto, diferentes táticas são possíveis, especialmente a avaliação de uma série congênere que consiste em uma família de compostos estruturalmente semelhantes ao protótipo. Para a obtenção desta série podem-se aplicar alguns conceitos, como por exemplo, o bioisosterismo.⁵

O bioisosterismo refere-se à estratégia de modificar compostos ou subunidades estruturais de compostos bioativos que apresentam volumes moleculares, formas, distribuições eletrônicas e propriedades físico-químicas semelhantes resultando em propriedades biológicas similares. O bioisosterismo é dividido em duas categorias: bioisosterismo clássico e não-clássico, dividindo o clássico em função da valência de átomos, grupamentos ou radicais, incluindo nesta categoria os anéis equivalentes (aromáticos ou não). Quanto ao não clássico, a substituição visa uma atividade similar, independente da estrutura eletrônica da molécula.^{5, 9, 10}

No bioisosteísmo têm-se a premissa que dois compostos bioisostéricos, perante um dado receptor, terão afinidades semelhantes e, portanto, atividade biológica similar. Porém, deve-se considerar que mesmo grupamentos considerados isostéricos podem apresentar atividades farmacológicas diferentes. Por isso, vale ressaltar, que uma substituição bioisostérica efetuada com êxito para uma série de substâncias que atuem em determinado sítio receptor não obrigatoriamente terá o mesmo sucesso para outra série terapêutica envolvida com outro sítio receptor, pois em diferentes bioreceptores as propriedades de reconhecimento molecular são distintas.⁵

Nesta tese, será utilizado do bioisosterismo e do “*know how*” do nosso grupo de pesquisa para a obtenção de séries congêneres, com o intuito de encontrar compostos mais eficientes e eficazes para as patologias estudadas.

Neste trabalho serão abordadas quatro diferentes patologias. Com o intuito de facilitar a leitura e compreensão desta tese, a mesma foi dividida em 3 capítulos de acordo com a patologia alvo: *Capítulo 1-*

Tuberculose; *Capítulo 2- Doença de Alzheimer e Capítulo 3- Doenças protozoárias (Doença de Chagas e Leishmaniose).*

Dentre as patologias estudadas neste trabalho, três delas (tuberculose, Doença de Chagas e Leishmaniose) são consideradas doenças negligenciadas, termo este utilizado para designar as doenças que não apresentam atrativos econômicos para o desenvolvimento de fármacos, quer seja pela baixa prevalência ou por atingir populações de regiões em desenvolvimento.¹¹ A outra patologia abordada nesta tese é a doença de Alzheimer, que é a forma mais comum de demência, a qual é caracterizada por uma síndrome em que há deterioração na memória, pensamento, comportamento e a capacidade de realizar atividades diárias.¹²

Quanto à tuberculose- Capítulo 1

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa, causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*.¹³ Já há alguns anos que inúmeras doenças causadas por bactérias estão sofrendo com a resistência ao tratamento usual com antibióticos, isso porque, há estirpes patogênicas que estão tornando-se resistentes a diversos antibióticos e a agentes terapêuticos, sendo a resistência a múltiplos fármacos um grande problema enfrentado no combate a diversas doenças. Com isso, a comunidade científica tem voltado suas atenções na pesquisa de novos tratamentos para a TB, que apresentem diferentes mecanismos de ação daqueles já conhecidos.

Neste sentido, foi verificado que a *Mtb* secreta duas proteínas tirosina fosfatases (PTPs): PtpA e PtpB.^{14, 15} Estas proteínas estão envolvidas na sobrevivência da bactéria no hospedeiro^{14, 16} e estudos têm demonstrado que a inibição das mesmas atenua o crescimento da *Mtb*. Assim, esta inibição vem sendo utilizada como uma nova estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da TB.^{17, 18}

Nosso grupo de pesquisa, já há algum tempo, tem identificado algumas classes de compostos que atuam como inibidores de PtpA e PtpB.¹⁸⁻²² Com isso, neste trabalho, propõe-se o estudo de tiossemicarbazonas como uma nova classe de inibidores de PtpA.

As tiossemicarbazonas apresentam inúmeras atividades biológicas relatadas na literatura²³⁻²⁶ e têm-se mostrado como bons inibidores enzimáticos como, por exemplo, inibidores da cisteína proteases, proteína essencial para várias funções do parasita da malária.²⁷ Outro exemplo é a tiossemicarbazona Triapina (molécula promissora para a terapia anticancerígena) que é um potente inibidor da ribonucleotídeo redutase.²⁸ Diante do exposto, surgiu o interesse em

estudar séries congêneres dessa classe de composto como inibidores de PtpA da *Mtb*.

Quanto à Doença de Alzheimer - Capítulo 2

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência, caracterizada por uma síndrome em que há deterioração na memória, pensamento, comportamento e a capacidade de realizar atividades diárias.¹² A DA não é completamente compreendida e hipóteses diferentes tentam explicar suas causas, as quais constituem a base das terapias atuais.²⁹ A hipótese colinérgica é a explicação mais aceita para a causa da DA³⁰, uma vez que a doença está associada a uma redução nos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A acetilcolinesterase (AChE) é uma das enzimas responsáveis pela hidrólise de ACh, diante disso, a abordagem mais promissora para o tratamento sintomático da DA é aumentar os níveis da ACh pela inibição da AChE.³¹

Outra hipótese interessante propõe que a DA está relacionada ao estresse oxidativo.^{32, 33} Desta forma, o uso de compostos antioxidantes produziu resultados promissores em relação à DA.³⁴ A existência de diferentes hipóteses possíveis para explicar o início e a progressão da DA direciona o desenvolvimento de novos fármacos para moléculas com ações múltiplas capazes de atuar de forma complementar e que podem trazer resultados satisfatórios para o tratamento da doença.^{35, 36}

As tiossemicarbazonas têm-se mostrado como compostos que possuem excelentes atividades antioxidantes^{23, 37} e há estudos relatando resultados interessantes dessa classe de composto no combate à DA.³⁸⁻⁴⁰ Diante disso, surgiu o interesse em analisar uma série de tiossemicarbazona quanto a sua capacidade antioxidante e de inibição da AChE. Além disso, estudos quânticos foram realizados para analisar teoricamente a atividade antioxidante dos compostos.

Quanto às doenças protozoárias (Doença de Chagas e Leishmaniose) - Capítulo 3

A Doença de Chagas é uma doença potencialmente fatal causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A principal via de transmissão para humanos ocorre através de insetos vetores triatomíneos hematófagos que se tornam portadores do protozoário.⁴¹

O mesmo ocorre com a Leishmaniose, que é transmitida ao homem por vetores através da picada de fêmeas de mosquitos da subfamília Phlebotominae. É uma doença causada por várias espécies intracelular de parasitas protozoários do gênero *Leishmania*.⁴²

Ambas as doenças são consideradas doença tropical negligenciada (DTN) e atinge principalmente a população pobre, em

países em desenvolvimento, não sendo atrativas para as companhias farmacêuticas. Dessa forma, poucos recursos são investidos no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, por isso a importância em estudar as DTNs

As amidas apresentam diversas atividades biológicas, incluindo a capacidade tripanocida^{43, 44} e leishmanicida^{45, 46}. Além disso, em um estudo referente à piperlongumina⁴⁷, verificou-se que essa amida é seletiva. Neste sentido, surgiu o interesse em sintetizar amidas análogas a piperlongumina e avaliar frente aos protozoários *T. cruzi* e *L. amazonensis*.

A partir desta seção, são expostos os objetivos deste trabalho, seguidos pelos *Capítulos 1, 2 e 3*. Cada capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre o tema, parte experimental, resultados e discussões e considerações parciais. O trabalho é finalizado com as conclusões e as perspectivas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esta tese de doutorado tem como objetivo geral: planejar, sintetizar, caracterizar e avaliar tiossemicarbazonas e amidas como possíveis compostos bioativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO 1

- ✓ Planejar tiossemicarbazonas baseadas em compostos bioativos descritos na literatura;
- ✓ Sintetizar, purificar e caracterizar diferentes tiossemicarbazidas, intermediário para a formação das tiossemicarbazonas;
- ✓ Sintetizar, purificar e caracterizar diferentes tiossemicarbazonas, por meio de uma condensação das tiossemicarbazidas com diferentes aldeídos;
- ✓ Investigar a ação inibitória das moléculas obtidas *in vitro* frente à proteína tirosina fosfatase PtpA de *Mtb*;
- ✓ Determinar a IC₅₀ dos compostos mais ativos;
- ✓ Estudo de seletividade para os melhores inibidores;
- ✓ Determinar os parâmetros cinéticos, bem como o mecanismo de inibição, do composto mais promissor;
- ✓ Estabelecer relação estrutura-atividade.

CAPÍTULO 2

- ✓ Avaliar uma série de tiossemicarbazonas como possíveis agentes terapêuticos para o tratamento da Doença de Alzheimer.
- ✓ Investigar a capacidade inibitória *in vitro* desses compostos frente à enzima acetilcolinesterase;
- ✓ Realizar testes de antioxidantes *in vitro*, avaliando a atividade de eliminação de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂);
- ✓ Analisar teoricamente a atividade antioxidante por meio de estudos quânticos;
- ✓ Estabelecer relação estrutura-atividade.

CAPÍTULO 3

- ✓ Planejar amidas baseadas em compostos bioativos descritos na literatura;
- ✓ Sintetizar, purificar e caracterizar diferentes amidas por meio de reações entre aminas com ácidos cinâmicos;
- ✓ Investigar a ação inibitória dos compostos *in vitro* frente aos protozoários *T. cruzi* e da *L. amazonensis*;
- ✓ Determinar o CI_{50} e o CC_{50} dos compostos mais ativos;
- ✓ Estabelecer relação estrutura-atividade.

CAPÍTULO 1

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TUBERCULOSE E PROTÉINAS TIROSINA FOSFATASE A E B

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa, causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). É considerada uma das 10 principais causas de morte em todo o mundo. Em 2016, 1,7 milhões de pessoas morreram por conta da TB e 10,4 milhões de pessoas ficaram doentes.¹³

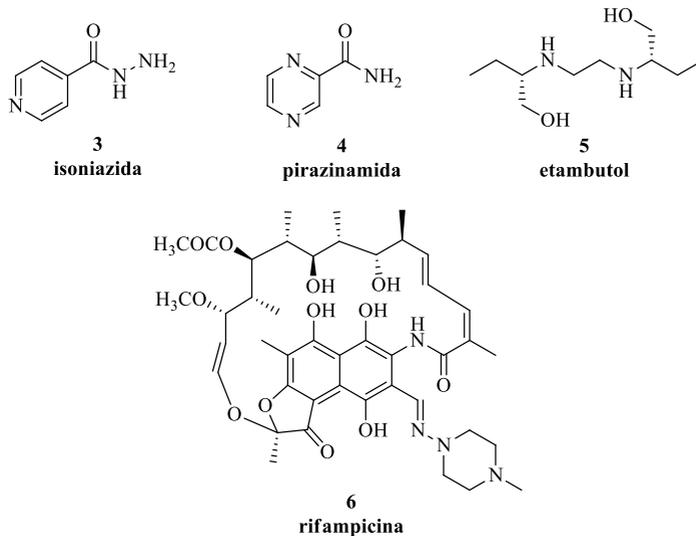
O indivíduo com esta doença pode apresentar pequenos sintomas por alguns meses, o que resulta em um atraso no diagnóstico e a fácil transmissão da bactéria pelo ar a partir da tosse, espirro ou saliva de pessoas contaminadas com a doença ativa. Estima-se que um quarto da população mundial tem a TB latente, ou seja, que as pessoas foram infectadas pela bactéria, mas não estão doentes e dessa maneira não transmitem a doença.¹³

Em 2016, 64% dos novos casos de tuberculose ocorreram na Índia, Indonésia, China, Filipinas, Paquistão, Nigéria e África do Sul.¹³ Vale ressaltar que os países citados com maior predominância da TB são regiões consideradas em desenvolvimento, podendo classificar esta doença como negligenciada.

Há alguns anos é utilizado o mesmo tratamento para o combate da doença com antibióticos de primeira escolha (Figura 3), porém há inúmeros relatos de cepas resistentes ao tratamento usual. Um tratamento alternativo são os antibióticos de segunda escolha (Figura 4), que apresentam desvantagens como: maiores efeitos colaterais longa duração e alto custo do tratamento.^{13, 48}

Para o tratamento da TB de primeira escolha, é necessária a administração de múltiplos antibióticos como isoniazida **3**, pirazinamida **4**, etambutol **5** e rifampicina **6** (Figura 3) por um longo período de tempo. No caso de insucesso do primeiro tratamento utiliza-se os fármacos de segunda escolha como, por exemplo, etionamida **7**, ácido *p*-aminosalicílico **8**, cicloserina **9**, canamicina **10**, tiacetazona **11**, amicacina **12** e capreomicina **13** (Figura 4).⁴⁸

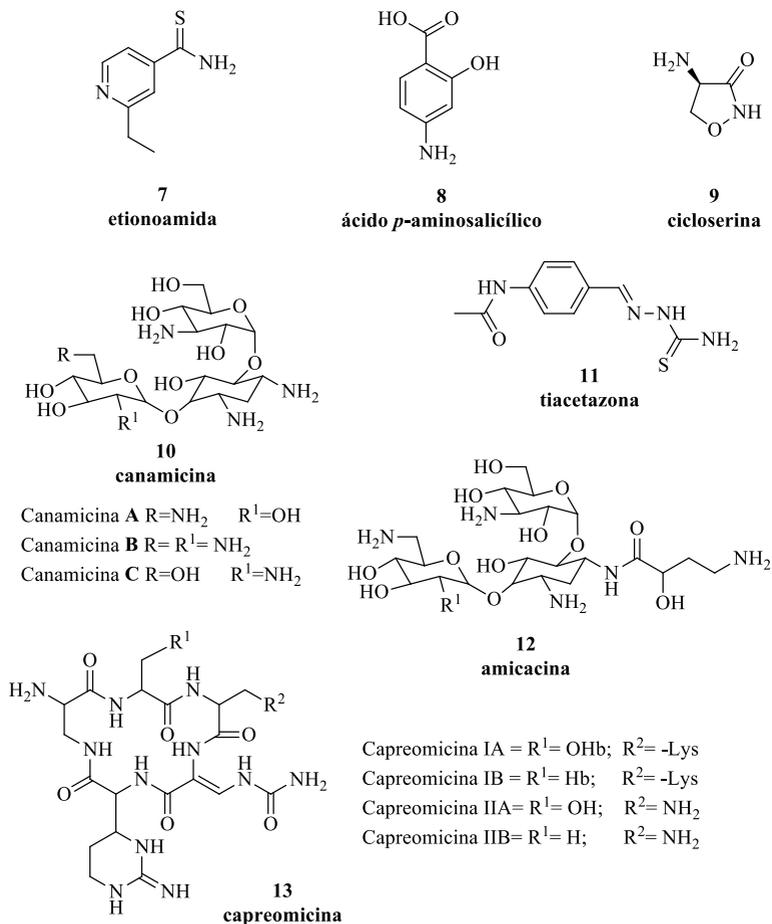
Figura 3. Fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento da tuberculose.



Há alguns anos que inúmeras doenças causadas por bactérias estão sofrendo com a resistência ao tratamento usual com antibióticos. Isso ocorre porque, há estirpes patogênicas que estão tornando-se resistentes à diversos antibióticos e a agentes terapêuticos, sendo a resistência a múltiplos fármacos (MDR do inglês “*multidrug resistance*”) um grande problema enfrentado no combate a diversas doenças.⁴⁹

Com isso, a comunidade científica tem voltado suas atenções na pesquisa de novos tratamentos para estas doenças. O planejamento e síntese de novas moléculas que possam ser protótipos de fármacos mais eficientes do que os disponíveis atualmente e que aliem novos tratamentos e diferentes mecanismos de ação para superar a resistência aos fármacos atuais, têm motivado a pesquisa científica em Química Medicinal.

Figura 4. Fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento da tuberculose.



Neste sentido, foi verificado que a *Mtb* tem como célula hospedeira os macrófagos, que são as células responsáveis pela ativação da resposta imune, necessária para controlar e eliminar a invasão de micro-organismos.^{50, 51} Esta micobactéria desenvolveu uma estratégia para manter-se dentro dos macrófagos, secretando diversas proteínas imunogênicas que têm como função modular a resposta imune do hospedeiro. Dentre elas estão as proteínas serina/treonina cinases e fosfatases e as proteínas tirosina fosfatases (PTP).^{52, 53}

Com a sequência completa do DNA (do inglês “*deoxyribonucleic acid*”) da *Mtb* foi possível identificar os genes de duas PTPs, que são

proteínas ativas e secretadas pela micobactéria, chamadas de PtpA e PtpB.^{15, 54} Estas proteínas estão envolvidas na sobrevivência da bactéria no hospedeiro,^{54, 55} estudos têm demonstrado que a inibição das mesmas atenua o crescimento da *Mtb*, sendo uma nova estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos para a TB.^{17, 18}

A proteína VPS33B fosforilada promove a fusão dos fagossomos infectados com os lisossomos, mecanismo pelo qual os macrófagos promovem sua atividade microbicida. A PtpA é capaz de desfosforilar esta proteína, inativando-a, sendo então essencial para a persistência intracelular bacteriana. Com isso, sugere-se que a inativação desta enzima atenua o crescimento da *Mtb*.^{17, 53}

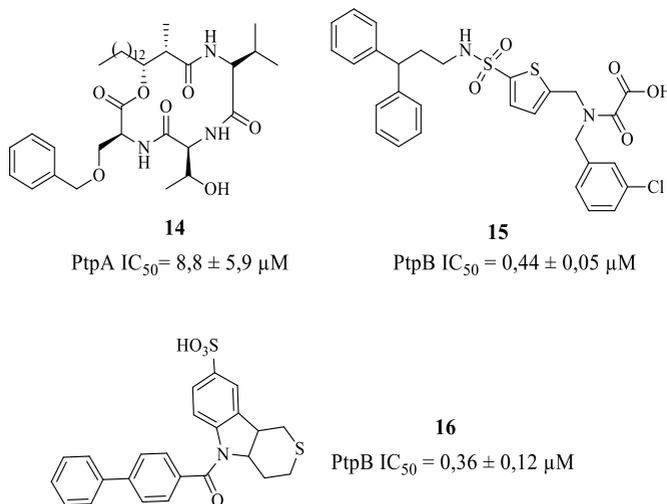
A PtpB se enquadra como uma fosfatase com tripla especificidade, que catalisa a desfosforilação de resíduos tirosina, serina/treonina e fosfoinosítídeos.^{56, 57} Baseando-se na atividade da PtpB sobre fosfoinosítídeos, há estudos que argumentam que a PtpB auxilia na inibição da fusão fagossoma-lisossoma, pois esta proteína pode ser capaz de perturbar o metabolismo de fosfoinosítídeos do hospedeiro e as suas vias de sinalização que desempenham uma função importante na maturação do fagossoma.⁵²

A busca por inibidores de PtpA e PtpB é uma estratégia diferente dos tratamentos convencionais, ou seja, não tem ação bactericida como ao antibióticos utilizados e com essa característica reduz as chances de resistência aos fármacos.

Inicialmente foi relatado na literatura compostos análogos de produtos naturais como inibidores da PtpA. Na Figura 5, pode-se observar o composto **14** (análogo da estevastelina), que apresentou um IC₅₀ (concentração necessária de um composto para ele inibir 50% da atividade da enzima) de 8,8 µM.⁵⁸

Quanto a inibição da PtpB, há relatos de inibidores com especificidade e seletividade, como é o caso do composto **15** ((oxalilamino-metileno)-tiofeno sulfonamida- OMTS), com IC₅₀ de 0,44 µM (Figura 5).⁵⁹ Outro caso, é um composto **16** derivado indol[2,3- α]quinolizidinas com um IC₅₀ de 0,36 µM (Figura 5).⁶⁰

Figura 5. Inibidores de PtpA e PtpB descritos na literatura.



Nosso grupo de pesquisa tem encontrado bons inibidores de PtpA e PtpB, na Figura 6 pode-se observar alguns desses compostos. De uma maneira geral, verificou-se que as chalconas (cetonas α - β -insaturadas), que têm em sua estrutura o grupamento naftila, apresentaram-se como bons inibidores de PtpA e PtpB (compostos **17** e **19**). Para os inibidores de PtpA a presença de grupos que aumentam a densidade eletrônica do anel aromático (grupo metoxila) parece contribuir para os bons resultados (compostos **17** e **18**). Pode-se dizer que a presença de grupos polares e hidrofóbicos na mesma estrutura favorece a inibição dessas proteínas.¹⁹⁻²¹ Em um estudo de modelagem molecular realizado para a chalcona **17**, verificou-se que o grupamento metoxila estava realizando ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos da proteína e, também, observou-se a presença de interações π - π entre o substituinte 2-naftila e o resíduo da cadeia lateral Trp48 do sítio ativo da PtpA (inibidor competitivo).¹⁸

Recentemente, Dutta et.al. desenvolveram dois inibidores potentes e seletivos de PtpA e PtpB. O composto **21** denominado pelos autores de L3335-M34 (Figura 7) é o mais potente e seletivo inibidor de PtpA já descrito na literatura, com um IC₅₀ de 160 nM e uma seletividade superior a 20 vezes para as outras PTPs analisadas no estudo. O inibidor de PtpB **22**, estudado pelos autores foi chamado de L01-Z08 (Figura 7), apresentou um IC₅₀ de 38 nM e foi 66 vezes menos potente para a PtpA e pelo menos 37 vezes mais seletivo para as outras

PTPs avaliadas. O grande diferencial deste estudo foi avaliar e propor um tratamento concomitante dos inibidores com os fármacos de primeira escolha, com isso, podendo reduzir o risco de cepas resistentes a *Mtb*. Os resultados obtidos foram interessantes, pois a superfície pulmonar envolvida pela inflamação, após 6 semanas, foi significativamente menor para o grupo que foi tratado com os fármacos e os inibidores (9,23%) do que para aquele apenas com os fármacos (36,28%).⁶¹

Figura 6. Inibidores de PtpA e PtpB estudados pelo nosso grupo de pesquisa.

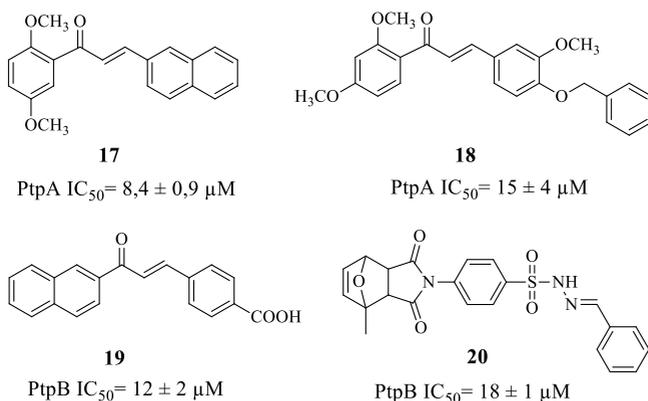
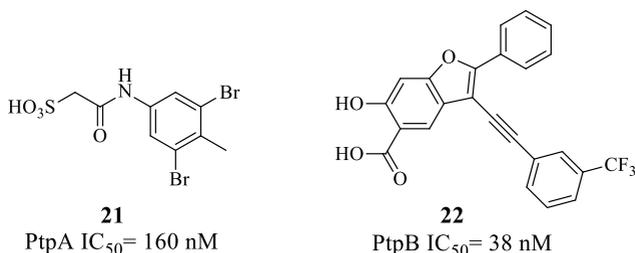


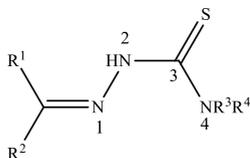
Figura 7. Inibidores potentes e seletivos de PtpA e PtpB.



3.2 TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas são bases de Schiff, cuja estrutura química geral e sua numeração segundo a IUPAC pode ser observada na Figura 8.^{62, 63}

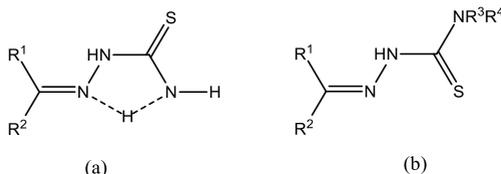
Figura 8. Estrutura química geral das tiossemicarbazonas.



Notas: R¹, R², R³ e R⁴=H, Alquil e/ou Aril.

Essa classe de compostos pode ter substituições na posição N-1 e N-4 (Figura 8), resultando em análogos com características que podem diferir entre si.^{63, 64} Por exemplo, quando as tiossemicarbazonas não apresentam substituição na posição N-4 verifica-se que o átomo de enxofre fica posicionado *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina. Esse arranjo é favorecido pela ligação de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio da imina e o hidrogênio da tioamida. Porém, ao adicionar grupos substituintes na posição N-4, favorece a conformação *sin*, muito provavelmente pelo impedimento estérico (Figura 9).^{63, 65, 66}

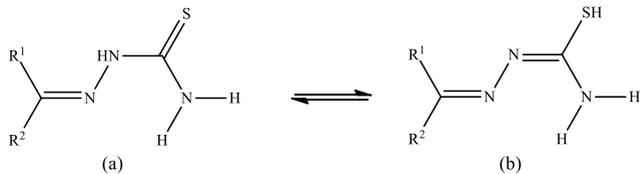
Figura 9. Conformações (a) *anti* (b) *sin*.



Notas: R¹, R², R³ e R⁴= Alquil e/ou Aril.

Além disso, as tiossemicarbazonas apresentam um equilíbrio tautomérico, entre as formas tiureia e tiol (Figura 10), podendo ser explicado pelo sistema de deslocalização eletrônica.^{63, 67-69}

Figura 10. Equilíbrio tautomérico das tiossemicarbazonas (a) forma tiureia (b) forma tiol.



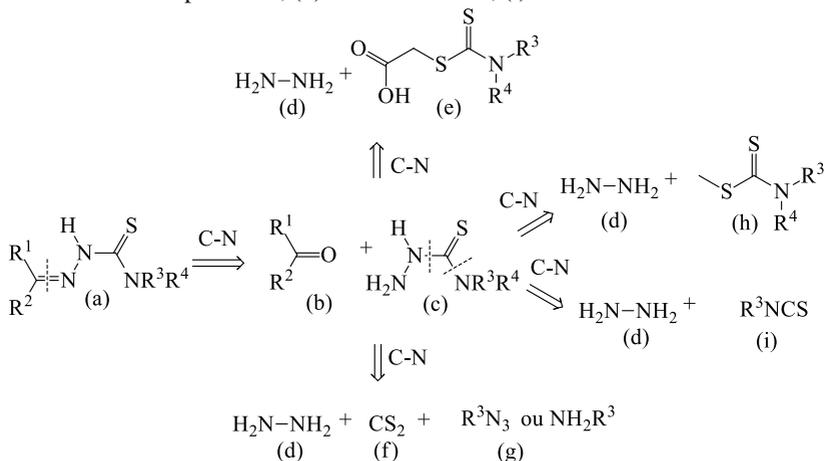
A síntese das tiossemicarbazonas é muito relatada na literatura. Esta reação é conhecida por sua versatilidade, baixo custo de síntese, alta quimiosseletividade e por apresentar bons rendimentos.⁷⁰⁻⁷²

Na análise retrossintética (Figura 11), verifica-se a obtenção da tiossemicarbazona pela reação de aldeídos ou cetonas com tiossemicarbazidas. As tiossemicarbazidas, intermediários da reação, podem ser sintetizadas por diversas maneiras a partir de hidrato de hidrazina, como é listado abaixo e demonstrado na Figura 11.⁶³

- Com ácidos tiocarbamoiltioglicólico.⁷³
- Com ditiocarbamatos.⁷⁴
- Com isotiocianatos.^{26, 75}
- Com azidas ou aminas primárias na presença de dissulfeto de carbono.^{74, 76}

Em geral, a síntese entre as tiossemicarbazidas e o derivado carbonílico, aldeído ou cetona é descrita como uma condensação equimolar em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido.^{63, 77, 78}

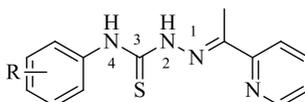
Figura 11. Análise retrossintética das tiossemicarbazonas (a) tiossemicarbazonas, (b) aldeídos ou cetonas, (c) tiossemicarbazida, (d) hidrazina, (e) ácidos tiocarbamoiltioglicólicos, (f) dissulfeto de carbono, (g) azidas ou aminas primárias, (h) ditiocarbamatos, (i) isotiocianatos.



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

As tiossemicarbazonas são normalmente sintetizadas, no estado sólido, como misturas dos isômeros *E* e *Z*, já em solução, ocorre a isomerização para a configuração de maior estabilidade termodinâmica, a *E*.^{63, 79} Em um estudo foram observados sinais duplicados no espectro de RMN de ¹H (Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio) das tiossemicarbazonas da Figura 12, o que indica uma mistura dos isômeros *E* (95%) e *Z* (5%). O hidrogênio do nitrogênio 2 apresentou um deslocamento químico de 10,94-10,61 ppm, indicando a configuração *E*, já o deslocamento químico de 14,79-14,16 ppm, indica a configuração *Z*.⁸⁰

Figura 12. Estrutura química geral das 2-acetilpiridina-tiossemicarbazonas.



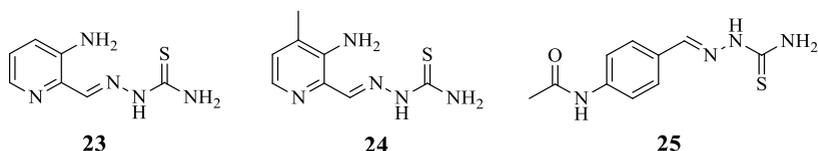
Notas: R=H, *o*-CH₃, *m*-CH₃, *p*-CH₃, *o*-Cl, *m*-Cl, *p*-Cl.

As tiossemicarbazonas apresentam inúmeras atividades biológicas relatadas na literatura, como por exemplo, antiprotozoária⁷³, antiviral⁸¹, antitumoral^{69, 79, 82-84}, antimicrobiana²⁶, antibacteriana^{76, 77, 85}, antileishmanial⁸⁶, antiparasitária⁸⁷, entre outras.

Dentre os estudos realizados com tiossemicarbazonas, pode-se citar a triapina **23** (3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona; Triapine®, Vion Pharmaceuticals Inc, New Haven, CT) e o composto **24** (3-aminopiridina-4-metil-2-carboxaldeído tiossemicarbazona; 3-AMP) (Figura 13) como compostos orgânicos promissores para o combate às células tumorais. Segundo Liu et. al., esses compostos são mais potentes que a hidroxiuréia, fármaco aprovado pela “*Food and Drug Administration*”, para inibir a enzima ribonucleotídeo redutase em células da leucemia L-1210.^{80, 83, 88} Há fortes correlações entre a atividade dessa enzima e a taxa de replicação das células cancerígenas, ou seja, a inibição dessa enzima é de grande interesse para o desenvolvimento de agentes antitumorais e um grande número de compostos tem sido identificado como inibidores dessa enzima.²⁸

A triapina **23** é uma das tiossemicarbazonas mais estudadas da última década, sendo alvo de vários ensaios clínicos em fase I e fase II como um anticancerígeno.^{80, 83} Porém, além da triapina há outras tiossemicarbazonas que apresentam resultados interessantes. Como por exemplo, a amitiozona **25** (Figura 13), utilizada no tratamento da tuberculose como fármaco de segunda escolha.^{48, 89}

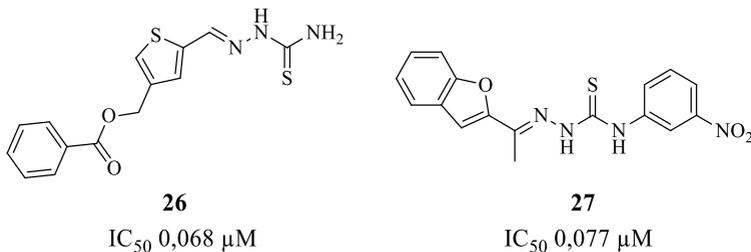
Figura 13. Estrutura química de tiossemicarbazonas promissoras.



Na literatura há relatos de tiossemicarbazonas que atuam como inibidores da enzima tirosinase. A tirosinase é uma metaloenzima que está envolvida na biossíntese da melanina. A melanina desempenha um papel importante em múltiplos fatores fisiológicos e patológicos. O acúmulo e produção excessiva de melanina são causados pela atividade anormal da tirosinase, que pode acarretar vários distúrbios como: lentigo actínico, efelide, melanoma e também está associado a doenças neurodegenerativas como Parkinson.⁹⁰⁻⁹² Derivados de

tiossemicarbazonas, como o composto **26**, (Figura 14- IC_{50} de 0,068 μM .) tem-se mostrado eficiente na inibição da tirosinase.⁹⁰

Figura 14. Inibidor de tirosinase **26** e inibidor de urease **27**.



Também há relatos de tiossemicarbazonas como inibidores de urease. Um elevado nível de atividade desta enzima causa muitas infecções patogênicas clínicas, como a formação de pedras infecciosas e úlcera péptica. A inibição da atividade dessa enzima tem potencial significativo para curar doenças infecciosas. Na Figura 14 pode-se observar a tiossemicarbazona **27** que apresenta um IC_{50} de 0,077 μM frente a urease.⁹³

Como visto anteriormente, há uma tiossemicarbazona que é utilizada como fármaco de segunda escolha para o tratamento da tuberculose (amitiozona) e que, em geral, essa classe de compostos apresenta bons inibidores enzimáticos. Diante disso, surgiu o interesse em verificar séries congêneres de tiossemicarbazonas como candidatos a inibidores de PtpA. Para isso, foi utilizado do bioisosterismo e do “*know how*” do nosso grupo de pesquisa para a obtenção das séries.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram das marcas comerciais: Sigma-Aldrich, Merck, Fluka ou Vetec.

As reações realizadas nesta pesquisa foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de alumínio com sílica gel com indicador fluorescente no comprimento de onda de 254 nm e 366 nm.

Os espectros de RMN de ^1H (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio), de ^{13}C (Ressonância Magnética Nuclear de Carbono) e o experimento de correlação de deslocamento químico heteronuclear (HETCOR) foram realizados ou no equipamento Bruker Ac-200F, frequência de 200MHz para o núcleo de hidrogênio e de 50MHz para o carbono, ou no equipamento VARIAN OXFORD AS-400, frequência 400MHz para hidrogênio e de 100MHz para o carbono. Os solventes utilizados para fazer estas análises, foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6), acetona deuterada (acetona-d_6) ou piridina deuterada (piridina-d_6). Todos os solventes apresentam como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os espectros foram tratados no programa TopSpin 3.1.

Os pontos de fusão (p.f.) não corrigidos dos compostos foram determinados em aparelho digital de ponto de fusão, MGAPH-301, Microquímica Equipamentos Ltda.

Os dados de espectro de massa de alta resolução (HRMS) foram coletados em espectrômetro de massa Bruker micrOTOF-QII (Bruker Daltonics), com ionização por eletrospray (ESI-MS- do inglês “*Electrospray ionization-mass spectrometry*”) no modo positivo, utilizando acetonitrila como solvente.

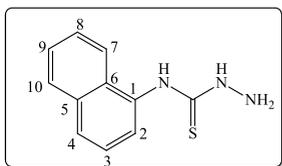
Todas as estruturas foram desenhadas no programa ChemDraw Ultra 12.0. A nomenclatura dos compostos foi obtida pelo mesmo programa. A numeração utilizada na caracterização foi dada de modo aleatório para atribuição dos sinais.

Para os diversos processos envolvidos no teste biológico, foram utilizados os seguintes equipamentos: Termoblock Mixing Block MB-101 (BIOER), Incubator Shaker Series (Innova44), Cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare) e espectrofotômetro de placas ELISA (TECAN).

4.1 SÍNTESE DAS TIOSSEMICARBAZIDAS

As tiossemicarbazidas **31-33** foram obtidas a partir da síntese do respectivo isotiocianato **28-30** (10 mmol) com hidrazina hidratada (10 mmol) em álcool isopropílico (20 mL) (Tabela 1). Essa mistura reacional permaneceu sob agitação magnética por 3 horas, à temperatura ambiente (t.a). O precipitado formado foi lavado com álcool isopropílico e filtrado a vácuo.⁹⁴

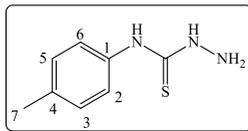
Caracterização das tiossemicarbazidas:



31 *N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotoioamida. Rendimento 77%; sólido branco; p.f.134,9-136,8°C; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 9,25 (s, 1H, NH), 7,96-7,94 (m, 1H, H10), 7,90-7,88 (m, 1H, H4), 7,81 (d, 1H, H8, *J* = 8,1 Hz), 7,67 (d, 1H, H2, *J* = 6,8 Hz), 7,54-7,49 (m, 3H, H3, H7 e H9). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 181,7 (C=S); 135,7; 134,2; 130,2; 128,5; 126,4; 125,8; 125,2; 123,1. HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 240,05656 [M+H]⁺, calculado para C₁₁H₁₁N₃S, 240,05659.

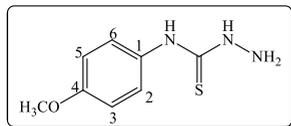
32 *N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotoioamida.

Rendimento 73%; sólido branco; p.f.137,7-138,3°C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,39 (d, 2H, H2 e H6, *J* = 7,8 Hz), 7,17 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,3 Hz), 3,99 (s, 2H, NH₂), 2,34 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 181,0 (C=S); 135,9 (C1); 135,1 (C4); 129,4 (C3 e C5); 124,6 (C2 e C6), 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 182,0745 [M+H]⁺, calculado para C₈H₁₁N₃S, 182,0746.



33 *N*-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotoioamida.

Rendimento 86%; sólido branco; p.f.138,2-139,6°C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 8,98 (s, 1H, NH), 7,44 (d, 2H, H2 e H6, *J* = 8,7 Hz), 6,86 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,7 Hz), 4,72 (s, 2H, NH₂), 3,73 (s, 3H). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 180,4 (C=S); 156,6 (C4); 132,7 (C1); 126,0 (C2 e C6); 113,7 (C3 e C5); 55,6 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 198,0695 [M + H]⁺, calculado para C₈H₁₁N₃OS, 198,0696.

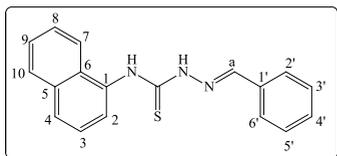


4.2 SÍNTESE DAS TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita na literatura.²⁶ Em um balão de fundo redondo foi adicionado o intermediário **31-33** previamente sintetizado em 11 mL de álcool etílico e 22 mL de água destilada, aos quais foram adicionados diferentes benzaldeídos substituídos (1,25 mmol). Essa reação foi catalisada por ácido acético e refluxada por 1 hora. Em seguida, o produto formado foi filtrado a vácuo. Quando se fez necessário, o produto foi recristalizado com etanol.

Neste trabalho, foi desenvolvida uma biblioteca química de 50 tiossemicarbazonas, as quais foram sintetizadas em duas etapas, como pode ser verificado na Tabela 1.

Caracterização das tiossemicarbazonas:

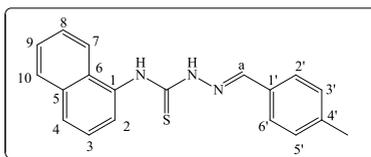


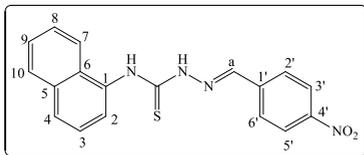
34a (*E*)-2-benzilideno-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotoioamida.

Rendimento 76%; sólido branco; p.f. 217,0-218,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 11,93 (s, 1H, NH), 10,41 (s, 1H, NH), 8,22 (s, 1H, Ha), 8,00-7,84 (m, 5H), 7,57-7,52 (m, 4H), 7,43-7,40 (m, 3H). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 177,8 (C=S); 143,0 (Ca); 134,3; 133,6; 133,1; 130,8; 129,7; 129,0; 128,6; 127,7; 127,5; 126,8; 126,3; 125,4; 125,2; 121,8. HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 306,10588 [M + H]⁺, calculado para C₁₈H₁₅N₃S, 306,10594.

34b (*E*)-2-(4-metilbenzilideno)-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotoioamida.

Rendimento 71%; sólido branco; p.f. 197,0-199,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 11,89 (s, 1H, NH), 10,38 (s, 1H, NH), 8,18 (s, 1H, Ha), 7,98 (m, 1H, H10), 7,91-7,82 (m, 4H), 7,58-7,49 (m, 4H), 7,23 (d, 2H, H3' e H5', *J*= 8,0 Hz), 2,33 (s, 3H, CH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 178,3 (C=S); 143,3 (Ca); 140,2; 136,2; 134,1; 131,9; 131,1; 129,7; 128,4; 127,3; 126,9; 126,4 (2); 125,8; 123,8; 21,5 (CH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 320,12160 [M + H]⁺, calculado para C₁₉H₁₇N₃S, 320,12159.





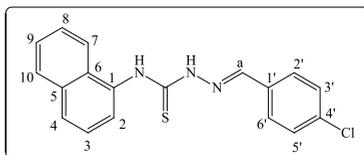
34c (*E*)-*N*-(naftalen-1-il)-2-(4-nitrobenzilideno)hidrazinacarbotioamida.

Rendimento 71%; sólido amarelo; p.f. 229,0-230,0 °C; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 12,25 (s, 1H, NH), 10,66 (s, 1H,

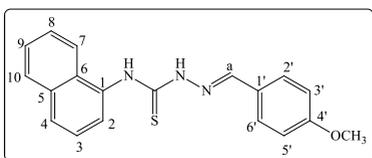
NH), 8,30 (s, 1H, Ha), 8,24 (picos sobrepostos, 4H), 8,01-7,98 (dd, 1H, $J = 6,0$ Hz e $J = 3,0$ Hz), 7,93 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz), 7,88-7,85 (dd, 1H, $J = 6,4$ Hz e $J = 3,4$ Hz), 7,60-7,50 (m, 4H). RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 178,8 (C=S); 148,1 (C4'); 141,2 (Ca); 140,5; 136,0; 134,2; 131,0; 128,9; 128,5; 127,6; 127,0; 126,6; 126,5; 125,9; 124,2; 123,8. HRMS (ESI-TOF) m/z : 351, 0909 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$, 351,0910.

34d (*E*)-2-(4-clorobenzilideno)-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotioamida.

Rendimento 44%; sólido branco; p.f. 206,0-208,0 °C; RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 11,69 (s, 1H, NH), 10,17 (s, 1H,



NH), 7,89 (s, 1H, Ha), 7,70 (d, 2H, H3' e H5', $J = 8,3$ Hz), 7,62-7,54 (m, 2H), 7,30-7,16 (m, 7H). RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 178,5 (C=S); 141,7 (Ca); 136,1; 134,8; 134,1; 133,6; 131,0; 129,7; 129,1; 128,4; 127,4; 126,9; 126,5; 126, 5; 125,9; 123,9. HRMS (ESI-TOF) m/z : 340,0674 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{S}$, 340,0670.



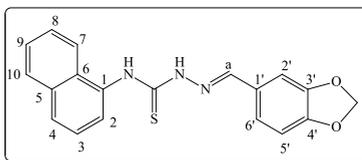
34e (*E*)-2-(4-metoxibenzilideno)-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotioamida.

Rendimento 69%; sólido branco; p.f. 203,0-205,0 °C; RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm:

11,83 (s, 1H, NH), 10,34 (s, 1H, NH), 8,16 (s, 1H, Ha), 8,00-7,88 (m, 5H), 7,56-7,54 (m, 4H), 6,98 (d, 2H, H3' e H5', $J = 8,4$ Hz), 3,80 (s, 3H, OCH₃). RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 178,0 (C=S); 161,3 (C4'); 143,2 (Ca); 136,2; 134,2; 131,1; 129,7; 128,4; 127,3; 127,2; 126,9; 126,5; 126,4; 125,9; 123,8; 114,6; 55,8 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) m/z : 336,1161 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$, 336,1165.

34f (*E*)-2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotioamida.

Rendimento 60%; sólido branco; p.f. 208,0-209,0 °C; RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 11,84 (s, 1H, NH), 10,40 (s, 1H, NH), 8,12 (s, 1H, Ha), 8,00-7,84 (m, 4H), 7,60-7,48 (m, 4H), 7,17 (d, 1H, H6', $J = 8,1$ Hz), 6,95 (d, 1H, H5', $J = 7,6$ Hz), 6,06 (s, 2H, CH₂). RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 178,1 (C=S); 149,4 (C4'); 148,5 (C3'); 142,8 (Ca); 136,2; 134,1; 131,1; 129,2; 128,4; 127,3; 127,0; 126,5; 125,9; 124,7; 123,9; 108,6 (C2'); 106,0 (C5'); 101,9 (CH₂). HRMS (ESI-TOF) m/z : 350,0957 [M + H]⁺, calculado para C₁₉H₁₅N₃O₂S, 350,0958.



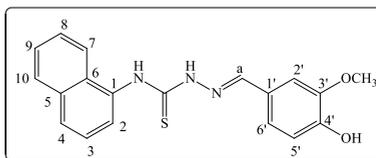
34g (*E*)-2-([1,1'-bifenil]-4-ilmetileno)-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotioamida.

Rendimento 42%; sólido branco; p.f. 204,0-206,0 °C; RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 11,99 (s, 1H, NH), 10,48 (s, 1H, NH), 8,26 (s, 1H,

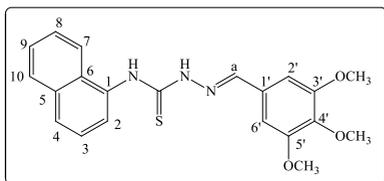
Ha), 8,06-7,96 (m, 3H), 7,93-7,86 (m, 2H), 7,73 (d, 4H, $J = 7,85$ Hz), 7,57-7,38 (m, 7H). RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 178,4 (C=S); 142,8 (C4'); 141,9 (Ca); 139,8; 136,2; 134,2; 133,8; 131,1; 129,4; 128,7; 128,4; 128,3; 127,3; 127,3; 127,1; 126,9; 126,5; 126,4; 125,9; 123,8. HRMS (ESI-TOF) m/z : 382,1375 [M + H]⁺, calculado para C₂₄H₁₉N₃S, 382,1372.

34h (*E*)-2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotioamida.

Rendimento 69%; sólido amarelo; p.f. 210,0-212,0 °C; RMN de ^1H (400 MHz, pyridine- d_6) δ /ppm: 13,07 (s, 1H, NH), 11,14 (s, 1H, NH), 8,61 (s, 1H, Ha), 8,41 (m, 1H), 8,02 (m, 1H), 7,89 (m, 1H), 7,81 (m, 2H), 7,52-7,47 (m, 3H), 7,38 (d, 1H, H5', $J = 8,07$ Hz), 7,25-7,23 (m, 2H), 3,53 (s, 3H, m-OCH₃). RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 177,8 (C=S); 149,5 (C3'); 148,5 (C4'); 144,0 (Ca); 136,2; 134,2; 131,1; 128,4; 127,3; 126,9; 126,5; 126,4; 125,9; 125,8; 123,8; 123,2 (C6'); 115,8 (C5'); 110,3 (C2'); 56,4



(*m*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 352,1112 [M + H]⁺, calculado para C₁₉H₁₇N₃O₂S, 352,1114.

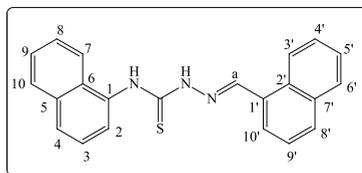


34i (*E*)-*N*-(naftalen-1-il)-2-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)hidrazina-carbotioamida. Rendimento 38%; sólido amarelo; p.f. 202,0-203,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 107,5 (s, 1H, NH), 9,36 (s, 1H, NH), 8,02 (m, 1H),

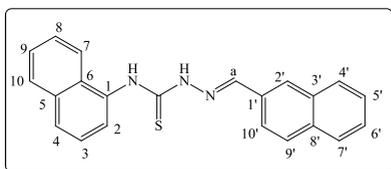
7,95 (s, 1H, Ha), 7,92-7,86 (m, 3H), 7,61-7,49 (m, 3H), 6,98 (s, 2H, H2', H6'), 3,89 (s, 3H, *p*-OCH₃); 3,87 (s, 6H, *m*-OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 178,2 (C=S); 153,6; (C3' e C5') 143,3 (Ca); 139,7 (C4'); 136,2; 134,2; 131,2; 130,0; 128,5; 127,5; 127,0; 126,6; 126,5; 125,9; 123,8; 105,4 (C2' e C6'); 60,5 (*p*-OCH₃); 56,6 (*m*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 396,1376 [M + H]⁺, calculado para C₂₁H₂₁N₃O₃S, 396,1377.

34j (*E*)-*N*-(naftalen-1-il)-2-(naftalen-1-ilmetileno)hidrazina-

carbotioamida Rendimento 78%; sólido amarelo; p.f. 199,0-201,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 11,98 (s, 1H, NH), 10,47 (s, 1H, NH), 9,13 (s, 1H, Ha), 8,50 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz); 8,38 (d, 1H, *J* = 8,0



Hz); 8,05-7,90 (m, 5H), 7,69-7,56 (m, 7H). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 178,3 (C=S); 141,4 (Ca); 136,1; 134,2; 133,8; 131,1; 130,9; 130,8; 129,7; 129,3; 128,5; 127,6; 127,4; 126,8; 126,5; 126,0; 125,9; 123,8; 123,0. HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 356,12160 [M + H]⁺, calculado para C₂₂H₁₇N₃S, 356,12159.



34k (*E*)-*N*-(naftalen-1-il)-2-(naftalen-2-ilmetileno)hidrazi-

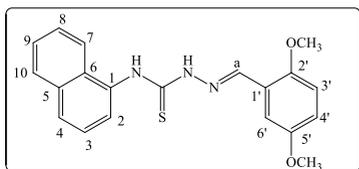
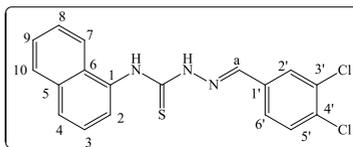
nacarbotoamida. Rendimento 63%; sólido branco; p.f. 198,0-200,0 °C; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO) δ/ppm: 12,07 (s, 1H,

NH), 10,51 (s, 1H, NH), 8,40-8,38 (m, 2H), 8,21 (s, 1H, Ha), 8,01-7,90 (m, 6H), 7,60-7,53 (m, 6H). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 178,4 (C=S); 143,3 (Ca); 136,3; 134,2; 133,4; 132,5; 131,2; 129,6; 128,7; 128,6; 128,5; 128,2; 127,5; 127,4; 127,1; 127,0; 126,6; 126,5;

125,9; 124,0. HRMS (ESI-TOF) m/z : 356,1218 $[M + H]^+$, calculado para $C_{22}H_{17}N_3S$, 356,1216.

34l (*E*)-2-(3,4-diclorobenzilideno)-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotioamida. Rendimento 75%; sólido branco; p.f. 206,0-207,0 °C; RMN de 1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm :

12,10 (s, 1H, *NH*), 10,56 (s, 1H, *NH*), 8,42 (s, 1H, Ha), 8,17 (s, 1H, H2'), 8,01-7,82 (m, 4H); 7,68 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz); 7,62-7,48 (m, 4H). RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 178,6 (C=S); 140,4 (Ca); 136,1; 135,5; 134,1; 132,4; 132,2; 131,2; 131,1; 128,7; 128,4; 127,5; 127,1; 126,6; 126,5; 125,9; 123,9. HRMS (ESI-TOF) m/z : 374,0284 $[M + H]^+$, calculado para $C_{18}H_{13}Cl_2N_3S$, 374,0280.



34m

(*E*)-2-(2,5-

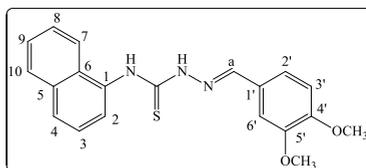
dimetoxibenzilideno)

-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotioamida. Rendimento 69%; sólido branco; p.f. 200,0-202,0 °C; RMN de 1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm :

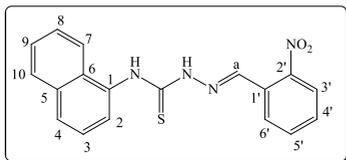
11,92 (s, 1H, *NH*), 10,39 (s, 1H, *NH*), 8,55 (s, 1H, Ha), 7,98 (dd, 1H, $J = 3,3$ e 6,0 Hz), 7,91-7,84 (m, 3H), 7,58-7,52 (m, 4H), 7,04-6,97 (m, 2H), 3,82 (s, 3H, *o*-OCH₃), 3,72 (s, 3H, *m*-OCH₃). RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 178,3 (C=S); 153,8 (C2'); 152,9 (C5'); 138,7 (Ca); 136,3; 134,1; 131,1; 128,4; 127,3; 127,0; 126,5; 125,9; 123,8; 123,3; 117,6; 113,5; 111,4; 56,7 (*o*-OCH₃); 56,1 (*m*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) m/z : 366,1270 $[M + H]^+$, calculado para $C_{20}H_{19}N_3O_2S$, 366,1271.

34n (*E*)-2-(3,4-dimetoxibenzilideno)-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotioamida. Rendimento 87%; sólido branco; p.f. 217,0-218,0 °C; RMN de 1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm :

11,85 (s, 1H, *NH*), 10,29 (s, 1H, *NH*), 8,15 (s, 1H, Ha), 7,99 (dd, 1H, $J = 6,1$ Hz e $J = 2,8$ Hz); 7,92-7,87 (m, 2H); 7,63-7,53 (m, 5H), 7,27 (d, 1H, H2', $J = 7,9$ Hz), 6,99 (d, 1H, H3', $J = 7,9$ Hz), 3,80 (s, 6H, picos sobrepostos, OCH₃). RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 177,9 (C=S); 151,2 (C5'); 149,6 (C4'); 143,6 (Ca); 136,3; 134,1; 131,2; 128,4;



127,4; 127,2; 127,0; 126,5; 125,9; 123,9; 123,0; 111,7; 109,3; 56,2 (*m*-OCH₃); 56,0 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 366,1273 [M + H]⁺, calculado para C₂₀H₁₉N₃O₂S, 366,1271.



34o (*E*)-*N*-(naftalen-1-il)-2-(2-nitrobenzilideno)hidrazinacarbotoiameda.

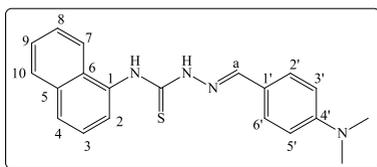
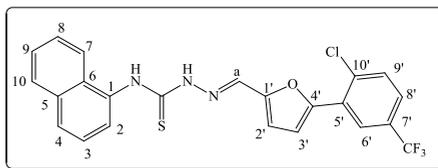
Rendimento 72%; sólido amarelo; p.f. 202,0-204,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 12,26 (s, 1H, NH), 10,56 (s, 1H, NH),

8,66 (s, 1H, Ha), 8,06 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz); 7,99 (dd, 1H, *J* = 6,2 Hz e *J* = 3,0 Hz); 7,92 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz); 7,88 (dd, 1H, *J* = 6,3 Hz e *J* = 3,0 Hz); 7,74 (dd, 1H, *J* = 7,6 Hz); 7,66-7,51 (m, 6H). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 178,8 (C=S); 148,8 (C2'); 138,1 (Ca); 136,0; 134,1; 133,7; 130,9; 130,8; 129,0; 128,9; 128,4; 127,5; 126,9; 126,6; 126,5; 125,9; 125,0; 123,8. HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 351,09101 [M + H]⁺, calculado para C₁₈H₁₄N₄O₂S, 351,09102.

34p (*E*)-2-((5-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)furan-2-il)metileno)-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotoiameda.

Rendimento 82%; sólido amarelo; p.f. 213,0-

214,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 12,12 (s, 1H, NH), 10,32 (s, 1H, NH), 8,23 e 8,21 (s, s, 2H, Ha e H6', picos sobrepostos), 7,99 (dd, 1H, *J* = 7,3 Hz e *J* = 3,3 Hz), 7,93-7,82 (m, 3H), 7,71 (dd, 1H, *J* = 1,9 Hz e *J* = 8,5 Hz), 7,59-7,52 (m, 4H), 7,47 (d, 1H, H3', *J* = 3,7 Hz), 7,37 (d, 1H, H2', *J* = 3,8 Hz). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 178,1 (C=S); 150,9 (C4'); 149,5 (C1'); 135,8 (Ca); 134,1; 133,6; 132,6; 132,4; 130,7; 129,2; 129,1; 128,6; 128,5; 127,3; 126,6; 126,5; 125,9; 125,8; 124,9; 124,9; 123,5; 115,3 (C2'); 114,5 (C3'). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 474,0650 [M + H]⁺, calculado para C₂₃H₁₅ClF₃N₃OS, 474,0649.



34q (*E*)-2-(4-(dimetil-amino)benzilideno)-*N*-(naftalen-1-il)hidrazinacarbotoiameda.

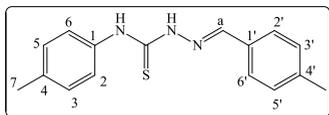
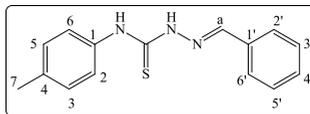
Rendimento 78%; sólido branco; p.f. 195,0-197,0 °C; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm:

11,70 (s, 1H, NH), 10,22 (s, 1H, NH), 8,10 (s, 1H, Ha), 7,99-7,96 (dd,

1H, $J = 6,3$ Hz e $J = 3,6$ Hz), 7,90- 7,86 (m, 2H), 7,73 (d, 2H, H2' e H6', $J = 8,7$ Hz), 7,57-7,52 (m, 4H), 6,72 (d, 2H, H3' e H5', $J = 9,1$ Hz), 2,97 (s, 6H, CH₃). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 177,4 (C=S); 151,9 (C4'); 144,3 (Ca); 136,3; 134,2; 131,1; 129,4; 128,4; 127,2; 126,8; 126,5; 126,4; 125,9; 123,9; 121,9 (C1'); 112,1 (C3' e C5'); 40,2 (CH₃). HRMS (ESI-TOF) m/z: 349,1482 [M + H]⁺, calculado para C₂₀H₂₀N₄S, 349,1481.

35a (*E*)-2-benzilideno-*N*-(*p*-toluil)hidra-zinacarbotoioamida.

Rendimento 81%; sólido branco; p.f. 171,0-172,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 10,15 (s, 1H, NH), 9,12 (s, 1H, NH), 7,95 (s, 1H, Ha), 7,68 (m, 2H, H3' e H5'), 7,50 (d, 2H, H2 e H6, $J = 8,2$ Hz), 7,42 (m, 3H, H2', H6' e H4'), 7,22 (d, 2H, H3 e H5, $J = 8,2$ Hz), 2,37 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,1 (C=S); 142,9 (Ca); 136,2 (C1); 135,2 (C1'); 133,1 (C4); 130,6 (C4'); 129,4 (C3 e C5); 128,8 (C3' e C5'); 127,4 (C2' e C6'); 124,8 (C2 e C6); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z: 270,1063[M+H]⁺, calculado para C₁₅H₁₅N₃S, 270,1059.

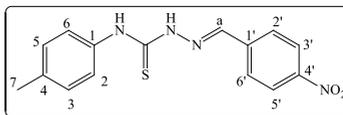


35b (*E*)-2-(4-metilbenzilideno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotoioamida.

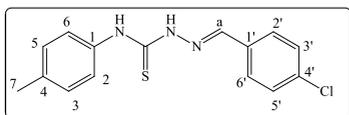
Rendimento 80%; sólido branco; p.f. 195,8-196,5 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 10,20 (s, 1H, NH), 9,11 (s, 1H, NH), 7,92 (s, 1H, Ha), 7,56 (d, 2H, H2 e H6, $J = 8,1$ Hz), 7,50 (d, 2H, H2' e H6', $J = 8,3$ Hz), 7,21 (d, 4H, H3, H5, H3' e H5', $J = 8,1$ Hz), 2,38 (s, 3H, CH₃) 2,37 (s, 3H, CH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,0 (C=S); 143,2 (Ca); 141,1(C4'); 136,2 (C1); 135,2 (C1'); 130,4 (C4); 129,6 (C3 e C5); 129,4 (C3' e C5'); 127,4 (C2' e C6'); 124,9 (C2 e C6); 21,5 (CH₃); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z: 284,1213[M+H]⁺, calculado para C₁₆H₁₇N₃S, 284,1216.

35c (*E*)-2-(4-nitrobenzilideno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotoioamida.

Rendimento 97%; sólido amarelo; p.f. 207,5-209,5 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9,99 (s, 1H, NH), 9,08 (s, 1H, NH), 8,29 (d, 2H, H2' e H6', $J = 8,8$ Hz), 7,96 (s, 1H, Ha), 7,85 (d, 2H, H3' e H5', $J = 8,8$ Hz), 7,50 (d, 2H, H2 e H6, $J = 8,3$ Hz), 7,22 (d, 2H, H3 e H5, sobreposto com o clorofórmio deuterado), 2,39 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (50 MHz,



DMSO-d₆) δ /ppm: 177,0 (C=S); 148,1(C4'); 141,0 (Ca); 140,4 (C1); 136,8 (C1'); 135,2 (C4); 129,0 (C2' e C6'); 128,9 (C3 e C5); 126,5 (C2 e C6); 124,2 (C3' e C5'); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z : 315,0913[M+H]⁺, calculado para C₁₅H₁₄N₄O₂S, 315,0910.



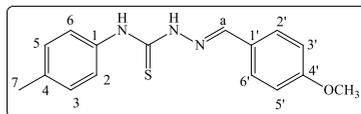
35d (E)-2-(4-clorobenzilideno)-N-(p-toluil)hidrazinacarbotoamida.

Rendimento 93%; sólido branco; p.f. 172,5-174,4 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 9,99

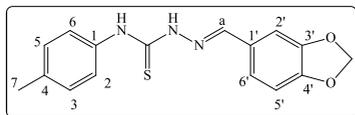
(s, 1H, NH), 9,07 (s, 1H, NH), 7,88 (s, 1H, Ha), 7,62 (d, 2H, H3' e H5', J = 8,6 Hz), 7,49 (d, 2H, H2 e H6, J = 8,3 Hz), 7,39 (d, 2H, H2' e H6', J = 8,6 Hz), 7,22 (d, 2H, H3 e H5, J = 8,2 Hz), 2,38 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 176,1 (C=S); 141,4 (Ca); 136,6 (C1); 136,4 (C4'); 135,1 (C1'); 131,6 (C4); 129,4 (C3 e C5); 129,2 (C2' e C6'); 128,5 (C3' e C5'); 124,9 (C2 e C6); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z : 304,0672[M+H]⁺, calculado para C₁₅H₁₄ClN₃S, 304,0670.

35e (E)-2-(4-metoxibenzilideno)-N-(p-toluil)hidrazinacarbotoamida.

Rendimento 82%; sólido branco; p.f. 183,2-185,0 °C; RMN de ¹H (200



MHz, CDCl₃) δ /ppm: 9,91 (s, 1H, NH), 9,10 (s, 1H, NH), 7,88 (s, 1H, Ha), 7,63 (d, 2H, H2' e H6', J = 8,7 Hz), 7,51 (d, 2H, H2 e H6, J = 8,2 Hz), 7,22 (d, 2H, H3 e H5, J = 8,1 Hz), 6,94 (d, 2H, H3' e H5', J = 8,7 Hz), 3,86 (s, 3H, *p*-OCH₃), 2,38 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 175,8 (C=S); 161,7 (C4'); 142,9 (Ca); 136,1 (C1); 135,3 (C4); 129,4 (C2' e C6'); 129,1 (C3 e C5); 125,8 (C1'); 124,9 (C2 e C6); 114,3 (C3' e C5'); 55,4 (*p*-OCH₃); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z : 300,11653[M+H]⁺, calculado para C₁₆H₁₇N₃OS, 300,11651.



35f (E)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-N-(p-toluil)-hidrazinacarbotoamida.

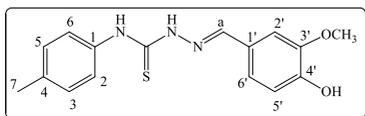
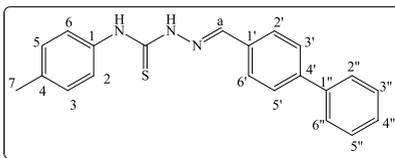
Rendimento 60%; sólido branco; p.f. 183,0-184,8 °C;

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO) δ /ppm: 11,63 (s, 1H, NH), 10,01 (s, 1H, NH), 8,04 (s, 1H, Ha), 7,81 (s, 1H, H2'), 7,38 (d, 2H, H2 e H6, J = 8,2 Hz), 7,18- 7,11 (m, 3H, H3, H5 e H6'), 6,94 (d, 1H, H5', J = 7,5 Hz), 6,06 (s, 2H, CH₂), 2,30 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 176,3 (C=S); 149,5 (C4'); 148,5 (C3'); 143,0 (Ca); 137,0 (C1); 134,9 (C4); 129,1 (C1'); 128,9 (C3 e C5); 126,4 (C2 e C6); 124,7 (C6');

108,6 (C2'); 106,1 (C5'); 101,9 (CH₂); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z: 314,0956[M+H]⁺, calculado para C₁₆H₁₅N₃O₂S, 314,0958.

35g (*E*)-2-([1,1'-bifenil]-4-
ilmetileno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazi-
nacarbotoiámidá. Rendimento

82%; sólido branco; p.f. 165,9-167,8 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9,78 (s, 1H, NH), 9,14 (s, 1H, NH), 7,93 (s, 1H, Ha), 7,76 (d, 2H, H2' e H6', J= 8,5 Hz), 7,67-7,60 (m, 4H, H3', H5', H2'' e H6''), 7,53 (d, 2H, H2 e H6, J= 8,3 Hz), 7,47-7,38 (m, 3H, H3'', H5'', H4''), 7,22 (d, 2H, H3 e H5, J=8,3 Hz), 2,38 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 175,9 (C=S); 143,3 (C4'); 142,9 (Ca); 140,1 (C1''); 136,2 (C1); 135,2 (C1'); 132,1 (C4); 129,4 (C3 e C5); 128,9; 127,9; 127,5; 127,0; 125,0 (C2 e C6); 21,1 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z: 346,1369[M+H]⁺, calculado para C₂₁H₁₉N₃S, 346,1372.

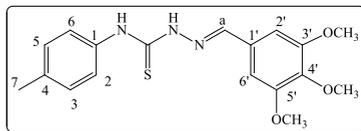


35h (*E*)-2-(4-hidroxi-3-metoxi-
benzilideno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazi-
nacarbotoiámidá. Rendimento 83%;

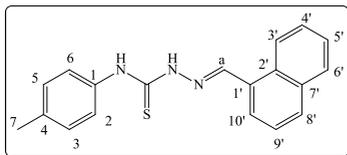
sólido branco; p.f. 157,5-159,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO) δ/ppm: 11,59 (s, 1H, NH), 9,88 (s, 1H, NH), 8,04 (s, 1H, Ha), 7,50 (s, 1H, H2'), 7,42 (d, 2H, H2 e H6, J= 8,3 Hz), 7,16 (d, 3H, H3, H5 e H6', sobreposto), 6,80 (d, 1H, H5', J= 8,1 Hz), 3,83 (s, 3H, *m*-OCH₃), 2,31 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 175,8 (C=S); 148,3 (C3'); 146,9 (C4'); 143,6 (Ca); 136,3 (C1); 135,3 (C4); 129,4 (C3 e C5); 125,6 (C1'); 125,2 (C2 e C6); 122,7 (C6'); 114,7 (C5'); 108,5 (C2'); 56,1 (*m*-OCH₃); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z: 316,1113[M+H]⁺, calculado para C₁₆H₁₇N₃O₂S, 316,1114.

35i (*E*)-2-(3,4,5-trimetoxibenzi-
lídén)-*N*-(*p*-toluil)-hidrazi-
nacarbotoiámidá. Rendimento 73%; sólido

branco; p.f. 167,8-169,9 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO) δ/ppm: 11,77 (s, 1H, NH), 9,96 (s, 1H, NH), 8,07 (s, 1H, Ha), 7,41(d, 2H, H2 e H6, J= 8,5 Hz), 7,18 (m, 4H, H3 e H5, H2' e H6', picos sobrepostos), 3,84 (s, 6H, *m*-OCH₃, simétricos), 3,70 (s, 3H, *p*-OCH₃), 2,32 (s, 3H, CH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,1 (C=S); 153,6 (C3' e C5'); 143,1 (Ca); 140,6 (C4'); 136,5 (C1); 135,2 (C4); 129,5 (C3 e C5); 128,4



(C1'); 125,3 (C2 e C6); 104,7 (C2' e C6'); 61,0 (*p*-OCH₃); 56,3 (*m*-OCH₃); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 360,1373[M+H]⁺, calculado para C₁₈H₂₁N₃O₃S, 360,1376.

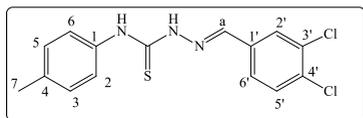
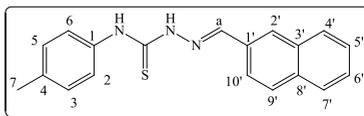


35j (*E*)-2-(naftalen-1-ilmetileno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotoamida.

Rendimento 83%; sólido amarelo claro; p.f. 173,0-175,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9,90 (s, 1H, NH), 9,18 (s, 1H, NH), 8,63 (s, 1H, Ha), 8,41(d, 1H, H10', *J* = 7,0 Hz), 7,97-7,90 (m, 3H, H6', H8', H9'), 7,62-7,49 (m, 5H, H2, H6, H3', H4', H5'), 7,22 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,3 Hz), 2,37 (s, 3H, CH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,1 (C=S); 141,9 (Ca); 136,2; 135,5; 133,8; 131,2; 130,9; 129,4 (C3 e C5); 129,0; 128,8; 127,4; 126,9; 126,3; 125,3; 124,7 (C2 e C6); 123,2 (C3'); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 320,12157[M+H]⁺, calculado para C₁₉H₁₇N₃S, 320,12159.

35k (*E*)-2-(naftalen-2-ilmetileno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotoamida.

Rendimento 73%; sólido branco; p.f. 199,3-200,3 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO) δ/ppm: 10,25 (s, 1H, NH), 9,18 (s, 1H, NH), 8,10 (s, 1H, Ha), 7,96- 7,82(m, 5H, H2', H4', H7', H9' e H10'), 7,55-7,50 (m, 4H, H2, H6, H5', H6'), 7,23 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,6 Hz), 2,38 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,0 (C=S); 143,2 (Ca); 136,3; 135,2; 134,4; 133,1; 130,7; 129,8 (C3 e C5); 129,4; 128,7; 128,4; 127,9; 127,4; 126,8; 125,0 (C2 e C6); 122,4; 21,1 (C7). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 320,1214[M+H]⁺, calculado para C₁₉H₁₇N₃S, 320,1216.

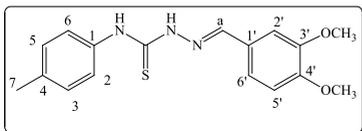
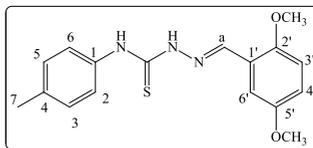


35l (*E*)-2-(3,4-diclorobenzilideno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotoamida.

Rendimento 76%; sólido branco; p.f. 206,4-208,0 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 10,54 (s, 1H, NH), 9,04 (s, 1H, NH), 7,89 (s, 1H, Ha), 7,77 (s, 1H, H2'), 7,50-7,45(m, 4H, H2, H6, H5' e H6', picos sobrepostos), 7,23 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,2 Hz), 2,38 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,2 (C=S); 140,2 (Ca); 136,6 (C1); 134,9 (C1'); 134,6 (C4'); 133,4 (C3'); 133,2 (C4); 130,9 (C5'); 129,5 (C3 e C5); 128,6 (C2'); 126,5 (C6'); 125,1 (C2 e C6); 21,1 (C7). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 338,02801[M+H]⁺, calculado para C₁₅H₁₃Cl₂N₃S, 338,02800.

35m (*E*)-2-(2,5-dimetoxibenzilideno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotoi-amida.

Rendimento 87%; sólido branco; p.f. 179,0-181,2 °C; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 9,20 (s, 1H, NH), 9,08 (s, 1H, NH), 8,22 (s, 1H, Ha), 7,51 (d, 2H, H2 e H6, $J = 8,4$ Hz), 7,38 (d, 1H, H6', $J = 2,9$ Hz), 7,20 (d, 2H, H3, H5, $J = 8,2$ Hz), 6,97 (dd, 1H, H4', $J = 9,0$ Hz e 3,0 Hz), 6,87 (d, 1H, H3', $J = 9,1$ Hz), 3,84 (s, 3H, *o*-OCH₃), 3,82 (s, 3H, *m*-OCH₃), 2,36 (s, 3H, H7). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 176,1 (C=S); 153,7 (C2'); 153,1 (C5'); 138,8 (Ca); 136,0 (C1); 135,3 (C4); 129,3 (C3 e C5); 124,7 (C2 e C6); 122,1 (C1'); 117,7 (C4'); 112,6 (C3'); 110,6 (C6'); 56,2 (*o*-OCH₃); 55,9 (*m*-OCH₃); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z : 330,1274[M+H]⁺, calculado para C₁₇H₁₉N₃O₂S, 330,1271.

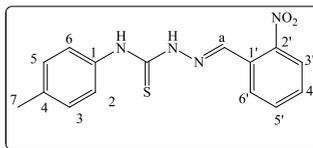


35n (*E*)-2-(3,4-dimetoxibenzilideno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotoi-amida.

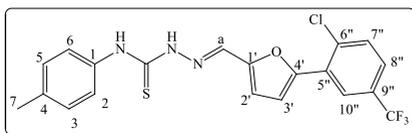
Rendimento 83%; sólido branco; p.f. 182,5-184,5 °C; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 9,93 (s, 1H, NH), 9,04 (s, 1H, NH), 7,86 (s, 1H, Ha), 7,49 (d, 2H, H2 e H6, $J = 8,2$ Hz), 7,25- 7,16 (m, 4H, H3, H5, H2' e H6'), 6,89 (d, 1H, H5', $J = 8,2$ Hz), 3,94 e 3,93 (s, 6H, *m*-OCH₃ e *p*-OCH₃), 2,37 (s, 3H, H7). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 175,9 (C=S); 151,5 (C3'); 149,4 (C4'); 143,3 (Ca); 136,3 (C1); 135,3 (C4); 129,4 (C3 e C5); 126,0 (C1'); 125,1 (C2 e C6); 122,4 (C6'); 111,0 (C5'); 109,0 (C2'); 56,0 (*m*-OCH₃ e *p*-OCH₃); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z : 330,1270[M+H]⁺, calculado para C₁₇H₁₉N₃O₂S, 330,1271.

35o (*E*)-2-(2-nitrobenzilideno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotoi-amida.

Rendimento 90%; sólido amarelo; p.f. 194,3-195,7 °C; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 9,72 (s, 1H, NH), 9,06 (s, 1H, NH), 8,42 (s, 1H, Ha), 8,09-8,00 (m, 2H, H3' e H6'), 7,74- 7,50 (m, 4H, H3, H5, H4' e H5'), 7,21 (d, 2H, H3 e H5, $J = 8,4$ Hz), 2,37 (s, 3H, H7). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 176,4 (C=S); 148,2 (C2'); 137,6 (Ca); 136,3 (C1); 135,0 (C4); 133,3 (C1'); 130,6 (C4'); 129,4 (C3 e C5); 128,7 (C3'); 128,1 (C6'); 125,0 (C5'); 124,4 (C2 e C6); 21,0



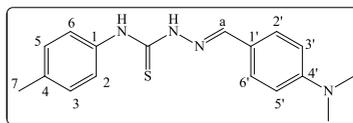
(C7). HRMS (ESI-TOF) m/z : 315,0907[M+H]⁺, calculado para C₁₅H₁₄N₄O₂S, 315,0910.



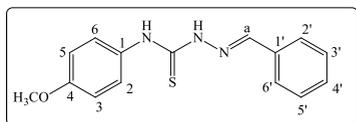
35p (*E*)-2-((5-2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)furano-2-il)metileno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotoamida. Rendimento 92%; sólido amarelo claro; p.f.

207,5-209,5 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9,96 (s, 1H, NH), 9,19 (s, 1H, NH), 8,20 (s, 1H, Ha), 7,83 (s, 1H, H10'), 7,62- 7,46 (m, 4H, H2, H6, H7'' e H8''), 7,33 (d, 1H, H3' J = 3,7 Hz), 7,23 (d, 2H, H3, H5, J =8,5 Hz), 6,92 (d, 1H, H2', J = 3,7 Hz), 2,38 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,1 (C=S); 150,7 (C4'); 149,5 (C1'); 136,8 (Ca); 134,9; 133,6; 132,6; 132,1; 129,9; 129,3; 129,0 (C3 e C5); 128,6; 128,0; 126,7; 126,0; 125,4 (C2 e C6); 125,0; 121,3; 115,2 (C2'); 114,9 (C3'); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z : 438,0650[M+H]⁺, calculado para C₂₀H₁₅ClF₃N₃OS, 438,0649.

35q (*E*)-2-(4-(dimetilamino)benziledeno)-*N*-(*p*-toluil)hidrazinacarbotoamida. Rendimento 89%; sólido amarelo; p.f. 195,2-196,4 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9,45



(s, 1H, NH), 9,09 (s, 1H, NH), 7,77 (s, 1H, Ha), 7,57-7,50 (m, 4H, H2, H6, H2' e H6'), 7,20 (d, 2H, H3 e H5, J = 8,3 Hz), 6,69 (d, 2H, H3' e H5', J = 8,9 Hz), 3,03 (s, 6H, CH₃), 2,36 (s, 3H, H7). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 175,4 (C=S); 152,0 (C4'); 143,8 (Ca); 135,8 (C1); 135,6 (C4); 129,3 (C3 e C5); 129,0 (C2' e C6'); 124,7 (C2 e C6); 120,6 (C1'); 111,8 (C3' e C5'); 40,1 (CH₃); 21,0 (C7). HRMS (ESI-TOF) m/z : 313,1479[M+H]⁺, calculado para C₁₇H₂₀N₄S, 313,1481.



36a (*E*)-2-benziledeno-*N*-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotoamida.

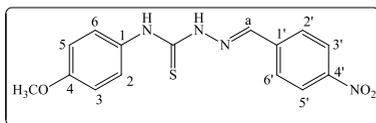
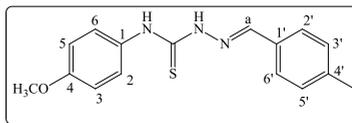
Rendimento 79%; sólido branco; p.f. 192,2-193,8 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 10,21 (s, 1H, NH), 9,05 (s, 1H, NH), 7,95 (s, 1H, Ha), 7,70-7,65 (m, 2H, H3' e H5'), 7,51-7,40 (m, 5H, H2, H6, H2', H6' e H4'), 6,95 (d, 2H, H3 e H5, J = 8,9 Hz), 3,83 (s, 3H, *p*-OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,4 (C=S); 158,1 (C4); 143,2 (Ca); 133,2 (C1); 130,7 (C1'); 130,6 (C4'); 128,8 (C3' e C5'); 127,5 (C2' e C6'); 126,9 (C2 e C6); 114,1 (C3

e C5); 55,4 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 286,1006 [M + H]⁺, calculado para C₁₅H₁₅N₃OS, 286,1009.

36b (*E*)-*N*-(4-metoxifenil)-2-(4-metilbenzilideno)hidrazinacarbotoioamida.

Rendimento 85%; sólido branco; p.f. 174,9-175,4 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 10,00

(s, 1H, NH), 9,04 (s, 1H, NH), 7,90 (s, 1H, Ha), 7,57 (d, 2H, H2' e H6', *J* = 8,3 Hz), 7,49 (2H, H2 e H6, *J* = 8,9 Hz), 7,22 (d, 2H, H3' e H5', *J* = 8,0 Hz), 6,94 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,7 Hz), 3,83 (s, 3H, *p*-OCH₃), 2,39 (s, 3H, CH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,4 (C=S); 158,0 (C4); 143,2 (Ca); 141,1 (C4'); 130,7 (C1); 130,4 (C1'); 129,6 (C3' e C5'); 127,4 (C2' e C6'); 126,8 (C2 e C6); 114,0 (C3 e C5); 55,4 (*p*-OCH₃); 21,5 (CH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 300,1166 [M + H]⁺, calculado para C₁₆H₁₇N₃OS, 300,1165.



36c (*E*)-*N*-(4-metoxifenil)-2-(4-nitrobenzilideno)hidrazinacarbotoioamida.

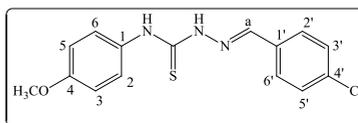
Rendimento 44%; sólido amarelo; p.f. 200,9-202,7 °C; RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆)

δ/ppm: 12,01 (s, 1H, NH), 10,23 (s, 1H, NH), 8,27-8,21 (m, 5H, Ha, H2', H3', H5' e H6'), 7,40 (d, 2H, H2 e H6, *J* = 8,8 Hz), 6,95 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 9,0 Hz), 3,78 (s, 3H, *p*-OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 177,3 (C=S); 157,6 (C4); 148,1 (C4'); 141,1 (Ca); 140,3 (C1); 132,2 (C1'); 128,8 (C2' e C6'); 128,2 (C2 e C6); 124,2 (C3' e C5'); 113,8 (C3 e C5); 55,7 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 331,0857 [M + H]⁺, calculado para C₁₅H₁₄N₄O₃S, 331,0859.

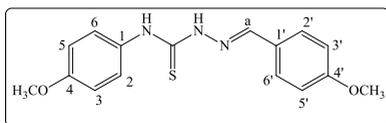
36d (*E*)-2-(4-clorobenzilideno)-*N*-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotoioamida.

Rendimento 89%; sólido branco; p.f. 174,0-175,7 °C; RMN

de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 10,08 (s, 1H, NH), 9,00 (s, 1H, NH), 7,89 (s, 1H, Ha), 7,61 (d, 2H, H3' e H5', *J* = 8,7 Hz), 7,48 (2H, H2 e H6, *J* = 8,9 Hz), 7,38 (d, 2H, H2' e H6', *J* = 8,4 Hz), 6,40 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,9 Hz), 3,83 (s, 3H, *p*-OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,5 (C=S); 158,1 (C4); 141,7 (Ca); 136,5 (C1); 131,6 (C4'); 130,5 (C1'); 129,2 (C2' e C6'); 128,6 (C3' e C5'); 126,9 (C2 e C6); 114,1 (C3



e C5); 55,4 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 320,0617 [M + H]⁺, calculado para C₁₅H₁₄ClN₃OS, 320,0619.



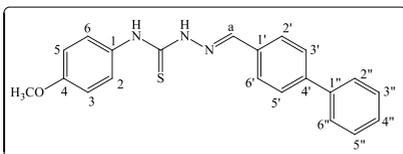
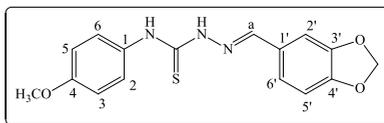
36e **(E)-2-(4-metoxibenilideno)-N-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotioamida.** Rendimento 83%; sólido branco; p.f. 159,5-161,0 °C;

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 10,21 (s, 1H, NH), 9,02 (s, 1H, NH), 7,91 (s, 1H, Ha), 7,61 (d, 2H, H2' e H6', *J* = 8,7 Hz), 7,48 (2H, H2 e H6, *J* = 8,7 Hz), 6,99- 6,90 (m, 4H, H3, H5, H3' e H5' picos sobrepostos com *J* = 8,7 Hz), 3,84 (s, *p*-OCH₃), 3,83 (s, 3H, *p*-OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,2 (C=S); 161,7 (C4'); 158,0 (C4); 142,9 (Ca); 130,8 (C1); 129,1 (C1'); 126,8 (C2' e C6'); 125,8 (C2 e C6); 114,4 (C3' e C5'); 114,0 (C3 e C5); 55,4 (2, *p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 316,1113 [M + H]⁺, calculado para C₁₆H₁₇N₃O₂S, 316,1114.

36f **(E)-2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-N-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotioamida.**

Rendimento 88%; sólido branco; p.f. 189,4-191,3 °C; RMN de ¹H

(200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 11,64(s, 1H, NH), 10,00 (s, 1H, NH), 8,04 (s, 1H, Ha), 7,83 (s, 1H, H2'), 7,37 (d, 2H, H2 e H6, *J* = 8,9 Hz), 7,13 (d, 1H, H6', *J* = 8,3 Hz), 6,93 (m, 3H, H3, H5 e H5'), 6,07 (s, 2H, CH₂), 3,77 (s, 3H, *p*-OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 176,6 (C=S); 157,4 (C4); 149,4 (C4'); 148,5 (C3'); 142,8 (Ca); 132,5 (C1); 129,1 (C1'); 128,1 (C2 e C6); 124,6 (C6'); 113,6 (C3 e C5); 108,6 (C2'); 106,0 (C5'); 101,9 (CH₂); 55,7 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 330,0902 [M + H]⁺, calculado para C₁₆H₁₅N₃O₃S, 330,0907.



36g **(E)-2-([1,1'-bifenil]-4-ilmetileno)-N-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotioamida.** Rendimento 97%; sólido branco; p.f. 188,1-189,3 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃)

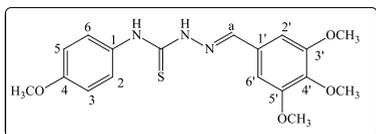
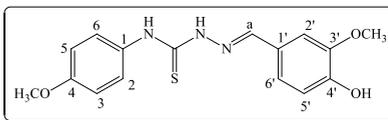
δ/ppm: 10,23 (s, 1H, NH), 9,08 (s, 1H, NH), 7,99 (s, 1H, Ha), 7,75 (d, 2H, H2 e H6, *J* = 8,7 Hz), 7,66-7,60 (m, 4H, H3', H5', H2'' e H6''), 7,53-7,38 (m, 5H, H2', H6', H3'', H4'' e H5''), 6,95 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,7

H_z), 3,83 (s, 3H, *p*-OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,5 (C=S); 158,1 (C4); 143,4 (C4'); 142,6 (C1''); 140,0 (Ca); 132,0; 130,7; 128,9; 127,9; 127,5; 127,0; 126,8 (C2 e C6); 114,1 (C3 e C5); 55,5 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 362,1316 [M + H]⁺, calculado para C₂₁H₁₉N₃OS, 362,1322.

36h (*E*)-2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)-*N*-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotoamida.

Rendimento 86%; sólido branco; p.f. 193,1-195,0 °C; RMN de ¹H

(200 MHz, acetona-d₆) δ/ppm: 10,48 (s, 1H, NH), 9,64 (s, 1H, NH), 8,16 (s, 1H, Ha), 7,58-7,52 (m, 3H, H2, H6 e H2'); 7,23 (dd, 1H, H6', *J* = 8,1 e 1,9 Hz), 6,93-6,87 (m, 3H, H3, H5 e H5'), 3,88 (s, 3H, *m*-OCH₃), 3,81 (s, 3H, *p*-OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, acetona-d₆) δ/ppm 176,7 (C=S); 157,5 (C4); 149,1 (C3'); 147,9 (C4'); 143,1 (Ca); 132,1 (C1); 126,6 (C2 e C6); 126,1 (C1'); 122,5 (C6'); 115,0 (C5'); 113,3 (C3 e C5); 109,4 (C2'); 55,6 (*m*-OCH₃); 54,8 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 332,1060 [M + H]⁺, calculado para C₁₆H₁₇N₃O₃S, 332,1063.



36i (*E*)-*N*-(4-metoxifenil)-2-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)hidrazinacarbotoamida.

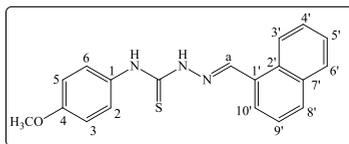
Rendimento 86%; sólido branco; p.f.176,3-177,5 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃)

δ/ppm: 9,92(s, 1H, NH), 8,96 (s, 1H, NH), 7,83 (s, 1H, Ha), 7,47 (d, 2H, H2 e H6, *J* = 8,9 Hz), 6,95 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,9 Hz), 6,88 (s, 2H, H2' e H6'), 3,91 (s, 6H, *m*-OCH₃), 3,89 (s, 3H, *p*-OCH₃), 3,83 (s, 3H, *p*-OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,6 (C=S); 158,2 (C4); 153,6 (C3' e C5'); 143,0 (Ca); 140,7 (C4'); 130,6 (C1); 128,3 (C1'); 127,0 (C2 e C6); 114,1 (C3 e C5); 104,7 (C2' e C6'); 60,9 (*p*-OCH₃); 56,3 (*m*-OCH₃); 55,4 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 376,1323 [M + H]⁺, calculado para C₁₈H₂₁N₃O₄S, 376,1326.

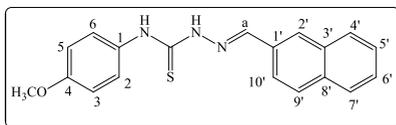
36j (*E*)-*N*-(4-metoxifenil)-2-(naftalen-1-ilmetileno)hidrazinacarbotoamida.

Rendimento 88%; sólido amarelo claro; p.f. 192,8-193,5 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃)

δ/ppm: 10,16 (s, 1H, NH), 9,11 (s, 1H, NH), 8,68 (s, 1H, Ha), 8,40 (d, 1H, H10', *J* = 7,3 Hz), 7,98-7,89 (m,



3H, H6', H8', H9'), 7,63-7,49 (m, 5H, H2, H6, H3', H4', H5'), 6,94 (s, 2H, H3 e H5, $J = 9,2$ Hz), 3,83 (s, 3H, p -OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 176,5 (C=S); 158,0 (C4); 141,8 (Ca); 133,8; 131,2; 130,9; 130,7; 129,0; 128,7; 127,4; 126,9; 126,6 (C2 e C6); 126,3; 125,3; 123,1; 114,1 (C3 e C5); 55,4 (p -OCH₃). HRMS (ESI-TOF) m/z : 336,1168 [M + H]⁺, calculado para C₁₉H₁₇N₃OS, 336,1165.



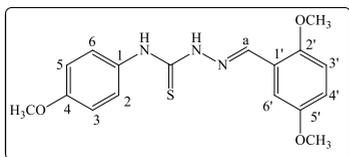
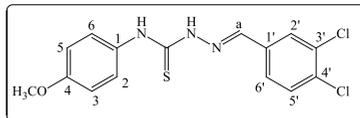
36k (*E*)-*N*-(4-metoxifenil)-2-(naftalen-2-ilmetileno)hidrazinacarbotioamida. Rendimento 89%; sólido branco; p.f. 204,6-206,7 °C; RMN de ¹H (200 MHz,

DMSO-d₆) δ /ppm: 11,85 (s, 1H, NH), 10,10 (s, 1H, NH), 8,34 (m, 2H); 8,17 (s, 1H, Ha), 8,00-7,92 (m, 3H); 7,58-7,53 (m, 2H), 7,43 (d, 2H, H2 e H6, $J = 8,7$), 6,95 (d, 2H, H3 e H5, $J = 8,7$), 3,78 (s, 3H, p -OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 176,9 (C=S); 157,4 (C4); 143,1 (Ca); 134,2; 133,3; 132,5; 132,4; 129,5; 128,7; 128,6; 128,1 (C2 e C6); 127,5; 127,1; 123,8; 113,7 (C3 e C5); 55,7 (p -OCH₃). HRMS (ESI-TOF) m/z : 336,1169 [M + H]⁺, calculado para C₁₉H₁₇N₃OS, 336,1165.

36l (*E*)-2-(3,4-diclorobenzilideno)-*N*-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotioamida. Rendimento 86%; sólido

branco; p.f. 185,5-186,5 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 10,52

(s, 1H, NH), 8,98 (s, 1H, NH), 7,89 (s, 1H, Ha); 7,77 (s, 1H, H2'), 7,49-7,44 (m, 4H, H2, H6, H5' e H6'), 6,95 (d, 2H, H3 e H5, $J = 8,8$ Hz), 3,84 (s, 3H, p -OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 176,9 (C=S); 158,3 (C4); 140,1 (Ca); 134,6 (C1); 133,4 (C1'); 133,1 (C4'); 130,9 (C3'); 130,4 (C5'); 128,6 (C6'); 126,9 (C2 e C6); 126,5 (C2'); 114,1 (C3 e C5); 55,4 (p -OCH₃). HRMS (ESI-TOF) m/z : 354,0227 [M + H]⁺, calculado para C₁₅H₁₃Cl₂N₃OS, 354,0229.



36m (*E*)-2-(2,5-dimetoxibenzilideno)-*N*-(4-metoxifenil)hidrazinacarbotioamida. Rendimento 92%;

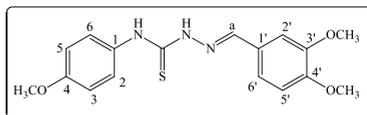
sólido branco; p.f. 194,8-195,6 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 9,10 (s, 1H, NH), 9,01 (s, 1H,

NH), 8,21 (s, 1H, Ha), 7,50 (d, 2H, H2 e H6, $J = 8,9$ Hz), 7,38 (d, 1H, H6', $J = 2,8$ Hz), 7,00-6,85 (m, 4H, H3, H5, H3' e H4'), 3,84, 3,83 e

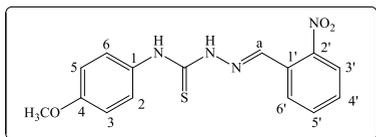
3,82 (s, 9H, picos sobrepostos, OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 176,8 (C=S); 157,4 (C2'); 153,8 (C5'); 152,9 (C4); 138,7 (Ca); 132,5 (C1); 128,2 (C2 e C6); 123,2 (C1'); 117,5 (C4'); 113,7 (C3 e C5); 113,5 (C3'); 111,4 (C6'); 56,7 (*o*-OCH₃); 56,1 (*m*-OCH₃); 55,7 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 346,1221 [M + H]⁺, calculado para C₁₇H₁₉N₃O₃S, 346,1220.

36n (*E*)-2-(3,4-dimetoxibenzi-
lideno)-*N*-(4-metoxifenil)hidra-
zinacarbotoamida.

Rendimento 81%; sólido amarelo claro; p.f. 175,3-177,8 °C; RMN de ¹H (200



MHz, CDCl₃) δ/ppm: 10,09 (s, 1H, NH), 8,98 (s, 1H, NH), 7,88 (s, 1H, Ha), 7,48 (d, 2H, H2 e H6, *J* = 8,9 Hz), 7,24 (d, 1H, H2', *J* = 2,0), 7,17 (dd, 1H, H6', *J* = 8,3 e 2,0 Hz), 6,95 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,9 Hz), 6,88 (d, 1H, H5', *J* = 8,3), 3,94 e 3,93 (s, 6H), 3,83 (s, 3H). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 176,3 (C=S); 158,1 (C4); 151,5 (C3'); 149,5 (C4'); 143,4 (Ca); 130,8 (C1); 127,0 (C2 e C6); 126,0 (C1'); 122,4 (C6'); 114,1 (C3 e C5); 111,0 (C5'); 108,6 (C2'); 56,1 (OCH₃); 56,0 (OCH₃); 55,4 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 346,12203 [M + H]⁺, calculado para C₁₇H₁₉N₃O₃S, 346,12199.



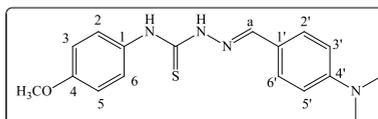
36o (*E*)-*N*-(4-metoxifenil)-2-(2-
nitrobenzilideno)hidrazinacarboto-
amida.

Rendimento 67%; sólido amarelo; p.f. 209,3-211,6 °C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9,45 (s, 1H, NH), 8,98 (s, 1H, NH),

8,40 (s, 1H, Ha), 8,06 (m, H3' e H6', 2H), 7,73-7,59 (m, 2H, H4' e H5'), 7,51 (d, 2H, H2 e H6, *J* = 8,8 Hz), 6,94 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,8 Hz), 3,83 (s, 3H, *p*-OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 177,3 (C=S); 157,5 (C4); 148,8 (C2'); 137,9 (Ca); 133,7 (C1); 132,2 (C1'); 130,9 (C4'); 129,0 (C3'); 128,8 (C6'); 128,0 (C2 e C6); 124,9 (C5'); 113,8 (C3 e C5); 55,7 (*p*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 331,0863 [M + H]⁺, calculado por C₁₅H₁₄N₄O₃S, 331,0859.

36p (*E*)-2-(4-(dimetilamino)-
benzilideno)-*N*-(4-metoxifenil)-
hidrazinacarbotoamida.

Rendimento 79%; sólido amarelo; p.f. 180,1-181,8 °C; RMN de ¹H



(200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9,89 (s, 1H, NH), 9,02 (s, 1H, NH), 7,82 (s, 1H, Ha), 7,52 (m, 4H, picos sobrepostos com $J= 8,9$ Hz), 6,93 (d, 2H, H3 e H5, $J= 8,9$ Hz), 6,68 (d, 2H, H3' e H5', $J= 8,9$ Hz), 3,83 (s, 3H, *p*-OCH₃), 3,02 (s, 6H, CH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 175,7 (C=S); 157,8 (C4); 152,0 (C4'); 144,0 (Ca); 131,0 (C1); 129,0 (C2' e C6'); 126,7 (C2 e C6); 120,5 (C1'); 114,0 (C3 e C5); 111,7 (C3' e C5'); 55,4 (, *p*-OCH₃); 40,1 (CH₃). HRMS (ESI-TOF) *m/z*: 329,1435 [M + H]⁺, calculado por C₁₇H₂₀N₄OS, 329,1431.

4.3 PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DAS BACTÉRIAS COMPETENTES

O processo de preparo das bactérias competentes e a transformação bacteriana foram baseados no protocolo descrito na literatura.⁹⁵ Todos os testes enzimáticos foram realizados no Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), no Departamento de Bioquímica da UFSC, sob coordenação do Prof. Dr. Hernán Terenzi.

Foram semeadas bactérias *Escherichia coli* BL21(DE3) em placas de Petri contendo LB-ágar (extrato de levedura 0,5%, peptona 1%; NaCl 1%; ágar 2% pH 7,5). Estas placas foram incubadas por um período de 16 horas a 37°C. Transcorrido o tempo, transferiu-se uma colônia para 50 mL de meio LB (extrato de levedura 0,5%, peptona 1%; NaCl 1% pH 7,5) o qual foi incubado sob agitação a 37 °C até que fosse atingida a densidade óptica de 0,4 no comprimento de onda de 600 nm. Em seguida centrifugou-se a suspensão de células (6000 g por 20 minutos) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi homogeneizado com 25 mL de uma solução gelada (4 °C) de CaCl₂ 0,1 mol L⁻¹. A suspensão foi incubada por uma hora em gelo e novamente centrifugada. O sedimento foi então, homogeneizado com 5 mL de uma solução gelada de CaCl₂ 0,1 mol L⁻¹ contendo 20% de glicerol, a suspensão foi mantida por 30 minutos em gelo e em seguida foram feitas alíquotas de 150 µL. As alíquotas foram conservadas a -80 °C.

Os plasmídeos que contém os genes da PtpA, PtpB, YopH e os genes codificantes das PTP humanas PTP1B, LYP e PEST estão disponíveis no laboratório e foram cedidos por pesquisadores parceiros. O plasmídeo contendo o gene da PtpA de *Mycobacterium tuberculosis* (pET28a-Mt_PtpA) e o plasmídeo contendo o gene da PtpB (pET28a-Mt_PtpB) foram cedidos pelo Dr. Pedro Alzari (Unité de Biochimie Structurale, Institut Pasteur, Paris, França). O plasmídeo contendo o gene da YopH de *Yersinia enterocolitica* (pT7-7Yop51*Δ16) e o plasmídeo contendo o gene da PTP1B humana (pET19b-Hs_PTP1B)

foram cedidos pelo Dr. Tiago A. S. Brandão da Universidade Federal de Minas Gerais (Departamento de Química, UFMG). Já os plasmídeos pET28a-LYP e pET28a-PTP_PEST codificantes das PTP humanas LYP e PTP-PEST respectivamente, foram fornecidos pelo Dr. Nuzio Bottini do Institute for Genetic Medicine em Los Angeles, Estados Unidos.

No processo de transformação, cerca de 50 ng dos plasmídeos foram adicionados separadamente a uma alíquota de 150 μL de *E. coli* BL21(DE3) competente. Incubou-se as células por 20 minutos a 4 °C. Em seguida realizou-se um choque térmico ao colocar as células por 2 minutos a 42 °C seguidos de 2 minutos a 4 °C. As células foram então homogeneizadas após o acréscimo de 500 μL de meio LB. Incubou-se a suspensão por 1 hora a 37 °C. As bactérias foram semeadas em meio LB ágar suplementado com o antibiótico pertinente a cada plasmídeo (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina para os vetores codificantes da YopH e PTP1B; 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina para os demais vetores).

4.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para expressar a enzima PtpA foi feito pré inóculo de 10 mL de meio LB (Luria- Bertani) suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina. A este meio foi adicionada separadamente, uma colônia bacteriana obtida durante o processo de transformação. O pré inóculo desta enzima foi mantido sob agitação (150 rpm) a 37 °C por um período de 16 horas. Após a primeira etapa de incubação, 5 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para uma garrafa de cultivo contendo 250 mL de meio LB suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina. A garrafa de cultivo da enzima foi mantida sob agitação (150 rpm) a 37 °C até que o valor de 0,6 de densidade óptica a 600 nm fosse atingido. Em seguida, a garrafa de cultivo foi incubada por 20 minutos a 15 °C antes do acréscimo de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) à concentração final de 0,5 mmol L⁻¹. O cultivo foi mantido na temperatura de 15 °C para a expressão da fosfatase por um período de 16 horas sob agitação (150 rpm). O cultivo foi, então, centrifugados a 5.000 x g, por 20 min, 4 °C. Os sedimentos obtidos após a centrifugação dos cultivos foram homogeneizados com o tampão de lise (20 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8,0; 0,5 mol L⁻¹ NaCl; 10 mmol L⁻¹ imidazol e 10 % glicerol) acrescido de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inibidor de protease PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) e sonicados em gelo. Em seguida, realizou-se a centrifugação 16.000 x g por 40 minutos, a 4 °C. Separou-se a frações solúveis para proceder com o processo de purificação.

A purificação das proteínas recombinantes foi feita com o cromatógrafo ÄKTA (GE Healthcare). A fosfatase PtpA possui um grupo de seis histidinas em sua parte N-terminal (His-Tag) o qual facilita as suas purificações pela metodologia de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC- do inglês “*Immobilized Metal Affinity Chromatography*”). As frações solúveis anteriormente obtidas foram eluídas em colunas His-Trap (colunas contendo níquel como metal imobilizado, Amersham Biosciences) com o uso dos tampões A (Tris-HCl 20 mmol L⁻¹ pH 8,0; NaCl 0,5 mol L⁻¹; glicerol 10%) e tampão B (Tris-HCl 20 mmol L⁻¹ pH 8,0; NaCl 0,5 mol L⁻¹; glicerol 10%; Imidazol 0,5 mmol L⁻¹; 1 β-mercaptoetanol 1 mmol L⁻¹). Por possuir uma estrutura química semelhante à histidina, o imidazol contido no tampão B compete pelo níquel presente na coluna com a cauda de histidina das proteínas recombinantes, à medida que a concentração do imidazol aumenta, as proteínas de interesse são eluídas.

A pureza das frações obtidas após a purificação foi analisada através de eletroforese em géis de poliacrilamida sob condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE – do inglês “*Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”). Os géis foram posteriormente corados com o corante Coomassie Brilliant Blue R-250.

As frações correspondentes à proteína purificada foram submetidas a diálises sequenciais para a retirada gradual do imidazol. O último tampão utilizado na diálise e no qual as proteínas foram mantidas é o Tris-HCl pH 8,0; NaCl 50 mmol L⁻¹, EDTA (do inglês “*Ethylenediamine tetraacetic acid*”) 5mmol L⁻¹; glicerol 20%; DTT (ditiotreitól) 5mmol L⁻¹. Logo após, procedeu-se à concentração das proteínas por ultrafiltração.

Neste trabalho foi realizado o teste de seletividade, para isto foram utilizadas outras enzimas: PtpB, YopH e as enzimas humanas Ptp1B, PEST e LYP, as quais foram previamente expressas e purificadas pela aluna de mestrado do prof. Hernán Terenzi, Ana Caroline Arruda de Souza. Para realizar a expressão e purificação da YopH e da PTP1B utilizou-se os protocolos previamente descritos em Brandão ⁹⁶ e Chiaradia ²⁰ com pequenas modificações. Já para as enzimas PtpB, PEST e LYP foi utilizado o mesmo procedimento descrito para a PtpA.

As enzimas foram quantificadas através do método de Bradford ⁹⁷ com o uso de soroalbumina bovina como padrão ou através da absorbância em 280 nm na presença de hidrócloro de guanidina 6 mmol L⁻¹. Após o processo de purificação, todas as enzimas utilizadas no presente trabalho foram fracionadas e mantidas em freezer -80 °C.

4.5 TRIAGEM DOS INIBIDORES

Os ensaios de triagem foram feitos em microplacas de 96 poços tendo 200 μL de volume final. Primeiramente foi adicionado 5 μL do composto (concentração final de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, solvente DMSO), 165 μL de água mili-Q, 20 μL de tampão imidazol e 2 μL da proteína a 5 μM (concentração final de 50 nmol L^{-1}). A microplaca foi incubada por 10 minutos a 37 °C e após, foi adicionado 5 μL de *p*NPP (*p*-nitrofenilfosfato- substrato sintético de fosfatase).

A absorbância foi medida a 410 nm em espectrofotômetro de placas ELISA (TECAN) por 10 minutos a 37 °C com leituras a cada minuto. Controle negativo foi feito na presença de DMSO no lugar do composto. O percentual de atividade inibitória foi calculado pela média de três experimentos feitos em triplicata em dias distintos.

4.6 DETERMINAÇÃO DO IC_{50}

O potencial de inibição das moléculas foi determinado por meio do cálculo do valor de IC_{50} (concentração inibitória necessária para cada inibidor diminuir em 50% a atividade da enzima original). Os valores de IC_{50} foram determinados graficamente usando concentrações crescentes de inibidor *versus* porcentagem de inibição (11 concentrações diferentes). A atividade enzimática é expressa em valores de percentual de atividade residual comparada ao controle sem inibidor. Os dados experimentais foram analisados por meio do programa Microsoft Office Excel 2016 e os valores de IC_{50} determinados graficamente por regressão linear de melhor ajuste. Os ensaios foram realizados em triplicata em três dias distintos.

4.7 TESTE DE SELETIVIDADE

Para a determinação do índice de seletividade determinou-se os valores de IC_{50} do inibidor frente às outras fosfatases (PtpB, YopH, PTP1B, PEST e LYP), empregando a mesma metodologia usada no ensaio de determinação do IC_{50} , modificando apenas a concentração das enzimas (PtpB 3 μM , YopH 1,5 μM , PTP1B PEST 14 μM , LYP 160 nM). Os ensaios foram realizados em triplicata em três dias distintos. Em seguida, foi feita a relação $\text{IC}_{50\text{PTP}}/\text{IC}_{50\text{PtpA}}$.

4.8 TESTE DE CINÉTICA ENZIMÁTICA

No ensaio cinético, a atividade enzimática da PtpA foi avaliada usando três concentrações do inibidor (concentrações baseadas nos valores de IC_{50}) e oito concentrações de *p*NPP (0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,8; 20,0 mmol L⁻¹). Assim como na triagem e nos ensaios de IC_{50} , a cinética enzimática foi feita em microplaca, com o substrato sintético *p*NPP e um volume final de reação de 200 µL. As velocidades de reação foram expressas como a atividade específica da proteína (µmol. *p*NP. min⁻¹ mg⁻¹). A produção de *p*-nitrofenol (*p*NP) foi quantificada e analisada pelo gráfico de Michaelis-Menten no GraphPad Prism 5.0.

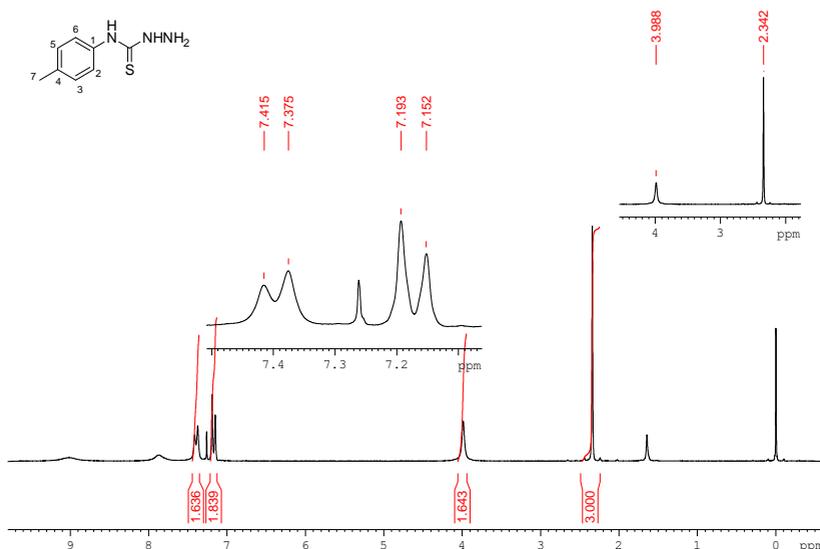
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

A primeira estratégia desenvolvida nesse trabalho foi a realização da síntese dos intermediários de reação, as tiossemicarbazidas **31-33**, a partir dos isotocianatos e hidrazina, utilizando a metodologia descrita por Serra et. al. (2014). Os intermediários foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C . A caracterização detalhada para estes compostos é apresentada na parte experimental e os espectros podem ser observados no Apêndice I.

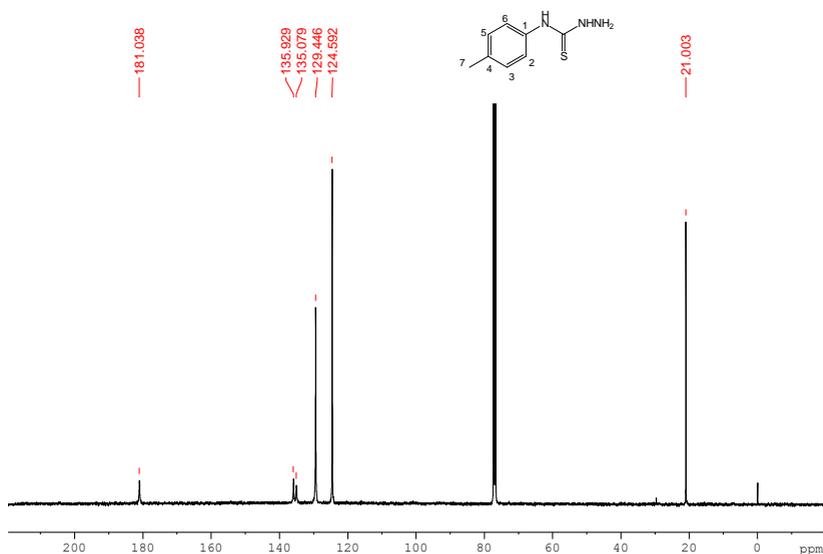
Para exemplificar a caracterização dos intermediários foi escolhido o composto **32**. No espectro de RMN de ^1H (Figura 15) pode-se observar um simpleto em 2,34 ppm referente a metila ligada ao anel aromático. Na sequência tem-se um sinal em 3,99 ppm relativo a dois hidrogênios, o qual pode ser atribuído aos hidrogênios do NH_2 . Na região dos anéis aromáticos verifica-se dois dupletos, o primeiro em 7,17 ppm referente aos hidrogênios H3 e H5, com constante de acoplamento de $J = 8,3$ Hz e o outro em 7,39 ppm com $J = 7,9$ Hz atribuído aos hidrogênios H2 e H6.

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **32**.



No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 16), observa-se primeiramente em 21,0 ppm o sinal referente ao carbono da metila. Logo após, na faixa de 124,6-135,9 ppm têm-se os carbonos aromáticos e o carbono da tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$) em 181,0 ppm.

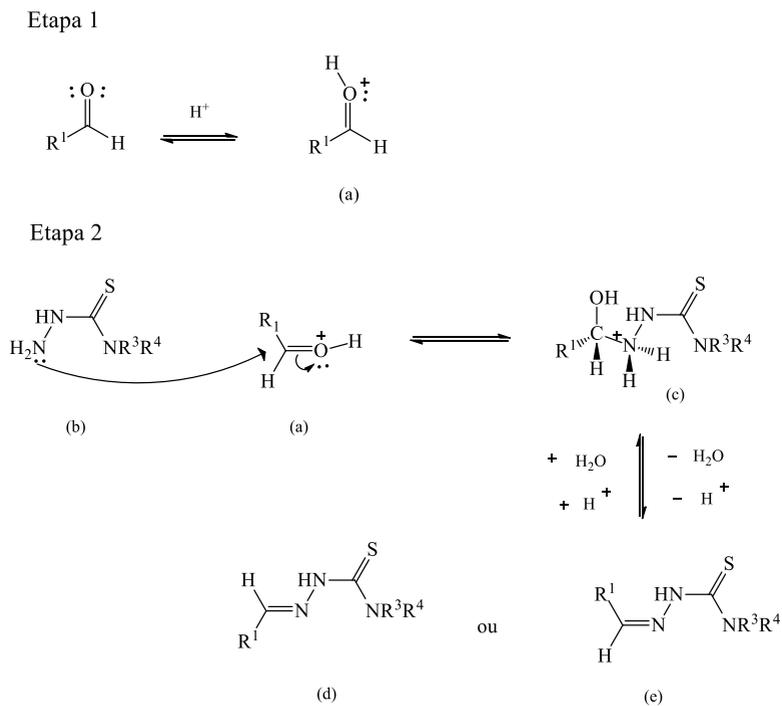
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **32**.



Depois de obtidos os intermediários de reação, foram sintetizadas 50 tiossemicarbazonas, das quais 22 não foram relatadas na literatura (**34b**, **34d**, **34f**, **34g**, **34i-p**, **35g**, **35i**, **35k**, **35l**, **36g**, **36i**, **36k**, **36l**, **36n**, **36o**). Os outros compostos já foram descritos na literatura⁹⁸⁻¹⁰⁵, porém não há relato de estudos destes como inibidores de PtpA e PtpB de *Mtb*. As tiossemicarbazonas foram preparadas a partir da reação entre as tiossemicarbazidas e diferentes aldeídos, obtendo-se, no geral, rendimentos entre 42 e 97%.

O mecanismo de reação proposto para a síntese das tiossemicarbazonas inicia-se pela formação do íon oxônio, seguido do ataque nucleofílico do nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida, que resulta na formação do hemiacetal protonado, o qual deve perder uma molécula de água, formando o produto desejado (Esquema 1).^{63, 106}

Esquema 1. Mecanismo da formação de tiossemicarbazonas (a) íon oxônio, (b) tiossemicarbazida, (c) hemiaminal protonado, (d) isômero *E*, (e) isômero *Z*.



Na Tabela 2 estão listados os pontos de fusão da literatura e experimentais dos compostos, bem como, o número de registro CAS quando relatado na literatura.

Tabela 2. Ponto de fusão (experimental e reportado na literatura) e número de registro CAS das tiossemicarbazonas.

Composto	R ₁	R ₂	p.f. Exp. (°C)	p.f. Lit. (°C)	CAS
34a	1-naftila	Ph	217,0-218,0	**	133296-67-0
34b*	1-naftila	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	197,0-199,0	-	-
34c	1-naftila	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	229,0-230,0	218-220 *	51454-72-9
34d*	1-naftila	4-Cl-C ₆ H ₄	206,0-208,0	-	-
34e	1-naftila	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	203,0-205,0	**	109807-18-3
34f*	1-naftila	3,4-OCH ₂ O-C ₆ H ₃	208,0-209,0	-	-
34g*	1-naftila	4-C ₆ H ₄ -Ph	204,0-206,0	-	-
34h	1-naftila	3-OCH ₃ ,4-OH-C ₆ H ₃	210,0-212,0	**	70161-75-0
34i*	1-naftila	3,4,5-OCH ₃ -C ₆ H ₂	202,0-203,0	-	-
34j*	1-naftila	1-naftila	199,0-201,0	-	-
34k*	1-naftila	2-naftila	198,0-200,0	-	-
34l*	1-naftila	3,4-Cl-C ₆ H ₃	206,0-207,0	-	902272-65-5
34m*	1-naftila	2,5-OCH ₃ -C ₆ H ₃	200,0-202,0	-	-
34n*	1-naftila	3,4-OCH ₃ -C ₆ H ₃	217,0-218,0	-	902272-67-7
34o*	1-naftila	2-NO ₂ -C ₆ H ₄	202,0-204,0	-	-
34p*	1-naftila	5-(2-Cl,5-CF ₃)-C ₆ H ₃ -furan-2-il	213,0-214,0	-	-
34q	1-naftila	4-N(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₄	195,0-197,0	191-194 *	51454-74-1
35a	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	Ph	171,0-172,0	171 *	89713-29-1
35b	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	195,8-196,5	**	98172-98-6
35c	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	207,5-209,5	209-210 ^o	316138-19-9
35d	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	4-Cl-C ₆ H ₄	172,5-174,4	**	97496-61-2
35e	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	183,2-185,0	189-190 ^o	98110-71-5
35f	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	3,4-OCH ₂ O-C ₆ H ₃	183,0-184,8	202-203 ^o	97724-22-6
35g*	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	4-C ₆ H ₄ -Ph	165,9-167,8	-	875882-15-8
35h	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	3-OCH ₃ ,4-OH-C ₆ H ₃	157,5-159,0	182-183 ^o	98110-81-7
35i*	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	3,4,5-OCH ₃ -C ₆ H ₂	167,8-169,9	-	316131-53-0
35j	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	1-naftila	173,0-175,0	**	316135-88-3
35k*	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	2-naftila	199,3-200,3	-	316132-24-8
35l*	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	3,4-Cl-C ₆ H ₃	206,4-208,5	-	-
35m	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	2,5-OCH ₃ -C ₆ H ₃	179,0-181,2	**	943921-94-6
35n	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	3,4-OCH ₃ -C ₆ H ₃	182,5-184,5	**	49773-68-4
35o	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	2-NO ₂ -C ₆ H ₄	194,3-195,7	204-205 ^o	98307-46-1
35p*	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	5-(2-Cl,5-CF ₃)-C ₆ H ₃ -furan-2-il	207,5-209,5	-	-
35q	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	4-N(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₄	195,2-196,4	203 ^o	98343-61-4

(continua)

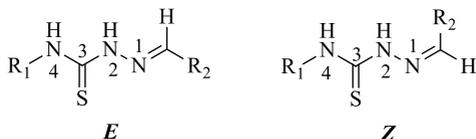
(conclusão)					
36a	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	Ph	192,2-193,8	**	913329-63-2
36b	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	174,9-175,4	**	20158-23-0
36c	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	200,9-202,7	**	913329-71-2
36d	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	4-Cl-C ₆ H ₄	174,0-175,7	188-190 ^e	281213-04-5
36e	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	159,5-161,0	169 ^λ	740-86-3
36f	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3,4-OCH ₂ O-C ₆ H ₃	189,4-191,3	195 ^λ	742-52-9
36g*	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	4-C ₆ H ₄ -Ph	188,1-189,3	-	-
36h	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3-OCH ₃ ,4-OH-C ₆ H ₃	193,1-195,0	**	902-60-3
36i*	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3,4,5-OCH ₃ -C ₆ H ₂	176,3-177,5	-	-
36j	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	1-naftila	192,8-193,5	**	744-01-4
36k*	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	2-naftila	204,6-206,7	-	-
36l*	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3,4-Cl-C ₆ H ₃	185,5-186,5	-	-
36m	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	2,5-OCH ₃ -C ₆ H ₃	194,8-195,6	208-210 ^λ	473682-88-1
36n*	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3,4-OCH ₃ -C ₆ H ₃	175,3-177,8	-	880066-82-0
36o*	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	2-NO ₂ -C ₆ H ₄	209,3-211,6	-	903358-48-5
36p	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	4-N(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₄	180,1-181,8	**	20158-22-9

Fonte: O Autor. CAS= número de registro, obtido no SciFinder. *Compostos não relatados na literatura. **p.f. não encontrado na literatura. –Dados não encontrados na literatura. ^eChough et. al., 1971; ^f Fromm, 1926; ^g Tişler, 1956; ^h Priyanka et. al., 2011; ^λ Substance detail SciFinder.

Todos os compostos foram caracterizados por RMN de ¹H e ¹³C e espectro de massa de alta resolução. A caracterização detalhada para estes compostos é apresentada na parte experimental e os espectros podem ser observados no Apêndice I e II. Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se os solventes CDCl₃ ou DMSO-d₆ e a numeração foi atribuída aleatoriamente apenas para identificação dos sinais.

Em todos os espectros de RMN de ¹H foi possível verificar a formação do produto. Sinais característicos foram identificados, como por exemplo, o hidrogênio do carbono imínico, que aparece como um simpleto em 7-8 ppm. Além desse sinal, têm-se os hidrogênios ligados ao nitrogênio da tioamida, que surgem como dois simpletos entre 10-11 ppm. Esses dados referentes aos sinais característicos das tiossemicarbazonas são descritos na literatura.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Além disso, essa classe de compostos pode ser sintetizada como uma mistura isomérica de *E* e *Z*, como é demonstrado na Figura 17. Lessa et.al. observaram que o hidrogênio do nitrogênio ligado a imina (N-2, verificar Figura 17) pode apresentar sinais duplicados no espectro de RMN de ¹H, no deslocamento químico de ~10 ppm indicando a configuração *E* e no deslocamento de ~14 ppm a configuração *Z*.⁸⁰

Figura 17. Isômeros *E* e *Z* das tiossemicarbazonas.

Notas: R₁ e R₂= Alquil e/ou Aril.

No caso das tiossemicarbazonas relatadas nesta tese, não foi formada a mistura isomérica, pois nos espectros de RMN de ¹H verificou-se que o sinal referente ao hidrogênio do N-2 apresenta um deslocamento químico entre 10-11 ppm. Essa evidência experimental indica que os compostos obtidos neste trabalho apresentam a configuração *E*, mais estável.

Desse modo, o composto **35I** foi escolhido para demonstrar a caracterização das tiossemicarbazonas por RMN de ¹H, de ¹³C e HETCOR.

O espectro de RMN de ¹H do composto **35I** pode ser analisado na Figura 18. O sinal em 2,38 ppm é referente aos três hidrogênios da metila ligado ao anel aromático, H7 (numeração definida aleatoriamente e demonstrada na Figura 17). Na sequência têm-se os deslocamentos químicos típicos de hidrogênios aromáticos. Primeiramente, encontra-se o duplete dos hidrogênios H3 e H5 com uma constante de acoplamento de *J* = 8,2 Hz. Logo após os sinais sobrepostos em 7,45-7,50 ppm, referente a quatro hidrogênios, são atribuídos aos hidrogênios H2, H6, H5' e H6'. Já em 7,77 ppm tem-se um simpleto de um hidrogênio, atribuído ao H2'. Por fim, pode-se observar os sinais característicos da formação da tiossemicarbazona, em 7,89 ppm o hidrogênio Ha e os dois últimos sinais referentes aos hidrogênios ligados ao nitrogênio.

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 19), observa-se primeiramente em 21,1 ppm o sinal referente ao carbono da metila. Logo após, na faixa de 125,1-136,6 ppm têm-se os carbonos aromáticos. Os dois carbonos mais desblindados são: o Ca, com um deslocamento químico próximo ao dos aromáticos em 140,2 ppm; e o carbono da tioacetona (C=S) em 176,2 ppm.

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **351**.

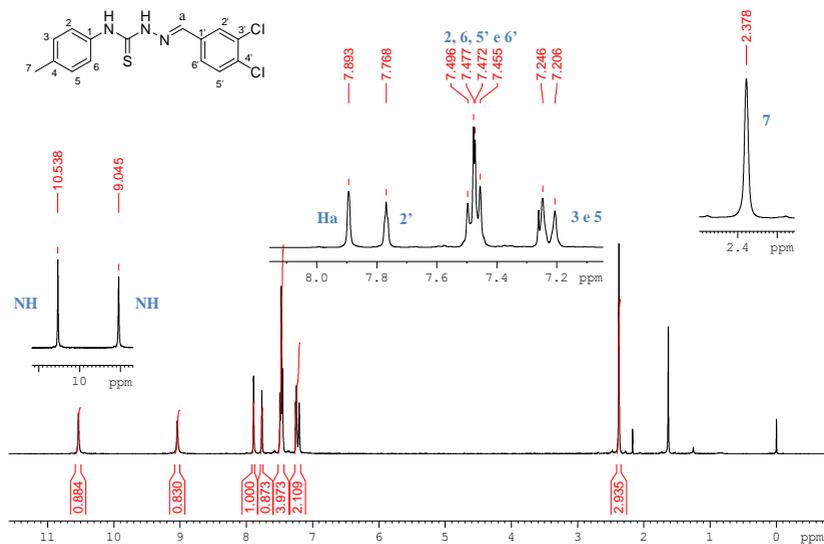
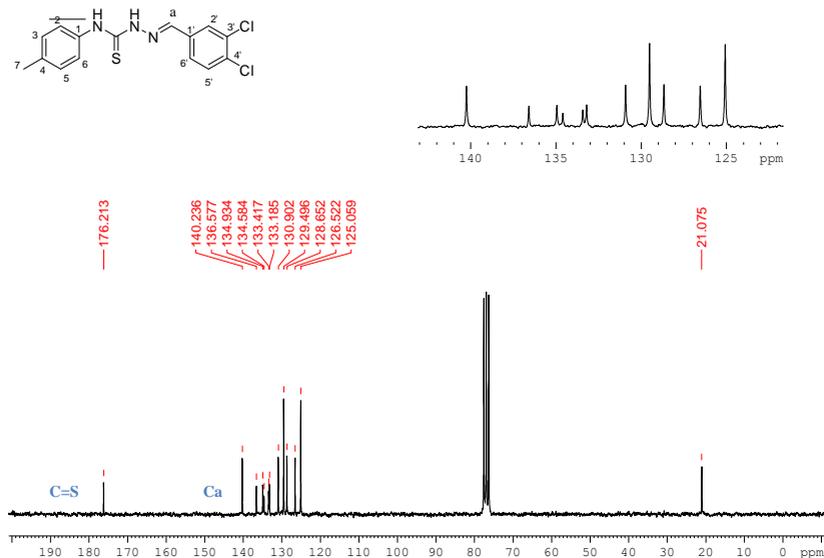


Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **351**.

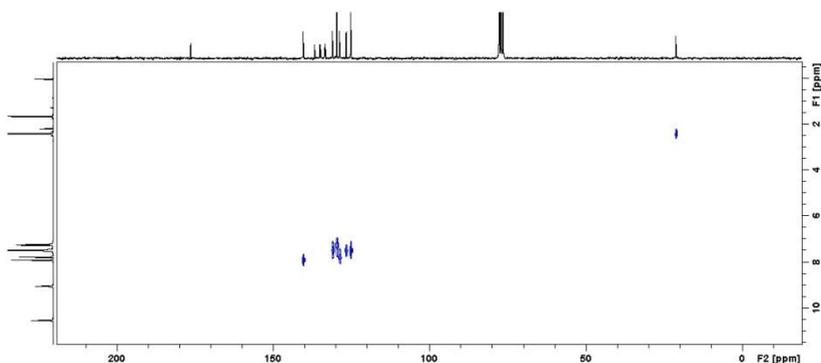


Também foi utilizada a técnica bidimensional HETCOR, onde observa-se uma correlação entre carbonos e prótons ligados. Na Figura 20, pode-se analisar o espectro em um todo e na Figura 21 a expansão na região dos aromáticos.

Com a utilização desta técnica espera-se confirmar que os sinais mais desblindados do espectro de RMN de ^1H (~10 ppm) não referem-se ao sinal característico do aldeído disponível do reagente precursor evidenciando a formação do novo grupo funcional imina.

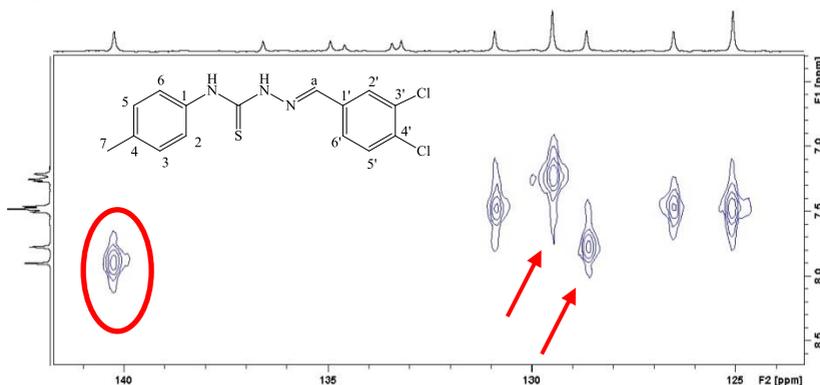
Na Figura 20, confirma-se o que era esperado, no qual os hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio, mais desblindados, não apresentaram correlação com o espectro de carbono.

Figura 20. Espectro de HETCOR do composto **35I**.



Na expansão do HETCOR (Figura 21), verifica-se a correlação entre o hidrogênio e o carbono imínico, que são sinais característicos da formação da tiossemicarbazona (circulado na figura: $\text{H}_a = 7,89$ ppm e $\text{C}_a = 140,2$ ppm), confirmando a formação do produto desejado. Quanto aos aromáticos, os sinais 136,6; 134,9; 134,6; 133,4 e 133,2 ppm são quaternários, ou seja, não apresentam correlações no HETCOR. Dentre as outras correlações, pode-se identificar os carbonos, C3 e C5, em 129,5 ppm, bem como o carbono C2' em 128,6 ppm (destacados na figura por uma flecha).

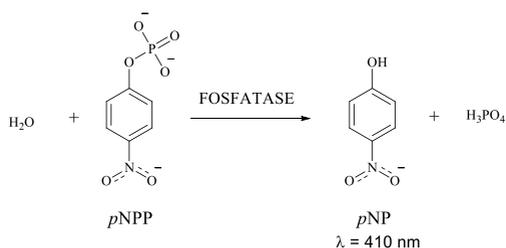
Figura 21. Expansão do espectro de HETCOR do composto **35I**.



5.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA

As propriedades inibitórias das 50 tiossemicarbazonas sintetizadas foram avaliadas *in vitro* frente à PtpA de *Mtb*, utilizando a metodologia descrita previamente por nosso grupo de pesquisas com pequenas alterações. A porcentagem de inibição foi avaliada espectrofotometricamente na concentração de 25 μM para cada composto da série utilizando *p*NPP como substrato. A atividade enzimática da PtpA foi mensurada monitorando a hidrólise do substrato artificial *p*NPP em *p*NP (Esquema 2).¹⁹

Esquema 2. Representação esquemática da clivagem do substrato *p*NPP realizada pelas fosfatases.



Os resultados podem ser observados na Tabela 3. Analisando a Tabela 3, verifica-se que vários compostos foram ativos contra a enzima, com a porcentagem de inibição atingindo 86,7%. Especificamente, os resultados indicam que 22 de 50 compostos (**34a-**

34c, 34f, 34g, 34k-34q, 35c, 35f, 35g, 35j, 35k, 35p, 35q, 36c e 36g) exibiram atividade inibitória contra PtpA (inibição > 25%).

Para o ensaio de IC₅₀ foram selecionados apenas os compostos que obtiveram resultados de inibição superiores a 60% (**34c, 34f, 34g, 34k, 34l, 34n, 34p, 35p, 36c**). Neste ensaio utilizou-se sete diferentes concentrações de cada composto e pNPP como substrato. Os compostos apresentaram inibição substancial de PtpA, com valores de IC₅₀ inferiores a 24 μM (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de inibição de PtpA na concentração de 25μM e IC₅₀ dos compostos ativos.^a

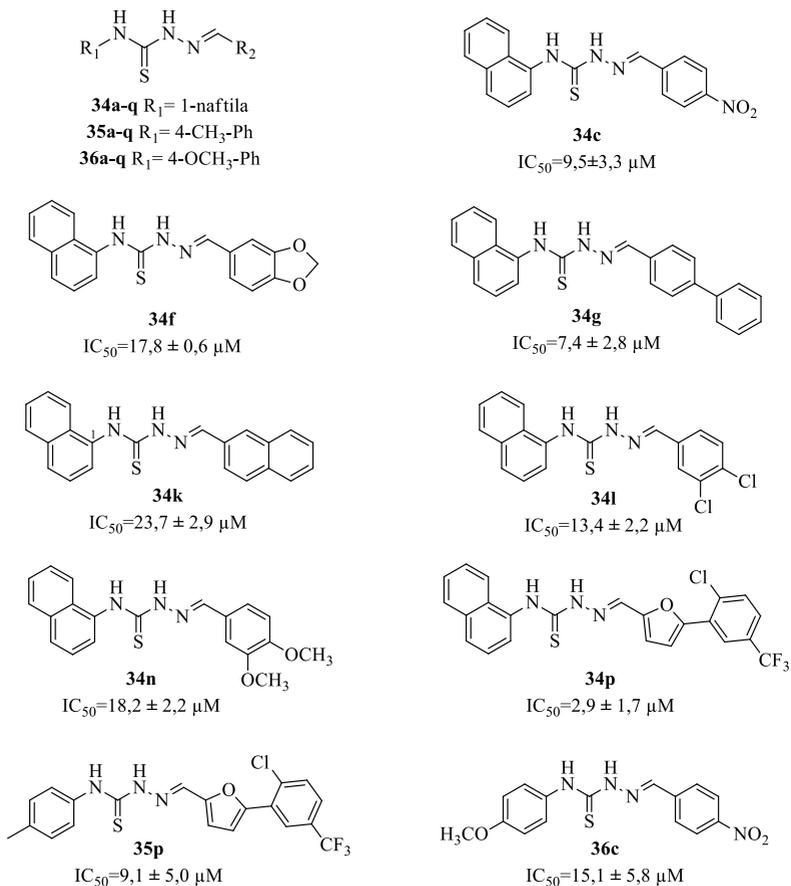
Composto	Inibição de PtpA (%)	IC ₅₀ (μM)	Composto	Inibição de PtpA (%)	IC ₅₀ (μM)
34a	58,1 ± 5,3	nd	35i	0	nd
34b	54,1 ± 4,2	nd	35j	33,7 ± 1,0	nd
34c	77,7 ± 5,1	9,5 ± 3,3	35k	29,3 ± 1,2	nd
34d	0	nd	35l	23,4 ± 4,2	nd
34e	22,6 ± 3,9	nd	35m	2,8 ± 2,2	nd
34f	62,6 ± 3,0	17,8 ± 0,6	35n	6,6 ± 1,8	nd
34g	79,7 ± 1,8	7,4 ± 2,8	35o	21,6 ± 2,0	nd
34h	0	nd	35p	66,0 ± 0,6	9,1 ± 5,0
34i	0	nd	35q	35,4 ± 3,4	nd
34j	10,3 ± 1,6	nd	36a	0	nd
34k	67,7 ± 5,2	23,7 ± 2,9	36b	0	nd
34l	83,7 ± 3,5	13,4 ± 2,2	36c	64,4 ± 3,5	15,1 ± 5,8
34m	44,2 ± 2,1	nd	36d	1,0 ± 9,3	nd
34n	64,5 ± 4,6	18,2 ± 2,2	36e	0	nd
34o	52,4 ± 2,0	nd	36f	0	nd
34p	86,7 ± 0,8	2,9 ± 1,7	36g	41,2 ± 8,4	nd
34q	51,6 ± 1,2	nd	36h	6,6 ± 1,8	nd
35a	16,6 ± 2,3	nd	36i	0	nd
35b	0,7 ± 7,5	nd	36j	22,7 ± 1,8	nd
35c	37,2 ± 1,8	nd	36k	23,7 ± 7,0	nd
35d	4,9 ± 5,6	nd	36l	21,4 ± 3,7	nd
35e	8,9 ± 2,9	nd	36m	0	nd
35f	25,9 ± 1,5	nd	36n	0	nd
35g	26,3 ± 3,3	nd	36o	0	nd
35h	8,8 ± 1,6	nd	36p	3,9 ± 4,0	nd

^aDados são expressos como médias ± DP de três experimentos independentes.nd=não determinado.

A série que apresentou o maior número de compostos ativos tem o substituinte 1-naftila em R₁ (ver estrutura geral das

tiossemicarbazonas na Figura 22). Isso já era esperado porque, em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, observou-se que um grupamento hidrofóbico aparenta ser favorável à atividade inibitória de PtpA de derivados de chalconas.¹⁹ Esse efeito foi explicado pela presença de interações π - π entre os substituinte 2-naftila de inibidores competitivos e o resíduo da cadeia lateral Trp48 do sítio ativo da PtpA, para inibidores competitivos.¹⁸

Figura 22. Estruturas das tiossemicarbazonas mais ativas neste trabalho.

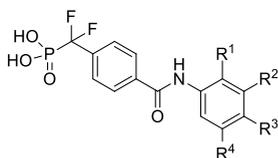


Ao comparar os três substituintes em R₁ (1-naftila, 4-CH₃-Ph e 4-OCH₃-Ph - Figura 22) das tiossemicarbazonas avaliadas neste estudo,

pode-se observar que, quando o efeito doador de elétrons do substituinte aumenta, a atividade inibitória tende a diminuir. Em relação aos substituintes R_2 dos compostos com inibição de PtpA acentuada, os grupos retiradores de elétrons tendem a aumentar a atividade inibitória. Este efeito foi mais evidente para os compostos **34c**, **34g**, **34l**, **34p**, **35p** e **36c**. No presente trabalho, o composto mais ativo apresenta um grupo hidrofóbicos em R_1 e substituinte polar em R_2 .

O melhor inibidor de PtpA encontrado foi o composto **34p** ($IC_{50} = 2,9 \pm 1,7 \mu M$), derivado de 1-naftila e 5-(2-Cl,5-CF₃)-C₆H₃-furano-2-il. O resultado obtido corrobora com um estudo relatado na literatura referente a derivados de benzanilida (Esquema 3), onde verificou-se que grupos retiradores de elétrons nas posições *meta* e *para* resultam em uma melhoria substancial na inibição de PtpA e que a presença de um grupo trifluorometila (-CF₃) leva a maior afinidade de ligação, o que é explicado pelo π -stacking com Trp48 no sítio ativo da enzima.¹¹⁰

Esquema 3. Esquema com o K_i de alguns derivados de benzanilida relatados na literatura.



$R^1 = CF_3$	$K_i = 54,8 \pm 14,5 \mu M$
$R^3 = CF_3$	$K_i = 18,5 \pm 2,5 \mu M$
$R^3 = Br$	$K_i = 10,3 \pm 1,0 \mu M$
R^2 e $R^4 = CF_3$, $R^3 = Br$	$K_i = 1,4, \pm 0,3 \mu M$

A seletividade é o grande desafio no desenvolvimento de inibidores de PTPs, uma vez que o sítio ativo é altamente conservado em toda a família e a maioria das PTPs de interesse farmacêutico possui um homólogo humano próximo, o que causaria efeitos adversos se inibido por drogas não específicas.¹¹¹ Diante disso, a comunidade científica tem buscado inibidores seletivos de PTPs.

Neste estudo, os quatro mais potentes inibidores de PtpA (**34c**, **34g**, **34p** e **35p**) foram avaliados frente as diferentes fosfatases: PtpB, PTP1B, YopH, PEST e LYP, a fim de verificar a seletividade dos inibidores (Tabela 4). No ensaio de seletividade, determinou-se o IC_{50} dos compostos frente às enzimas citadas anteriormente. O índice de seletividade (IS) foi representado pela relação $IC_{50}PTP / IC_{50}PtpA$. Os compostos com valores IS superiores a 1 são mais seletivos para PtpA, os compostos com valores IS iguais a 1 têm seletividade igual para as

duas enzimas avaliadas, e os compostos com valores inferiores a 1 são mais seletivos para o homólogo enzimático.

Analisando os valores de IS, na Tabela 4, verifica-se que os compostos avaliados foram mais seletivos para PtpA frente a PtpB (IS \geq 1,9). Todos os compostos testados foram mais seletivos para PtpA sobre as fosfatases humanas PTP1B, PEST e LYP. Em relação à PTP1B, todos os compostos têm IS \geq 1,8, sendo o composto **34g** o mais seletivo comparado a esta proteína. Para as fosfatases PEST e LYP, foram observados os maiores valores de IS (IS \geq 5,4) em comparação com outras fosfatases. Quanto à YopH, as tiosemicarbazonas analisadas apresentaram IS \geq 0,9, indicando que não são seletivas em relação a esta enzima, isso não representa um problema, pois esta fosfatase está envolvida em doenças causadas por *Yersinia spp*¹¹², não sendo um homólogo humano da PtpA.

Tabela 4. Índice de seletividade (IS) dos compostos **34c**, **34g**, **34p** e **35p** nas PTPs representativas.^a

Comp.	34c		34g		34p		35p	
	IC ₅₀ (μ M)	SI	IC ₅₀ (μ M)	SI	IC ₅₀ (μ M)	SI	IC ₅₀ (μ M)	SI
PtpA	9,5 \pm 3,3	Ref.	7,4 \pm 2,8	Ref.	2,9 \pm 1,7	Ref.	9,1 \pm 5,0	Ref.
PtpB	18,4 \pm 0,9	1,9	17,6 \pm 2,7	2,4	6,2 \pm 1,5	2,1	30,3 \pm 1,1	3,3
Ptp1B	17,0 \pm 3,5	1,8	> 50	> 6,8	9,4 \pm 0,8	3,2	38,2 \pm 8,0	4,2
YopH	7,1 \pm 0,8	0,7	6,5 \pm 2,3	0,9	2,6 \pm 1,5	0,9	6,9 \pm 1,2	0,8
PEST	> 50	> 5,3	> 50	> 6,8	15,7 \pm 3,1	5,4	> 50	> 5,5
LYP	> 50	> 5,3	> 50	> 6,8	> 50	> 10,3	> 50	> 5,5

^aDados são expressos como médias \pm DP de três experimentos independentes. Índice de Seletividade (SI) é dado por IC₅₀PTP/IC₅₀PtpA. Ref.= referência.

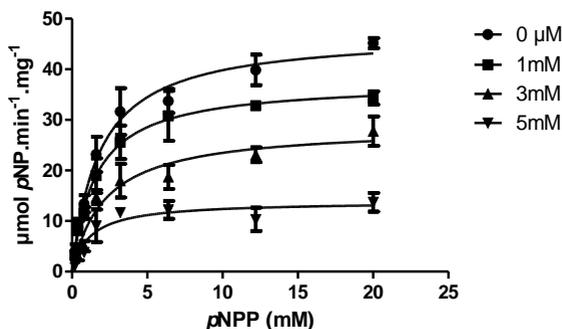
A determinação do IC₅₀ é uma avaliação preliminar da afinidade relativa dos diferentes compostos para uma enzima alvo. Para avaliar corretamente a afinidade, é preciso definir o mecanismo de inibição da enzima alvo com o composto. Existem duas amplas classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis.^{113, 114}

Dentre os inibidores reversíveis há três tipos de inibição, os inibidores *competitivos*, *não-competitivos* e *incompetitivos*. Os primeiros se ligam exclusivamente a forma enzimática livre, podem ligar-se ao sítio ativo e bloqueiam o acesso do substrato à ele. Os inibidores não-competitivos se ligam com alguma afinidade tanto com a enzima livre quanto ao complexo enzima-substrato, além disso, o inibidor liga-se em um sítio diferente do sítio ativo. O último tipo de

inibidor, incompetitivo, liga-se exclusivamente ao complexo enzima-substrato.¹¹⁴

Experimentos *in vitro* foram planejados para investigar o modo de inibição do melhor inibidor encontrado neste trabalho **34p**. Para isso, foi realizado o ensaio de cinética enzimática para a tiossemicarbazona **34p**, onde foi avaliado três diferentes concentrações de inibidores e oito concentrações de *p*NPP. O mecanismo cinético de inibição e os valores de K_i (constante de dissociação do complexo enzima-inibidor) foram determinados. A análise cinética demonstrou que o composto **34p** apresenta um modo de inibição não-competitivo, como pode ser observado no gráfico de Michaelis-Menten na Figura 23. Observou-se que a V_{max} (velocidade máxima) diminui quando a concentração do inibidor é aumentada e o K_m (constante de Michaelis) permanece inalterado, sugerindo que o composto **34p** é um inibidor não-competitivo, com $\alpha = 1$. O parâmetro cinético K_i foi calculado por ajustes não-lineares de dados para a equação de inibição não-competitiva, pelo programa GraphPad, resultando em $K_i = 1,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ para PtpA.

Figura 23. Gráfico de Michaelis-Menten do composto **34p** frente à PtpA.

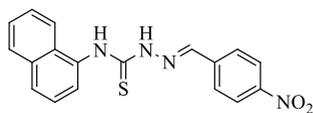
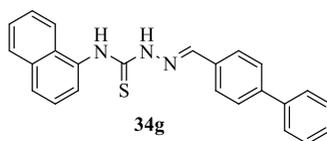
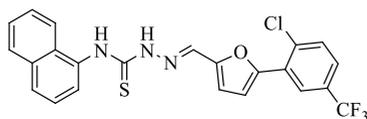
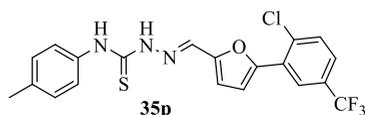


^aDados são expressos como médias \pm DP de três experimentos independentes.

É importante ressaltar que não há relato na literatura de um inibidor de PtpA não-competitivo, ou seja, a tiossemicarbazona **34p** é o primeiro inibidor não-competitivo descrito. Este fato pode explicar a seletividade do composto para a enzima, pois o sítio ativo é altamente conservado em toda a família e a maioria das PTPs de interesse farmacêutico possui um homólogo humano próximo, o que causaria efeitos adversos se inibido por drogas não específicas.

6 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Neste capítulo foram planejadas e sintetizadas 50 tiosemicarbazonas, das quais 22 são inéditas. Todos os compostos foram avaliados *in vitro* frente à PtpA de *Mtb*. Quatro compostos exibiram excelentes resultados de inibição, com IC_{50} inferior a $9,5 \mu\text{M}$ (**34c**, **34g**, **34p** e **35p**). Além disso, verificou-se que estes inibidores são potentes e seletivos para PtpA. O composto mais potente **34p** ($IC_{50} = 2,9 \mu\text{M}$) foi submetido a estudos cinéticos, mostrando um modo de inibição não-competitivo. Pela primeira vez, um inibidor de PtpA não-competitivo é relatado, o que pode explicar sua seletividade para esta enzima. Os derivados de tiosemicarbazona descritos aqui são uma nova classe de compostos potenciais para desenvolvimento de fármacos anti-TB.

**34c** $IC_{50}=9,5\pm 3,3 \mu\text{M}$ **34g** $IC_{50}=7,4 \pm 2,8 \mu\text{M}$ **34p** $IC_{50}=2,9 \pm 1,7 \mu\text{M}$ **35p** $IC_{50}=9,1 \pm 5,0 \mu\text{M}$

CAPÍTULO 2

O trabalho apresentado neste capítulo foi publicado na revista JBCS
(Journal of the Brazilian Chemical Society)- Apêndice VI.

7 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

7.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A demência é uma síndrome em que há deterioração na função cognitiva, ou seja, afeta a memória, o pensamento, o comportamento e a capacidade de realizar atividades diárias. Em todo o mundo, cerca de 50 milhões de pessoas têm demência, sendo a Doença de Alzheimer (DA) a forma mais comum.¹²

A DA é uma doença progressiva, ou seja, ela avança gradualmente com o tempo danificando partes do cérebro e com isso, mais sintomas são desenvolvidos. A maioria das pessoas que desenvolvem a DA tem uma idade superior a 65 anos, porém há casos de início precoce afetando pessoas mais jovens. Há alguns fatores de risco que podem estar ligado ao desenvolvimento da doença: idade, herança genética e estilo de vida.¹¹⁵

Em 1906, o médico Alois Alzheimer descreveu pela primeira vez a doença. Ele percebeu mudanças no tecido cerebral de uma mulher que havia morrido de uma doença mental incomum. Seus sintomas incluíam perda de memória, problemas de linguagem e comportamento. Após a morte da paciente, Alzheimer examinou seu cérebro e encontrou muitos aglomerados anormais (placas senis) e feixes de fibras emaranhados (emaranhados neurofibrilares).^{116, 117}

Pacientes com a DA geralmente apresentam os seguintes dados neuropatológicos: degeneração neurovascular, presença de atrofia cortical difusa, perdas neuronais e sinápticas envolvendo vários sistemas de neurotransmissão, presença de placas senis extracelulares (formada por agregados filamentosos da proteína β -amiloide, A β , peptídeo de 40 ou 42 resíduos) e emaranhados neurofibrilares intracelulares.¹¹⁷

Essa doença não é completamente entendida apesar dos inúmeros esforços na pesquisa para elucidar os mecanismos moleculares, celulares e bioquímicos.^{29, 118} Porém, várias hipóteses são propostas para explicar as bases moleculares da DA, como por exemplo, a hipótese colinérgica, hipótese glutamatérgica e hipótese da “cascata amiloide”.^{117, 119} Além disso, há outras propostas para explicar a patogênese da DA como o processo de hiperfosforilação da tau (proteína associada aos emaranhados neurofibrilares), a inflamação e o estresse oxidativo.^{118, 119}

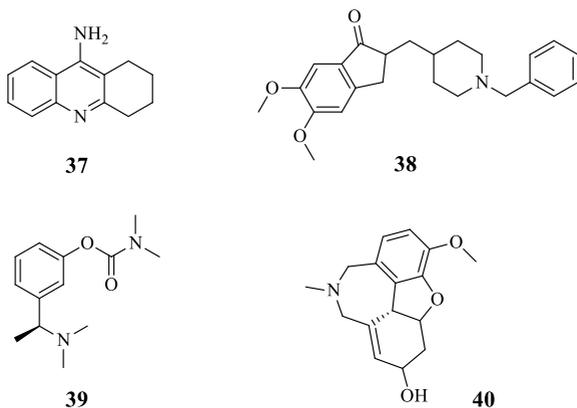
A hipótese colinérgica é a teoria mais aceita para explicar a patogênese da DA, a qual está associada a uma perda do sistema colinérgico. Ocorre uma redução dos níveis do neurotransmissor

acetilcolina (ACh) nas áreas do cérebro que lidam com a aprendizagem, a memória, o comportamento e as respostas emocionais.^{30, 31}

As enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) são responsáveis pela hidrólise do ACh, controlando a concentração deste neurotransmissor em diferentes tecidos de um organismo.²⁹ Assim, a abordagem mais promissora para o tratamento sintomático da DA é aumentar os níveis sinápticos do ACh no cérebro pela inibição da AChE e/ou BChE.^{29, 31} Os tratamentos com evidência clínica para os pacientes com a DA são com inibidores de colinesterase, em que a AChE constitui o alvo primário destes inibidores, porém a inibição conjunta da BChE pode prolongar o benefício do tratamento.¹²⁰

Os principais medicamentos utilizados em pacientes com a DA são: tacrina **37** (Cognex[®]), donepezila **38** (Aricept[®]), rivastigmina **39** (Exelon[®]) e galantamina **40** (Razadyne[®]) (Figura 24).^{31, 117} Os fármacos supracitados atuam como inibidores da AChE e, no caso da tacrina e rivastigmina, agem, também, inibindo a BChE. O uso desses medicamentos auxilia no retardo da progressão da disfunção cognitiva e pode ser eficaz para alguns pacientes nos estágios inicial e intermediário da doença.^{117, 120}

Figura 24. Estrutura química dos medicamentos utilizados para a DA.



Outra hipótese interessante propõe que a DA está relacionada ao estresse oxidativo.^{32, 33} O cérebro é especialmente suscetível ao dano oxidativo porque tem uma capacidade antioxidante limitada, alto teor de lipídios e alta taxa de consumo de oxigênio quando comparado a outros órgãos.^{33, 35}

Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) estão presentes no sistema biológico e são capazes de oxidar proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos e, dessa forma, iniciar um estresse oxidativo.¹²¹ Os compostos antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os efeitos danosos dos radicais livres, das ERO e das ERN.¹²² Estes compostos podem ter vários mecanismos de ação, como captação de radicais livres, capacidade de reduzir íons metálicos ou intermediários do processo de peroxidação lipídica através da doação de elétrons.¹²³ Assim, o uso de compostos antioxidantes tem produzido resultados promissores em relação à DA.³⁴

A existência de diferentes hipóteses possíveis para explicar o início e a progressão da DA direciona o desenvolvimento de novas moléculas promissoras com múltiplas ações, capazes de atuar de forma complementar e podendo trazer melhores resultados para o tratamento da doença.^{35,36}

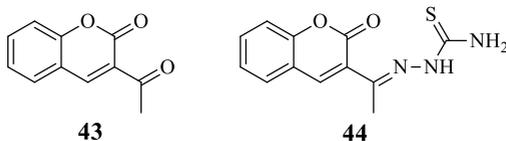
7.2 TIOSSEMICARBAZONAS

Como descrito anteriormente na revisão bibliográfica do Capítulo 1, as tiossemicarbazonas são bases de Schiff que apresentam inúmeras atividades biológicas, com isso têm sido amplamente estudadas na Química Medicinal.

Na literatura há relatos de tiossemicarbazonas com propriedades antioxidantes e que apresentam resultados interessantes no combate a DA.

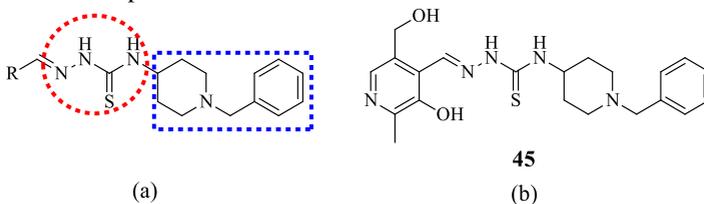
Dentre os estudos realizados com tiossemicarbazonas que apresentam atividade antioxidante pode-se citar o trabalho de Subhashree et. al., onde uma série derivada do 5-metoxisalicilaldeído e outra do 2-hidroxi-1-naftaldeído (Figura 25) foram sintetizadas e avaliadas biologicamente com testes *in vitro*. O ensaio antioxidante realizado foi o teste de sequestro de DPPH (do inglês “2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl”), sendo que os autores verificaram que os compostos possuem uma potência similar ao ácido ascórbico (padrão) a uma concentração similar (25mg mL⁻¹).¹²⁴

Figura 27- Tiossemicarbonas derivadas da cumarina.



Compreendendo que a DA é uma doença identificada por múltiplas características patológicas, Palanimuthu et. al. desenvolveram compostos híbridos com dois grupos farmacóforos de diferentes formas de ação, a fim de resultar em uma série de compostos protótipos multifuncionais. Os grupos farmacóforos (destacados na Figura 28-a) utilizados são o grupamento 1-benzilpiperidina (derivado do fármaco donepezila - inibidor da AChE) e a unidade de tiossemicarbazona (quelante de metal para diminuir o estresse oxidativo). Das tiossemicarbonas analisadas neste estudo, o composto **45** (Figura 28-b) destacou-se por apresentar a atividade multifuncional mais promissora exibindo: atividade antiproliferativa muito baixa, eficácia de quelação de ferro substancial, inibição da agregação β -amilóide mediada por cobre, inibição do estresse oxidativo, atividade inibidora moderada da acetilcolinesterase e indução autofágica.¹¹⁹

Figura 28. (a) Estrutura geral das 4-(1-benzilpiperidina-4-il)tiossemicarbonas (b) Estrutura do composto **45**.



Diante do exposto, surgiu o interesse em estudar uma série de tiossemicarbonas como candidatos a potenciais agentes terapêuticos multifuncionais para a DA. Para isso, foram realizados ensaios de inibição da AChE e ensaios antioxidantes.

8 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As tiossemicarbazonas **35a-q**, descritas no Capítulo 1 (Tabela 1-página 48), também foram avaliadas neste capítulo. Toda a parte metodológica referente à síntese e caracterização desses compostos foi descrita anteriormente (no tópico 4.1 e 4.2- páginas 49-67).

Os testes de atividade antioxidante e inibição da AChE foram realizados no Departamento de Química da UFSC- campus Blumenau pelo Prof. Dr. Aldo Sena de Oliveira. As medidas espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro DU640 da Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, CA).

8.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

8.1.1 Atividade de sequestro de óxido nítrico

Para medir a atividade de eliminação do óxido nítrico (NO), foram adicionados 1 mL de nitroprussiato de sódio (10 m mol L^{-1}) e 1,5 mL de solução salina tampão fosfato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4) em 0,5 mL das diferentes concentrações dos compostos a serem testados (25, 50, 75 e 100 mg mL^{-1}). Logo após, incubou-se durante 150 minutos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Após este período, 1 mL da mistura reacional foi tratada com 1 mL de reagente de Griess (1% de sulfanilamida; 2% de H_3PO_4 e 0,1% de dicloridrato de naftil etilenodiamina). A absorbância foi medida a 546 nm.¹²⁵ Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico.

8.1.2 Atividade de sequestro de peróxido de hidrogênio

A capacidade de eliminação de H_2O_2 das tiossemicarbazonas foi determinado espectrofotometricamente, de acordo com o método descrito por Ruch et. al, com modificações.¹²⁶ Primeiramente foram preparadas soluções dos compostos nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 mg mL^{-1} em DMSO e após foi preparado as soluções tampão fosfato. Na sequência em 3,4 mL destas soluções foram adicionados 0,6 mL de uma solução de H_2O_2 (40 mmol L^{-1} - preparada em tampão fosfato com pH 7,4). O valor de absorbância da mistura reacional foi medida em 230 nm. Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico.

8.2 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

A inibição enzimática foi medida usando o método descrito por Canto et. al. com modificações. Foram misturados: 90 μL de tampão Tris-HCl (de concentração 50 mmol L^{-1} ; pH 8,0), 30 μL de solução metanólica das tiossemicarbazonas (0,1 mg mL^{-1}) e 15 μL de uma solução AChE (0,25 U mL^{-1}). A solução AChE foi preparada dissolvendo 0,1% de albumina de soro bovino em 50 mmol L^{-1} de tampão Tris-HCl-pH 8. A mistura foi incubada durante 15 minutos. Após esse período, 25 μL de uma solução de iodeto de acetiltiocolina (15 mmol L^{-1} em água) e 140 μL de reagente de Ellman (3 mmol L^{-1} de 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) em tampão Tris-HCl-pH 8 contendo 0,1 mol L^{-1} de NaCl e 0,02 mol L^{-1} MgCl_2). Essa mistura final foi incubada durante mais 30 minutos a 28 °C. A absorbância foi medida em 405 nm. Como controle negativo foi utilizado o mesmo solvente em que a amostra foi dissolvida. Como controle positivo foi utilizado o Remynil[®], que contém 50% de galantamina.³⁵

Todos os experimentos supracitados foram realizadas em triplicata e os resultados médios foram calculados. Os dados foram expressos como média \pm DP. A análise de regressão linear foi utilizada para calcular EC_{50} (concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo) para os ensaios antioxidantes ou IC_{50} para atividade inibidora de acetilcolinesterase para cada composto.

8.3 ESTUDOS QUÂNTICOS

Os valores energéticos e a representação dos orbitais moleculares dos compostos foram obtidos usando o software ChemBioOffice 2010. Todos os cálculos químicos quânticos foram realizados utilizando a metodologia MM2.

9 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As tiossemicarbazonas **35a-q** (Tabela 1, página 47), foram avaliadas neste capítulo quanto: a sua capacidade inibitória da enzima acetilcolinesterase e a atividade antioxidante (via testes *in vitro*); a atividade sequestradora de óxido nítrico (NO) e do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Além disso, com o intuito de analisar teoricamente a atividade oxidante, foram realizados estudos quânticos para obterem-se os valores energéticos e a representação dos orbitais moleculares dos compostos.

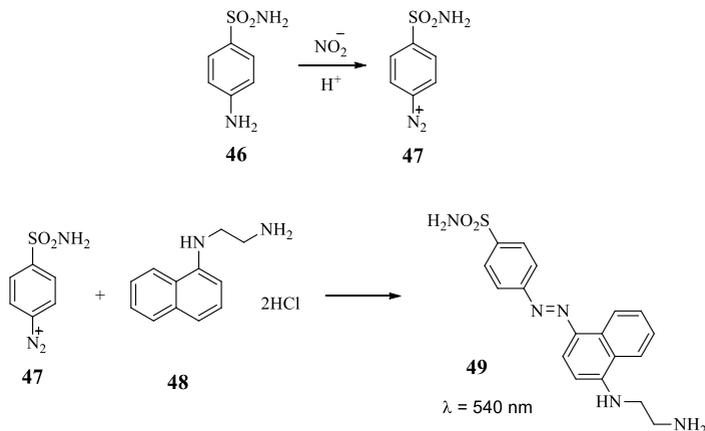
9.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante de um composto não deve basear-se exclusivamente em um único método.¹²⁷ Há vários testes antioxidantes, neste trabalho, a atividade antioxidante dos compostos **35a-q** foi analisada usando dois ensaios *in vitro*: a atividade sequestradora de NO e a atividade sequestradora de H₂O₂.

O óxido nítrico (NO) tem um papel na regulação de vários processos fisiológicos e é um importante mediador químico. Além disso, a via NO está envolvida em vários tipos de distúrbios, como a doença de Alzheimer, por respostas neuroinflamatórias. Observa-se a elevação da regulação da expressão da enzima óxido nítrico sintase, sugerindo um superprodução de NO nos neurônios e na glia.¹²⁸ Por isso o interesse em encontrar compostos capazes de sequestrar NO.

Na reação que determina a atividade sequestradora de NO, os radicais de óxido nítrico (NO) são gerados a partir de nitroprussiato de sódio e determinados pelo reagente Griess (1% de sulfanilamida, 2% de H₃PO₄ e 0,1% de dicloridrato de *N*-(1-naftil)etilenodiamina). Primeiramente, o nitroprussiato de sódio em solução aquosa gera espontaneamente NO, o qual interage com o oxigênio para produzir nitrito (NO₂⁻). O nitrito, por sua vez, pode ser estimado pelo reagente de Griess, que ao reagir com a sulfanilamida **46**, forma o diazo composto **47** o qual reage com o cloridrato de *N*-(1-naftil)etilenodiamina **48**, gerando o composto **49** de coloração vermelha intensa o qual pode ser determinado em 540 nm (Figura 29).^{129, 130} Os sequestradores de NO competem com o oxigênio que leva a uma produção reduzida de NO.

Figura 29. Reação de Griess.



Já quanto ao H_2O_2 , o mesmo é rapidamente decomposto em oxigênio e água, e isso pode produzir radicais hidroxílicos (OH^\bullet) que iniciam a peroxidação lipídica e causam danos no DNA, tornando-se assim um alvo para a pesquisa de novos compostos capazes de eliminar H_2O_2 .¹²⁷

A atividade de eliminação de óxido nítrico e do peróxido de hidrogênio foi calculada usando a Equação (1). Os resultados dos ensaios antioxidantes foram expressos em EC_{50} .

$$\% \text{ de sequestro} = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{branco}}} \cdot 100 \quad (1)$$

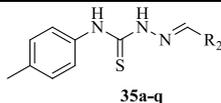
Os resultados da atividade de sequestro de óxido nítrico e do peróxido de hidrogênio dos compostos **35a-q** são apresentados na Tabela 5.

Todos os compostos analisados apresentaram um EC_{50} inferior ao do ácido ascórbico, ou seja, mais ativos do que o controle positivo. O composto **35j** foi o mais potente e o composto **35o** menos potente desta série para ambos os ensaios antioxidantes realizados. Os resultados de ambas as atividades experimentais estão linearmente correlacionados ($y = 0,96810x + 2,07336$; $R^2 = 0,99995$), indicando resultados consistentes entre ambos os testes.

Para a atividade antioxidante, os grupos dos compostos **35j** e **35p** (1-naftila e 5-(2-Cl-5- CF_3)- C_6H_3 -furan-2ila, respectivamente) parecem

ser importantes para os ensaios realizados neste estudo. Além disso, as tiosemicarbazonas **35c** e **35o** apresentaram os piores resultados da série, ambos os compostos têm um grupo nitro (NO₂) em sua estrutura, concluindo que este grupo de retirador de elétrons diminui a atividade antioxidante para esta série avaliada.

Tabela 5. EC₅₀ dos ensaios antioxidantes das tiosemicarbazonas **35a-q**.



Composto	R ₂	Atividade de sequestro do	
		NO EC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	H ₂ O ₂ EC ₅₀ (μmol L ⁻¹)
35a	Ph	8,856	10,654
35b	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	8,758	10,556
35c	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	9,681	11,483
35d	4-Cl-C ₆ H ₄	8,714	10,512
35e	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	8,788	10,585
35f	3,4-OCH ₃ -O-C ₆ H ₃	8,649	10,450
35g	4-C ₆ H ₄ -Ph	8,784	10,583
35h	3-OCH ₃ ,4-OH-C ₆ H ₃	8,862	10,661
35i	3,4,5-OCH ₃ -C ₆ H ₂	8,778	10,571
35j	1-naftila	8,631	10,429
35k	2-naftila	8,753	10,551
35l	3,4-Cl-C ₆ H ₃	8,646	10,448
35m	2,5-OCH ₃ -C ₆ H ₃	8,645	10,443
35n	3,4-OCH ₃ -C ₆ H ₃	8,855	10,653
35o	2-NO ₂ -C ₆ H ₄	10,203	12,006
35p	5-(2-Cl,5-CF ₃)-C ₆ H ₃ -furan-2-il	8,632	10,431
35q	4-N(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₄	8,726	10,528
Ácido Ascórbico		14,75	16,35

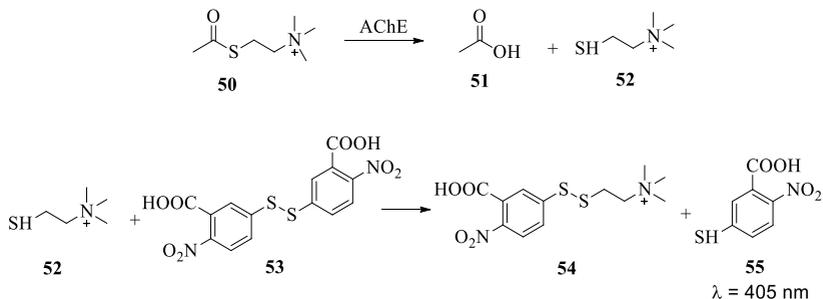
9.2 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

As tiosemicarbazonas **35a-q** foram avaliadas como inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Como visto anteriormente, a AChE é uma das enzimas responsáveis pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), e a redução desse neurotransmissor está relacionada com a DA. Diante disso, uma abordagem que tem sido utilizada para o tratamento da doença é aumentar os níveis da ACh pela inibição da enzima AChE.

O teste realizado para determinar a inibição da AChE consiste na hidrólise do substrato **50**, acetiltiocolina, gerando como produto o ácido

acético **51** e a tiocolina **52**. A tiocolina reage como o reagente de Ellman **53**, produzindo os compostos **54** e **55** (ácido 2-nitro-5-tiobenzoico), sendo que, este último apresenta uma coloração amarela, podendo ser facilmente detectado em um espectrofotômetro (Figura 30).¹³¹⁻¹³⁴

Figura 30. Reação da enzima acetilcolinesterase no teste.



A porcentagem de inibição foi calculada seguindo a Equação 2, onde A_{amostra} é a absorbância da amostra e A_{controle} é a absorbância sem a amostra.

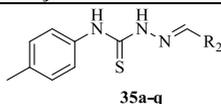
$$I (\%) = \left(100 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

O IC_{50} dos compostos foi determinado por um gráfico da porcentagem de inibição *versus* às concentrações da solução da amostra. Os compostos testados apresentaram resultados superiores (Tabela 6) ao padrão galantamina (medicamento ativo usado para o tratamento da DA). Além disso, vale ressaltar que o resultado obtido para o padrão está de acordo com os dados da literatura.³⁵ Os compostos mais ativos na série foram **35c**, **35o** e **35j**. Estes compostos possuem em sua estrutura o grupamento nitro (**35c**, **35o**) e naftila (**35j**).

Ao analisar os dados obtidos para o ensaio de inibição da enzima AChE, é possível perceber uma correlação entre o valor IC_{50} e os grupos substituintes presentes no anel. Os dois compostos mais ativos, com menores valores de IC_{50} , têm em sua estrutura um grupamento retirador de elétrons, o grupo nitro. Para os compostos com a menor atividade de inibição enzimática (**35q** e **35f**) foram observados em sua estrutura grupos capazes de aumentar a densidade eletrônica do anel aromático, pelo efeito doador.

Em relação à atividade inibidora da acetilcolinesterase, o grupo nitro (NO₂) pareceu ser importante para uma maior taxa de inibição, fato que difere da atividade antioxidante. No entanto, o grupo 1-naftila apresentou bons resultados para ambas as atividades, de modo que a tiossemicarbazona **35j** é um potencial agente terapêutico para o tratamento da DA, pois pode agir tanto como um inibidor eficiente da acetilcolinesterase, como um potente antioxidante.

Tabela 6. IC₅₀ do ensaio de inibição da AChE das tiossemicarbazonas **35a-q**.

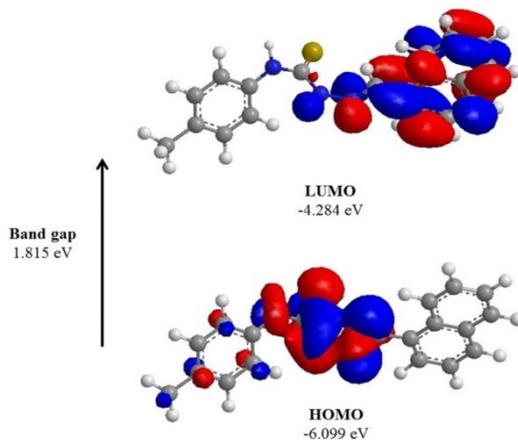


Composto	R ₂	Inibição da AChE IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)
35a	Ph	6,12
35b	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	6,36
35c	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	1,98
35d	4-Cl-C ₆ H ₄	9,44
35e	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	8,01
35f	3,4-OCH ₃ -C ₆ H ₃	10,33
35g	4-C ₆ H ₄ -Ph	4,66
35h	3-OCH ₃ ,4-OH-C ₆ H ₃	9,86
35i	3,4,5-OCH ₃ -C ₆ H ₂	8,94
35j	1-naftila	2,26
35k	2-naftila	4,45
35l	3,4-Cl-C ₆ H ₃	4,16
35m	2,5-OCH ₃ -C ₆ H ₃	7,28
35n	3,4-OCH ₃ -C ₆ H ₃	8,56
35o	2-NO ₂ -C ₆ H ₄	2,04
35p	5-(2-Cl,5-CF ₃)-C ₆ H ₃ -furan-2-il	6,54
35q	4-N(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₄	14,26
Ácido Ascórbico	-	-
Galantamina	-	17,05

9.3 ESTUDOS QUÂNTICOS

Estudos quânticos foram utilizados para analisar as tiosemicarbazonas **35a-q**. Os valores de energia de HOMO (do inglês “*highest occupied molecular orbital*”) e LUMO (do inglês “*lowest unoccupied molecular orbital*”) foram calculados e são mostrados na Tabela 7. O *band gap* (diferença de energia entre HOMO e LUMO) foi determinado para os compostos, conforme ilustrado em Figura 31. Assim, foi possível avaliar relações entre os resultados dos testes *in vitro* e os dados teóricos.

Figura 31. Band gap obtido para o composto **35j**.



A energia do HOMO (EHOMO) foi um melhor indicador da atividade antioxidante do que a energia do LUMO (ELUMO). Em geral, é possível relacionar valores de energia HOMO e atividade antioxidante. Pois a atividade antioxidante está relacionada à capacidade de doação de elétrons e um alto valor de EHOMO implica que a molécula é uma boa doadora de elétrons. O composto **35a**, no entanto, não mostrou uma relação direta entre EHOMO e atividade antioxidante, apresentando um alto valor de EHOMO e uma baixa atividade de eliminação de NO e H_2O_2 quando comparado aos outros compostos. Apesar dessa exceção, a EHOMO foi considerada um bom indicador de atividade antioxidante para a série testada neste estudo.

Em geral, o anel onde os substituintes foram inseridos não influenciou o valor energético do HOMO, mas influenciou o valor energético do LUMO (Apêndice III). Para os ensaios antioxidantes, verificou-se uma boa correlação com o HOMO e, com isso, pode-se

observar que o núcleo das tiosemicarbazonas é determinante para os bons resultados obtidos neste trabalho.

ELUMO foi um indicador melhor do que o EHOMO quanto à atividade inibidora da acetilcolinesterase.

Tabela 7. Valores energéticos do HOMO, LUMO e band gap das tiosemicarbazonas **35a-q**.

Composto	EHOMO (eV)	ELUMO (eV)	Band gap (EHOMO- ELUMO)
35a	-6,228	-2,514	3,714
35b	-6,219	-2,278	3,941
35c	-6,874	-5,453	1,421
35d	-6,187	-1,771	4,416
35e	-6,240	-1,874	4,366
35f	-6,142	-1,298	4,844
35g	-6,238	-3,718	2,520
35h	-6,293	-1,747	4,546
35i	-6,233	-1,837	4,396
35j	-6,099	-4,284	1,815
35k	-6,215	-3,824	2,391
35l	-6,140	-1,803	4,337
35m	-6,138	-2,094	4,044
35n	-6,282	-1,858	4,424
35o	-7,245	-5,285	1,960
35p	-6,129	-2,172	3,957
35q	-6,197	-0,539	5,658
Ácido Ascórbico	-10,474	-1,303	9,171
Galantamina	-8,968	0,703	8,265

Outras propriedades também podem ser deduzidas da análise dos valores de energia de HOMO e LUMO, como o potencial de ionização de um composto (PI), afinidade eletrônica (AE), eletronegatividade (μ), dureza (η) e moleza (S).¹³⁵

O PI das tiosemicarbazonas **35a-q** foi obtido utilizando a Equação (3).¹³⁵ Por conseguinte, quanto menor a energia necessária para remover um elétron, maior é a atividade antioxidante do composto, ou seja, quanto maior for o EHOMO, menor será o PI.

$$PI = -E_{HOMO} \quad (3)$$

A AE dos compostos foi obtida usando a Equação (4).¹³⁵ Altos valores de AE representam que um elétron pode ser facilmente adicionado à espécie, sendo diretamente relacionado à capacidade antioxidante do composto.

$$AE = -E_{LUMO} \quad (4)$$

Os valores de eletronegatividade (μ) foram obtidos utilizando a Equação (5).¹³⁵ Neste caso espera-se que um composto com uma baixa eletronegatividade apresente uma maior atividade antioxidante.

$$\mu = -\frac{1}{2} (E_{HOMO} + E_{LUMO}) \quad (5)$$

A polarização pode ser descrita em termos de dureza e moleza. Um átomo ou íon relativamente grande com uma pequena carga nuclear efetiva é relativamente facilmente distorcido (polarizado) por uma carga externa e é chamado de macio.¹³⁶ Uma distribuição de elétrons mais compacta resultante de uma carga nuclear líquida mais alta é chamado de duro. Os η e S das tiosemicarbonas foram obtidos utilizando as Equações (6) e (7).¹³⁵

$$\eta = -\frac{1}{2} (E_{HOMO} - E_{LUMO}) \quad (6)$$

$$S = -\frac{2}{(E_{HOMO} - E_{LUMO})} \quad (7)$$

Os valores encontrados para PI, AE, μ , η and S podem ser analisadas na Tabela 8.

As propriedades químicas que foram teoricamente calculadas a partir dos valores de LUMO não apresentaram uma boa correlação com as atividades antioxidantes, o que já era esperado, uma vez que os valores de energia do LUMO não eram bons indicadores. No entanto, observou-se uma correlação linear entre o PI e a atividade de eliminação do óxido nítrico ($y = 1,3981x + 0,0719$; $R^2 = 0,99699$) e entre o PI e a atividade de eliminação do peróxido de hidrogênio ($y = 1,40210x + 1,84593$; $R^2 = 0,99705$).

A AE apresentou uma melhor correlação com os resultados dos ensaios de inibição da acetilcolinesterase, mas não foi tão linear quanto a atividade antioxidante. Em geral, quanto maior o valor da afinidade eletrônica, maior a inibição da acetilcolinesterase. Além disso, uma relação com dureza e moleza pode ser encontrada considerando apenas os melhores e os piores resultados do teste de inibição enzimática. Neste estudo, foi possível observar que o composto mais mole foi o que apresentou o melhor resultado (**35c**) e o mais duro apresentou o pior

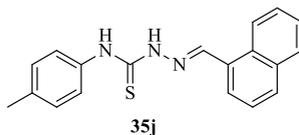
resultado (35q). É importante salientar que as correlações encontradas envolvendo estudos quânticos, em relação às atividades biológicas avaliadas neste trabalho, são de natureza qualitativa.

Tabela 8. Propriedades químicas das tiossemicarbazonas 35a-q.

Composto	PI (eV)	AE (eV)	η	S	μ
35a	6,228	2,514	1,857	0,5385	4,371
35b	6,219	2,278	1,970	0,5075	4,248
35c	6,874	5,453	0,7105	1,407	6,163
35d	6,187	1,771	2,208	0,4529	3,979
35e	6,240	1,874	2,183	0,4581	4,057
35f	6,142	1,298	2,422	0,4129	3,720
35g	6,238	3,718	1,260	0,7936	4,978
35h	6,293	1,747	2,273	0,4399	4,020
35i	6,233	1,837	2,198	0,4549	4,035
35j	6,099	4,284	0,9075	1,102	5,191
35k	6,215	3,824	1,195	0,8365	5,019
35l	6,140	1,803	2,168	0,4611	3,971
35m	6,138	2,094	2,022	0,4945	4,116
35n	6,282	1,858	2,212	0,4521	4,070
35o	7,245	5,285	0,980	1,020	6,265
35p	6,129	2,172	1,978	0,5054	4,150
35q	6,197	0,539	2,829	0,3535	3,368
Ácido Ascórbico	10,47	1,303	4,585	0,2181	5,888
Galantamina	8,968	-0,703	4,132	0,2420	4,835

10 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Neste estudo, dezessete tiossemicarbazonas (**35a-q**) foram analisados quanto à potência de inibição de AChE e à atividade antioxidante. Todos os compostos apresentaram excelente atividade como inibidores de AChE, sendo mais ativos que o fármaco de referência. Foram realizados dois ensaios de atividade antioxidante: de sequestro de óxido nítrico e de sequestro de peróxido de hidrogênio, sendo que os resultados mostraram uma boa atividade antioxidante. O composto **35j** mostrou ação múltipla, uma propriedade que o torna um potencial agente terapêutico para DA. Além disso, estudos quânticos mostraram que os valores de energia do HOMO foram um melhor indicador da atividade antioxidante do que os valores de energia do LUMO, enquanto os valores de energia do LUMO foram um melhor indicador da inibição de AChE.



CAPÍTULO 3

11 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo diversificado de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países, afetando mais de um bilhão de pessoas. Populações vivendo na pobreza, sem saneamento adequado e em contato próximo com vetores infecciosos, animais domésticos e gado são os mais afetados.¹³⁷ As DTNs são doenças infecciosas que impactam principalmente as pessoas mais pobres do mundo e que foram negligenciados há décadas. Os patógenos responsáveis inclui um grupo biologicamente diferente como protozoários, helmintos e bactérias.¹³⁸

Neste capítulo será abordado duas DTNs causadas por protozoários, Doenças de Chagas e Leishmaniose.

11.1 DOENÇA DE CHAGAS

Em 1909, Carlos Chagas descobriu a tripanossomíase americana, conhecida como Doença de Chagas. Uma doença potencialmente fatal causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).^{41, 139, 140}

A Doença de Chagas teve seu início há milhões de anos como uma doença enzoótica de animais selvagens. Quando o homem invadiu os ecótopos naturais da infecção, a doença começou a ser transmitida ao homem com uma antropozoonose.^{141, 142}

A principal via de transmissão de *T. cruzi* para humanos ocorre através de insetos triatomíneos hematófagos que se tornam portadores do protozoário. Há mais de 150 espécies de triatomíneos, vetores da doença, e mais de 100 espécies de mamíferos, principalmente selvagens, que mantêm a infecção por *T. cruzi* na natureza.^{41, 143}

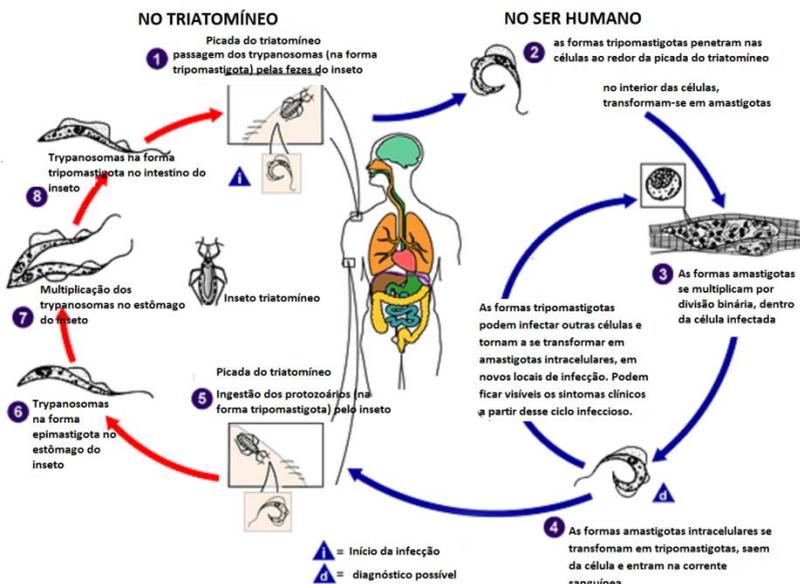
O desmatamento florestal favoreceu o deslocamento dos animais selvagens, dessa forma os triatomíneos se adaptaram ao novo nicho e começaram a usar os animais domésticos e o homem como fonte de alimento e três ciclos de intercomunicação foram estabelecidos: a natureza, arredores domésticos e ciclos domésticos.^{41, 142}

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, possui 3 formas principais de desenvolvimento: tripomastigota, amastigota e epimastigota.^{143, 144}

A forma epimastigota é a forma extracelular e não infecciosa do parasita encontrado no intestino dos insetos vetores. Quando os triatomíneos infectados se alimentam do sangue liberam a forma tripomastigota em suas fezes perto do local da mordida. Os tripomastigotas entram no hospedeiro, passam rapidamente pela

corrente sanguínea e depois colonizam os tecidos musculares e neuronais, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. Os amastigotas se multiplicam por fissão binária diferenciando-se em tripomastigotas e, em seguida, são liberados para a circulação como tripomastigotas sanguíneas. Quando o inseto se alimenta de sangue de um animal ou humano infectado ingere a forma tripomastigota, que se transforma em epimastigota no intestino do inseto para sobrevivência no vetor, então o parasita prolifera e se transforma em tripomastigota para ser liberado nas fezes do inseto (Figura 32).¹⁴³

Figura 32. Ciclo de vida do *T. cruzi*.



Fonte: Doença de Chagas. Disponível em: <
<http://www.misba.org.br/doenca/doencas-parasitarias/doenca-de-chagas/>>.
 Acesso em 22 jan. 2018.

A doença de Chagas se apresenta em duas fases. A fase aguda inicial dura cerca de 2 meses após a infecção. Durante a fase aguda, encontra-se um grande número de parasitas circulando no sangue, na maioria dos casos essa fase é assintomática, ou então, com poucos sintomas característicos. Os primeiros sinais visíveis característicos podem ser uma lesão da pele ou um inchaço violento das pálpebras de um olho. Além disso, a pessoa infectada pelo triatomíneo pode

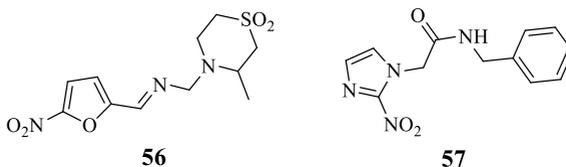
apresentar febre, dor de cabeça, glândulas linfáticas alargadas, palidez, dificuldade em respirar, dor muscular, inchaço e dor abdominal ou torácica.¹⁴⁰

Durante a fase crônica, os parasitas ficam alojados principalmente nos músculos cardíaco e digestivo. Até 30% dos pacientes sofrem de distúrbios cardíacos e até 10% sofrem de problemas digestivos (geralmente aumento do esôfago ou cólon), alterações neurológicas. Em anos posteriores, a infecção pode levar à morte súbita devido a arritmias cardíacas ou insuficiência cardíaca progressiva causada pela destruição do músculo cardíaco e seu sistema nervoso.

Estima-se que mais de 10.000 pessoas morram todos os anos de manifestações clínicas da doença de Chagas, que mais de 25 milhões de pessoas correm o risco de adquirir a doença e que 8 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina.¹⁴⁰

A doença de Chagas é clinicamente curável se o tratamento for iniciado numa fase precoce. Há dois medicamentos disponíveis para o tratamento da doença: nifurtimox **56** (Lampit[®], Bayer) e benznidazol **57** (Rochagan[®], Roche) (Figura 33).^{140, 143, 145} Esses dois medicamentos são os únicos medicamentos com maior eficácia clínica, mas estão longe de serem tratamentos ótimos, devido a efeitos adversos e baixa eficácia na fase crônica. Além disso, o benznidazol é o único tratamento disponível na maioria dos países endêmicos, pois a produção de nifurtimox foi interrompida no Brasil e em outros países da América Latina.¹⁴³

Figura 33. Estrutura química dos fármacos utilizados para tratamento da Doença de Chagas.



11.2 LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma doença causada por várias espécies intracelular de parasitas protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida ao homem por vetores através da picada de fêmeas de mosquitos da subfamília *Phlebotominae*.^{42, 146} É uma doença tropical negligenciada endêmica em regiões tropicais, subtropicais e em vários países mediterrânicos.^{42, 147}

Há mais de 20 espécies de *Leishmania* que podem ser transmitidas aos seres humanos por mais de 90 espécies de vetores. No entanto, as três principais formas da doença estão descritas a seguir:

- Leishmaniose cutânea (LC): é a forma mais comum de leishmaniose e provoca lesões cutâneas, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes ao longo da vida e deficiência grave. Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Estima-se que cerca de 0,6 milhões a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente no mundo todo.

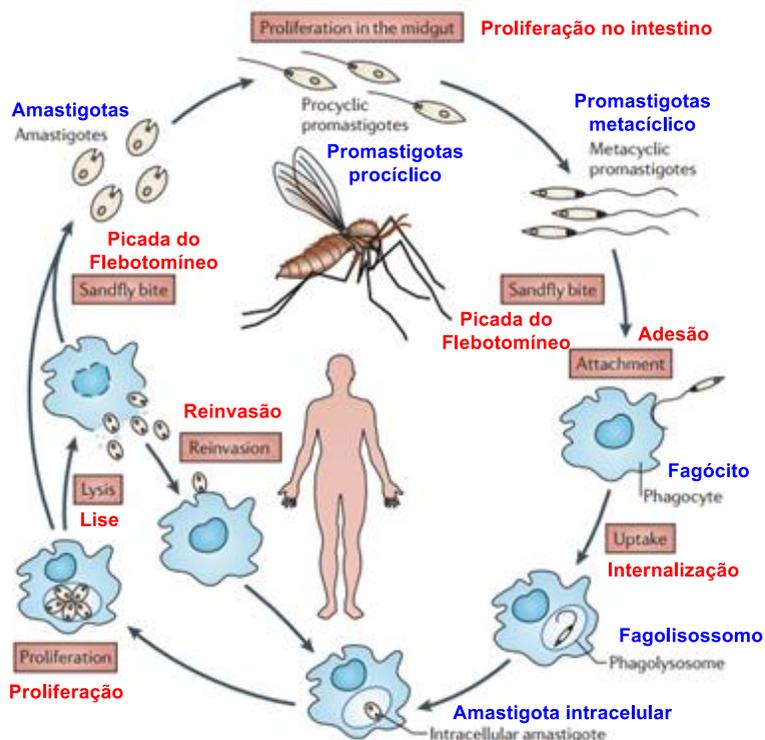
- Leishmaniose visceral (LV): também conhecida como kala-azar, é fatal se não for tratada em mais de 95% dos casos. Caracteriza-se por crises irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e fígado e anemia. Cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorrem em nível mundial a cada ano. Em 2015, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 7 países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão.¹⁴⁸

- Leishmaniose mucocutânea (LM): leva à destruição parcial ou total das mucosas do nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru.

As leishmanias assumem duas formas morfológicas distintas: promastigota no mosquito vetor e amastigota no hospedeiro mamífero. Durante o ciclo biológico (Figura 34) da *Leishmania spp.*, as fêmeas de *Phlebotominae* ingerem a forma amastigota. No trato digestório do inseto, as formas amastigotas se transformam em promastigotas flagelados que se proliferam através de divisão binária. Após, ocorre o processo de metaciclogênese com o surgimento da promastigotas metacíclicos (parasitos não proliferativos e altamente infectantes). Estes se acumulam nas porções anteriores da hipofaringe do inseto e durante o novo repasto sanguíneo são regurgitados na derme do hospedeiro. Os promastigotas metacíclicos são fagocitados, após estabelecer uma residência intracelular são transformados em amastigotas. Os

amastigotas sofrem replicação dentro das células hospedeiras, que se rompem permitindo uma nova reinfeção.^{149, 150}

Figura 34. Ciclo biológico da *Leishmania spp.*



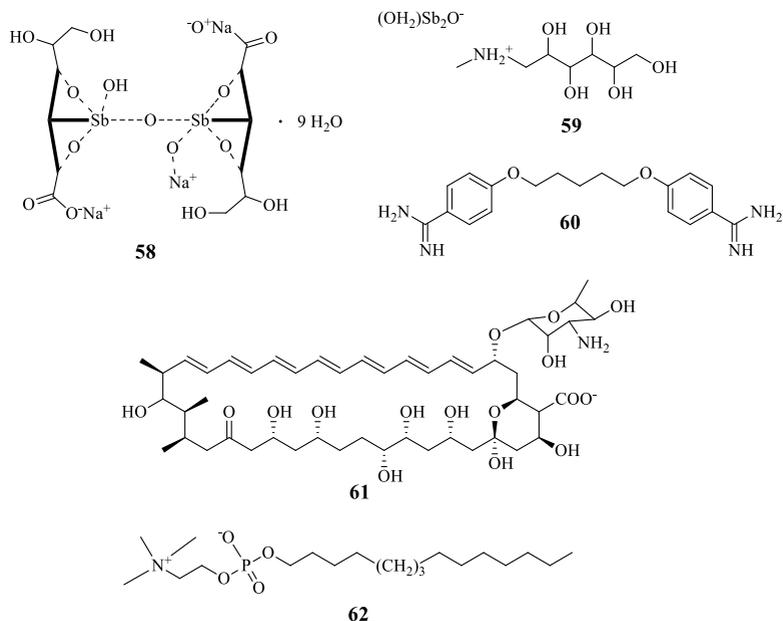
Fonte: Adaptado de Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, 2011. 9: p. 605.

Os dois medicamentos de primeira escolha utilizados para o tratamento da Leishmaniose, há mais de 70 anos, são: antimônio pentavalente estibogluconato de sódio **58** (Pentostan[®], Glaxo Wellcome) ou antimoniato de meglumina **59** (Glucantime[®], Sanofi-Aventis).⁴² O isetionato de pentamidina **60** (Pentacarinat[®], Rhône-Poulenc-*Rhorer*) é usado como uma alternativa para os fármacos de antimônio, sendo considerado em algumas localidades com uma terapia de primeira escolha (Figura 35).¹⁵¹

A alta toxicidade e as taxas de resistências observadas dos fármacos citados anteriormente resultaram no uso de medicamentos de

segundo escolha, como o anfotericina B **61** e miltefosina **62**.^{42, 147} Todos os medicamentos descritos apresentam eficácia variável e reações adversas, por isso a importância em realizar pesquisa nessa área na busca de novos fármacos mais potentes e seletivos.

Figura 35. Fármacos para o tratamento da Leishmaniose.



Ambas as doenças descritas neste Capítulo (Doença de Chagas e Leishmaniose) são DTNs e atinge principalmente a população pobre, em países em desenvolvimento, não sendo atrativas para as companhias farmacêuticas, e poucos recursos são investidos no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

11.3 AMIDAS

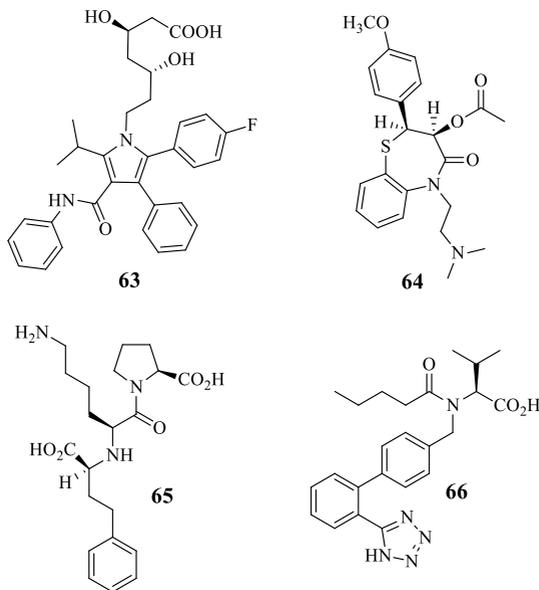
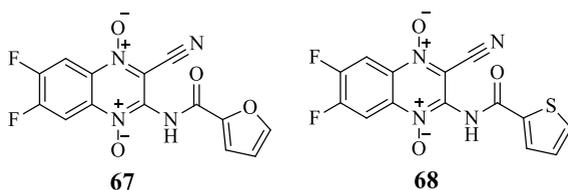
A ligação amídica é uma das ligações mais importantes na química orgânica, constituindo o principal grupo funcional de peptídeos, polímeros e, além disso, está presente em muitos produtos naturais e fármacos.^{152, 153}

As amidas são sintetizadas a partir da união de ácidos carboxílicos e aminas, no entanto, esta ligação não ocorre espontaneamente, por isso, é necessário ativar o ácido carboxílico. Uma infinidade de métodos e estratégias foi desenvolvida para esse fim, como por exemplo, transformar o ácido carboxílico em compostos de acila mais reativos (haleto de acila, anidrido de ácido, éster) ou, também, ativar a carbonila com reagentes de acoplamento. As carbodiimidas foram os primeiros reagentes de acoplamento a serem sintetizados, sendo bem comum o uso do DCC (diciclohexil carbodiimida), DIC (diisopropil carbodiimida) e do EDC.^{152, 154, 155}

As amidas apresentam uma variedade de atividade biológica, inclusive há medicamentos comercializados que apresentam em sua estrutura química este grupo funcional, como por exemplo: Atorvastatina **63**, fármaco que diminui a produção do colesterol, Diltiazem **64**, que atua como vasodilatador e depressor da função cardíaca, o Lisinopril **65** e o Valsartan **66** (Figura 36), fármacos utilizados para o tratamento da hipertensão arterial.¹⁵⁴

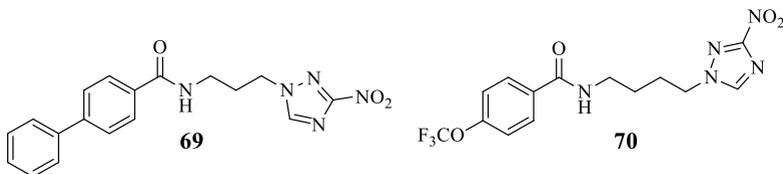
Na literatura encontram-se alguns trabalhos que relatam amidas como potenciais candidatos para o tratamento da Doença de Chagas^{43, 44} e da Leishmaniose.^{45, 46}

Dentre esses estudos, pode-se citar as amidas derivadas da quinoxalina que apresentaram atividade tripanocida na mesma ordem do medicamento Nifurtimox **56** (Figura 33). O composto **67** (Figura 37) apresentou um IC₅₀ de 18,2 µM, já o composto **68** da Figura 37 obteve um IC₅₀ de 10,8 µM, verifica-se que ambos apresentam o substituinte flúor, o que os diferencia são os anéis tiofeno e furano.¹⁵⁶

Figura 36. Fármacos com o grupo funcional amida em sua estrutura.**Figura 37.** Amidas derivadas da quinoxalina.

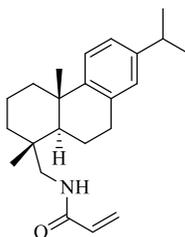
Outro exemplo interessante são as amidas baseadas 3-Nitro-1*H*-1,2,4-triazol que apresentaram-se como potentes agentes antitripanosomal com IC_{50} na escala de nanomolar. O derivado mais potente **69** (Figura 38) apresentou um IC_{50} de 43 nM contra o *T. cruzi* (36 vezes mais potente do que benznidazol **57**- Figura 33) e uma alta seletividade. O composto **70** é outro destaque neste estudo com um IC_{50} de 113 nM.¹⁵⁷

Figura 38. Amidas baseadas 3-Nitro-1*H*-1,2,4-triazol



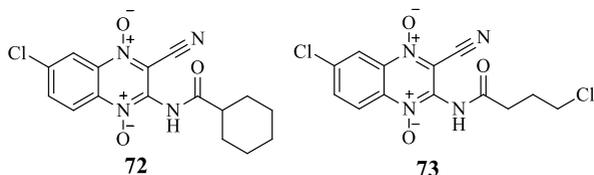
No trabalho de Pirttimaa et.al., amidas diterpenois do tipo abietano foram sintetizadas e avaliadas contra *L. donovani* e *T. cruzi*. O composto **71** foi o mais potente encontrado para ambos parasitas está representado na Figura 39, exibiu um IC₅₀ de 0,37 μM para o protozoário amastigoto da leishmania e um IC₅₀ de 0,6 μM para a forma amastigota de *T. cruzi*.¹⁵⁸

Figura 39. Amida diterpenoide do tipo abietano.

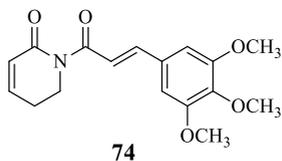


71

Quanto a Leishmaniose, Barea et.al., testaram amidas derivadas da quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido frente às espécies amastigota de *L. infantum* e *L. amazonensis*. Para a espécie *L. infantum* o composto **72** foi o mais potente com IC₅₀ de 2,5 μM, para a *L. amazonensis*, o derivado mais potente **73** obteve um IC₅₀ de 0,7 μM (Figura 40).¹⁵⁹

Figura 40. Amidas derivadas da quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido.

Além dos estudos que têm mostrado que as amidas apresentam atividade tripanocida e leishmanicida, outro estudo referente à piperlongumina motivou o desenvolvimento dessa parte da tese. Isso porque, a piperlongumina **74** (Figura 41) aumenta o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) e causa a morte celular apoptótica em células cancerosas e células normais projetadas para ter um genótipo de câncer, mas tem pouco efeito nas células normais primárias, ou seja, mostrou-se como um composto seletivo e sem toxicidade aparente em testes realizados com camundongos.⁴⁷

Figura 41. Piperlongumina.

De uma maneira geral, em todas as pesquisas na área da química medicinal têm-se buscado compostos protótipos mais seletivos, com a finalidade de diminuir os efeitos colaterais dos fármacos atuais. Neste sentido e diante de tudo que foi exposto, surgiu o interesse em sintetizar amidas análogas a piperlongumina e avaliar frente aos protozoários *T. cruzi* e *L. amazonensis*.

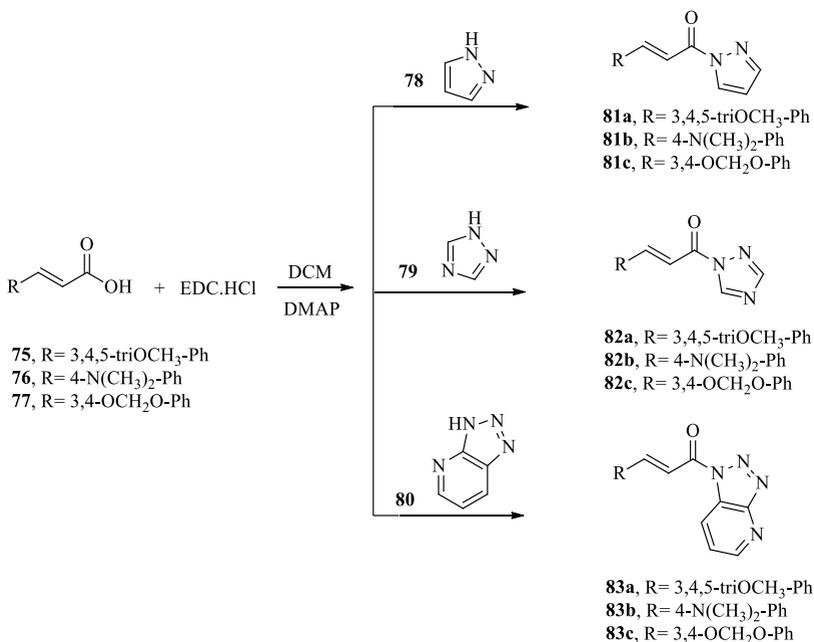
12 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O detalhamento referente aos aparelhos utilizados para a caracterização dos compostos sintetizados neste trabalho foi descrito no tópico Procedimento Experimental do Capítulo 1.

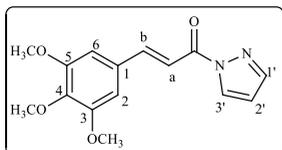
12.1 SÍNTESE DAS AMIDAS

As amidas **81a-c**, **82a-c** e **83a-c** foram obtidas reagindo uma quantidade equimolar do respectivo ácido **75-77** (2 mmol) e amina **78-80** (2 mmol) em 10 mL de diclorometano (DCM). Logo após, foi adicionado 4 mmol EDC (cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e quantidade catalítica de dimetilaminopiridina (DMAP) (Esquema 4). Essa mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por 10 horas. Depois de completa a reação, o solvente foi evaporado e o produto resultante foi lavado com água destilada, filtrado, seco e recristalizado com éter dietílico.¹⁶⁰

Esquema 4. Síntese das amidas **81a-c**, **82a-c** e **83a-c**.



Caracterização das amidas:



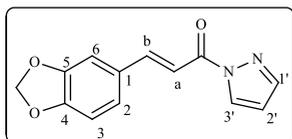
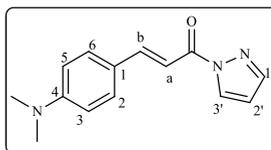
81a (*E*)-1-(1H-pirazol-1-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona.

Rendimento 74%; sólido amarelo; p.f. 139,5-140,9°C; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 8,40 (d, 1H, H3', $J = 2,8$ Hz), 7,97 (d, 1H, Hb, $J = 15,9$ Hz), 7,82-7,74

(sinais sobrepostos, 2H, Ha e H1', $J = 1,3$ e $15,9$ Hz); 6,92 (s, 2H, H2 e H6); 6,52 (dd, 1H, H2', $J = 1,5$ e $2,8$ Hz); 3,93 (s, 6H, OCH_3); 3,91 (s, 3H, OCH_3). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 163,5 (C=O); 153,5 (C3 e C5); 148,0 (C1'); 143,8 (Cb); 141,0 (C4); 129,8 (C1); 128,8 (C3'); 114,6 (Ca); 109,8 (C2'); 106,1 (C2 e C6); 61,0 (*p*- OCH_3); 56,3 (*m*- OCH_3). HRMS (ESI-TOF) m/z : 311,1008 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$, 311,1002.

81b (*E*)-3-(4-(dimetilamino)fenil)-1-(1H-pirazol-1-il)prop-2-en-1-ona.

Rendimento 61%; sólido amarelo; p.f. 114,1-116,2°C; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 8,40 (d, 1H, H3', $J = 2,6$ Hz), 7,99 (d, 1H, Hb, $J = 15,7$ Hz), 7,76 (d, 1H, H1', $J = 0,8$ Hz); 7,69-7,58 (sinais sobrepostos, 3H, Ha, H2 e H6, identificado $J = 8,8$ e $15,6$ Hz); 6,69 (d, 2H, H3 e H5, $J = 9,07$ Hz); 6,47 (dd, 1H, H2', $J = 1,5$ e $2,8$ Hz); 3,06 (s, 3H, CH_3). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 164,2 (C=O); 152,4 (C4); 148,9 (C1'); 143,3 (Cb); 130,9 (C2 e C6); 128,6 (C3'); 122,4 (C1); 111,7 (C3 e C5); 109,3 (Ca); 109,2 (C2'); 40,1 (CH_3). HRMS (ESI-TOF) m/z : 264,1108 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$, 264,1107.



81c (*E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-1-(1H-pirazol-1-il)prop-2-en-1-ona.

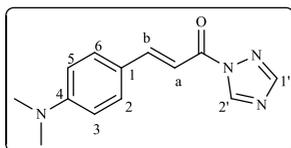
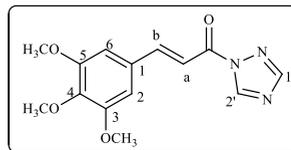
Rendimento 82%; sólido bege; p.f. 151,1-152,5°C; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 8,38 (d, 1H, H3', $J = 2,9$ Hz), 7,95

(d, 1H, Hb, $J = 15,9$ Hz), 7,76-7,68 (sinais sobrepostos, 2H, Ha e H1', identificado $J = 16,1$ Hz); 7,23-7,16 (sinais sobrepostos, 2H, H6 e H2, $J = 8,03$ Hz); 6,85 (d, 1H, H3, $J = 8,03$ Hz); 6,49 (dd, 1H, H2', $J = 1,3$ e $2,6$ Hz); 6,04 (s, 2H, CH_2). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 163,7 (C=O); 150,4 (C4); 148,5 (C5); 147,6 (C1'); 143,7 (Cb); 129,0 (C1); 128,7 (C3'); 125,7 (C2'); 113,5 (Ca); 109,7 (C2'); 108,6 (C3); 107,0

(C6); 101,7 (CH₂). HRMS (ESI-TOF) m/z: 265,05844 [M + Na]⁺, calculado para C₁₃H₁₀N₂O₃, 265,05836.

82a (*E*)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona.

Rendimento 61%; sólido amarelo; p.f. 141,0-142,4°C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9,04 (s, 1H, H1'), 8,11-8,011 (sinais sobrepostos, 2H, H2' e Hb, *J* = 15,7 Hz), 7,57 (d, 1H, Ha, *J* = 15,7 Hz); 6,92 (s, 2H, H1 e H6); 3,94 (s, 6H, OCH₃); 3,93 (s, 3H, OCH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 162,2 (C=O); 153,5 (C4); 153,0 (C3 e C5); 150,6 (C1' e C2'); 144,1 (Cb); 129,2 (C1); 113,5 (Ca); 106,5 (C2 e C6); 61,0 (*p*-OCH₃); 56,3 (*m*-OCH₃). HRMS (ESI-TOF) m/z: 312,0956 [M + Na]⁺, calculado para C₁₄H₁₅N₃O₄, 312,0955.

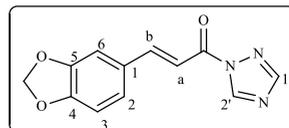


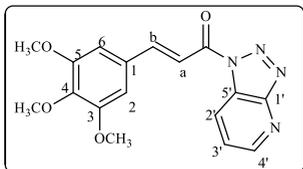
82b (*E*)-3-(4-(dimetilamino)fenil)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)prop-2-en-1-ona.

Rendimento 61%; sólido amarelo; p.f. 163,8-165,7°C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9,01 (s, 1H, H1'), 8,10-8,02 (m, 2H, sinais sobrepostos, H2' e Hb, *J* = 15,5 Hz), 7,59 (d, 2H, H2 e H6, *J* = 8,8 Hz); 7,41 (d, 1H, Ha, *J* = 15,6 Hz); 6,68 (d, 2H, H3 e H5, *J* = 8,9 Hz); 3,07 (s, 6H, CH₃). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 162,7 (C=O); 152,8 (C4); 152,6; 151,3; 143,8 (Cb); 131,4 (C2 e C6); 121,8 (C1); 111,7 (C3 e C5); 107,8 (Ca); 40,0 (CH₃). HRMS (ESI-TOF) m/z: 242,1159 [M], calculado para C₁₃H₁₄N₄O, 242,1162.

82c (*E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)prop-2-en-1-ona.

Rendimento 85%; sólido amarelo; p.f. 212,2-213,9°C; RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9,02 (s, 1H, H1'), 8,08-7,99 (m, 2H, sinais sobrepostos, H2' e Hb, identificado *J* = 15,6 Hz), 7,52 (d, 1H, Ha, *J* = 15,6 Hz); 7,23-7,16 (m, 2H, H2 e H6, identificado *J* = 8,6 Hz); 6,88 (d, 1H, H3, *J* = 7,7 Hz); 6,06 (s, 2H, CH₂). RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 162,3 (C=O); 152,9; 151,1 (C4); 150,1; 148,6 (C5); 143,9 (Cb); 128,5 (C1); 126,5 (C2); 112,4 (Ca); 108,7 (C3); 107,0 (C6); 101,9 (CH₂). HRMS (ESI-TOF) m/z: 266,0535 [M + Na]⁺, calculado para C₁₂H₉N₃O₃, 266,0536.



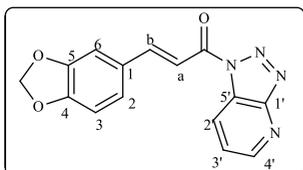
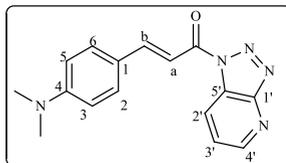


83a (*E*)-1-(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-il)-3-(3,4,5-trimetoxi-fenil)prop-2-en-1-ona.

Rendimento 59%; sólido amarelo; p.f. 176,4-179,0°C; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 8,88 (dd, 1H, $\text{H4}'$, $J = 0,9$ e $4,4$ Hz), 8,76 (dd, 1H, $\text{H2}'$, $J = 1,2$ e $8,3$ Hz), 8,11 (d, 1H, Hb , $J = 15,8$ Hz); 8,00 (d, 1H, Ha , $J = 15,7$ Hz); 7,65 (dd, 1H, $\text{H3}'$, $J = 5,0$ e $8,3$ Hz); 6,99 (s, 2H, H2 e H6); 3,97 (s, 6H, *m*- OCH_3); 3,94 (s, 3H, *p*- OCH_3). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 163,6 (C=O); 157,8 ($\text{C5}'$); 153,6 (C3 e C5); 149,9; 149,8; 141,7 (C4); 129,2 (C1); 124,6; 124,4 ($\text{C1}'$); 123,6; 113,7 (Ca); 106,4 (C2 e C6); 61,0 (*p*- OCH_3); 56,3 (*m*- OCH_3). HRMS (ESI-TOF) m/z : 363,1062 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4$, 363,1064.

83b (*E*)-1-(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)prop-2-en-1-ona.

Rendimento 64%; sólido laranja; p.f. 218,2-218,5°C; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 8,84 (dd, 1H, $\text{H4}'$, $J = 1,6$ e $4,4$ Hz), 8,76 (dd, 1H, $\text{H2}'$, $J = 1,6$ e $8,3$ Hz), 8,13 (d, 1H, Hb , $J = 15,6$ Hz); 7,84 (d, 1H, Ha , $J = 15,5$ Hz); 7,68- 7,56 (m, sinais sobrepostos, 3H, H2 , H6 e $\text{H3}'$, identificado $J = 4,5$, $8,3$ e $9,2$ Hz); 6,72 (s, 2H, H3 e H5); 3,09 (s, 6H, CH_3). RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 164,3 (C=O); 157,8 ($\text{C5}'$); 152,9 (C4); 150,7; 149,4; 131,4 (C2 e C6); 124,5 ($\text{C1}'$); 124,2; 123,7; 121,8 (C1); 111,7 (C3 e C5); 108,2 (Ca); 40,0 (OCH_3). HRMS (ESI-TOF) m/z : 316,1167 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}$, 316,1169.



83c (*E*)-1-(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-il)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)prop-2-en-1-ona.

Rendimento 80%; sólido amarelo; p.f. 205,2-206,5°C; RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm: 8,88 (dd, 1H, $\text{H4}'$, $J = 1,4$ e $4,5$ Hz), 8,73 (dd, 1H, $\text{H2}'$, $J = 1,5$ e $8,3$ Hz), 8,13 (d, 1H, Hb , $J = 15,9$ Hz); 7,93 (d, 1H, Ha , $J = 15,7$ Hz); 7,83 (dd, 1H, $\text{H3}'$, $J = 4,5$ e $8,3$ Hz); 7,67 (d, 1H, H6 , $J = 1,4$ Hz); 7,48 (dd, 1H, H2 , $J = 1,5$ e $8,1$ Hz); 7,06 (d, 1H, H3 , $J = 7,9$ Hz); 6,16 (s, 2H, CH_2). HRMS (ESI-TOF) m/z : 317,0643 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3$, 317,0645.

12.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os ensaios de atividade leishmanicida e tripanocida foram realizados em parceria com o laboratório de Protozoologia da UFSC, sob a supervisão do professor Mario Steindel, pela aluna Milene Hoer de Moraes.

Foi avaliada a toxicidade dos compostos sob as formas parasitárias de *Trypanosoma Cruzi* e *Leishmania amazonensis*, além de avaliar o índice de seletividade através da citotoxicidade em macrófagos.

12.2.1 Ensaio colorimétrico para triagem de compostos tripanocida

Para a triagem de atividade tripanocida 180 μL /poço de uma suspensão 5×10^6 epimastigotas de *T.cruzi* foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com 20 μL das amostras na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 48 horas a 34 °C. Como controle positivo foi usado o benzonidazol e como controle negativo foi utilizado o DMSO.

A atividade antiparasitária foi determinada pela técnica do MTT conforme Sieuwerts et al.. A técnica consiste na incorporação da substância hidrossolúvel Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) por células viáveis que reduzem o composto através da ação de desidrogenases mitocondriais, formando um sal de formazan insolúvel e com coloração roxa, que se deposita no citoplasma. A quantidade deste sal é diretamente proporcional ao número de células viáveis.¹⁶¹

Após 48 h de cultivo dos parasitas na presença de compostos, foi feita a adição de 50 μL de solução de MTT (10 mg mL^{-1}) nos poços e incubação a 26°C por 6 horas. Após centrifugação por 10 min, o sobrenadante foi removido e solubilizado com DMSO. A densidade óptica foi medida a 540 nm em uma leitora de placas TECAN® Infinite M200. Para cada amostra foram realizados três experimentos independentes em triplicata. O percentual de inibição para cada concentração dos compostos foi determinado conforme a Equação (8).

Os compostos que apresentam uma taxa de inibição superior a 50%, foram utilizados para determinar a concentração inibitória de 50% do parasita (CI₅₀) e a concentração inibitória de 50% de crescimento celular (CC₅₀). Foram utilizadas concentrações decrescentes de 100 a 1,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de compostos diluído no meio, conforme metodologia descrita acima. As CI₅₀ (concentração que inibe 50% dos parasitos) foram calculadas plotando-se as curvas concentração-resposta em um

modelo de regressão não linear no programa GraphPad Prism 5.03® (San Diego, USA).

$$I (\%) = \left(1 - \frac{D.O.composto - D.O.branco-composto}{D.O.controle\ negativo - D.O.branco-controle\ negativo} \right) \times 100 \quad (8)$$

12.2.2 Ensaio colorimétrico para triagem de compostos leishmanicidas

A metodologia utilizada para avaliar a triagem de compostos com atividade leishmanicida foi desenvolvida e validada no laboratório de Protozoologia da UFSC.¹⁶² Resumidamente, a linhagem de células de leucemia monocítica humana aguda THP-1 foram induzidas a diferenciação em fagócitos aderentes semelhantes a macrófagos conforme descrito por Schwende et.al.¹⁶³ As células THP-1 aderentes, diferenciadas em placas de 96 poços foram infectadas com clones de promastigotas de *L. amazonensis* expressando a enzima β -galactosidase. Após 24 horas de incubação, para permitir a transformação dos promastigotas em amastigotas, as células foram tratadas com 20 μ L dos compostos diluídos em meio de cultura na concentração de 50 μ g mL⁻¹ e as células cultivadas 48 horas a 34°C e 5% de CO₂. O sobrenadante foi removido e acrescentado 250 μ L de PBS (tampão salino fosfato) contendo 100 μ M CPRG (Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo) e NP-40 (Nonidet P-40) 0,1% (v/v). A reação foi desenvolvida durante 16 horas a 37°C e lida a 570 nm com referência em 630 nm em equipamento Tecan® Modelo Infinite M200. Como controle positivo foram utilizados a anfotericina B e como controle negativo foi utilizado o DMSO. O percentual de inibição para cada concentração dos compostos foi determinado conforme a Equação (8).

Os compostos que apresentam uma taxa de inibição superior a 50%, foram utilizados para determinar a concentração inibitória de 50% do parasita (CI₅₀) e a concentração inibitória de 50% de crescimento celular (CC₅₀). Foram utilizadas concentrações decrescentes de 100 a 1,56 μ g mL⁻¹ de compostos diluído no meio, conforme metodologia descrita acima. As CI₅₀ (concentração que inibe 50% dos parasitos) foram calculadas plotando-se as curvas concentração-resposta em um modelo de regressão não linear no programa GraphPad Prism 5.03® (San Diego, USA).

12.2.3 Ensaio de citotoxicidade

A viabilidade celular foi determinada através da técnica do MTT, conforme descrito por Sieuwerts et. al.¹⁶¹ As células (linhagem de células de THP-1) foram coletadas e quantificadas e semeadas em placas de 96 poços (4×10^4 células/poço) em 180 μL de RPMI (Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* 1650) completo. Em seguida, 20 μL dos compostos diluídos em meio de cultura em concentrações decrescentes de 100 a 1,56 μM foram adicionados sobre as células. Estas foram cultivadas por 72 horas a 37°C e 5% de CO_2 . As placas foram, então, centrifugadas (2.700xg/10 minutos), o sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspensionado em 50 μL de uma solução de MTT a 3 mg mL^{-1} . Na sequência, as placas foram incubadas a 37°C no escuro durante 4 horas e depois centrifugadas (2.700xg/10 minutos). O sobrenadante foi, então, retirado e o sedimento (sal de formazan) solubilizado em DMSO (100 μL /orifício) por uma hora sob agitação. A densidade óptica foi determinada a 540 nm em equipamento Tecan® modelo Infinite M200.

Poços contendo apenas meio de cultura foram utilizados como branco para cada concentração de compostos ou controles. DMSO 1% (v/v) foi o controle negativo de inibição celular. DMSO 20% foi o controle positivo. Anfotericina B foi testada até 10 μM . O percentual de inibição para cada concentração dos compostos foi determinado conforme a Equação (8). As CC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento celular) foram calculadas plotando-se as curvas concentração-resposta em um modelo de regressão não linear no programa GraphPad Prism 5.03® (San Diego, USA).

13 RESULTADOS E DISCUSSÕES

13.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

As amidas são sintetizadas a partir da união de ácidos carboxílicos e aminas, no entanto, esta ligação não ocorre espontaneamente, por isso, é necessário ativar o ácido carboxílico transformando em compostos de acila mais reativos ou ativando a carbonila com reagentes de acoplamento.^{154, 155} Diante das diversas metodologias desenvolvidas para a ativação da carbonila, neste trabalho foi escolhido o reagente de acoplamento EDC. Isso porque, o mesmo apresenta a vantagem de ser altamente solúvel em meio aquoso resultando na fácil remoção do excesso de reagente e do subproduto formado (ureia).¹⁶⁴

O mecanismo de reação proposto inicia-se pela adição do ácido carboxílico à ligação C=N da carbodiimida (EDC), que gera um derivado de ureia *O*-acilado. Este é um agente acilante reativo porque existe uma forte força motriz para a eliminação do grupo carbonato de ureia muito estável. A amina reage com o agente acilante ativo formando a amida desejada (Esquema 5).^{106, 136}

Foram sintetizadas 9 amidas com rendimentos na faixa de 59-85%. Dos compostos sintetizados neste capítulo apenas o **82b** já foi relatado na literatura.¹⁶⁵

Todos os compostos foram caracterizados por RMN de ¹H e ¹³C e espectro de massas de alta resolução, a caracterização detalhada para estes compostos é apresentada na parte experimental e os espectros podem ser observados no Apêndice IV e V. A numeração para a atribuição dos sinais foi determinada aleatoriamente. Na Tabela 9 estão listados os pontos de fusão experimental e reportado na literatura, bem como, o número de registro CAS quando disponível.

Esquema 5. Mecanismo da reação das amidas utilizando EDC (a) ácido carboxílico, (b) carbodiimida, (c) derivado de ureia *O*-acilado, (d) DMAP, (e) ureia, (f) intermediário reativo, (g) amina e (h) amida.

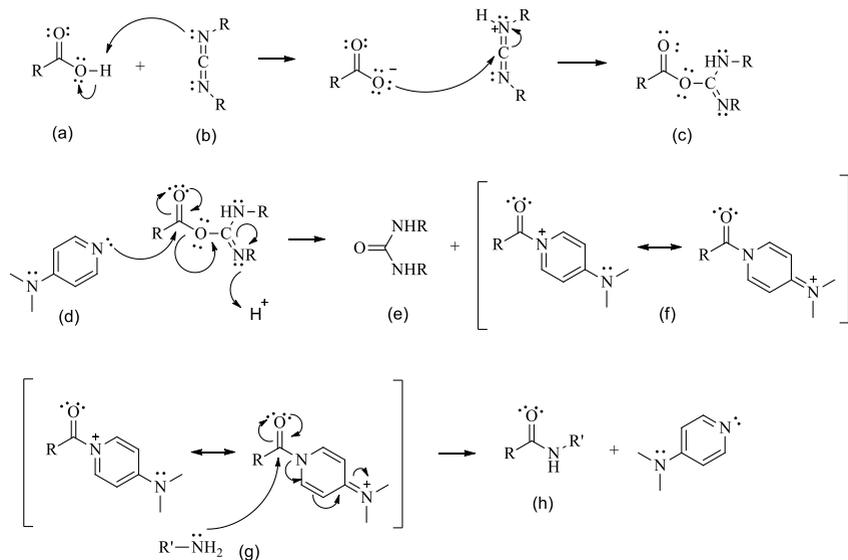


Tabela 9. Ponto de fusão (experimental e reportado na literatura) e número de registro CAS das amidas.

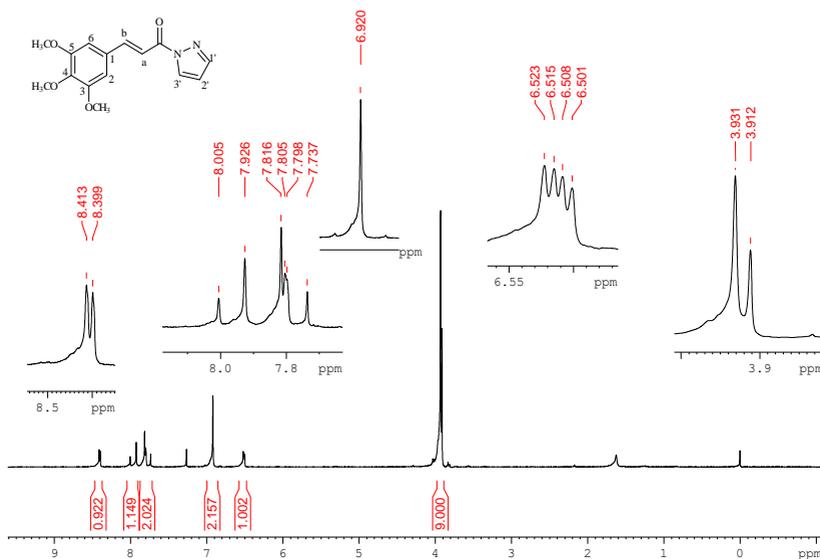
Composto	R ₁	R ₂	p.f. Exp. (°C)	p.f. Lit. (°C)	CAS
81a*	3,4,5-triOCH ₃ -Ph		139,5-140,9	-	-
81b*	4-N(CH ₃) ₂ -Ph		114,1-116,2	-	-
81c*	3,4-OCH ₂ O-Ph		152,1-152,5	-	543721-96-6
82a*	3,4,5-triOCH ₃ -Ph		141,0-142,4	-	-
82b	4-N(CH ₃) ₂ -Ph		163,8-165,7	-	150020-94-3
82c*	3,4-OCH ₂ O-Ph		212,2-213,9	-	-
83a*	3,4,5-triOCH ₃ -Ph		176,4-179,0	-	-
83b*	4-N(CH ₃) ₂ -Ph		218,2-218,5	-	-
83c*	3,4-OCH ₂ O-Ph		205,2-206,5	-	-

Fonte: O Autor. CAS= número de registro, obtido no SciFinder. *Compostos não relatados na literatura. –Dados não encontrados na literatura.

Para exemplificar a caracterização das amidas foi escolhido o composto **81a**.

O espectro de RMN de ^1H da amida **81a** pode ser analisado na Figura 42, o sinal em 3,91 ppm é referente aos três hidrogênios da metoxila (*p*- OCH_3), já o sinal em 3,93 ppm é atribuído aos outros seis hidrogênios das metoxilas (*m*- OCH_3). Na sequência, observa-se o duplo duplete do hidrogênio H2' em 6,52 ppm com as constantes de acoplamento de $J_{\text{H1}'\text{H2}} = 1,5$ Hz e $J_{\text{H3}'\text{H2}} = 2,8$ Hz, logo após tem-se um simpleto em 6,92 ppm referente aos hidrogênios H2 e H6. Na região em 7,82-7,74 ppm encontra-se sinais sobrepostos de dois hidrogênios que são atribuídos ao Ha e H1', pode-se identificar as constantes de acoplamento de $J_{\text{H1}'\text{H2}} = 1,3$ Hz e $J = 15,9$ Hz. Por fim, observa-se em 7,97 ppm o hidrogênio Hb com $J = 15,9$ Hz e em 8,40 ppm o duplete do hidrogênio H3' com $J_{\text{H3}'\text{H2}} = 2,8$ Hz.

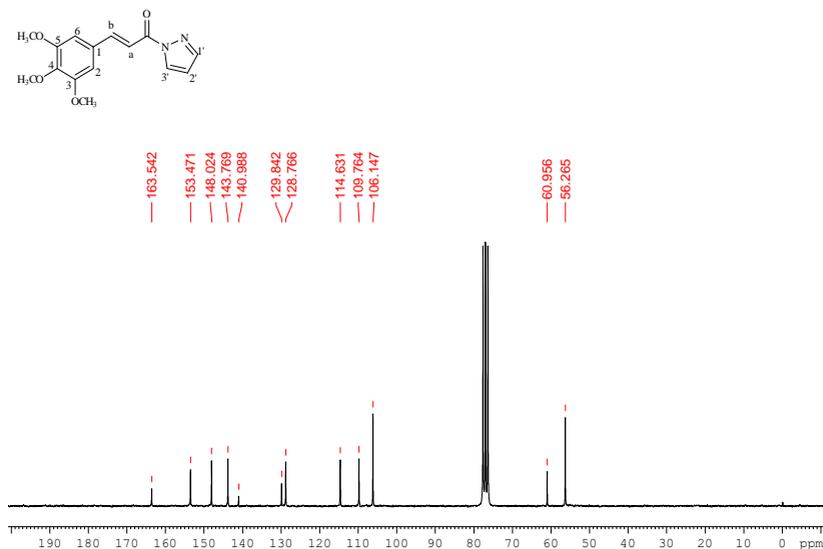
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **81a**.



No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 43), observa-se primeiramente os sinais referente aos carbonos das metoxilas em 56,3 ppm (*m*- OCH_3) e em 61 ppm (*p*- OCH_3). Na faixa de 106,1-153,5 ppm encontra-se os carbonos aromáticos e os carbonos vinílicos Ca (114,6 ppm) e Cb (143,8 ppm). Os carbonos mais desblindados são atribuídos

ao carbono carbonílico em 163,5 ppm e aos carbonos equivalentes C3 e C5 em 153,5 ppm.

Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **81a**.



13.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Após a caracterização das amidas, as mesmas foram avaliadas quanto à toxicidade nas formas parasitárias de *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*.

Inicialmente, foi realizada uma triagem dos compostos, na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, para verificar a porcentagem de inibição de crescimento do parasita *T. cruzi*. Os compostos que apresentam uma taxa de inibição superior a 50%, foram utilizados para determinar a CI_{50} e a CC_{50} . Analisando os resultados obtidos, na Tabela 10, verifica-se que dos 9 compostos avaliados 6 (**81a**, **81b**, **82b**, **82c**, **83a**, **83c**) foram capazes de eliminar mais do que 50% dos parasitas.

Para a determinação da CI_{50} foram utilizadas concentrações decrescentes dos compostos. Analisando os resultados obtidos para a série **81** e **82**, verificou-se que o substituinte 4- $\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{-Ph}$ em R_1 (ver Figura 44-a) parece ser importante para a atividade tripanocida, porém

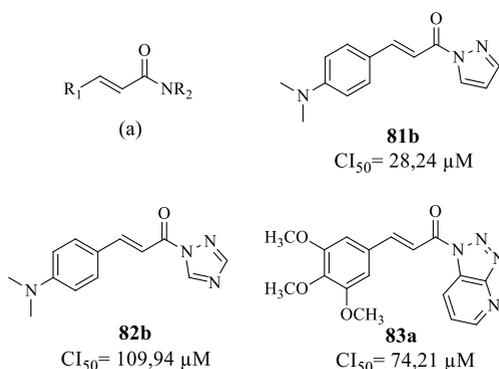
esse padrão não foi observado na série **83**. Os três compostos mais ativos encontrados neste trabalho para a inibição de *T. cruzi* estão destacados na Figura 44, sendo o que a amida **81b** é a mais promissora com CI_{50} de 28,24 μM .

Tabela 10. Porcentagem de inibição de *T. cruzi* na concentração de 50 $\mu g mL^{-1}$, CI_{50} , CC_{50} e IS dos compostos mais ativos.^a

Composto	Inibição de crescimento (%)	CI_{50} ($\mu g mL^{-1}$)	CI_{50} (μM)	CC_{50} ($\mu g mL^{-1}$)	CC_{50} (μM)	IS
81a	96,75 \pm 0,33	39,11 \pm 2,39	135,75	27,37 \pm 7,33	94,99	0,70
81b	98,30 \pm 0,11	6,81 \pm 0,74	28,24	82,42 \pm 7,24	341,82	12,10
81c	0	nd	nd	nd	nd	nd
82a	8,05 \pm 2,21	nd	nd	nd	nd	nd
82b	97,89 \pm 0,04	26,62 \pm 2,62	109,94	45,08 \pm 3,70	186,19	1,69
82c	75,16 \pm 3,89	34,88 \pm 2,36	143,50	24,07 \pm 4,59	99,03	0,69
83a	77,49 \pm 2,22	25,24 \pm 2,93	74,21	17,89 \pm 0,82	52,60	0,71
83b	17,67 \pm 1,38	nd	nd	nd	nd	nd
83c	88,90 \pm 3,77	32,48 \pm 1,85	110,45	37,91 \pm 5,09	128,91	1,17
Benzonidazol 20 μM	95,15 \pm 0,23		10,18 \pm 0,3		>500	> 49,11

^aDados são expressos como médias \pm DP de três experimentos independentes. nd=não determinado. Índice de seletividade (IS) é dado por CC_{50}/CI_{50} .

Figura 44. Estrutura geral das amidas (a) e estrutura química dos compostos mais ativos para *T. cruzi*.



Foi realizado o ensaio da atividade citotóxica sobre células THP-1 não infectadas (CC_{50}), com o objetivo de detectar um possível efeito

tóxico para as células normais. Analisando os dados da Tabela 10 verifica-se que o composto **81b** apresentou o maior valor de CC_{50} (341,82 μM), isso significa que ele foi o menos tóxico da série para a célula analisada.

A relação entre CC_{50}/CI_{50} resulta no índice de seletividade (IS). Quanto maior o valor do IS mais seletivo o composto é para a inibição do parasito, e como consequência, menos tóxico. Com isso, a amida **81b** foi o composto mais potente e seletivo identificado nesse estudo.

Também foi realizada uma triagem dos compostos frente ao parasita *L. amazonensis*, verificando a porcentagem de inibição de crescimento do mesmo. Assim como para o ensaio tripanocida, os compostos que apresentam uma taxa de inibição superior a 50%, foram utilizados para determinar a CI_{50} e a CC_{50} .

Na Tabela 11 pode-se verificar que apenas 4 compostos (**81a**, **81b**, **82b**, **83a**) foram capazes de eliminar mais do que 50% dos parasitas. Analisando os valores de CI_{50} , observa-se que o composto mais potente foi o **81a** ($CI_{50} = 42,97 \mu\text{M}$), os compostos **81b** e **82b** apresentaram respectivamente os CI_{50} de 47,24 μM e 57,66 μM .

Nesse caso, o composto mais ativo da série apresenta o grupamento 3,4,5-triOCH₃-Ph em R₁ (ver Figura 44-a), corroborando com estudos descritos na literatura que afirmam que a presença de grupos metoxila é importante para a atividade anti-leishmania.¹⁶⁶ Porém, vale ressaltar que as amidas **82a** e **83a** também apresentam em sua estrutura o grupamento trimetoxila, a primeira não atingiu inibição suficiente para seguir no teste de determinação do CI_{50} e a segunda (**83a**) apresentou um CI_{50} de 100,43 μM , não se destacando frente às outras amidas. Além disso, assim como para a atividade tripanocida o grupamento 4-N(CH₃)₂-Ph em R₁ também parece ser importante para a atividade leishmanicida. Os três compostos mais ativos para *L. amazonensis* podem ser visualizados na Figura 45.

Para ambos os testes realizados neste capítulo foi possível verificar que, de maneira geral, os compostos mais ativos têm em R₂ (Figura 44-a) um anel de cinco membros (pirazol ou triazol) em sua estrutura.

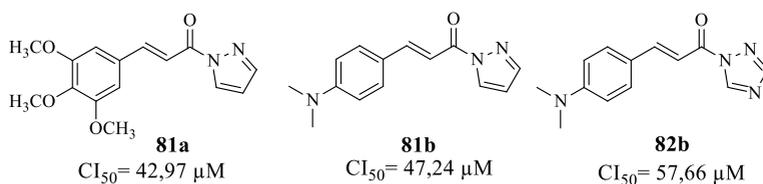
Tabela 11. Porcentagem de inibição de *L. amazonensis* na concentração de 50 µg mL⁻¹, CI₅₀, CC₅₀ e IS dos compostos mais ativos.^a

Composto	Inibição de crescimento (%)	CI ₅₀ (µg mL ⁻¹)	CI ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	CC ₅₀ (µM)	IS
81a	86,79 ± 2,02	12,38 ± 3,97	42,97	27,37 ± 7,33	94,99	2,21
81b	79,40 ± 1,43	11,39 ± 2,51	47,24	82,42 ± 7,24	341,82	7,23
81c	19,15 ± 4,57	nd	nd	nd	nd	nd
82a	32,64 ± 6,19	nd	nd	nd	nd	nd
82b	79,42 ± 1,37	13,96 ± 1,93	57,66	45,08 ± 3,70	186,19	3,23
82c	39,27 ± 3,80	nd	nd	nd	nd	nd
83a	67,09 ± 6,86	34,16 ± 9,77	100,43	17,89 ± 0,82	52,60	0,52
83b	3,49 ± 0,98	nd	nd	nd	nd	nd
83c	42,64 ± 3,58	nd	nd	nd	nd	nd
Anfotericina 2 µM	94,86 ± 0,90	nd	0,14 ± 0,02	nd	27,86 ± 0,98	199

^aDados são expressos como médias ± DP de três experimentos independentes. nd=não determinado. Índice de seletividade (IS) é dado por CC₅₀/CI₅₀.

Em relação ao IS, o compostos **81b** mostrou-se o mais seletivo, porém menos seletivo para a *L. amazonensis* do que para a *T. cruzi*, isso porque ele foi quase que o dobro mais potente para o parasita causador na Doença de Chagas.

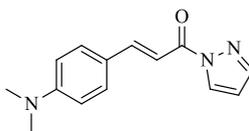
Figura 45. Estrutura química dos compostos mais ativos para *L. amazonensis*.



Com visto anteriormente, a motivação pela síntese de amidas análogas da piperlongumina (**74**- Figura 41) é dada pelo fato dessa amida não afetar células normais primárias, sendo seletiva. No nosso estudo, pode-se obter um composto chave que foi potente e relativamente seletivo, a amida **81b**. Para este composto, pretende-se continuar realizando testes de toxicidade, além dos ensaios de nanoemulsão que já estão em andamento e sendo realizados pela aluna Daniela Sousa Coelho, aluna do professor Marcelo Maraschin, no Laboratório de Morfogenese e Bioquímica Vegetal.

14 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Neste capítulo foram planejadas e sintetizadas 9 amidas, das quais 8 são inéditas, utilizando do reagente de acoplamento EDC. Os compostos obtidos foram investigados quanto a sua ação inibitória *in vitro* frente aos protozoários *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Para os ensaios realizados com o parasita da Doença de Chagas, os três compostos que obtiveram os melhores resultados foram **81b** (CI_{50} = 28,24 μ M), **83a** (CI_{50} = 74,21 μ M mL^{-1}) e **82b** (CI_{50} = 109,94 μ M). Para os ensaios com o *L. amazonensis*, obteve-se três compostos com valores de CI_{50} na faixa de 40-60 μ M, **81a** (CI_{50} = 42,97 μ M), **81b** (CI_{50} = 47,24 μ M) e **82b** (CI_{50} = 57,66 μ M). O composto mais potente e seletivo encontrado neste estudo foi a amida **81b**. Os derivados de amida descrito nesta tese são compostos potenciais para a pesquisa e desenvolvimento de drogas para o tratamento de DTNs como a Doença de Chagas e Leishmaniose.



81b

15 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesta tese foi possível planejar, sintetizar e caracterizar duas diferentes classes de compostos com propriedades biológicas conhecidas na literatura. Além disso, foram obtidos compostos bioativos para as diferentes patologias estudadas. Vale ressaltar que foram obtidos 30 compostos inéditos, sendo 22 tiossemicarbazonas e 8 amidas.

CAPÍTULO 1

Neste capítulo foram desenhadas séries congêneres de tiossemicarbazonas baseadas em compostos bioativos descritos na literatura (levou-se em conta o “*know how*” do nosso grupo de pesquisa), além disso, foi utilizada a estratégia do bioisosterismo para a obtenção das tiossemicarbazonas.

Foram sintetizadas e caracterizadas 3 tiossemicarbazidas (intermediários da reação) e 50 tiossemicarbazonas, das quais 22 não foram relatadas na literatura.

As tiossemicarbazonas foram avaliadas *in vitro* frente à PtpA de *Mtb*. Quatro compostos exibiram excelentes resultados de inibição, com IC₅₀ inferior a 9,5 µM (**34c**, **34g**, **34p** e **35p**). Além disso, verificou-se que estes inibidores são potentes e seletivos para PtpA. O composto mais potente **34p** (IC₅₀ = 2,9 µM) foi submetido a estudos cinéticos, mostrando um modo de inibição não-competitivo. Pela primeira vez, um inibidor de PtpA não-competitivo é relatado, o que pode explicar sua seletividade para esta enzima.

Foi possível fazer uma relação estrutura-atividade, inclusive comparando com estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa. De uma maneira geral, verificou-se que os compostos mais ativos apresentaram grupos hidrofóbicos na porção derivada da tiossemicarbazida e substituintes polares na porção derivada dos aldeídos.

Este trabalho está em fase de submissão (Apêndice VI). Pretende-se continuar avaliando a cinética das tiossemicarbazonas e realizando ensaios adicionais. Além disso, outras séries de tiossemicarbazonas já foram sintetizadas e logo deverão ser avaliadas quanto a sua ação inibitória de fosfatases.

CAPÍTULO 2

A existência de diferentes hipóteses possíveis para explicar a Doença de Alzheimer direciona o desenvolvimento de moléculas com ações múltiplas capazes de atuar de forma complementar. Nesse sentido, 17 tiossemicarbazonas (**35a-q**) foram analisados quanto à potência de inibição de AChE e à atividade antioxidante.

Todos os compostos apresentaram excelente atividade como inibidores de AChE, sendo mais ativo que o fármaco padrão. Foram realizados dois ensaios de atividade antioxidante: de eliminação de óxido nítrico (NO) e de eliminação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), os resultados mostraram uma boa atividade antioxidante.

Para a atividade antioxidante, os grupos volumosos dos compostos **35j** e **35p** (1-naftila e 5- (2-Cl-5-CF₃) -Ph-furan-2ila, respectivamente) parecem ser importantes para os ensaios realizados neste estudo. Em relação à atividade inibidora da AChE, o grupo nitro (NO₂) pareceu ser importante para uma maior taxa de inibição, fato que difere da atividade antioxidante.

O composto **35j** (grupo 1-naftila) mostrou ação múltipla, uma propriedade que o torna um potencial agente terapêutico para Doença de Alzheimer. Além disso, estudos quânticos mostraram que os valores de EHOMO eram um indicador melhor da atividade antioxidante do que os valores de ELUMO, enquanto o ELUMO era um indicador melhor da inibição de AChE.

Este trabalho foi publicado na revista JBCS (Apêndice VI). Além disso, pretende-se continuar avaliando outras tiossemicarbazonas.

CAPÍTULO 3

Neste capítulo foram planejadas amidas baseadas na estrutura da piperlongumina, isso porque há relatos na literatura que esta amida não afeta células normais primárias o que a torna potencial candidato a drogas seletivas. Com isso, foram sintetizadas e caracterizadas 9 amidas, das quais 8 são inéditas.

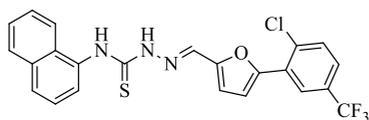
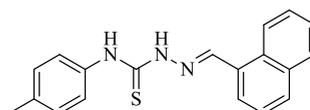
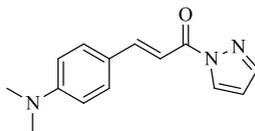
Os compostos obtidos foram investigados quanto a sua ação inibitória *in vitro* frente aos protozoários *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Para os ensaios realizados com o parasita da Doença de Chagas, os três compostos que obtiveram os melhores resultados foram **81b** (CI₅₀= 28,24 μM), **83a** (CI₅₀= 74,21 μM mL⁻¹) e **82b** (CI₅₀= 109,94 μM). Para os ensaios com o *L. amazonensis*, obteve-se três compostos com valores

de CI_{50} na faixa de 40-60 μM , **81a** (CI_{50} = 42,97 μM), **81b** (CI_{50} = 47,24 μM) e **82b** (CI_{50} = 57,66 μM).

O composto mais potente e seletivo encontrado neste estudo foi a amida **81b** para ambas as doenças protozoárias aqui estudadas. De uma maneira geral, pode-se dizer que o substituinte 4- $N(CH_3)_2$ -Ph na parte derivada do ácido carboxílico parece ser importante para a atividade tripanocida e leishmanicida, porém esta relação não foi efetiva analisando todos os compostos.

Para o composto mais ativo estão sendo realizados outros ensaios, como a formação de nanoemulsão com a realização dos mesmos testes parasitários, com a finalização destes trabalhos em parceria almeja-se a primeira publicação referente a este trabalho. Depois, pretende-se continuar realizando testes de toxicidade e outros ensaios.

Compostos mais ativos desta tese

**34p****35j****81b**

16 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Imming, P. **Chapter 2 - Medicinal Chemistry: Definitions and Objectives, Drug Activity Phases, Drug Classification Systems A2 - Wermuth, Camille Georges**, in *The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition)*. 2008, Academic Press: New York. p. 63-72.
2. IUPAC. **Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry (IUPAC Recommendations 1998)**. 2017 Acesso em 31 dez. 2017; Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html>.
3. Lima, L.M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, 2007. 30: p. 1456-1468.
4. Viegas Jr, C.; Bolzani, V.d.S.; Barreiro, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, 2006. 29: p. 326-337.
5. Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. **Química medicinal : as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. 2015, Porto Alegre: Artmed.
6. Suíça, *The Pharmaceutical Industry and Global Health: Facts and Figures 2017*, IFPMA, Editor. 2017.
7. **Guia 2017: Saúde se faz com ética e inovação**. Acesso em 31 dez. 2017; Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/guia/guia-2017/dados-do-setor>.
8. Montanari, C.A. **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**. 2011, São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.
9. Wermuth, C.G. **The practice of medicinal chemistry**. 2008 Acesso em 31 dez. 2017; Disponível em: <http://0-www.sciencedirect.com.fama.us.es/science/book/9780123741943>.
10. Patani, G.A.; LaVoie, E.J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. **Chemical Reviews**, 1996. 96(8): p. 3147-3176.
11. Brasil, *Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006*, ANVISA, Editor., Diário Oficial da União: Brasília.
12. WHO. **Dementia**. Acesso em 31 dez. 2017; Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>.
13. WHO. **Tuberculosis**. Acesso em 06 jan. 2018; Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.

14. Koul, A., et al. Cloning and Characterization of Secretory Tyrosine Phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol.**, 2000. 182: p. 5425.
15. Cole, S.T., et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, 1998. 393(6685): p. 537-544.
16. Koul, A., et al. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. **Nature Rev. Microbiol.**, 2004. 2: p. 189.
17. Bach, H., et al. *Mycobacterium tuberculosis* Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. **Cell Host & Microbe**, 2008. 3(5): p. 316-322.
18. Mascarello, A., et al. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2010. 18(11): p. 3783-3789.
19. Chiaradia, L.D., et al. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.**, 2008. 18: p. 6227.
20. Chiaradia, L.D., et al. Synthesis, Biological Evaluation, And Molecular Modeling of Chalcone Derivatives As Potent Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatases (PtpA and PtpB). **Journal of Medicinal Chemistry**, 2012. 55(1): p. 390-402.
21. Oliveira, K.N., et al. Sulfonyl-hydrazone derivatives as potent inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase B (PtpB). **MedChemComm**, 2011. 2: p. 500.
22. Mascarello, A., et al. Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase B (PtpB) Inhibitors from Natural Products. **PLOS ONE**, 2013. 8(10): p. e77081.
23. Thanh, N.D., et al. Synthesis and evaluation of in vivo antioxidant, in vitro antibacterial, MRSA and antifungal activity of novel substituted isatin N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -d-glucopyranosyl)thiosemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016. 123: p. 532-543.
24. Soares, M.A., et al. N4-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cells, structure–activity relationship studies and investigation on the mechanism of

- action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2012. 20(11): p. 3396-3409.
25. Sebastian, L., et al. N-methylisatin-beta-thiosemicarbazone derivative (SCH 16) is an inhibitor of Japanese encephalitis virus infection in vitro and in vivo. **Virology Journal**, 2008. 5: p. 64-64.
26. de Aquino, T.M., et al. Synthesis, anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones and 2-[(phenylmethylene)hydrazono]-4-oxo-3-phenyl-5-thiazolidineacetic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2008. 16(1): p. 446-456.
27. Adams, M., et al. Cyclopalladated organosilane-tethered thiosemicarbazones: novel strategies for improving antiplasmodial activity. **Dalton Transactions**, 2016. 45(13): p. 5514-5520.
28. Finch, R.A., et al. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. **Biochemical Pharmacology**, 2000. 59(8): p. 983-991.
29. Schwarz, S., et al. Converting maslinic acid into an effective inhibitor of acylcholinesterases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2015. 103(Supplement C): p. 438-445.
30. Paun, G., et al. Inhibitory potential of some Romanian medicinal plants against enzymes linked to neurodegenerative diseases and their antioxidant activity. **Pharmacognosy Magazine**, 2015. 11(42): p. 110-116.
31. Bezerra da Silva, C., et al. Effect of Donepezil, Tacrine, Galantamine and Rivastigmine on Acetylcholinesterase Inhibition in *Dugesia tigrina*. **Molecules**, 2016. 21(1): p. 53.
32. Markesbery, W.R.; Lovell, M.A. Damage to lipids, proteins, dna, and rna in mild cognitive impairment. **Archives of Neurology**, 2007. 64(7): p. 954-956.
33. Lovell, M.A., et al. Organoselenium (Sel-Plex diet) decreases amyloid burden and RNA and DNA oxidative damage in APP/PS1 mice. **Free Radical Biology and Medicine**, 2009. 46(11): p. 1527-1533.
34. Christen, Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 2000. 71(2): p. 621s-629s.

35. Canto, R.F.S., et al. Design, synthesis and evaluation of selenodihydropyrimidinones as potential multi-targeted therapeutics for Alzheimer's disease. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 2014. 12(21): p. 3470-3477.
36. Geldenhuys, W.J., et al. The emergence of designed multiple ligands for neurodegenerative disorders. **Progress in Neurobiology**, 2011. 94(4): p. 347-359.
37. Nguyen, D.T.; Le, T.H.; Bui, T.T.T. Antioxidant activities of thiosemicarbazones from substituted benzaldehydes and N-(tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)thiosemicarbazide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2013. 60(Supplement C): p. 199-207.
38. Ranade, D.S., et al. Thiosemicarbazone modification of 3-acetyl coumarin inhibits A β peptide aggregation and protect against A β -induced cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016. 121(Supplement C): p. 803-809.
39. Vieira, R.P., et al. Partial conversion of thioamide into nitrile in a copper(II) complex of 2,6-diacetylpyridine bis(thiosemicarbazone), a drug prototype for Alzheimer's disease. **Acta Crystallographica Section C**, 2015. 71(6): p. 430-434.
40. Barcelos, R.P., et al. Isatin-3-N4-benzilthiosemicarbazone, a non-toxic thiosemicarbazone derivative, protects and reactivates rat and human cholinesterases inhibited by methamidophos in vitro and in silico. **Toxicology in Vitro**, 2012. 26(6): p. 1030-1039.
41. Coura, J.R.; Viñas, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, 2010. 465: p. S6.
42. Oryan, A.; Akbari, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2016. 9(10): p. 925-932.
43. Konkle, M.E., et al. Indomethacin Amides as a Novel Molecular Scaffold for Targeting Trypanosoma cruzi Sterol 14 α -Demethylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2009. 52(9): p. 2846-2853.
44. Álvarez, G., et al. Identification of a New Amide-Containing Thiazole as a Drug Candidate for Treatment of Chagas' Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2015. 59(3): p. 1398-1404.
45. Brasil, P.F., et al. Antiproliferative and ultrastructural effects of phenethylamine derivatives on promastigotes and amastigotes of

- Leishmania (Leishmania) infantum chagasi. **Parasitology International**, 2017. 66(2): p. 47-55.
46. Suryawanshi, S.N., et al. Chemotherapy of leishmaniasis. Part XI: Synthesis and bioevaluation of novel isoxazole containing heteroretinoid and its amide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2012. 22(21): p. 6559-6562.
47. Raj, L., et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**, 2011. 475: p. 231.
48. Souza, M.V.N.d. ;Vasconcelos, T.R.A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, 2005. 28: p. 678-682.
49. Nikaïdo, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual review of biochemistry**, 2009. 78: p. 119-146.
50. Guirado, E.; Schlesinger, L.S.; Kaplan, G. Macrophages in tuberculosis: friend or foe. **Seminars in Immunopathology**, 2013. 35(5): p. 563-583.
51. Mueller, P.; Pieters, J. Modulation of macrophage antimicrobial mechanisms by pathogenic mycobacteria. **Immunobiology**, 2006. 211(6): p. 549-556.
52. Chao, J., et al. Protein kinase and phosphatase signaling in Mycobacterium tuberculosis physiology and pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 2010. 1804(3): p. 620-627.
53. Wong, D.; Chao, J.D.; Av-Gay, Y. Mycobacterium tuberculosis-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development. **Trends in Microbiology**, 2013. 21(2): p. 100-109.
54. Koul, A., et al. Cloning and Characterization of Secretory Tyrosine Phosphatases of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Bacteriology**, 2000. 182(19): p. 5425-5432.
55. Koul, A., et al. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. **Nat Rev Micro**, 2004. 2(3): p. 189-202.
56. Grundner, C.;Ng, H.;Alber, T. Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase PtpB Structure Reveals a Diverged Fold and a Buried Active Site. **Structure**, 2005. 13(11): p. 1625.

57. Beresford, N., et al. A virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity. **Biochem. J.**, 2007. 406: p. 13.
58. Manger, M., et al. Discovery of *Mycobacterium Tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase A (MptpA) Inhibitors Based on Natural Products and a Fragment-Based Approach. **ChemBioChem**, 2005. 6(10): p. 1749-1753.
59. Grundner, C., et al. Structural Basis for Selective Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase PtpB. **Structure**, 2007. 15(4): p. 499-509.
60. Chen, L., et al. Identification and Characterization of Novel Inhibitors of mPTPB, an Essential Virulent Phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, 2010. 1(7): p. 355-359.
61. Dutta, N.K., et al. Mycobacterial Protein Tyrosine Phosphatases A and B Inhibitors Augment the Bactericidal Activity of the Standard Anti-tuberculosis Regimen. **ACS Infectious Diseases**, 2016. 2(3): p. 231-239.
62. Panico, R.; Powell, W.H.; Richer, J.C. **IUPAC- Nomenclature of Organic Compounds**. 1993 [Acesso Date].
63. Tenório, R.P., et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, 2005. 28: p. 1030-1037.
64. Lobana, Tarlok S., et al. Thiosemicarbazone Derivatives of Copper(I): Influence of Substituents (R) at N1 Atom of [(C5H4N)HC2=N3N2H-C1(=S)N1HR] in the Formation of 1D or 2D Networks of Copper(I) Complexes. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, 2010. 636(15): p. 2698-2703.
65. Casas, J.S.;García-Tasende, M.S.;Sordo, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. **Coordination Chemistry Reviews**, 2000. 209(1): p. 197-261.
66. Chattopadhyay, D., et al. Structure of 1-(3,4-dichlorophenyl)-4-methylthiosemicarbazide. **Acta Crystallographica Section C**, 1989. 45(2): p. 314-317.
67. Bharti, N., et al. New palladium(II) complexes of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones: synthesis, spectral studies and In

- vitro anti-Amoebic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2003. 11(13): p. 2923-2929.
68. Antonini, I., et al. Elucidation of the structure of the antineoplastic agents, 2-formylpyridine and 1-formylisoquinoline thiosemicarbazones. **Journal of Medicinal Chemistry**, 1977. 20(3): p. 447-449.
69. Palenik, G.J.;Rendle, D.F.;Carter, W.S. The crystal and molecular structures of thiosemicarbazones; an antitumor agent 5-hydroxy-2-formylpyridine thiosemicarbazone sesquihydrate and the inactive acetone thiosemicarbazone. **Acta Crystallographica Section B**, 1974. 30(10): p. 2390-2395.
70. Benbrook, D.M., et al. Biologically Active Heteroarotinoids Exhibiting Anticancer Activity and Decreased Toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, 1997. 40(22): p. 3567-3583.
71. Du, X., et al. Synthesis and Structure–Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2002. 45(13): p. 2695-2707.
72. Rodriguez, E.C.; Marcaurelle, L.A.; Bertozzi, C.R. Aminoxy-, Hydrazide-, and Thiosemicarbazide-Functionalized Saccharides: Versatile Reagents for Glycoconjugate Synthesis. **The Journal of Organic Chemistry**, 1998. 63(21): p. 7134-7135.
73. Bharti, N., et al. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2002. 12(23): p. 3475-3478.
74. Ashton, W.T., et al. Nonpeptide angiotensin II antagonists derived from 4H-1,2,4-triazoles and 3H-imidazo[1,2-b][1,2,4]triazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, 1993. 36(5): p. 591-609.
75. Siatra-Papastaikoudi, T., et al. Synthesis of new alkylaminoalkyl thiosemicarbazones of 3-acetylindole and their effect on DNA synthesis and cell proliferation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 1995. 30(2): p. 107-114.
76. Pandeya, S.N., et al. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derived from isatin derivatives and N-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1999. 9(1): p. 25-31.

77. Holla, B.S., et al. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2003. 38(3): p. 313-318.
78. Somogyi, L. Reactions of flavonoid thiosemicarbazones under acetylating conditions. **Tetrahedron**, 1991. 47(44): p. 9305-9316.
79. Lemke, T.L., et al. Synthesis of 5,6-dihydro-8(7H)-quinolinone thiosemicarbazones as potential antitumor agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, 1977. 20(10): p. 1351-1354.
80. Lessa, J.A., et al. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: Cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2010. 45(12): p. 5671-5677.
81. Teitz, Y., et al. Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin- β 4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin- β -4':4'-diallylthiosemicarbazone. **Antiviral Research**, 1994. 24(4): p. 305-314.
82. de Oliveira, J.F., et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2015. 104: p. 148-156.
83. Feun, L., et al. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 2002. 50(3): p. 223-229.
84. Serda, M., et al. Synthesis and characterization of quinoline-based thiosemicarbazones and correlation of cellular iron-binding efficacy to anti-tumor efficacy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2012. 22(17): p. 5527-5531.
85. Kasuga, N.C., et al. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2003. 96(2): p. 298-310.
86. de Melos, J.L.R., et al. Novel 3,4-methylenedioxyde-6-X-benzaldehyde-thiosemicarbazones: Synthesis and antileishmanial effects against *Leishmania amazonensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2015. 103: p. 409-417.
87. Espíndola, J.W.P., et al. Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl

thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2015. 101: p. 818-835.

88. Liu, M.C.; Lin, T.C.; Sartorelli, A.C. Synthesis and antitumor activity of amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. **Journal of Medicinal Chemistry**, 1992. 35(20): p. 3672-3677.

89. Khalilian, M.H.; Mirzaei, S.; Taherpour, A. Comprehensive insights into the structure and coordination behavior of thiosemicarbazone ligands: a computational assessment of the E-Z interconversion mechanism during coordination. **New Journal of Chemistry**, 2015. 39(12): p. 9313-9324.

90. Dong, H., et al. Molecular docking and QSAR analyses of aromatic heterocycle thiosemicarbazone analogues for finding novel tyrosinase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, 2017. 75: p. 106-117.

91. Song, S., et al. Study on the design, synthesis and structure-activity relationships of new thiosemicarbazone compounds as tyrosinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. 139: p. 815-825.

92. Soares, M.A., et al. Thiosemicarbazones as inhibitors of tyrosinase enzyme. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2017. 27(15): p. 3546-3550.

93. Hameed, A., et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking of N-phenyl thiosemicarbazones as urease inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, 2015. 61: p. 51-57.

94. Serra, S., et al. Thiosemicarbazide, a fragment with promising indolamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibition properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2014. 82: p. 96-105.

95. Ausubel, F.M. ;Brent, R. **Short protocols in molecular biology. Ed. by Frederick M. Ausubel, Roger Brent etc. 2. ed.** 1992, New York - Chichester etc.: Wiley.

96. Brandão, T.A.S., et al. Impaired Acid Catalysis by Mutation of a Protein Loop Hinge Residue in a YopH Mutant Revealed by Crystal Structures. **Journal of the American Chemical Society**, 2009. 131(2): p. 778-786.

97. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 1976. 72(1-2): p. 248.
98. Li, Z.; Xiang, Y.; Tong, A. Ratiometric chemosensor for fluorescent determination of Zn²⁺ in aqueous ethanol. **Analytica Chimica Acta**, 2008. 619(1): p. 75-80.
99. Chough, Y.S.; Kim, W.H. Synthetic Studies on Chemotherapeutic Agents. III. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Thiosemicarbazone Derivatives. **YAKHAK HOEJI**, 1971. 15(4): p. 93-97.
100. Fromm, E. Über Harnstoffabkömmlinge. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, 1926. 447(1): p. 259-313.
101. Srinivasan, V.R.; Ramachander, G. Studies on 4-arylthiosemicarbazones & related products. I. Synthesis of some 4-arylthiosemicarbazones as potential antitubercular agents. **J Sci Ind Res (C)**, 1961. 20C: p. 351-3.
102. Tišler, M. 4-substituierte Thiosemicarbazide als Reagentien zur Charakterisierung von Aldehyden und Ketonen. **Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie**, 1956. 150(5): p. 345-347.
103. Chaaban, I., et al. **Hydroquinones, benzoquinones and quinol dimethyl ethers substituted at the 2-position by a heterocyclic ring: Synthesis and evaluation for potential antimicrobial activity**. Vol. 20. 2006. 107-114.
104. Bonizzoni, M., et al. (Benzylideneamino)thioureas – Chromogenic Interactions with Anions and N-H Deprotonation. **European Journal of Organic Chemistry**, 2006. 2006(16): p. 3567-3574.
105. Priyanka, S., et al. Synthesis and Screening of Substituted Thiosemicarbazone Derivatives: An Approach towards Novel Anticonvulsant Search. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, 2011. 11(1): p. 60-65.
106. Solomons, T.W.G.; Fryhle, C.B.; Oliveira, M.L.G.d. **Química Orgânica T. W. Graham Solomons, Craig B. Fryhle; tradução de Maria Lúcia Godinho de Oliveira**. 2009, Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos.
107. Hernández, W., et al. Synthesis, Characterization, and In Vitro Cytotoxic Activities of Benzaldehyde Thiosemicarbazone Derivatives

and Their Palladium (II) and Platinum (II) Complexes against Various Human Tumor Cell Lines. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 2008. 2008: p. 690952.

108. Holland, J.P., et al. Functionalized Bis(thiosemicarbazonato) Complexes of Zinc and Copper: Synthetic Platforms Toward Site-Specific Radiopharmaceuticals. **Inorganic Chemistry**, 2007. 46(2): p. 465-485.

109. Lin, L.-R., et al. A New “Switch-On” Fluorescence Chemosensor for Anions via Modulation of Intraligand and Metal-to-Ligand Charge-Transfer Emission in a Pd(II)-based Receptor. **Journal of Fluorescence**, 2011. 21(4): p. 1319-1324.

110. Rawls, K.A., et al. Fragment-based discovery of selective inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2009. 19: p. 6851.

111. Barr, A., J. Protein tyrosine phosphatases as drug targets: strategies and challenges of inhibitor development. **Future Medicinal Chemistry**, 2010. 2(10): p. 1563-1576.

112. Bottini, A., et al. High-Throughput Screening (HTS) by NMR Guided Identification of Novel Agents Targeting the Protein Docking Domain of YopH. **Chemmedchem**, 2016. 11(8): p. 919-927.

113. Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Principles of biochemistry**. 2008, New York: W.H. Freeman and Company.

114. Copeland, R.A. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery : a guide for medicinal chemists and pharmacologists**. 2006, New York: Wiley-Interscience.

115. **Alzheimer's disease**. Acesso em 16 jan. 2018; Disponível em: https://www.alzheimers.org.uk/info/20007/types_of_dementia/2/alzheimers_disease.

116. **Alzheimer's Disease Fact Sheet**. Acesso em 16 jan. 2018; Disponível em: <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet>

117. Falco, A.D., et al. DOENÇA DE ALZHEIMER: HIPÓTESES ETIOLÓGICAS E PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO. **Química Nova**, 2016. 39: p. 63-80.

118. Li, Y., et al. Inhibition of Acetylcholinesterase (AChE): A Potential Therapeutic Target to Treat Alzheimer's Disease. **Chemical Biology & Drug Design**, 2015. 86(4): p. 776-782.
119. Palanimuthu, D., et al. A novel class of thiosemicarbazones show multi-functional activity for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. 139: p. 612-632.
120. Engelhardt, E., et al. Tratamento da doença de Alzheimer: recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 2005. 63: p. 1104-1112.
121. Bano, T.;Kumar, N.;Dudhe, R. Free radical scavenging properties of pyrimidine derivatives. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, 2012. 2: p. 34-34.
122. Santos, M.H.d., et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, 2007. 30: p. 604-610.
123. Magina, M.A., et al. Antioxidant Activity of Three Species of *Eugenia* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, 2010. 29(3): p. 376-382.
124. Subhashree, G.R., et al. In vitro antioxidant, antiinflammatory and in silico molecular docking studies of thiosemicarbazones. **Journal of Molecular Structure**, 2017. 1145: p. 160-169.
125. Chandrashekararai, M., et al. Synthesis of Some New Pyrimidine-Azitinone Analogues and Their Antioxidant, In Vitro Antimicrobial, and Antitubercular Activities. **Journal of Chemistry**, 2014. 2014: p. 9.
126. Ruch, R.J.;Cheng, S.-j.;Klaunig, J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. **Carcinogenesis**, 1989. 10(6): p. 1003-1008.
127. Alam, M.N.;Bristi, N.J.;Rafiquzzaman, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2013. 21(2): p. 143-152.
128. Togo, T.;Katsuse, O.;Iseki, E. Nitric oxide pathways in Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias. **Neurological Research**, 2004. 26(5): p. 563-566.

129. Ramos, L.A.;Cavalheiro, C.C.S.;Cavalheiro, É.T.G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, 2006. 29: p. 1114-1120.
130. Sreejayan ;Rao, M.N.A. Nitric Oxide Scavenging by Curcuminoids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 1997. 49(1): p. 105-107.
131. Ellman, G.L., et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 1961. 7(2): p. 88-95.
132. Komersová, A.;Komers, K.;Čegan, A., *New Findings about Ellman's Method to Determine Cholinesterase Activity*, in *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2007. p. 150.
133. Ali-shtayeh, M.s., et al. **In-vitro screening of acetylcholinestrace inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease**. Vol. 4. 2014. 381-400.
134. Barboza, H.T.G., et al., *Teste de Inibição da Enzima Acetilcolinesterase de Compostos Organofosforados com Potencial Ação Fungicida na Cultura de Mamão (Carica papaya L.)*, P.e.A. Ministério da Agricultura, Editor. 2010, Embrapa Agroindústria de Alimentos: Rio de Janeiro.
135. Al-Majedy, Y., et al. Coumarins as Potential Antioxidant Agents Complemented with Suggested Mechanisms and Approved by Molecular Modeling Studies. **Molecules**, 2016. 21(2): p. 135.
136. Carey, F.A. **Advanced organic chemistry**. A, A. 2008, New York, NY: Springer.
137. WHO. **Neglected tropical diseases**. Acesso em 20 jan. 2018; Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.
138. Feasey, N., et al. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, 2010. 93(1): p. 179-200.
139. Coura, J.R. ;Dias, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2009. 104: p. 31-40.

140. WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Acesso em 16 jan. 2018; Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
141. Vinhaes, M.C.; Dias, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 2000. 16: p. S7-S12.
142. Coura, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2007. 102: p. 113-122.
143. Sanchez-Sancho, F.; Campillo, N.E.; Paez, J.A. Chagas Disease: Progress and New Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, 2010. 17(5): p. 423-452.
144. Kevin, M.B.; David, M.E. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? **Current Molecular Medicine**, 2008. 8(6): p. 510-518.
145. Coura, J.R.; Borges-Pereira, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2012. 45: p. 286-296.
146. Al-Kamel, M.A.N. Leishmaniasis and Malignancy: A Review and Perspective. **Clinical Skin Cancer**, 2017. 2(1): p. 54-58.
147. Pace, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, 2014. 69: p. S10-S18.
148. WHO. **Leishmaniasis**. Acesso em 19 jan. 2018; Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
149. Osorio y Fortéa, J., et al. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. **Immunological Reviews**, 2007. 219(1): p. 66-74.
150. Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, 2011. 9: p. 604.
151. Ameen, M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 2007. 8(16): p. 2689-2699.
152. Nordstrøm, L.U.; Vogt, H.; Madsen, R. Amide Synthesis from Alcohols and Amines by the Extrusion of Dihydrogen. **Journal of the American Chemical Society**, 2008. 130(52): p. 17672-17673.

153. Pattabiraman, V.R.; Bode, J.W. Rethinking amide bond synthesis. **Nature**, 2011. 480: p. 471.
154. Valeur, E.; Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, 2009. 38(2): p. 606-631.
155. Montalbetti, C.A.G.N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, 2005. 61(46): p. 10827-10852.
156. Ancizu, S., et al. Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1,4-di-N-oxidequinoxalin-2-yl)amide derivatives as hits for the development of neglected disease drugs. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 2009. 14(6): p. 2256-2272.
157. Papadopoulou, M.V., et al. Novel 3-Nitro-1H-1,2,4-triazole-Based Amides and Sulfonamides as Potential Antitrypanosomal Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2012. 55(11): p. 5554-5565.
158. Pirttimaa, M., et al. Abietane-Type Diterpenoid Amides with Highly Potent and Selective Activity against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Natural Products**, 2016. 79(2): p. 362-368.
159. Barea, C., et al. New Amide Derivatives of Quinoxaline 1,4-di-N-Oxide with Leishmanicidal and Antiplasmodial Activities. **Molecules**, 2013. 18(4): p. 4718.
160. Shankerrao, S.; Bodke, Y.D.; Mety, S.S. Synthesis, antioxidant, and antibacterial studies of phenolic esters and amides of 2-(1-benzofuran-2-yl) quinoline-4-carboxylic acid. **Medicinal Chemistry Research**, 2013. 22(3): p. 1163-1171.
161. Sieuwerts, A., et al. **The MTT tetrazolium salt assay scrutinized. How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival.** Vol. 33. 1995. 813-23.
162. TONINI, M.L., *Desenvolvimento de um teste colorimétrico para triagem da atividade leishmanicida de compostos utilizando Leishmania amazonensis expressando a enzima Beta-galactosidase*, Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. 2013, UFSC: Florianópolis. p. 119.
163. Schwende, H., et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Leukocyte Biology**, 1996. 59(4): p. 555-561.

164. Sehgal, D.; Vijay, I.K. A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation. **Analytical Biochemistry**, 1994. 218(1): p. 87-91.

165. Cai, G., et al. Circular dichroism exciton chirality method. New red-shifted chromophores for hydroxyl groups. **Journal of the American Chemical Society**, 1993. 115(16): p. 7192-7198.

166. Kayser, O.; Kiderlen, A.F. In vitro Leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. **Phytotherapy Research**, 2001. 15(2): p. 148-152.

**APÊNDICE I- Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das
tiosemicarbazonas.**

Figura 46. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) do composto **31**.

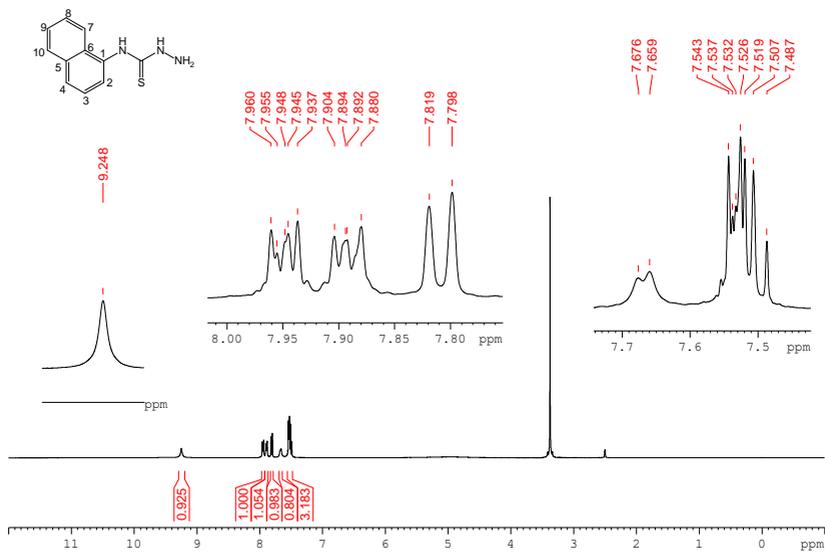


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) do composto **31**.

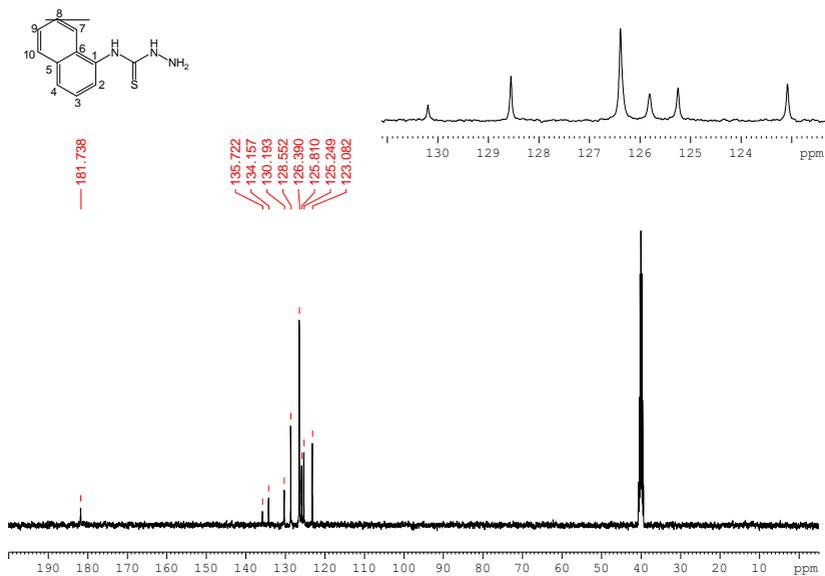


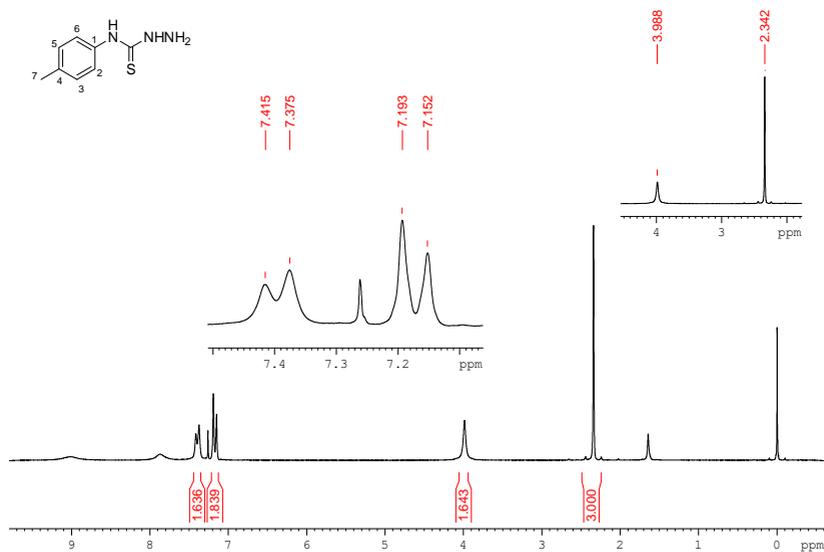
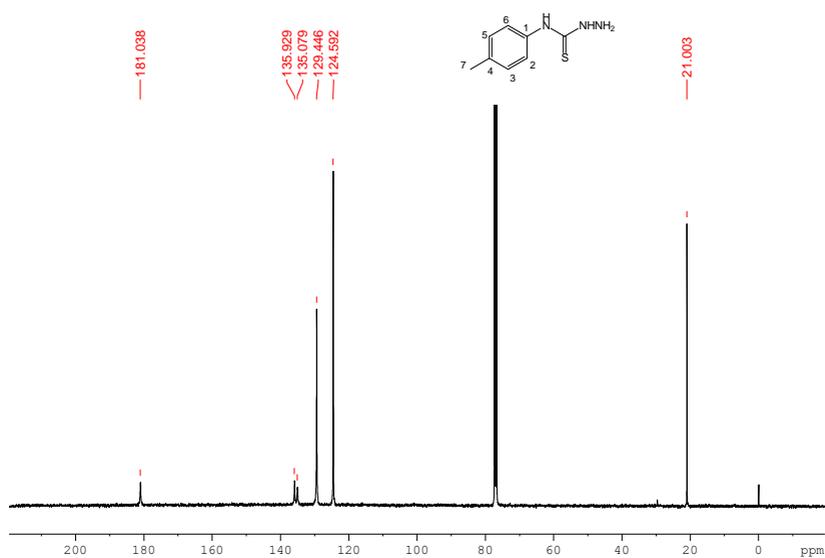
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **32**.**Figura 49.** Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **32**.

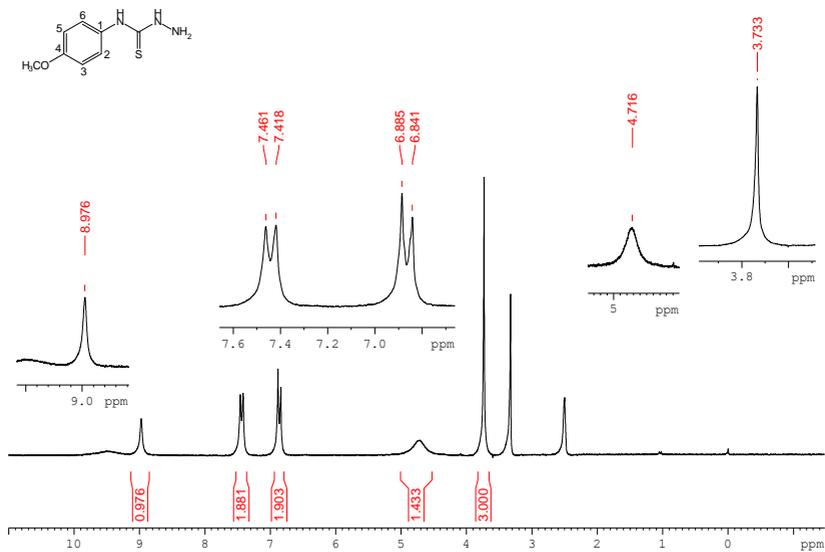
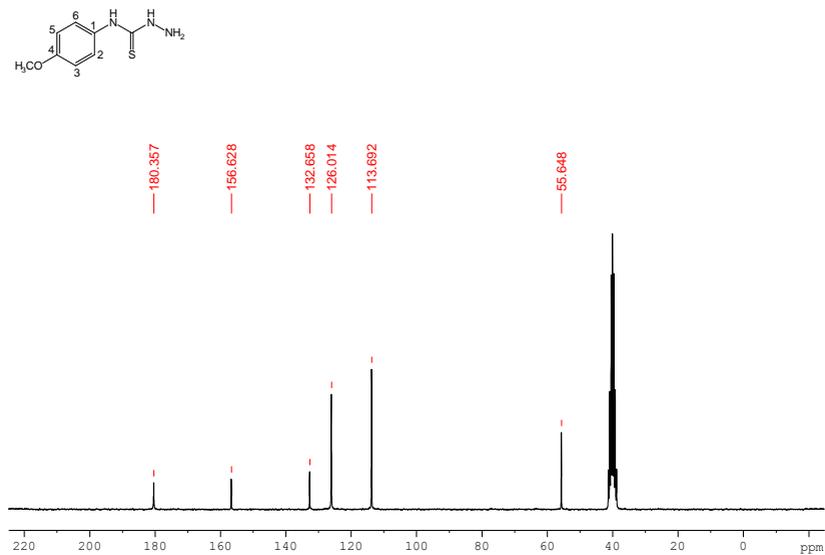
Figura 50. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto **33**.**Figura 51.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto **33**.

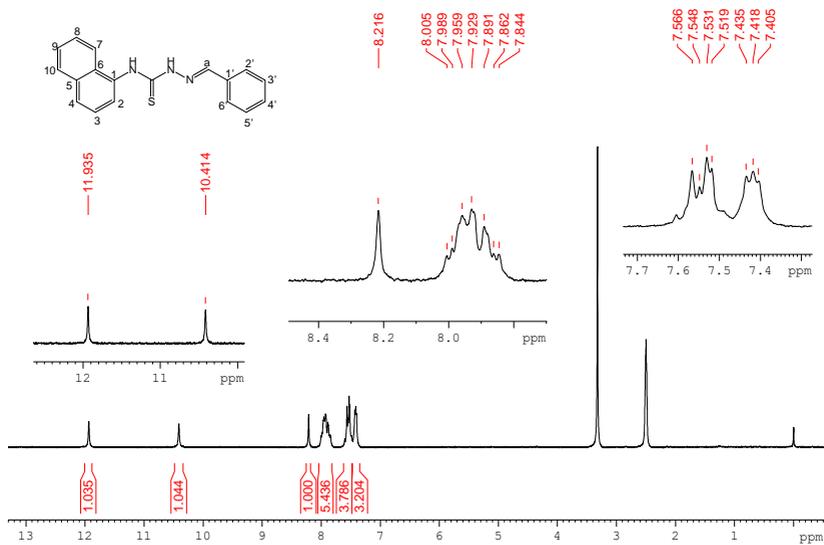
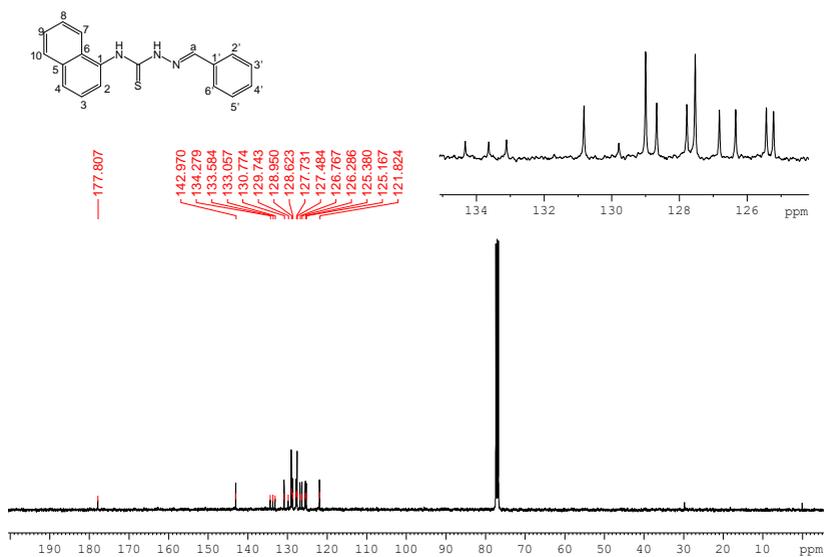
Figura 52. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto **34a**.**Figura 53.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **34a**.

Figura 54. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) do composto **34b**.

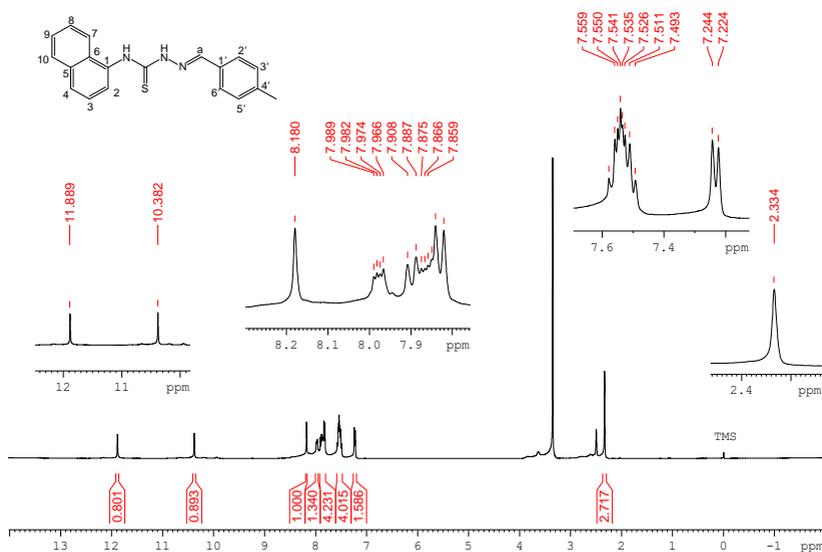


Figura 55. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **34b**.

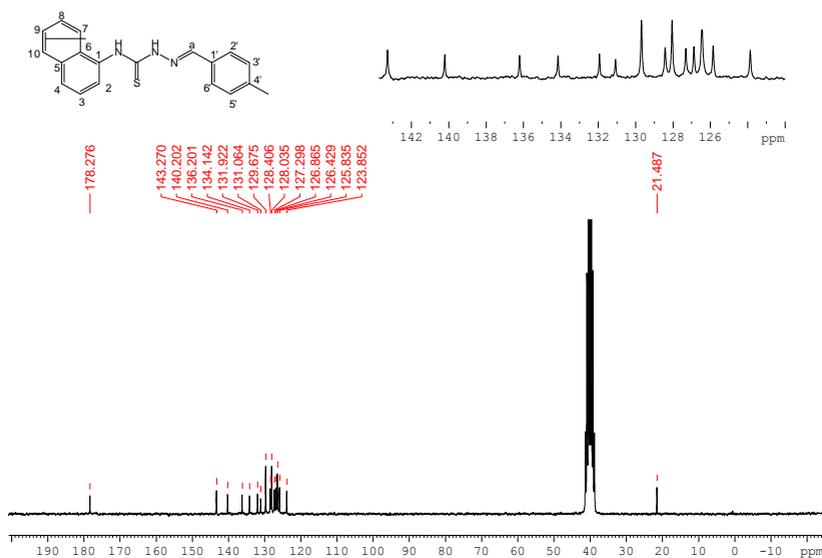


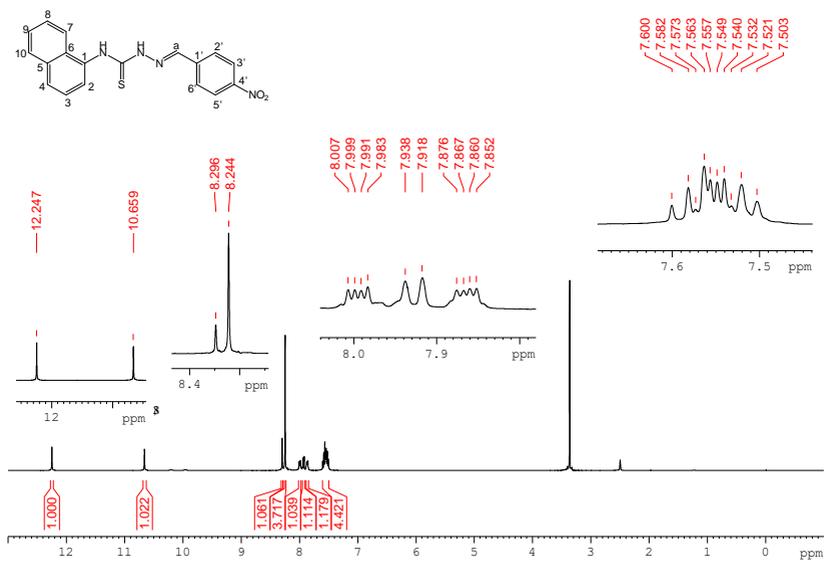
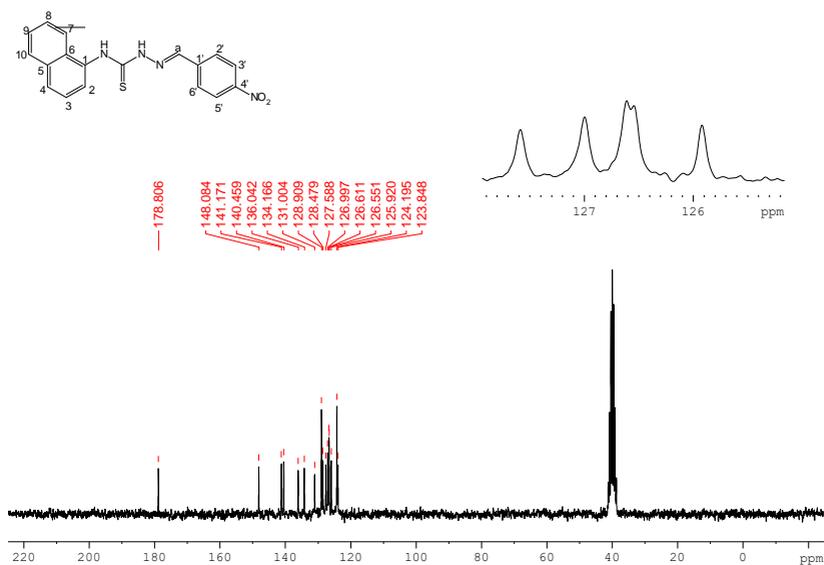
Figura 56. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **34c**.**Figura 57.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto **34c**.

Figura 58. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) do composto **34d**.

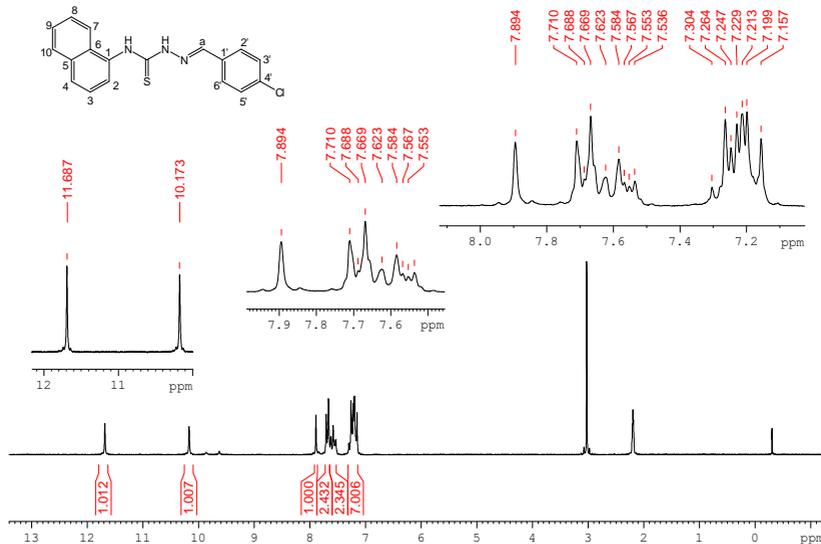


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **34d**.

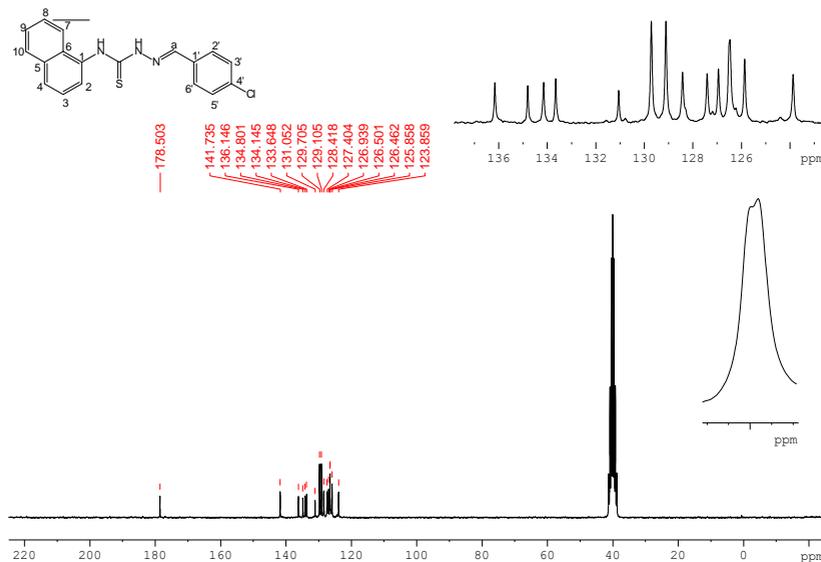


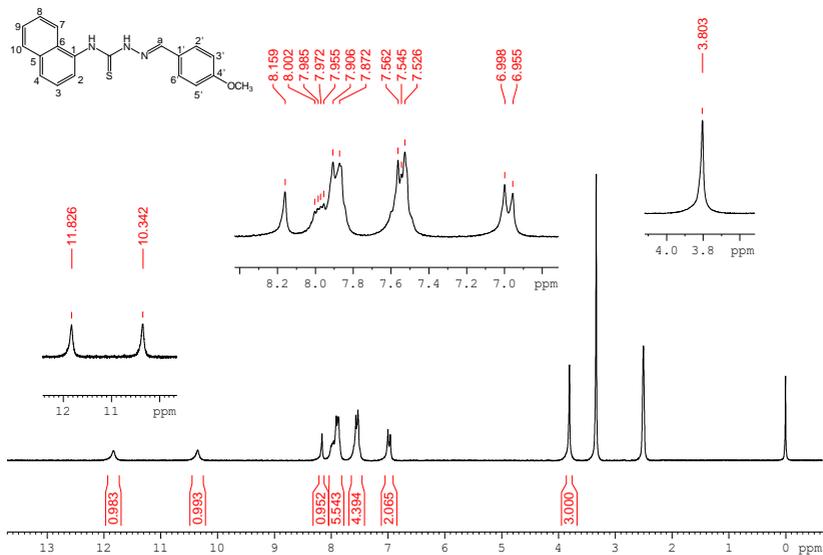
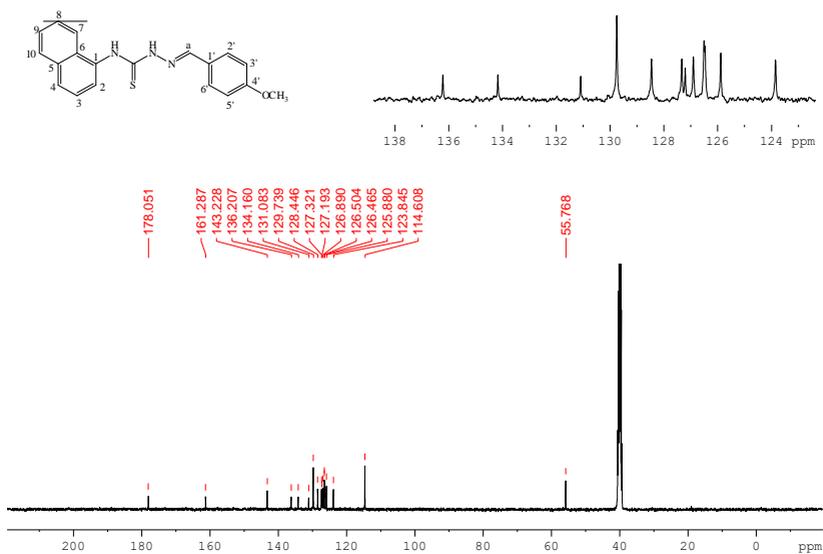
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto **34e**.**Figura 61.** Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto **34e**.

Figura 62. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto **34f**.

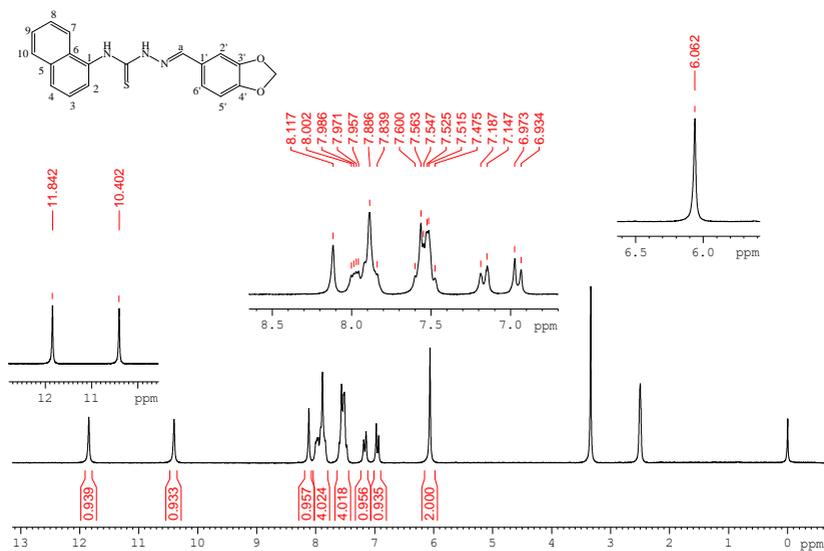


Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto **34f**.

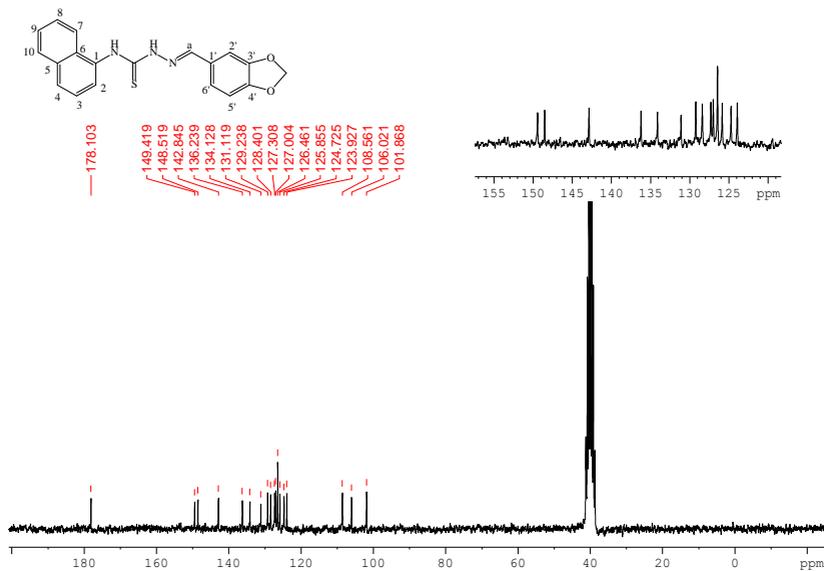


Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) do composto **34g**.

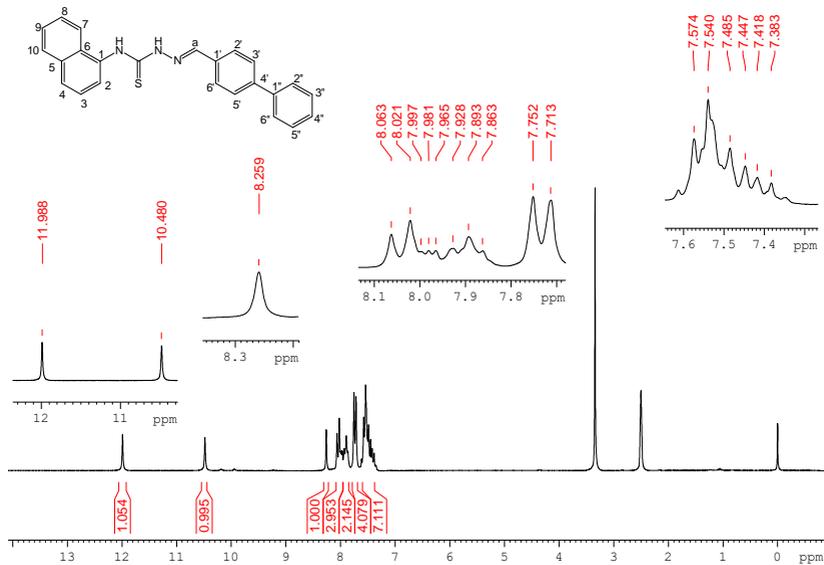


Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **34g**.

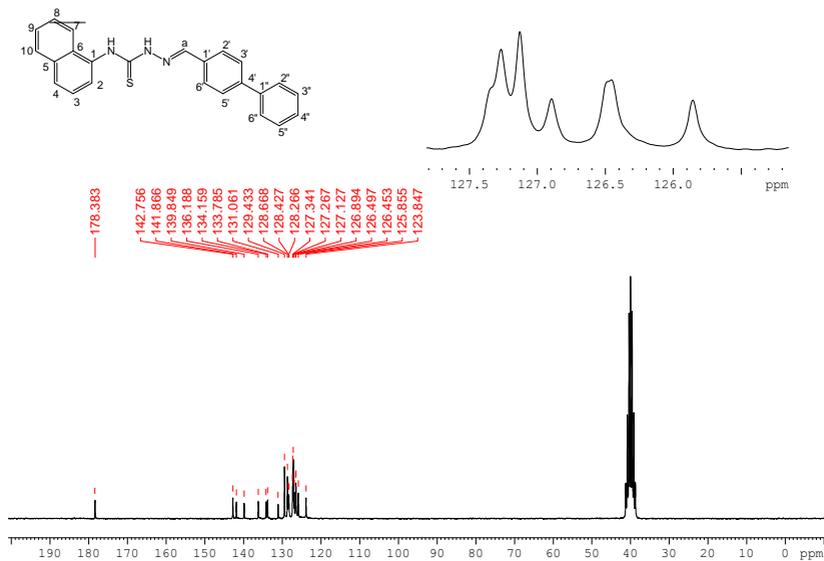


Figura 66. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, piridina- d_5) do composto **34h**.

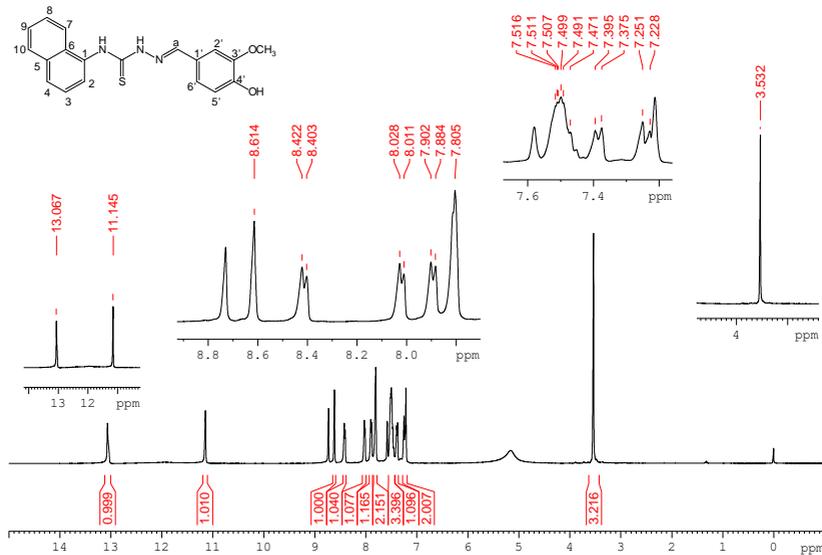


Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **34h**.

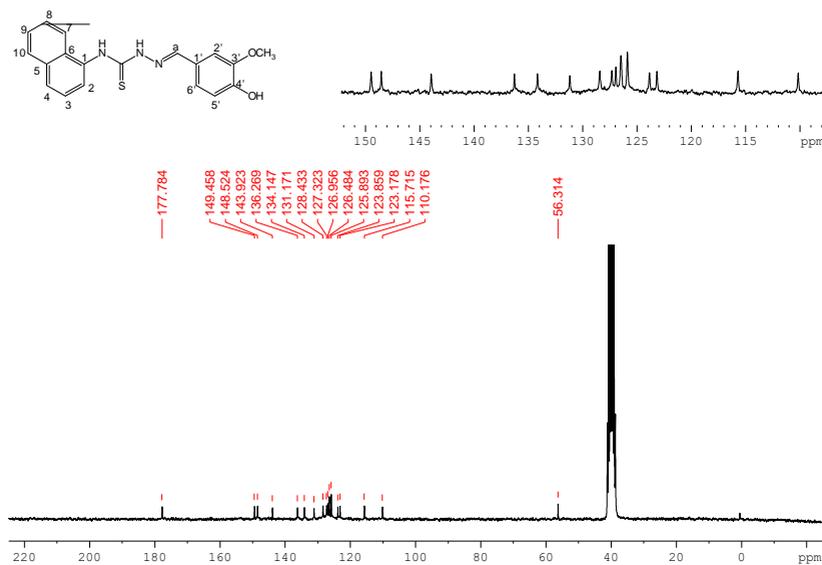


Figura 68. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **34i**.

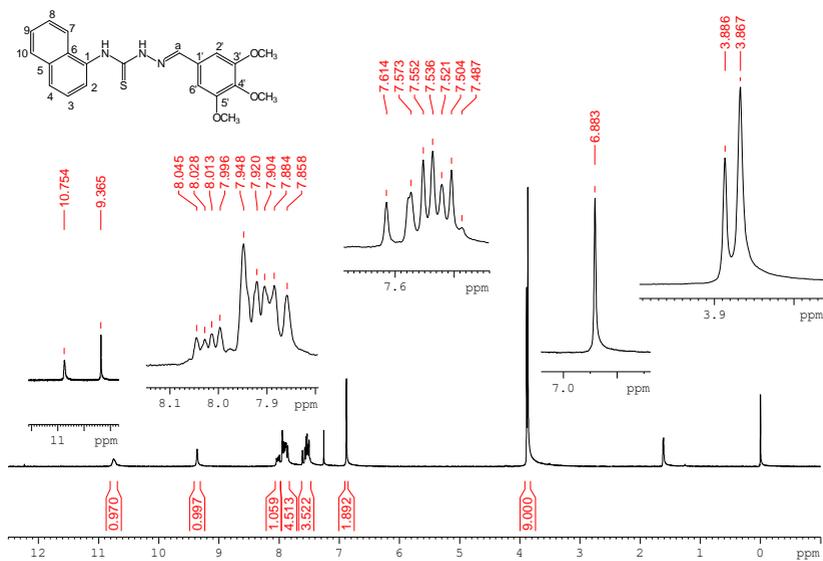


Figura 69. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **34i**.

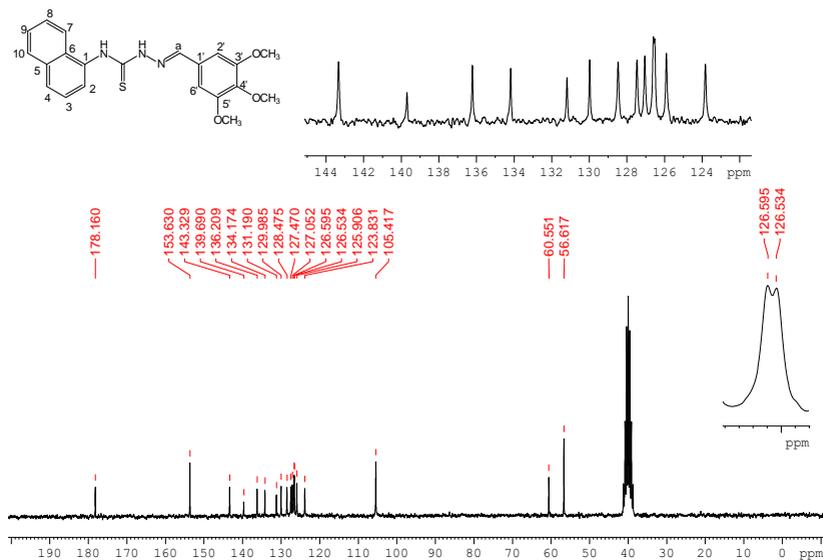


Figura 70. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto **34j**.

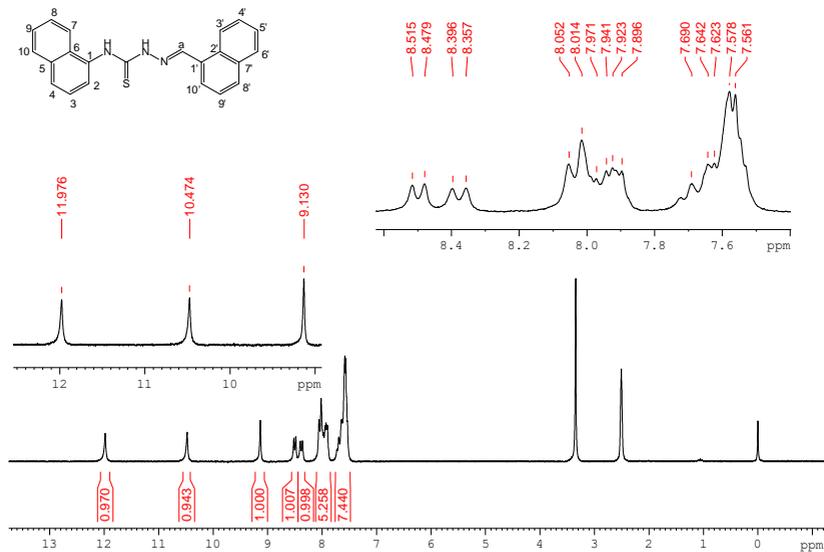


Figura 71. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto **34j**.

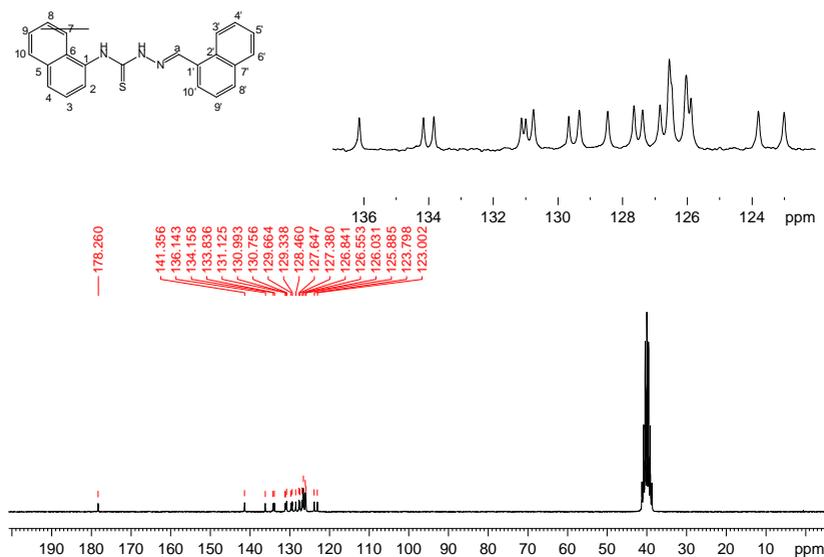


Figura 72. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **34k**.

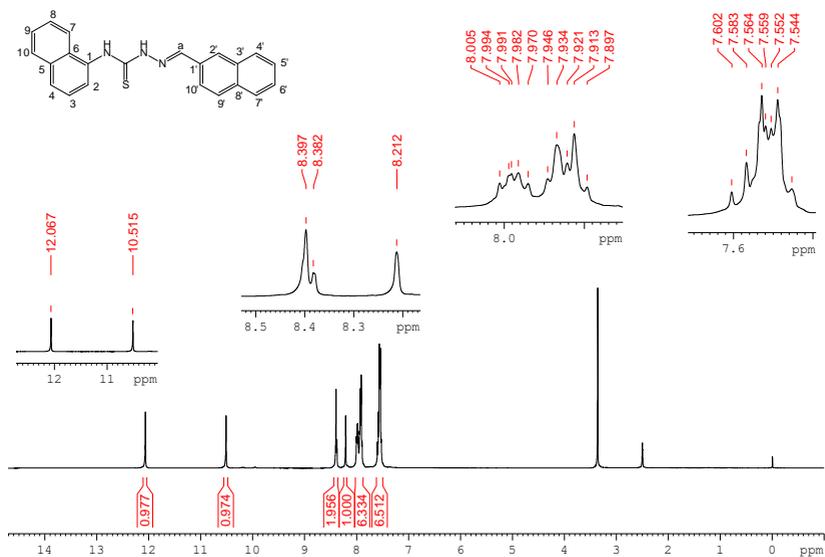


Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto **34k**.

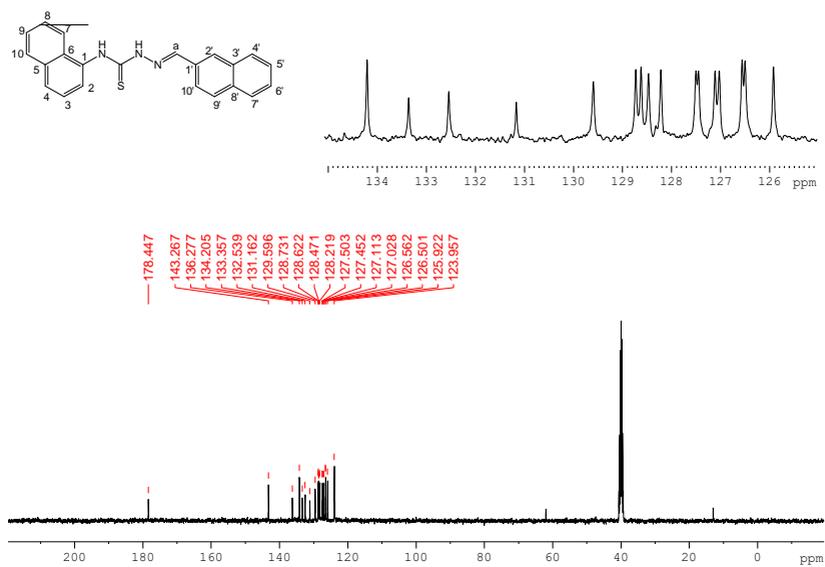


Figura 74. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) do composto **34I**.

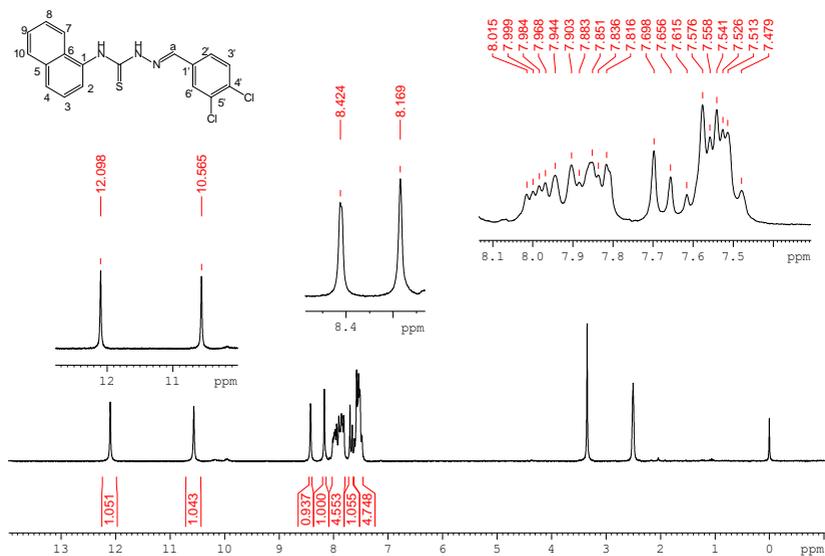


Figura 75. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **34I**.

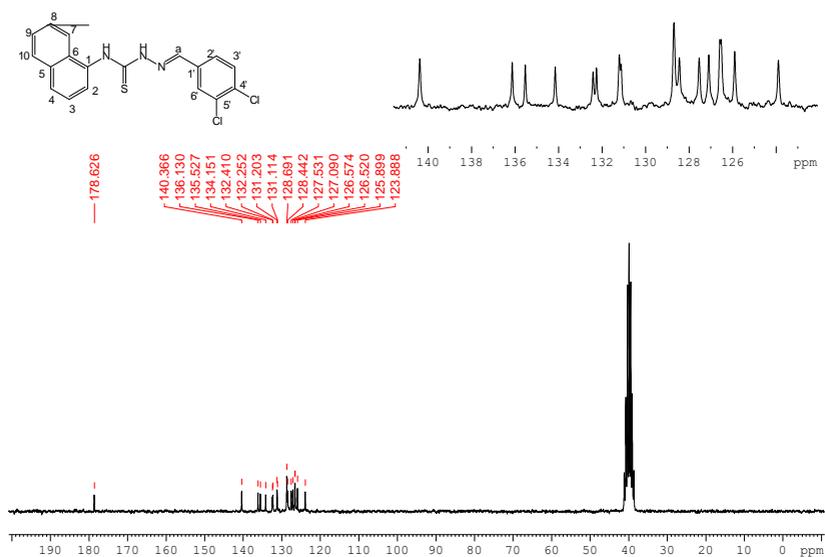


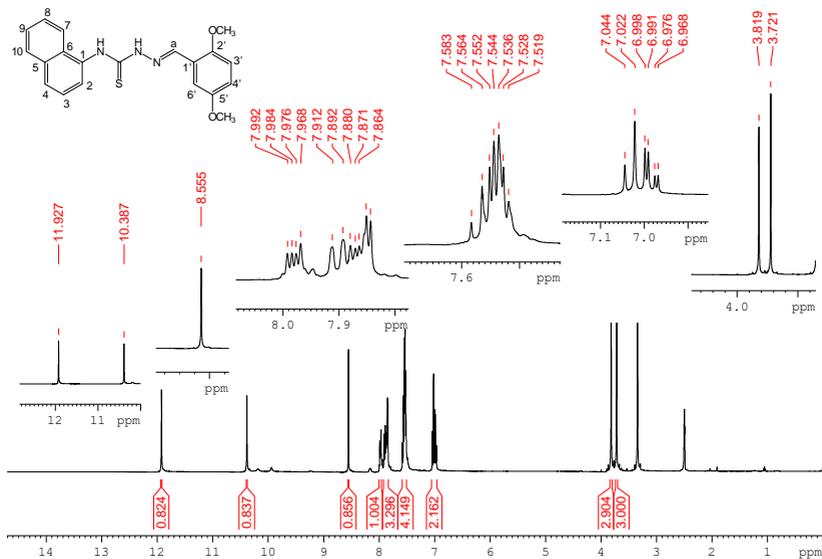
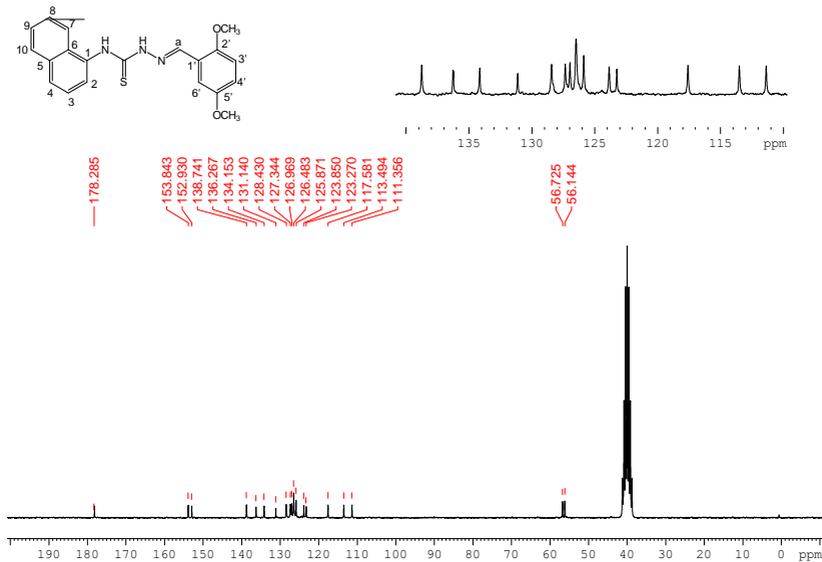
Figura 76. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) do composto **34m**.**Figura 77.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **34m**.

Figura 78. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) do composto **34n**.

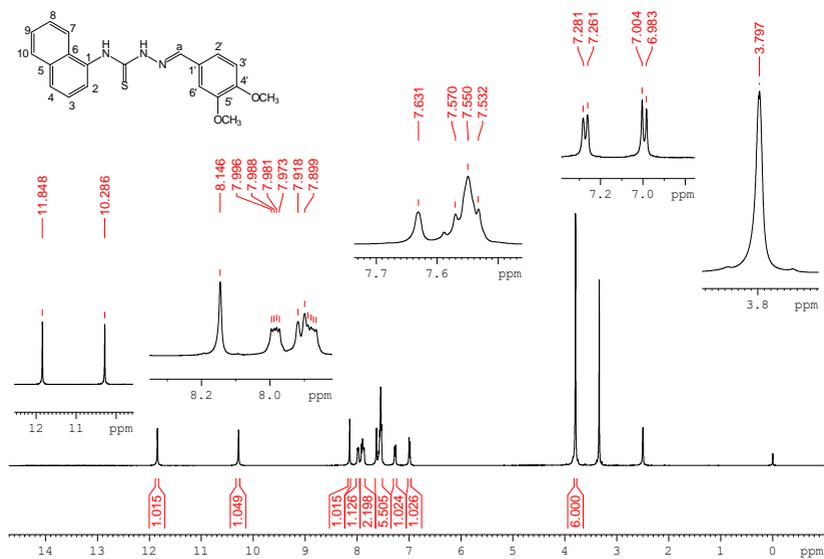


Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **34n**.

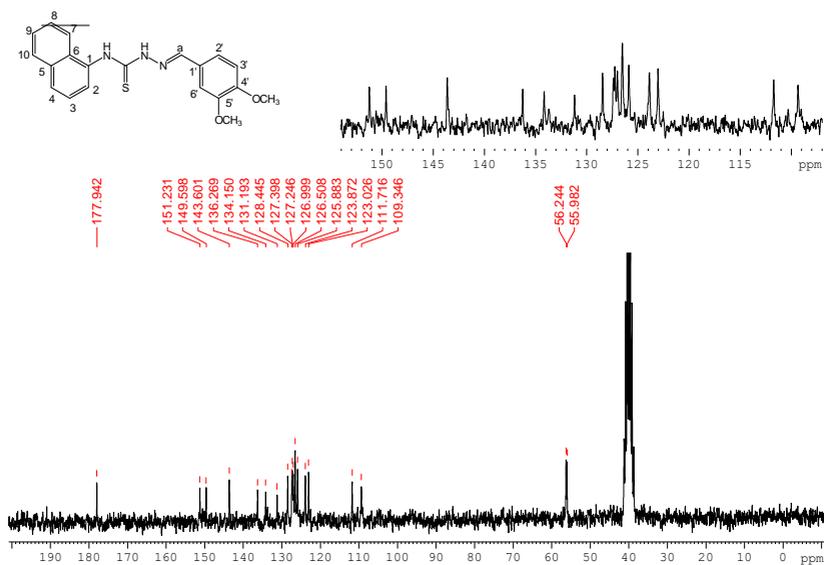


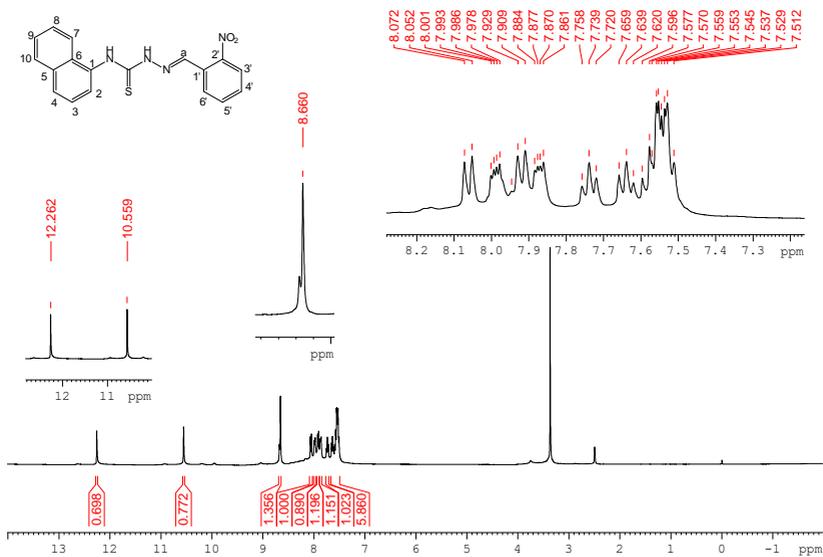
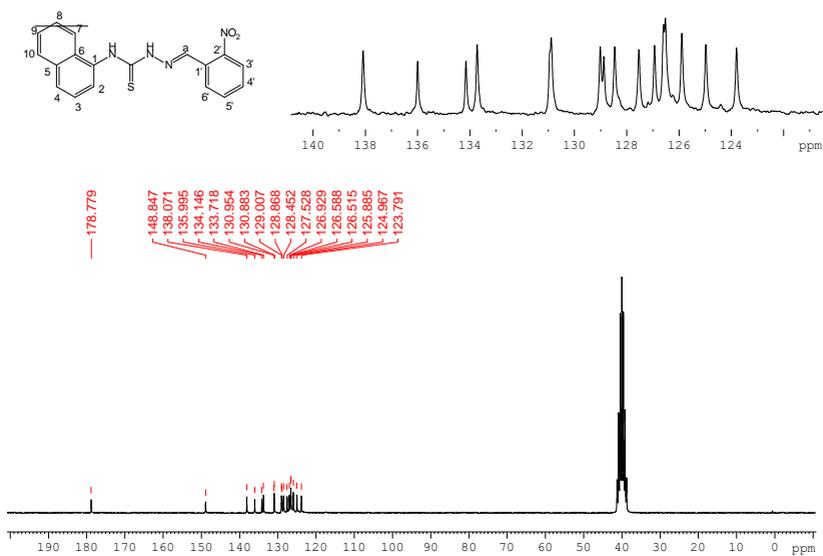
Figura 80. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **34o**.**Figura 81.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto **34o**.

Figura 82. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) do composto **34p**.

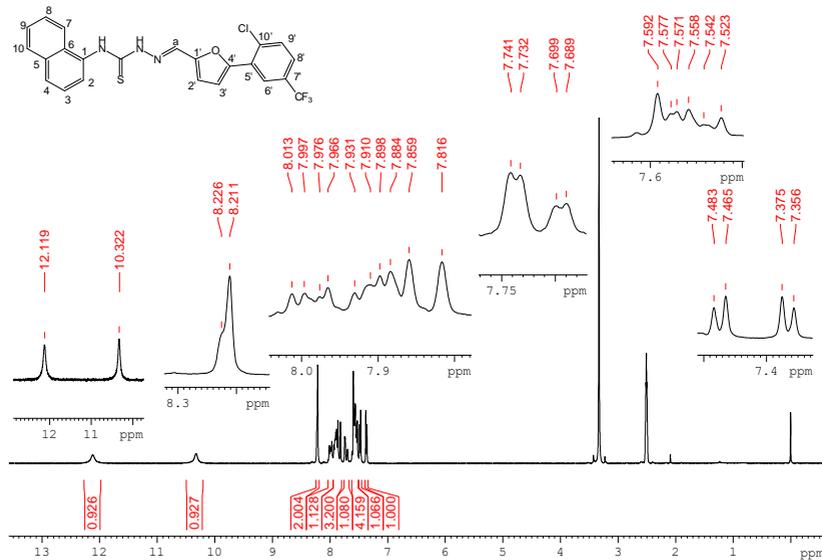


Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **34p**.

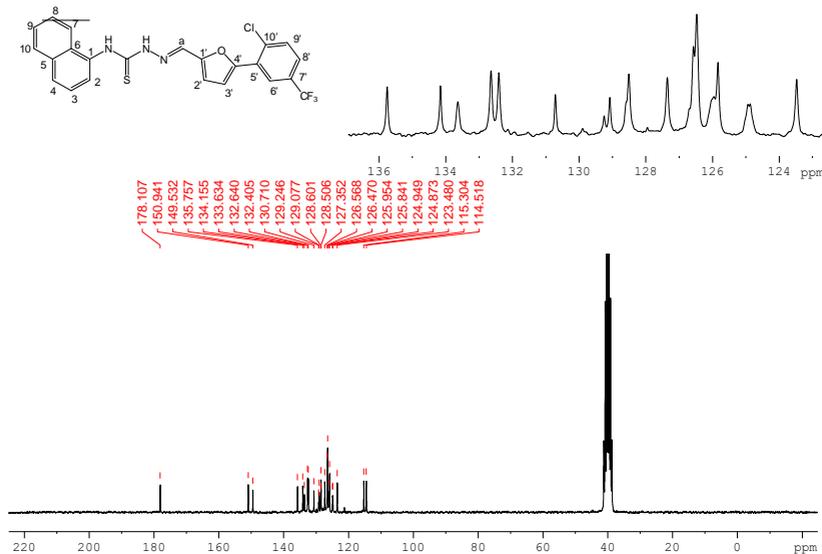


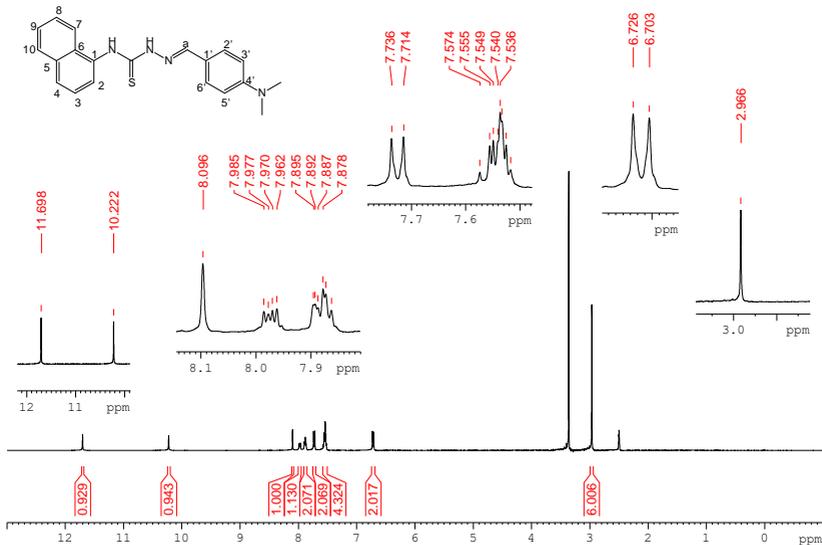
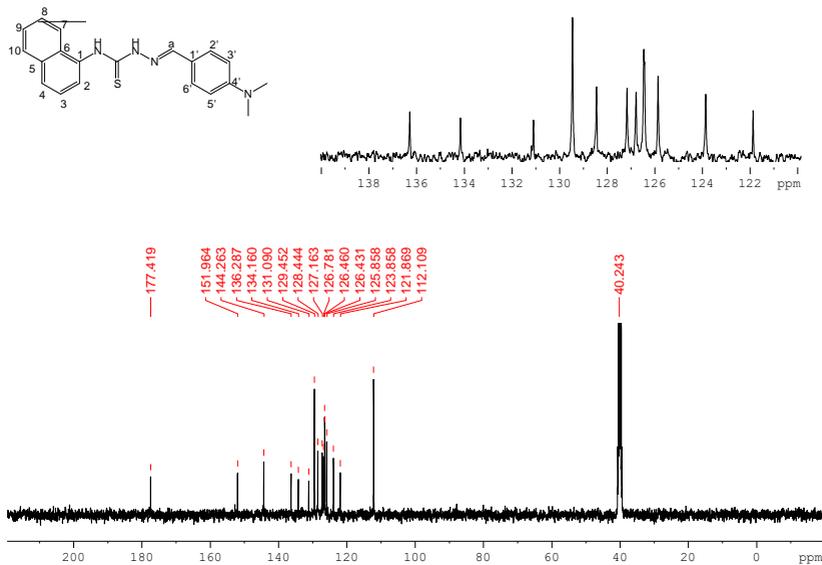
Figura 84. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) do composto **34q**.**Figura 85.** Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) do composto **34q**.

Figura 86. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35a**.

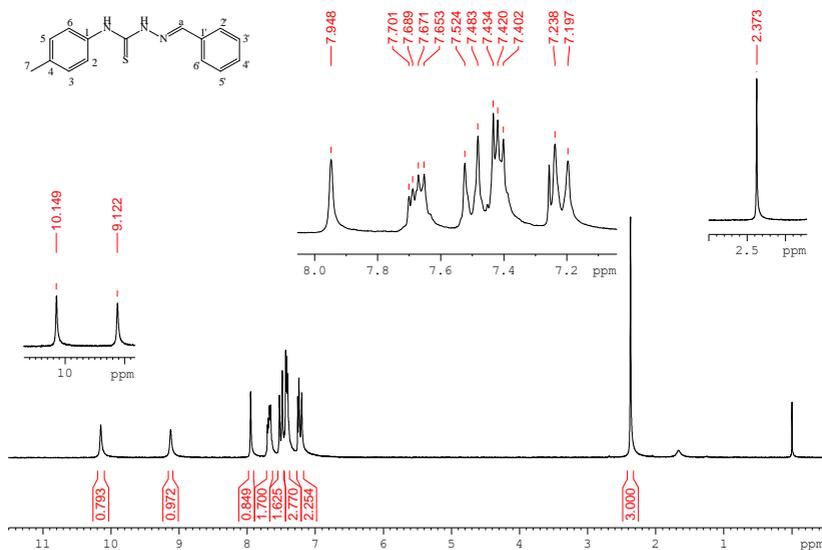


Figura 87. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35a**.

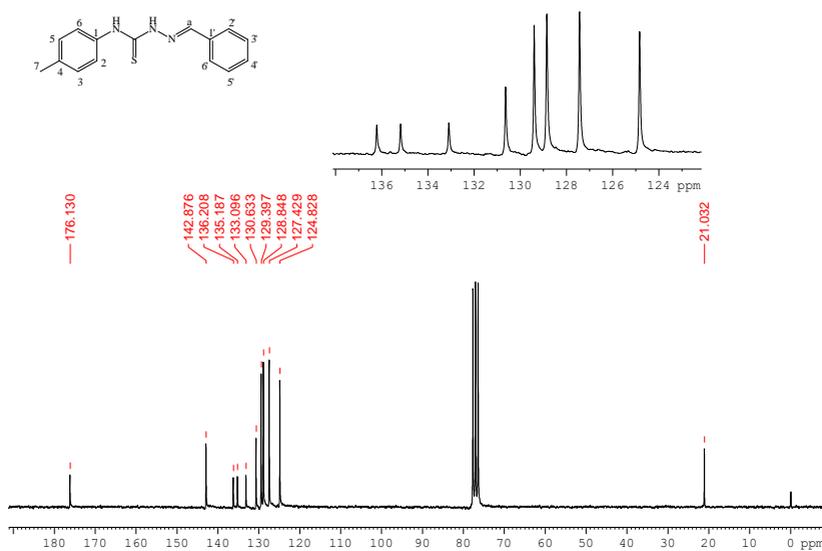


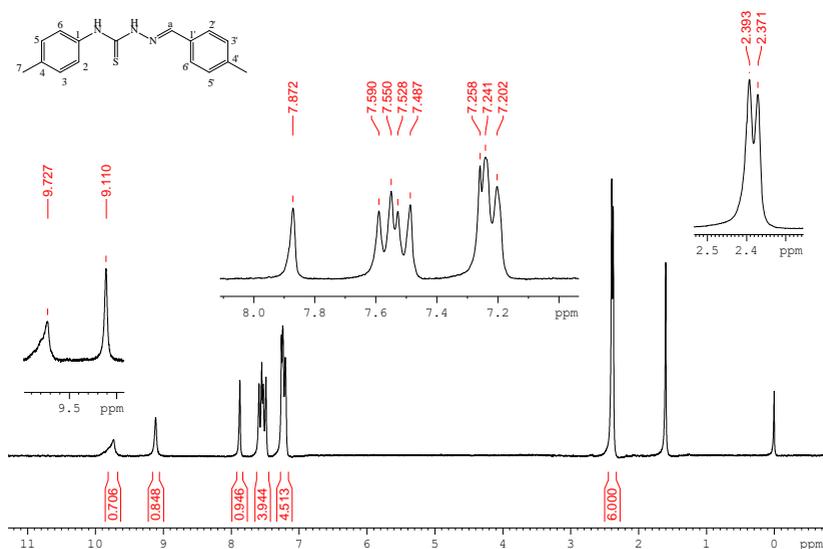
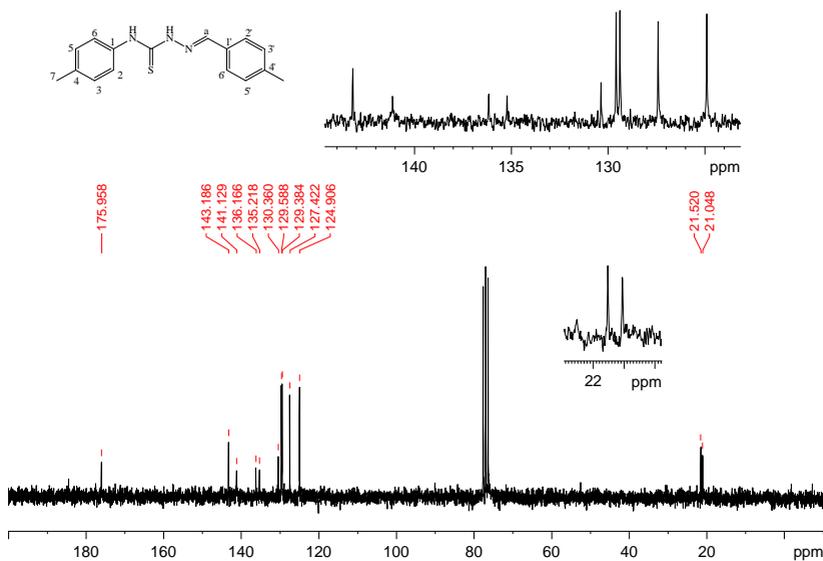
Figura 88. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35b**.**Figura 89.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35b**.

Figura 90. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35c**.

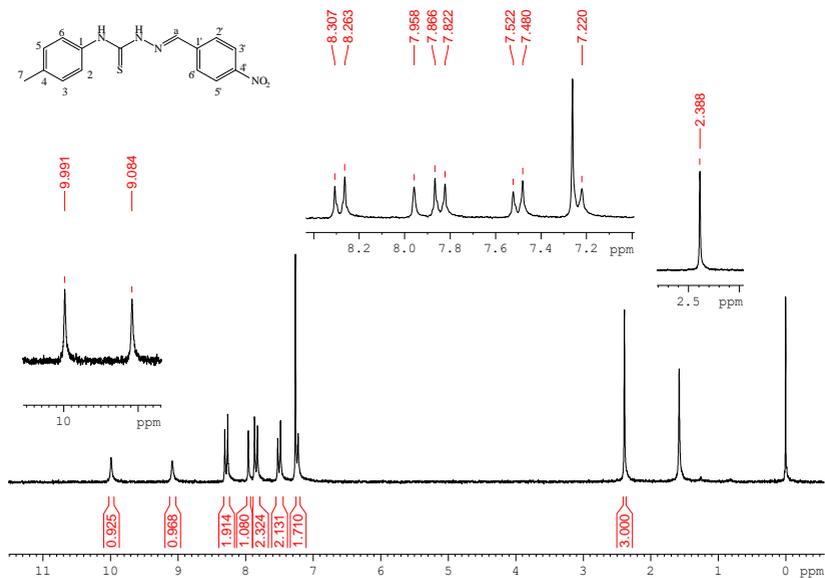


Figura 91. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **35c**.

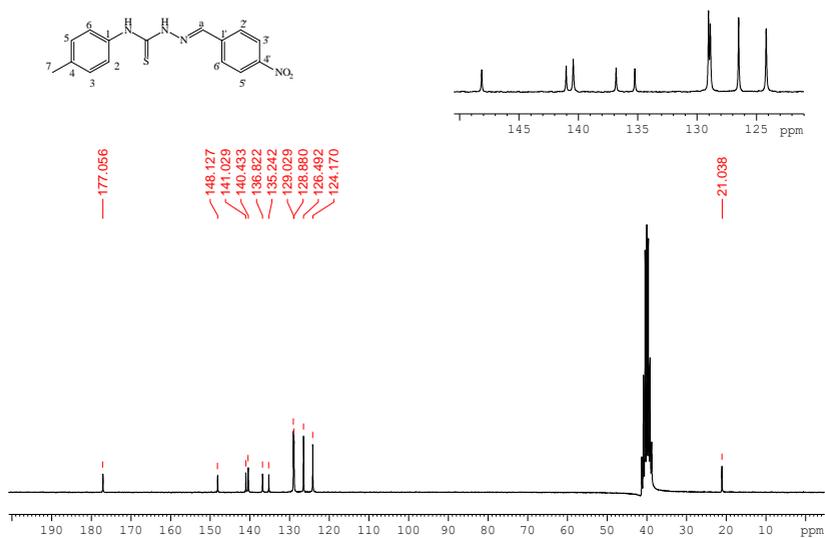


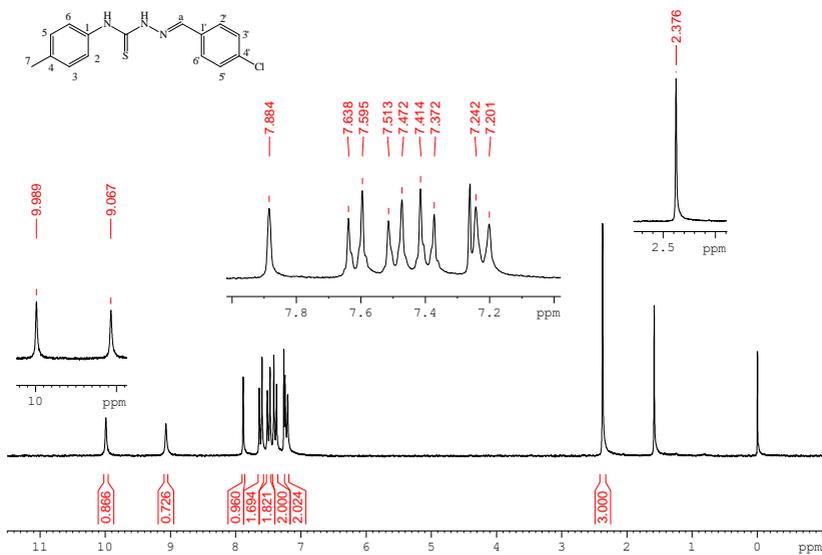
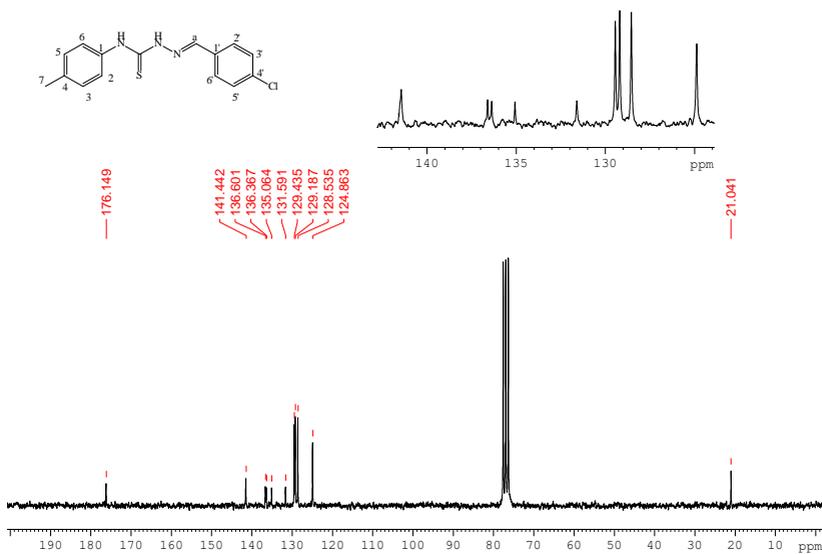
Figura 92. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35d**.**Figura 93.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35d**.

Figura 94. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35e**.

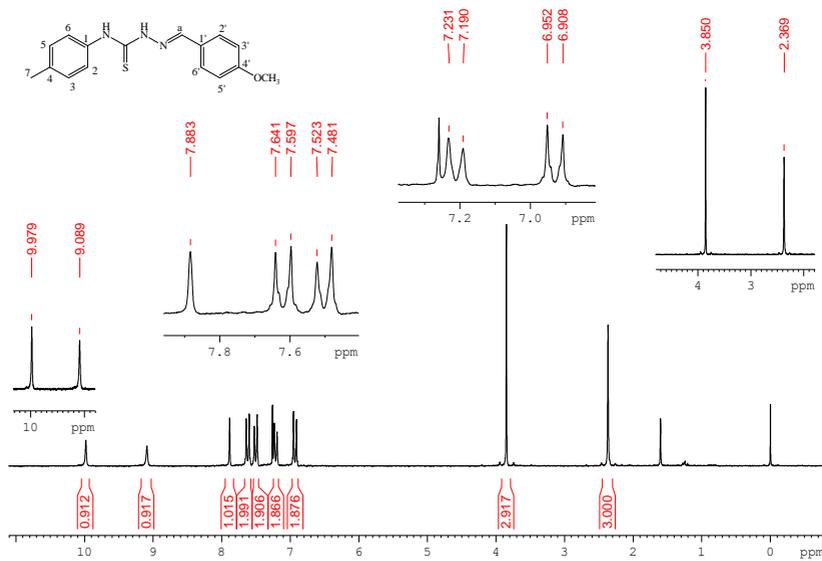


Figura 95. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35e**.

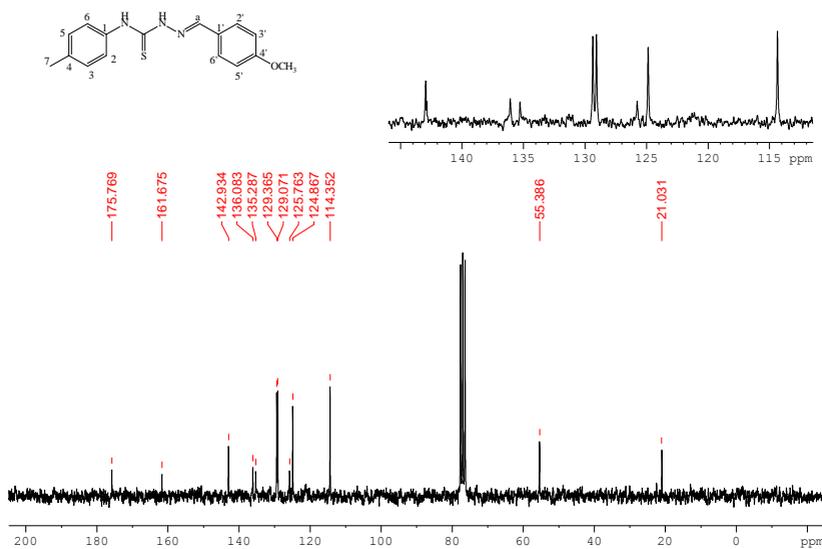


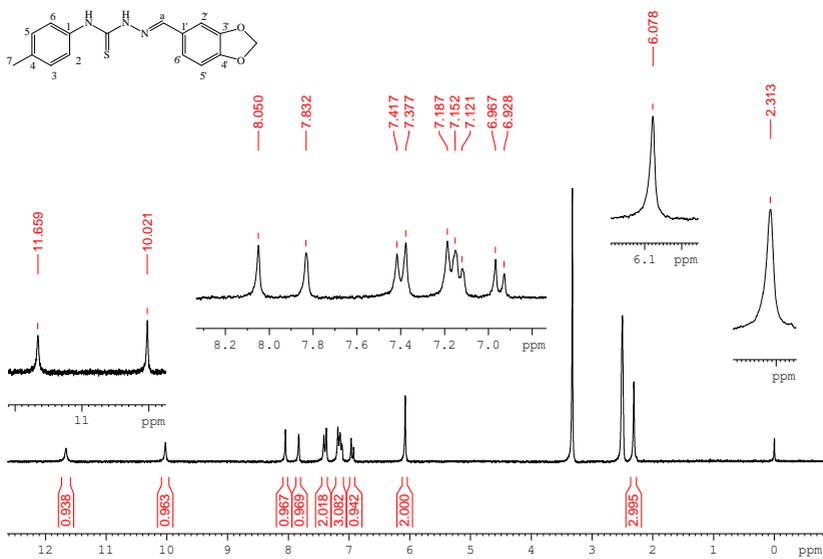
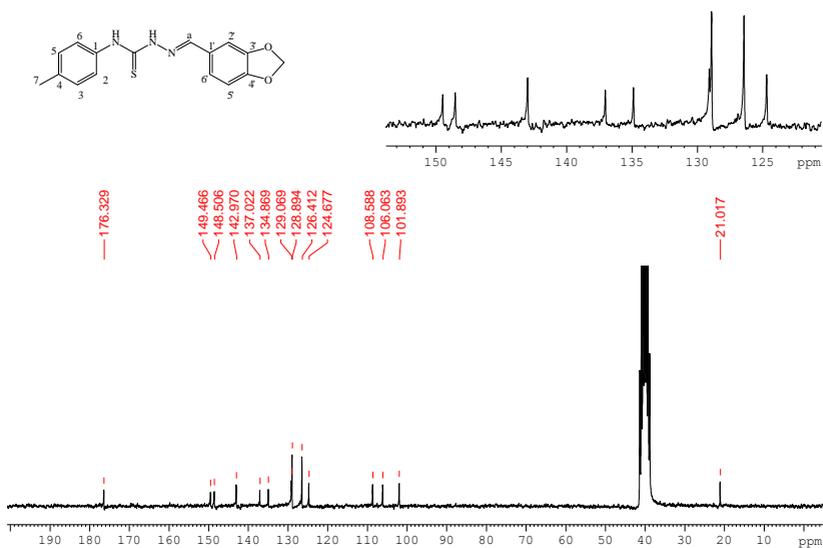
Figura 96. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto **35f**.**Figura 97.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto **35f**.

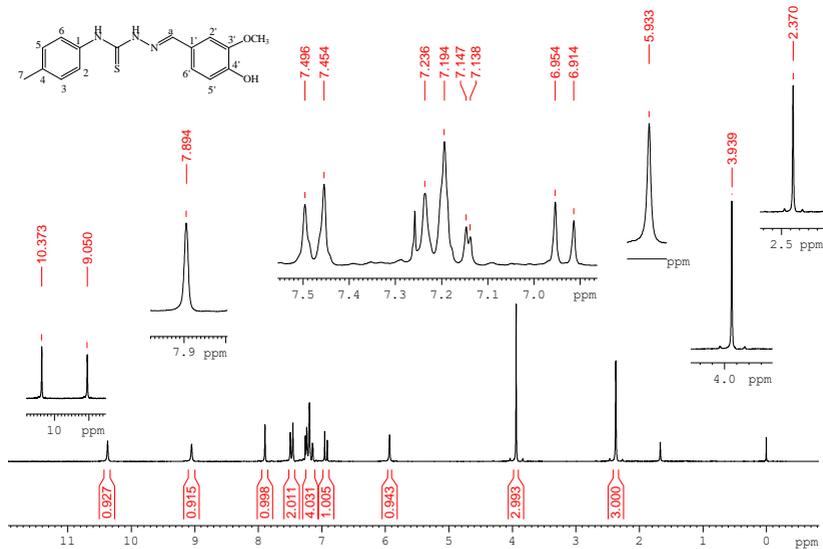
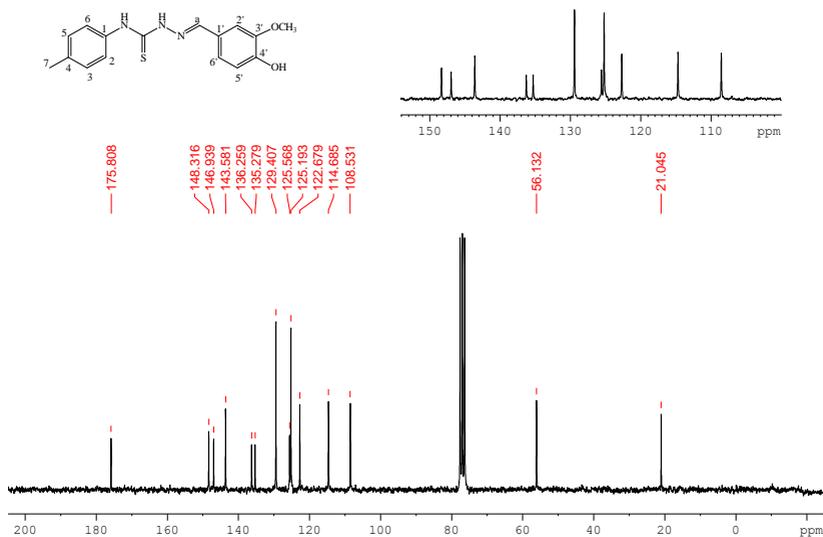
Figura 100. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35h**.**Figura 101.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35h**.

Figura 102. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35i**.

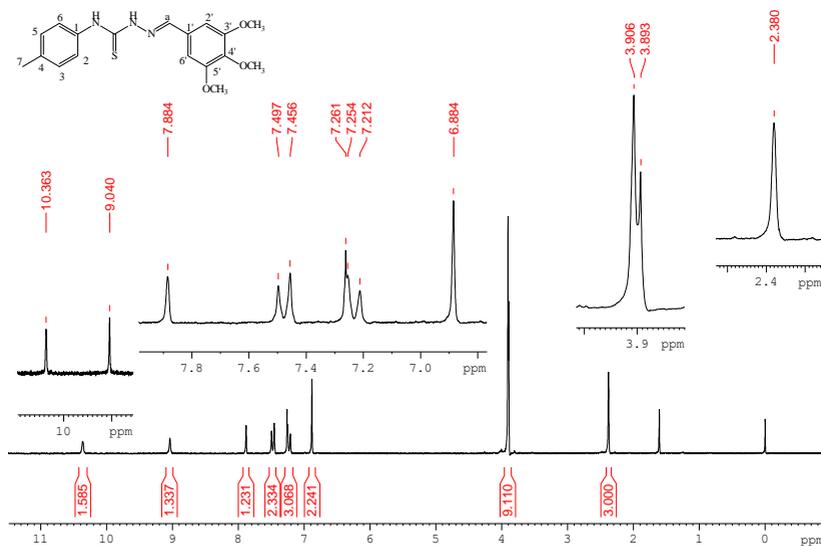


Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35i**.

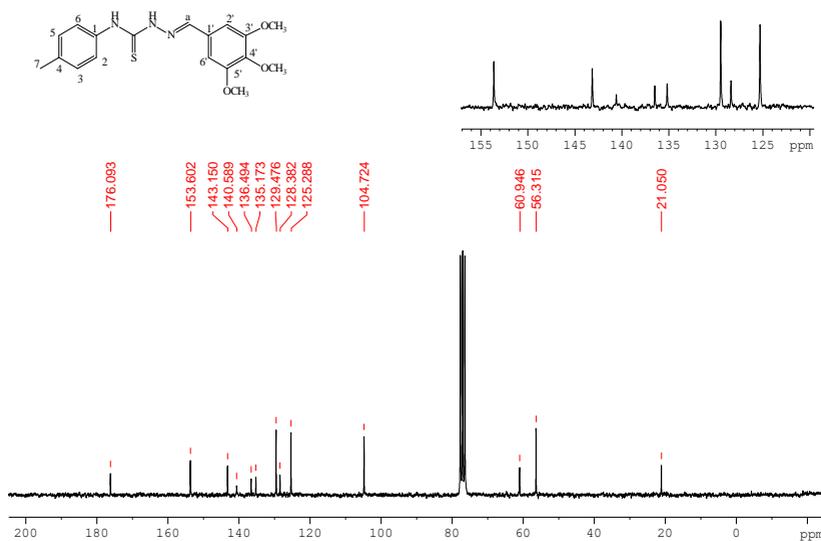


Figura 104. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35j**.

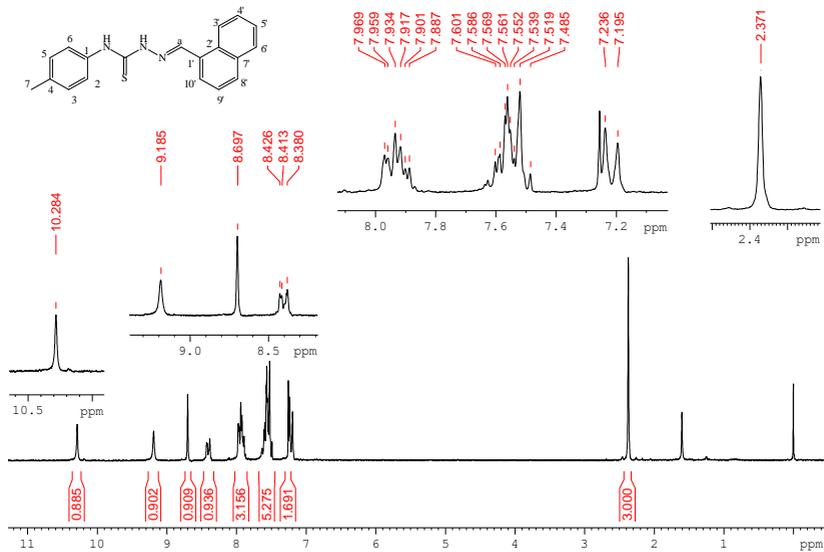


Figura 105. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35j**.

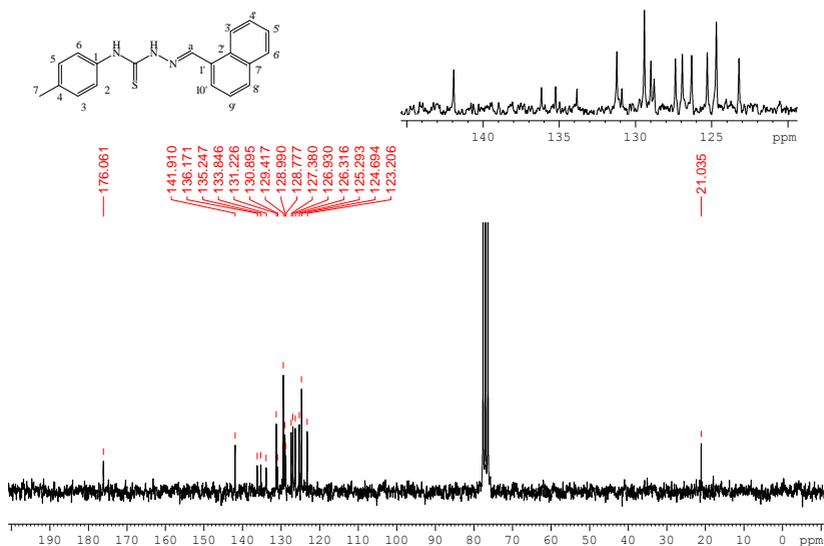


Figura 106. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35k**.

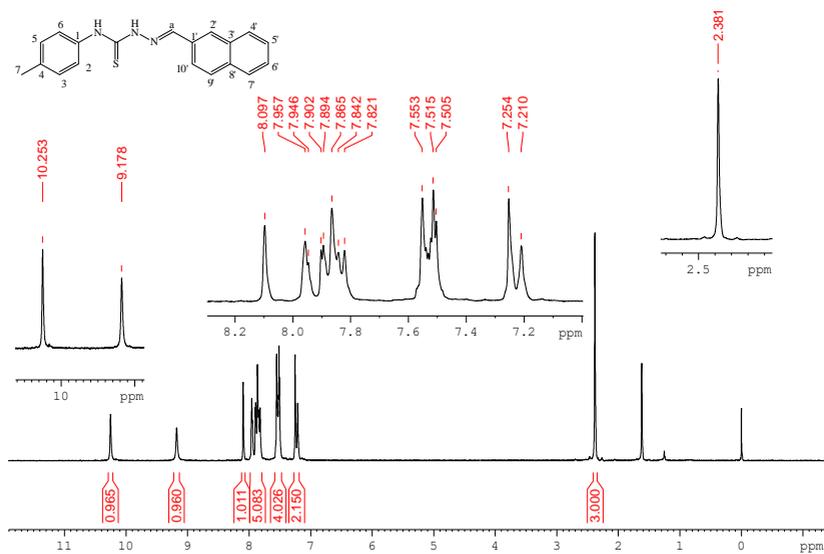


Figura 107. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35k**.

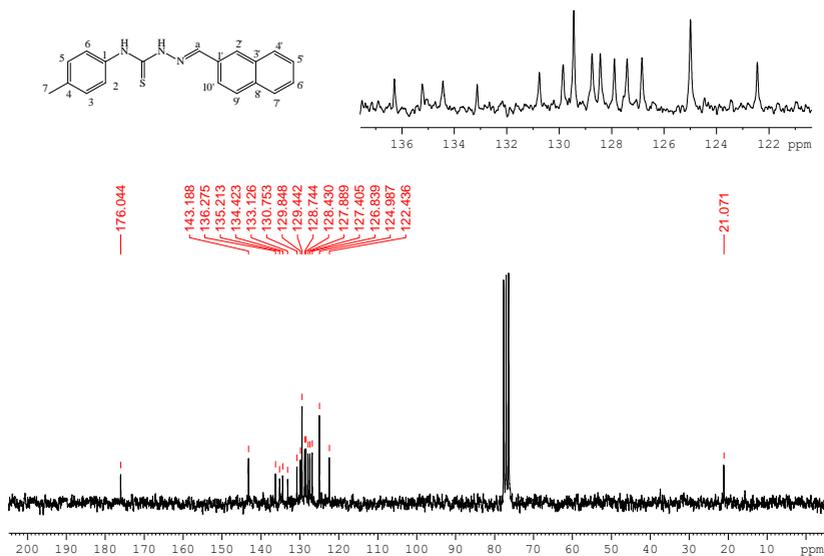


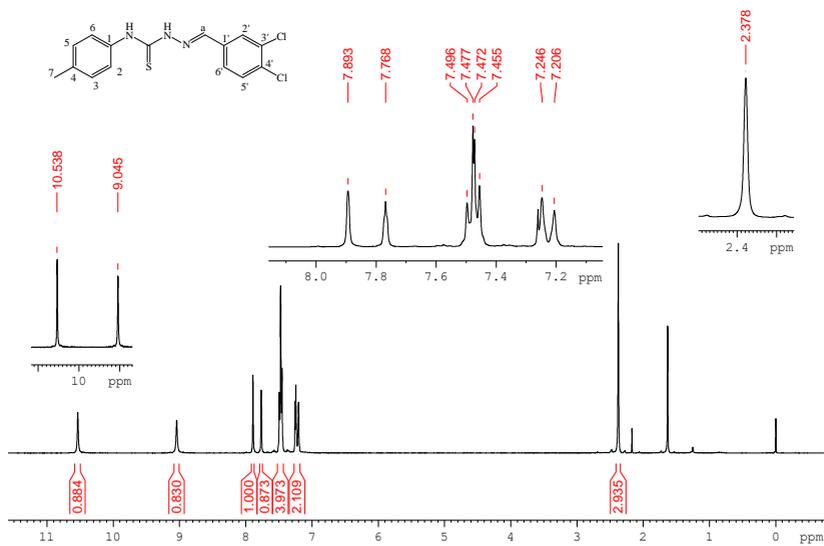
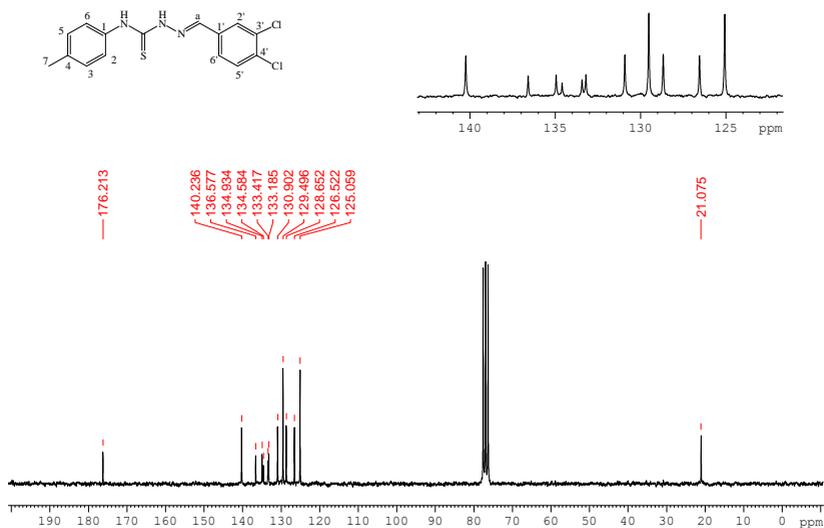
Figura 108. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **351**.**Figura 109.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **351**.

Figura 110. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35m**.

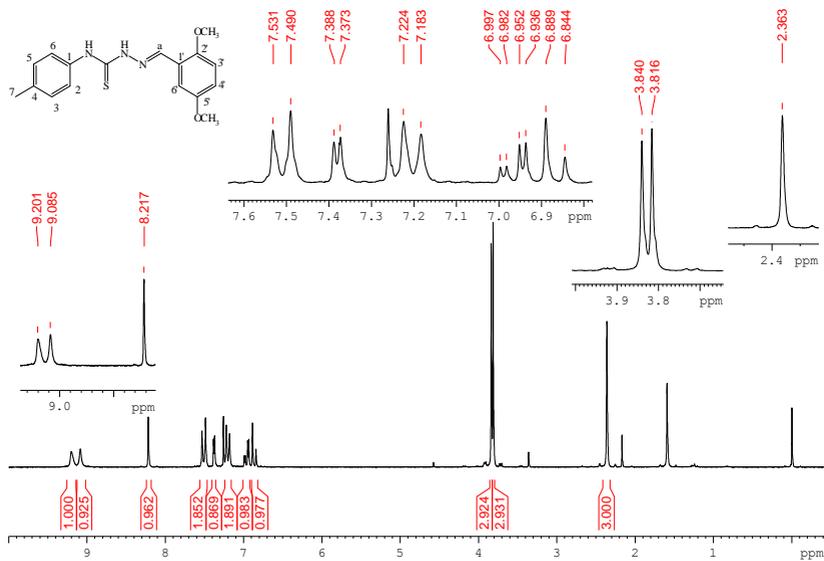


Figura 111. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35m**.

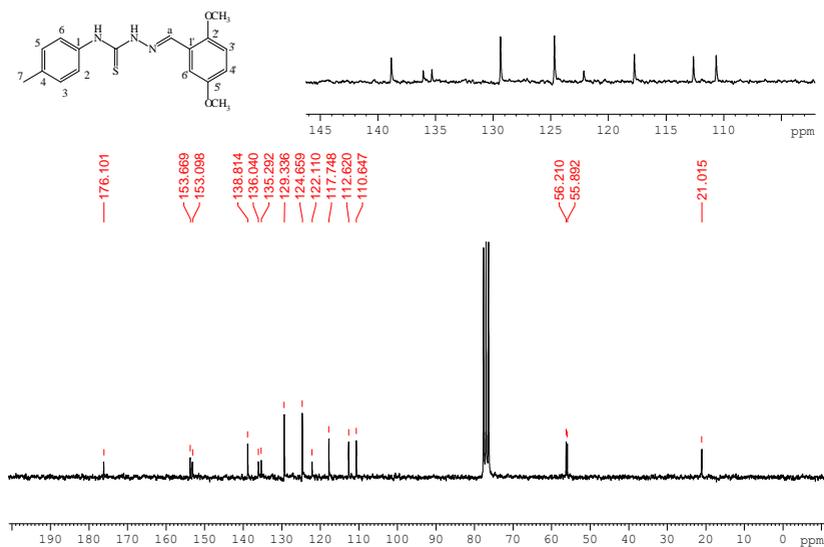


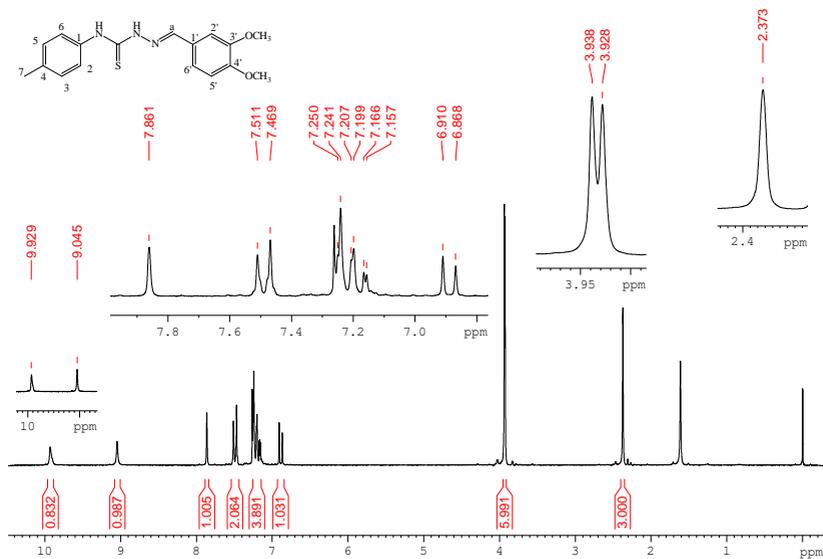
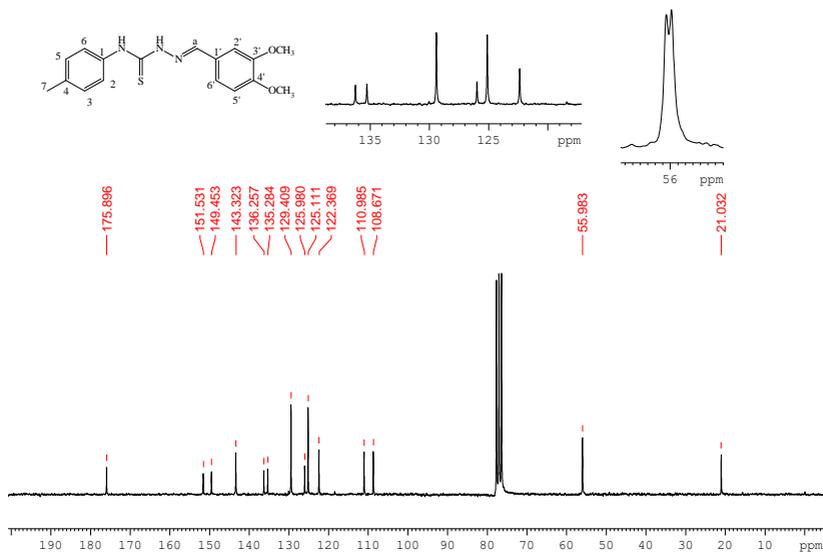
Figura 112. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35n**.**Figura 113.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35n**.

Figura 114. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35o**.

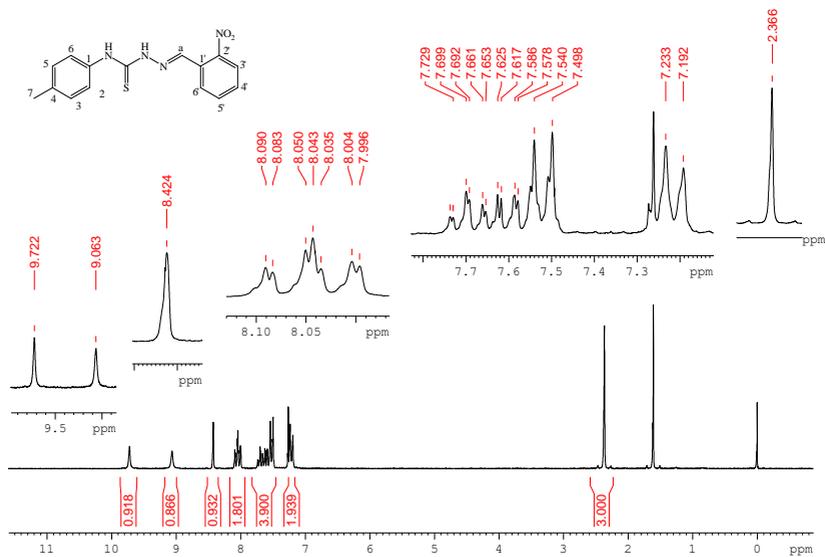


Figura 115. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35o**.

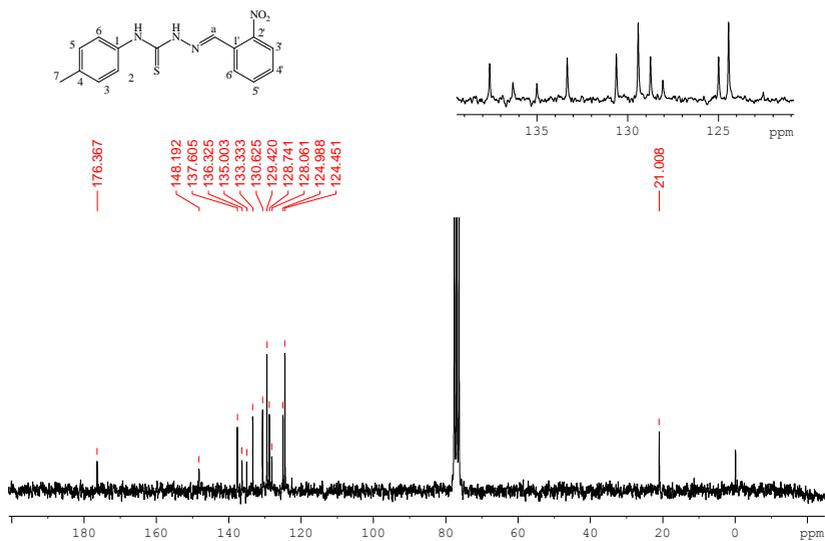


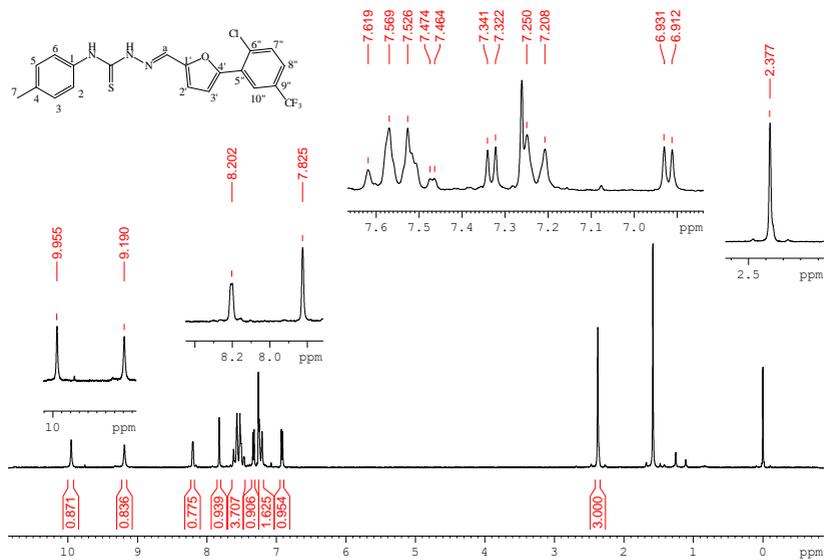
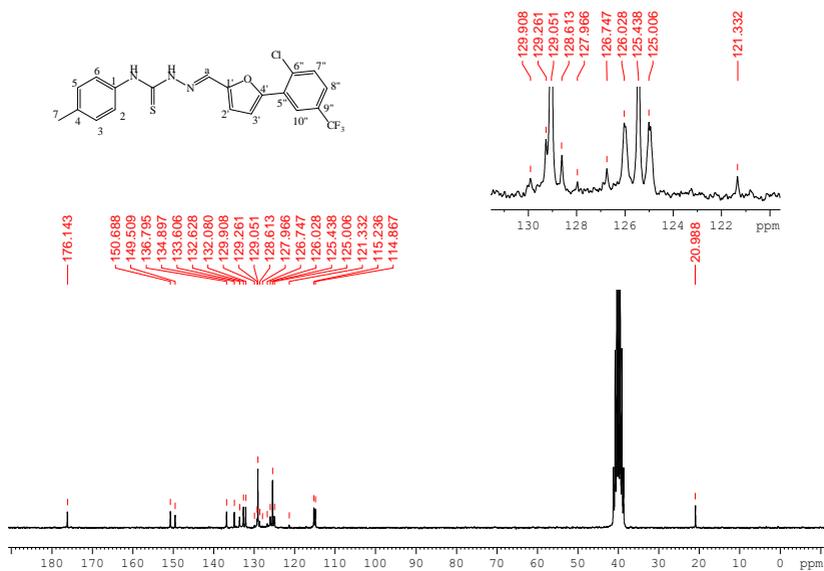
Figura 116. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35p**.**Figura 117.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **35p**.

Figura 118. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **35q**.

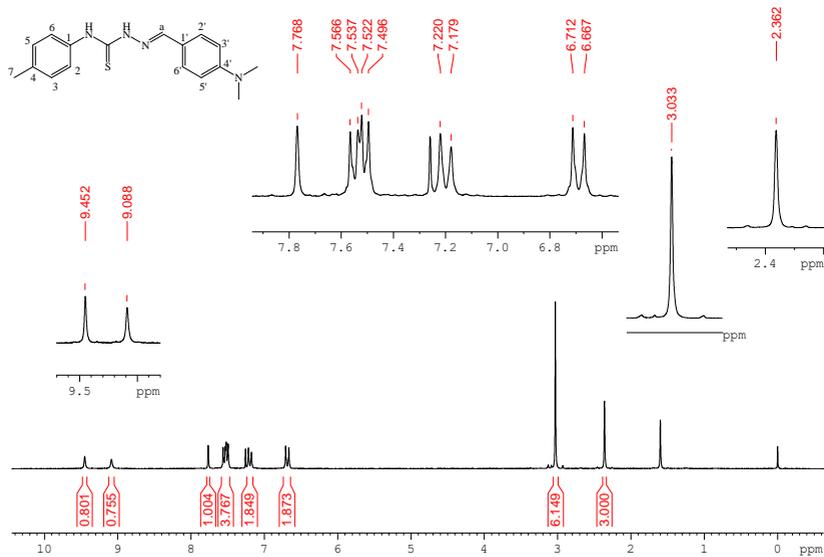


Figura 119. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **35q**.

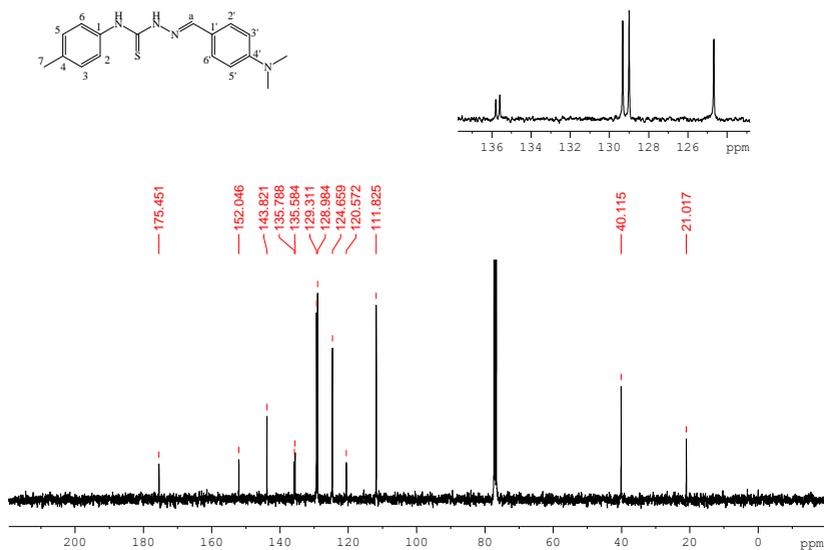


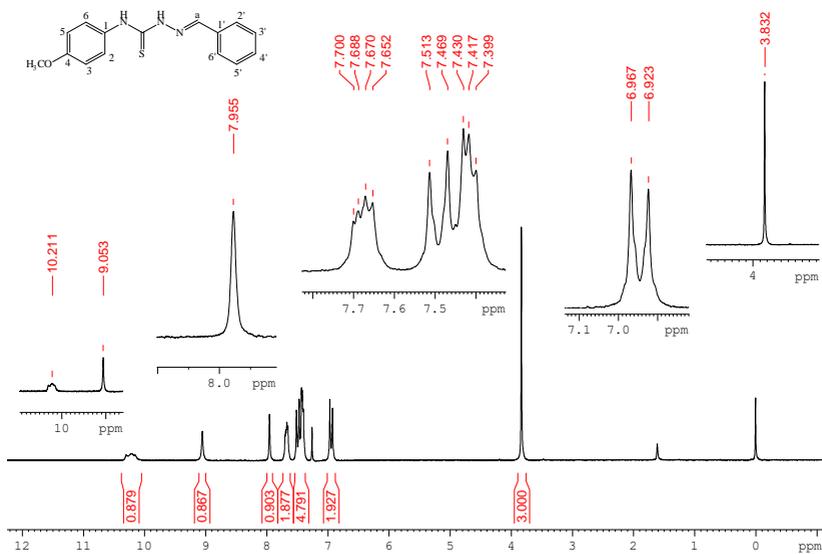
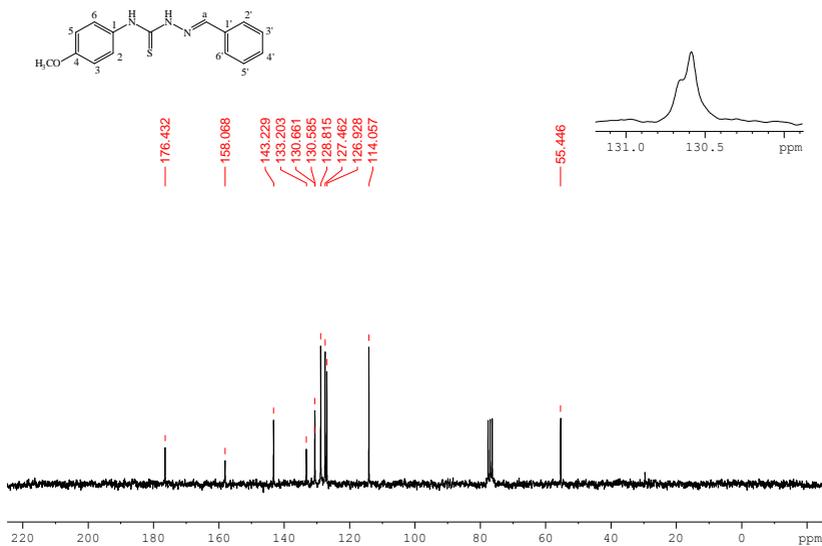
Figura 120. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36a**.**Figura 121.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **36a**.

Figura 122. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36b**.

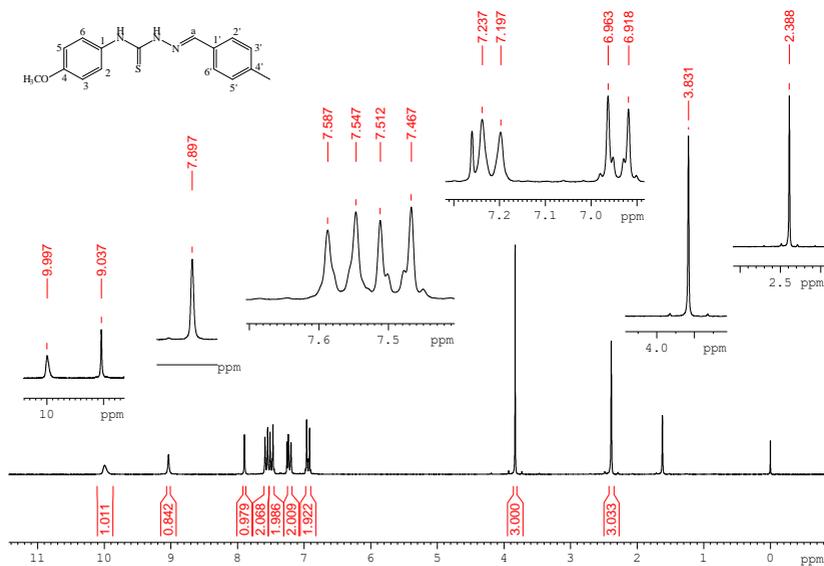


Figura 123. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **36b**.

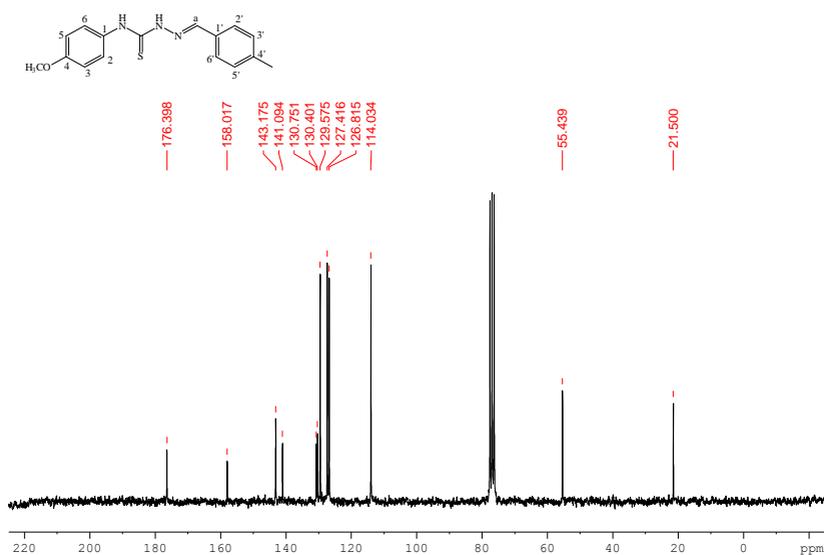


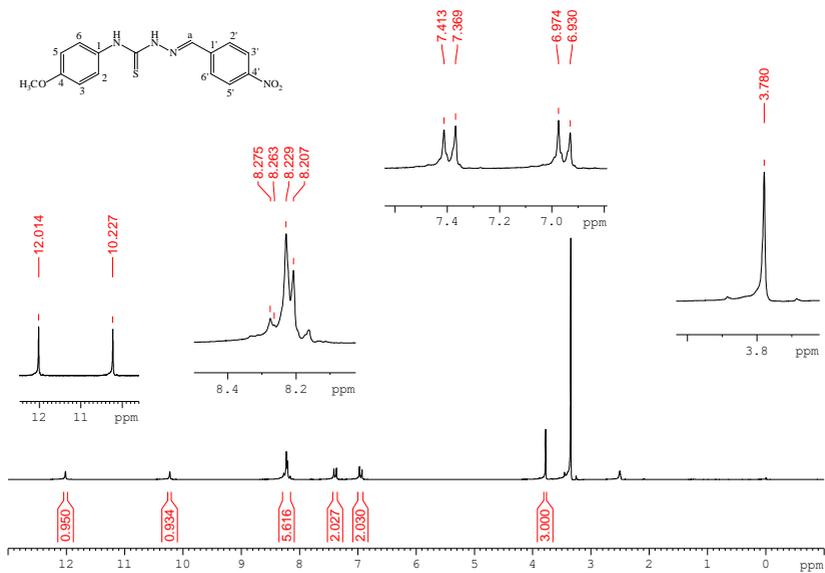
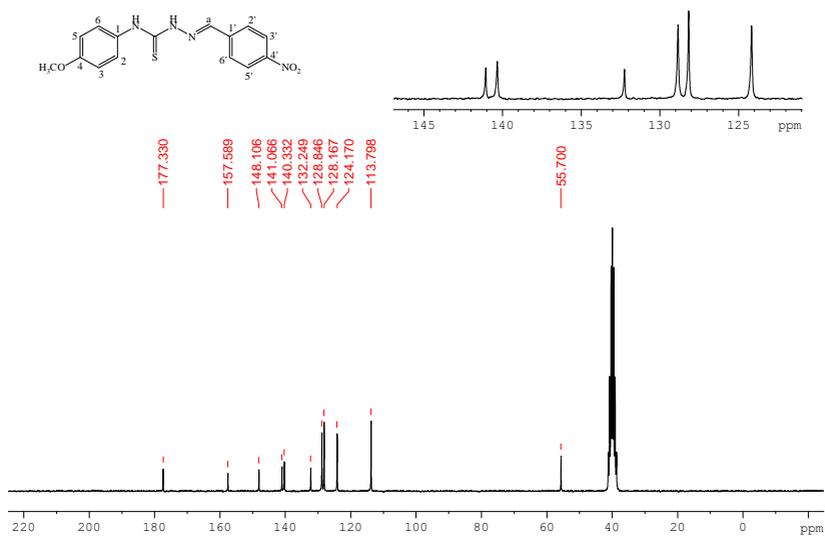
Figura 124. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) do composto **36c**.**Figura 125.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **36c**.

Figura 126. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36d**.

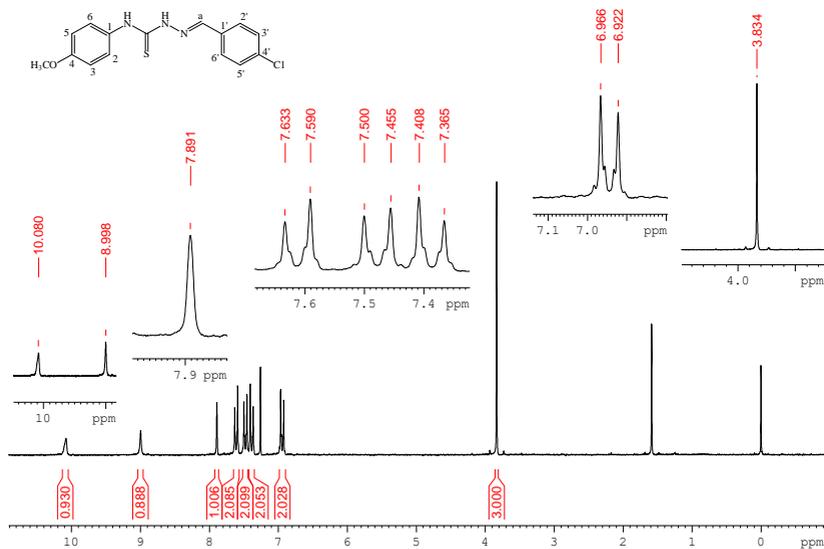


Figura 127. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **36d**.

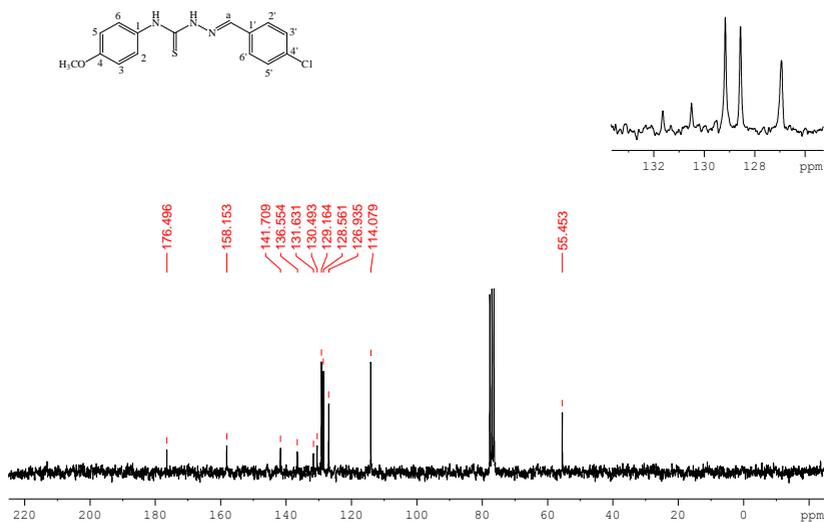


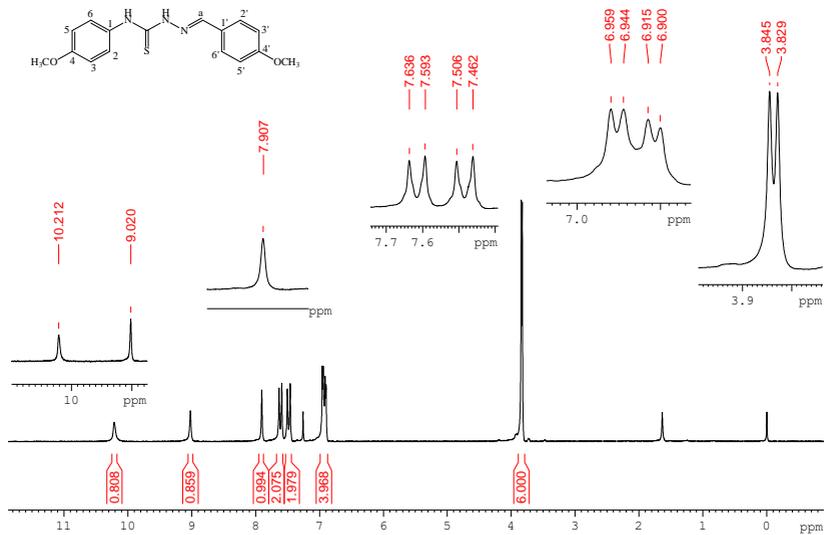
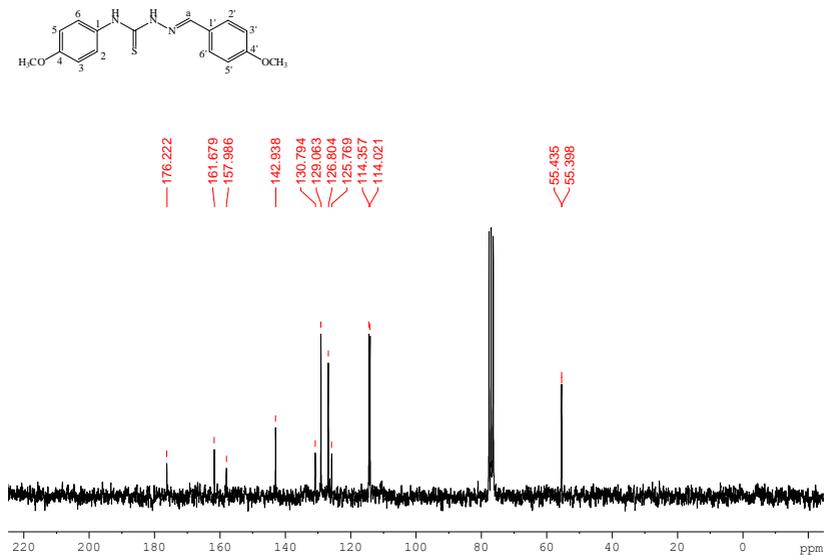
Figura 128. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36e**.**Figura 129.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **36e**.

Figura 130. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) do composto **36f**.

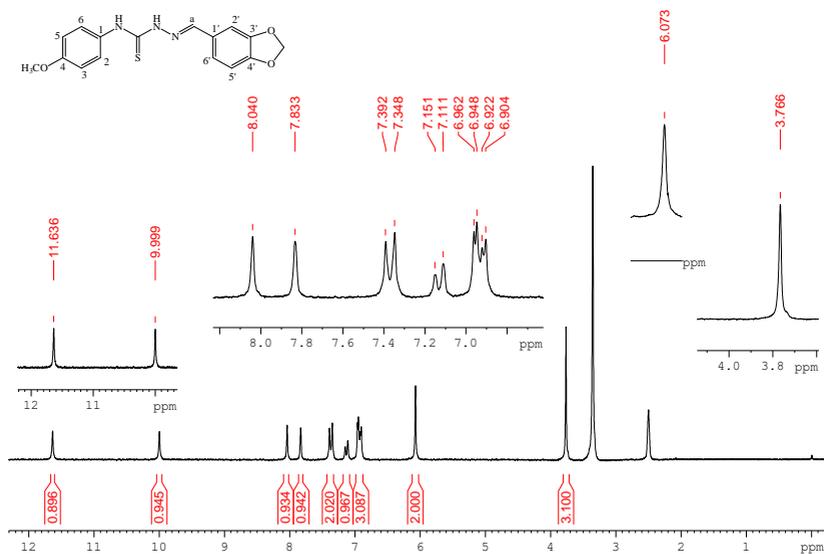


Figura 131. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) do composto **36f**.

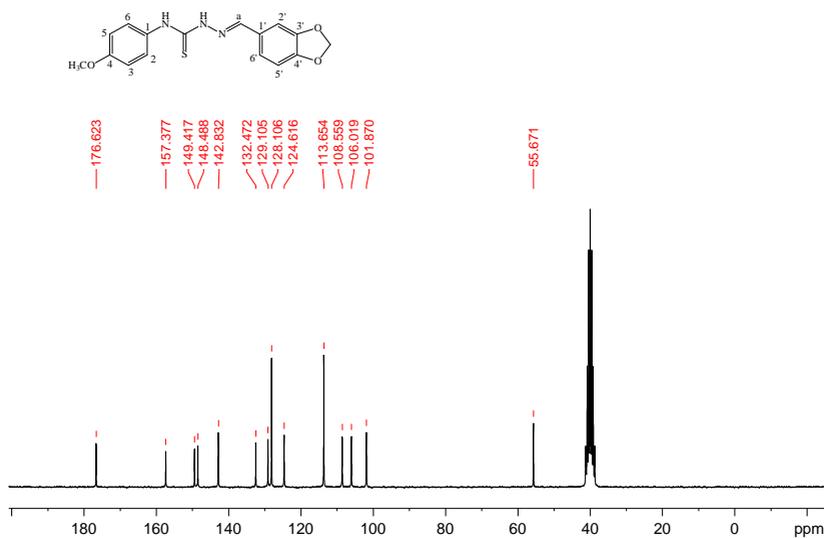


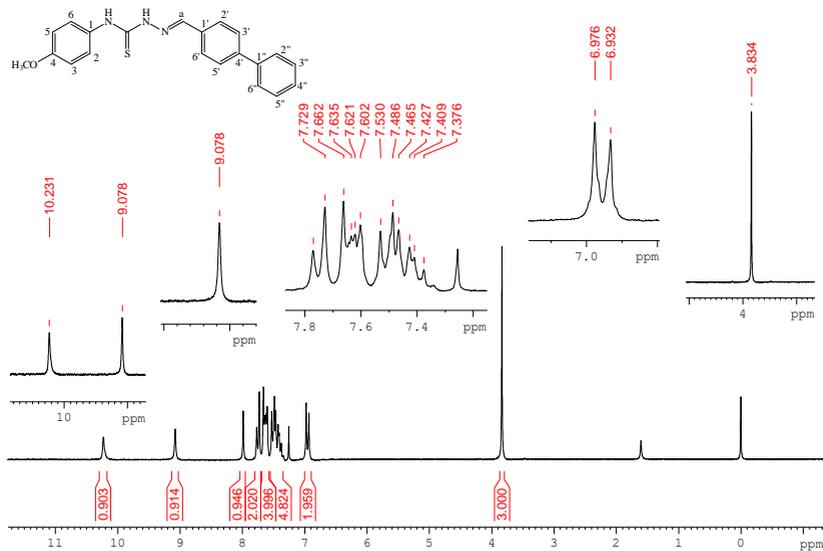
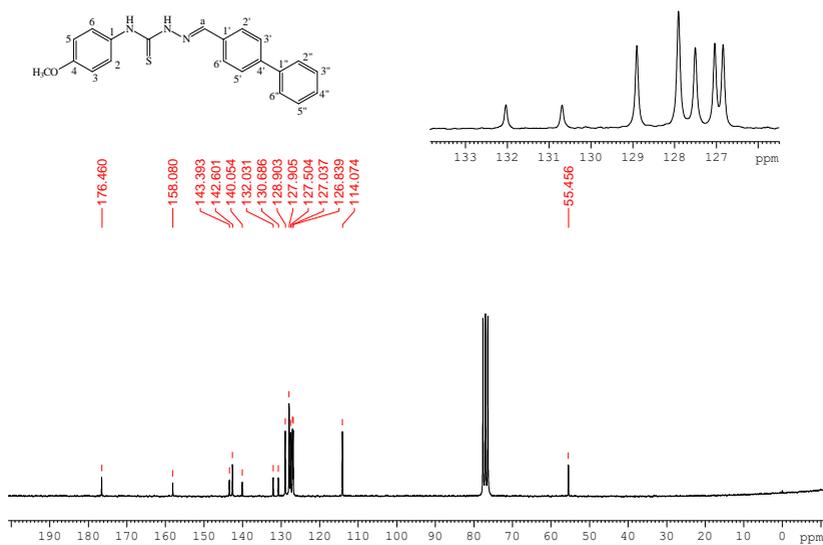
Figura 132. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36g**.**Figura 133.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **36g**.

Figura 134. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) do composto **36h**.

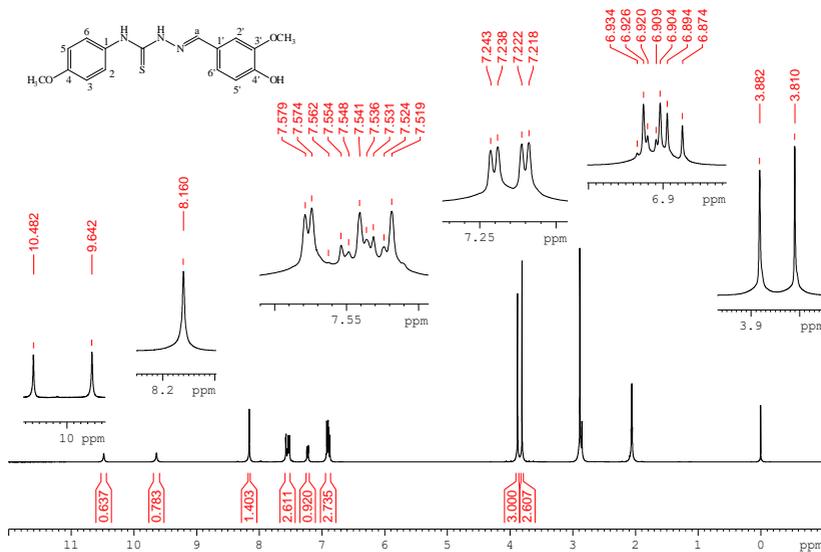


Figura 135. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, acetona- d_6) do composto **36h**.

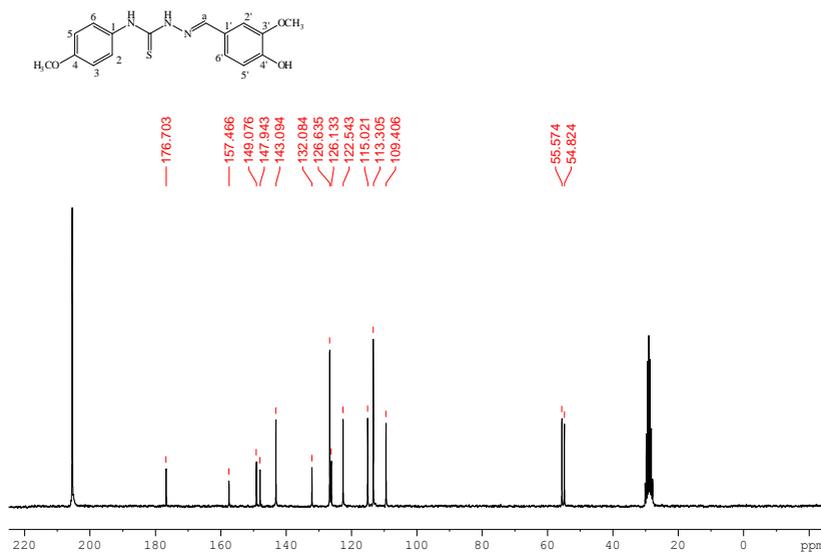


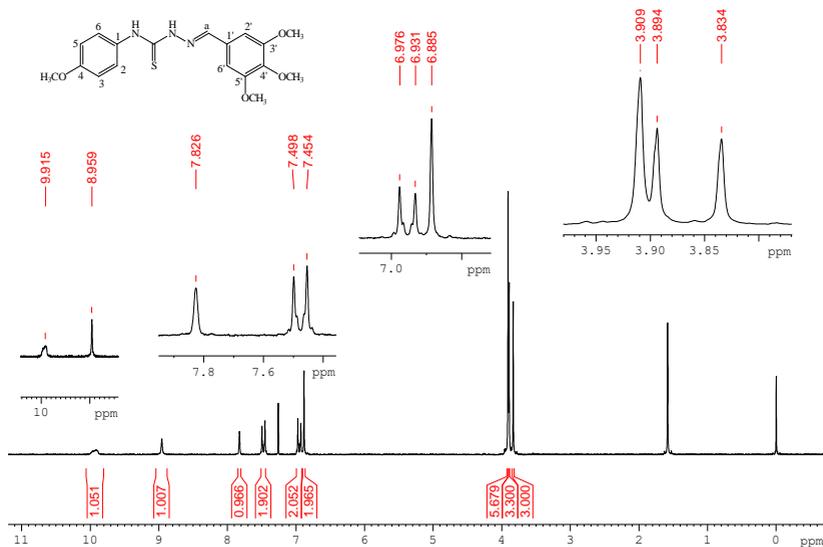
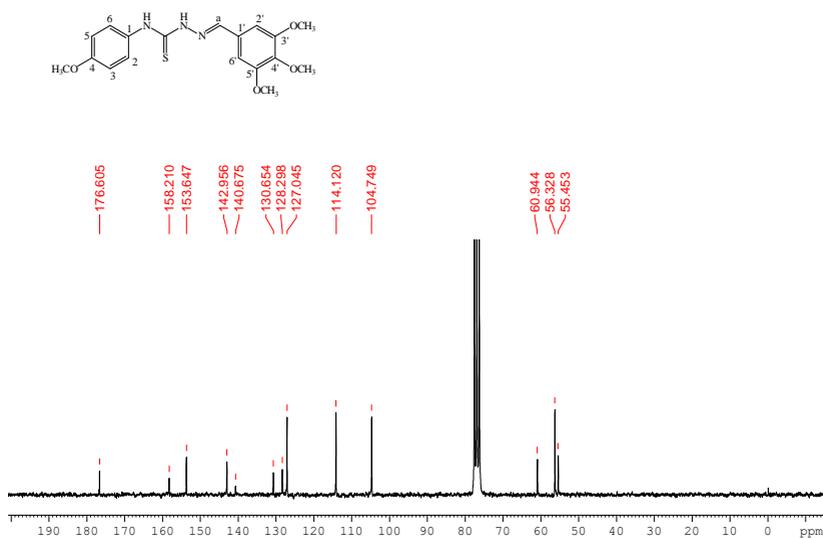
Figura 136. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36i**.**Figura 137.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **36i**.

Figura 138. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36j**.

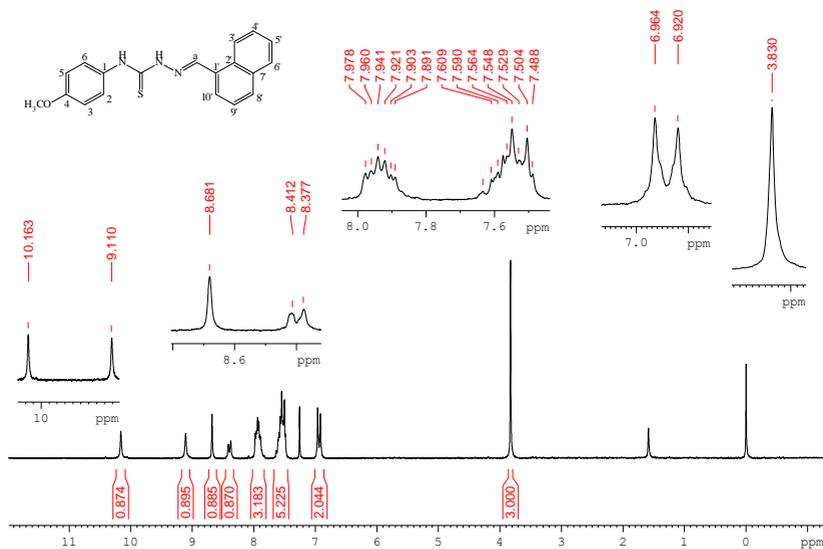


Figura 139. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **36j**.

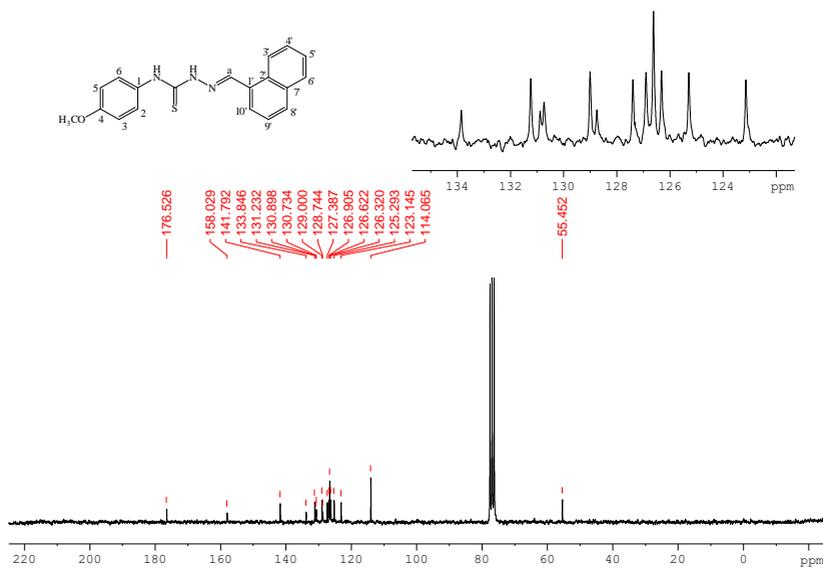


Figura 140. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) do composto **36k**.

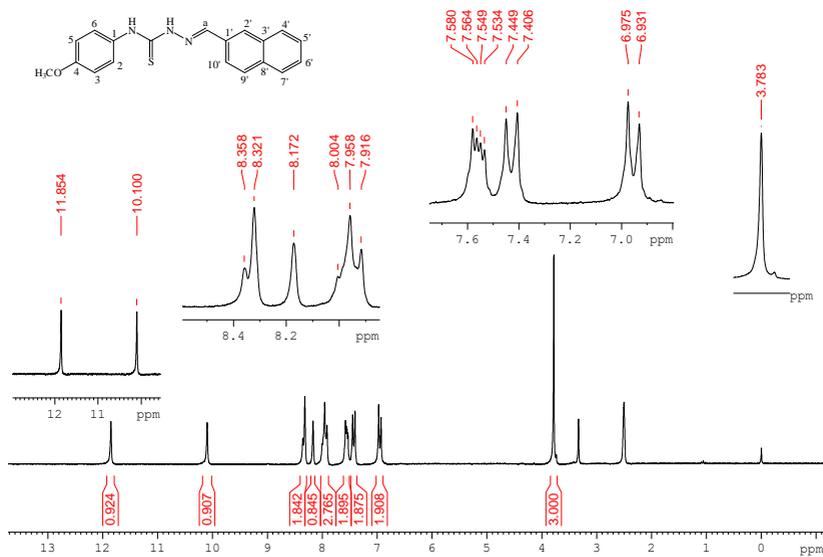


Figura 141. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **36k**.

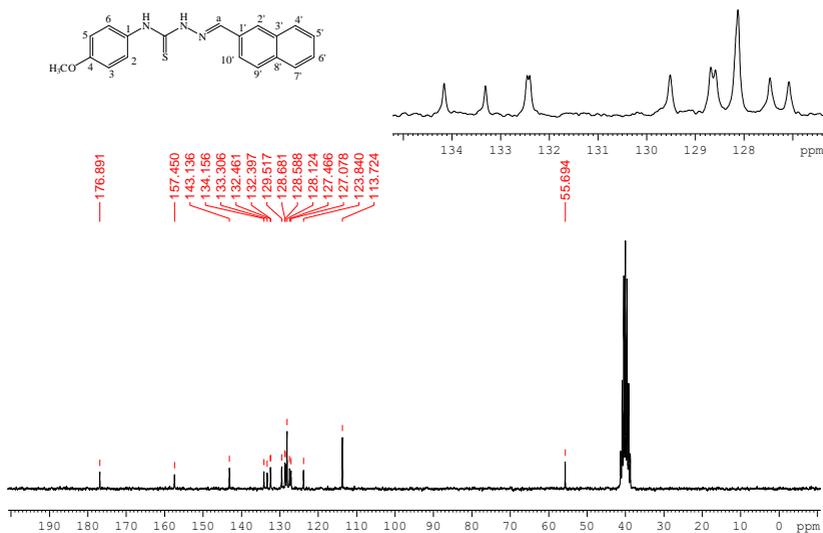


Figura 142. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36l**.

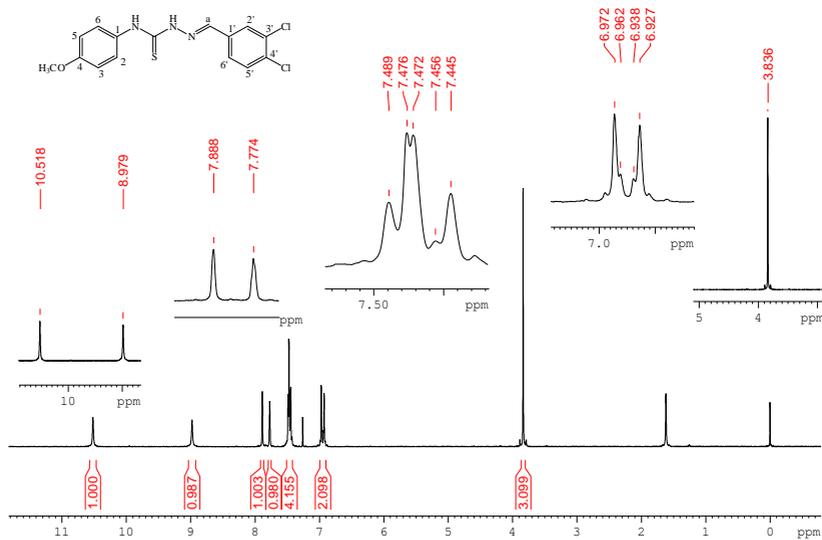


Figura 143. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **36l**.

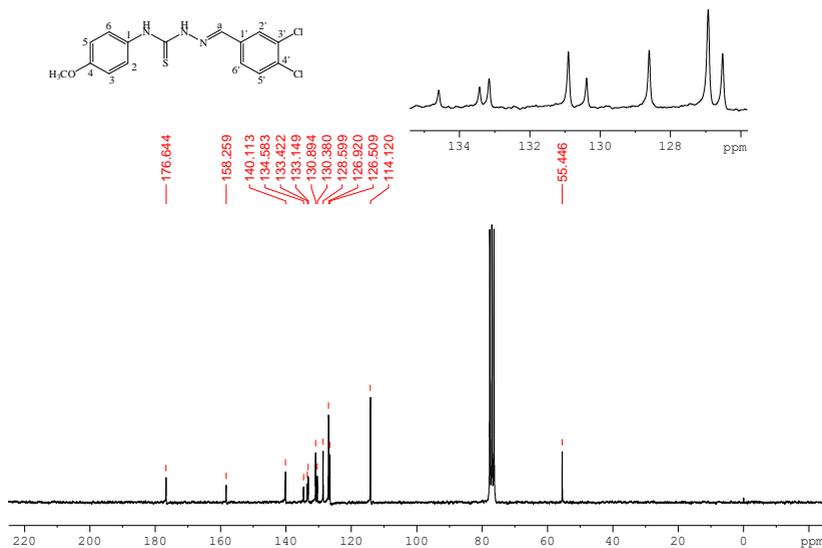


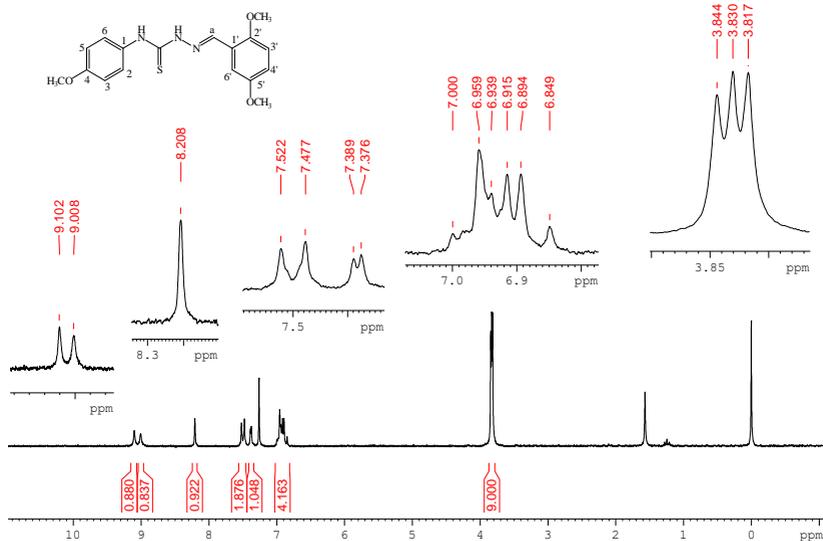
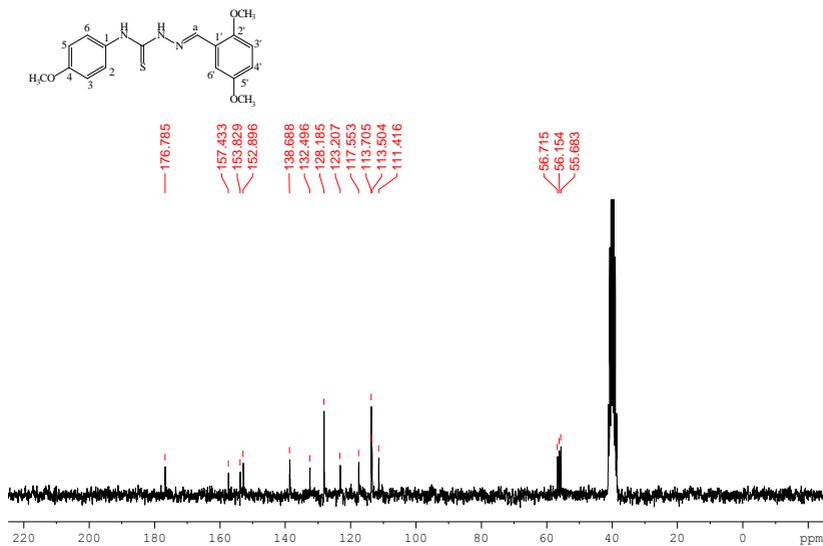
Figura 144. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36m**.**Figura 145.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **36m**.

Figura 146. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36n**.

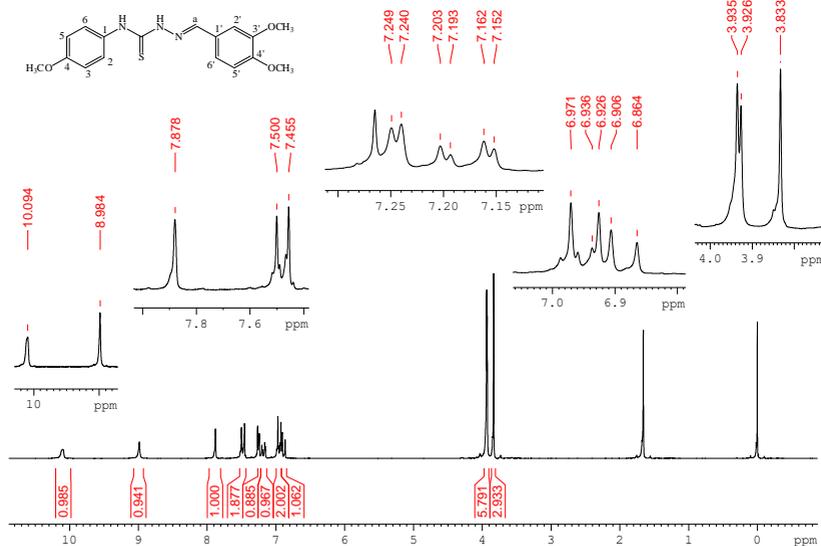


Figura 147. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **36n**.

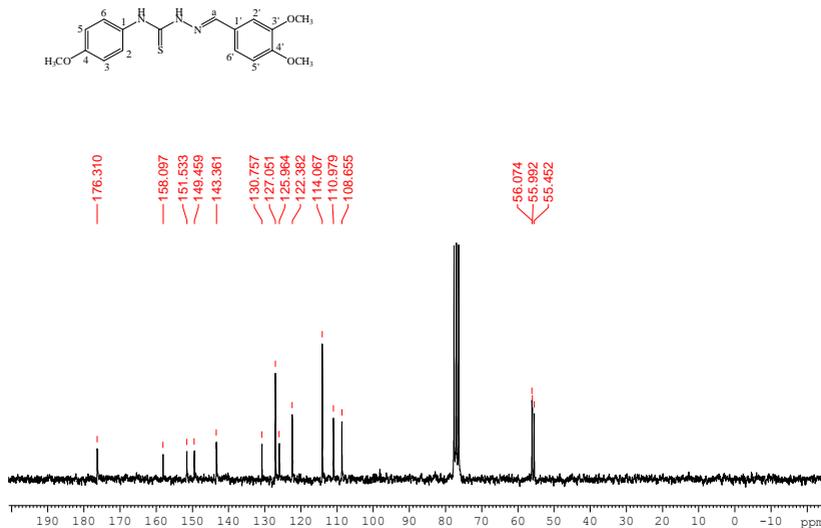


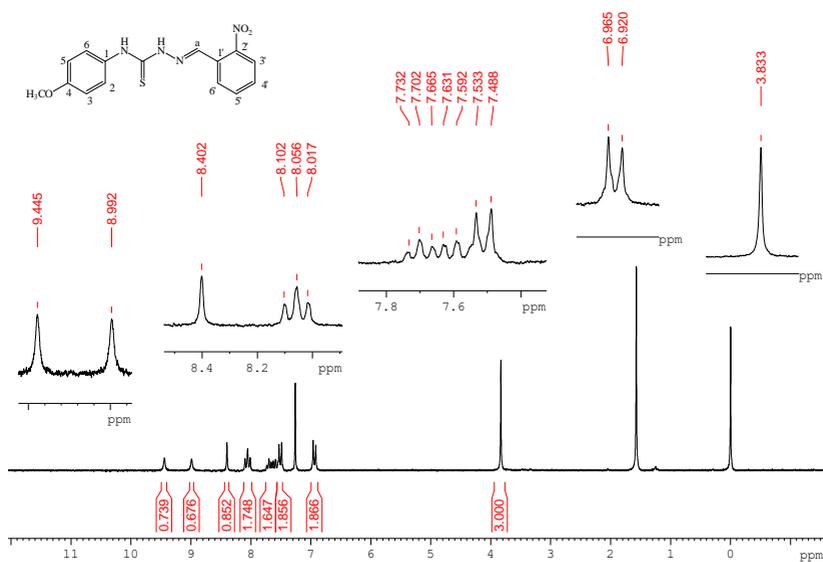
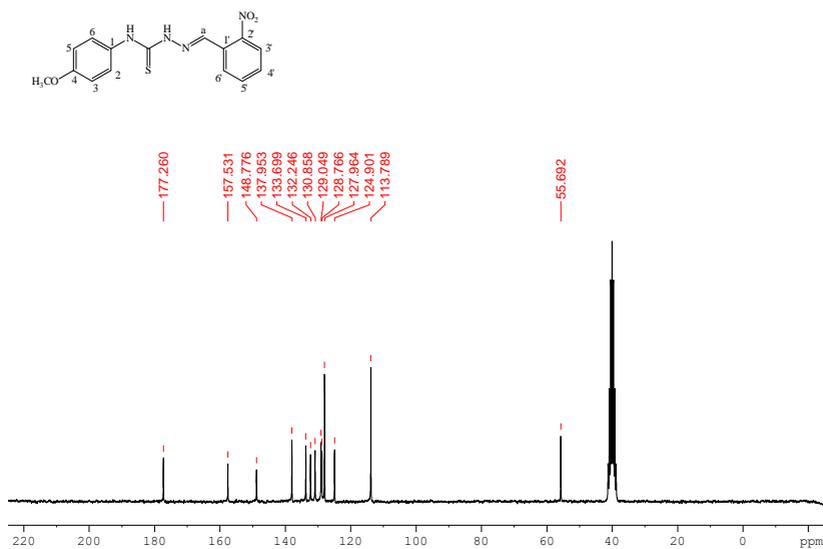
Figura 148. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36o**.**Figura 149.** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6) do composto **36o**.

Figura 150. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **36p**.

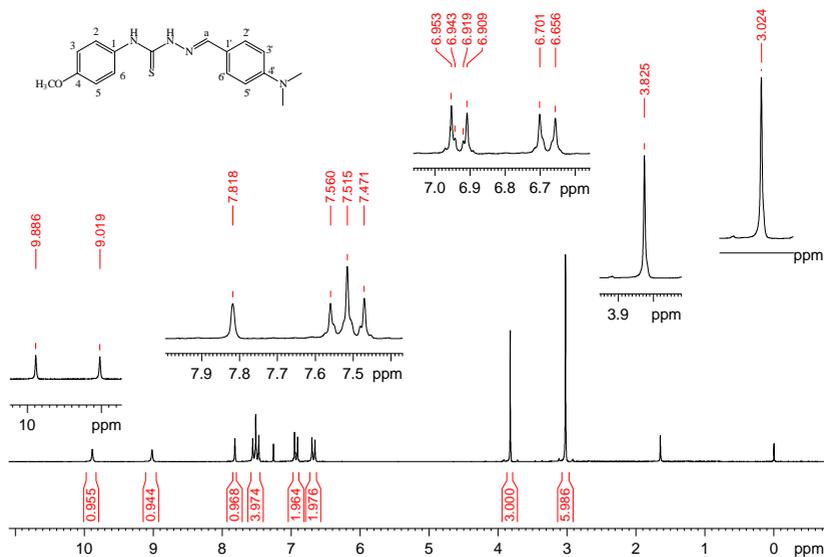
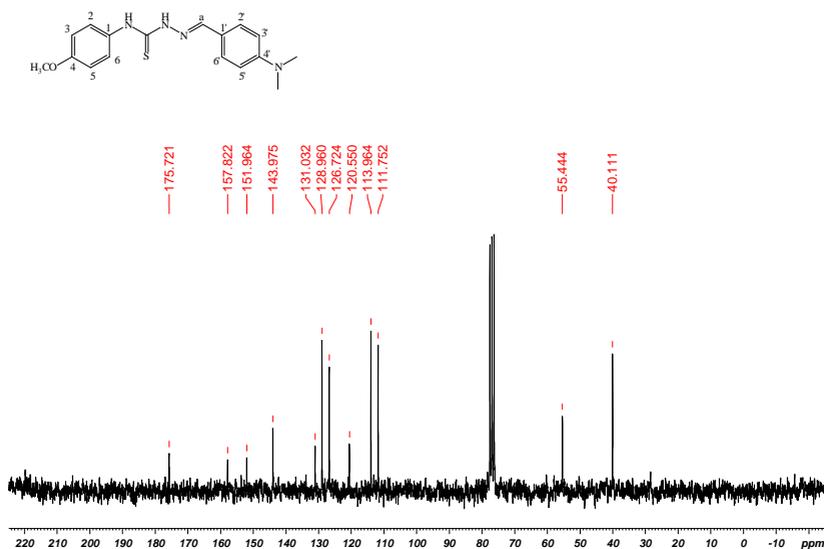


Figura 151. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **36p**.



**APÊNDICE II- Espectros de massas de alta resolução das
tiosemicarbazonas.**

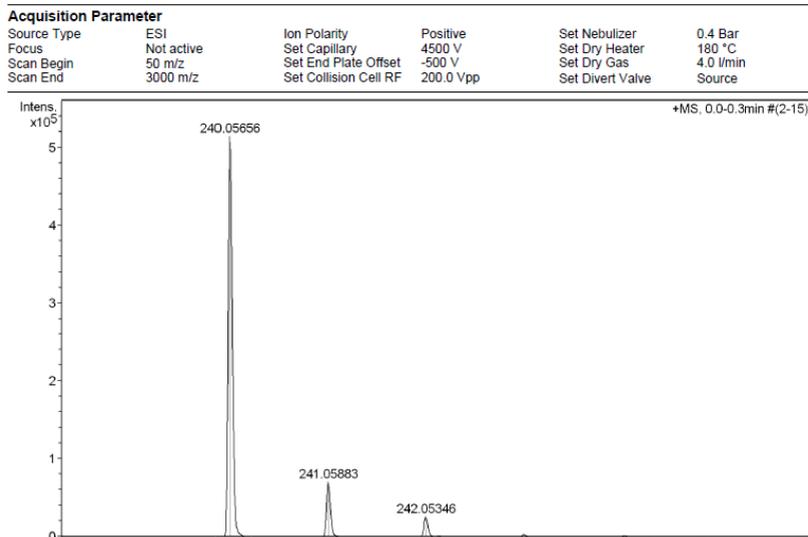
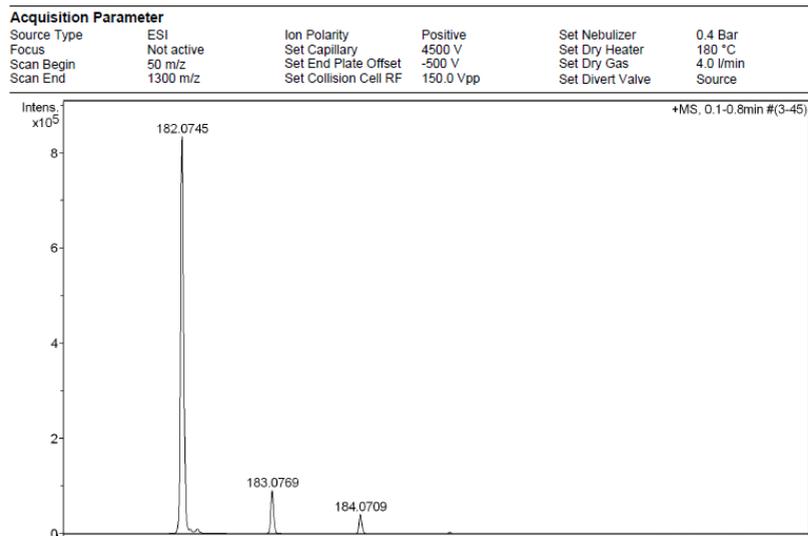
Figura 152. Espectro de massas de alta resolução do composto **31**.**Figura 153.** Espectro de massas de alta resolução do composto **32**.

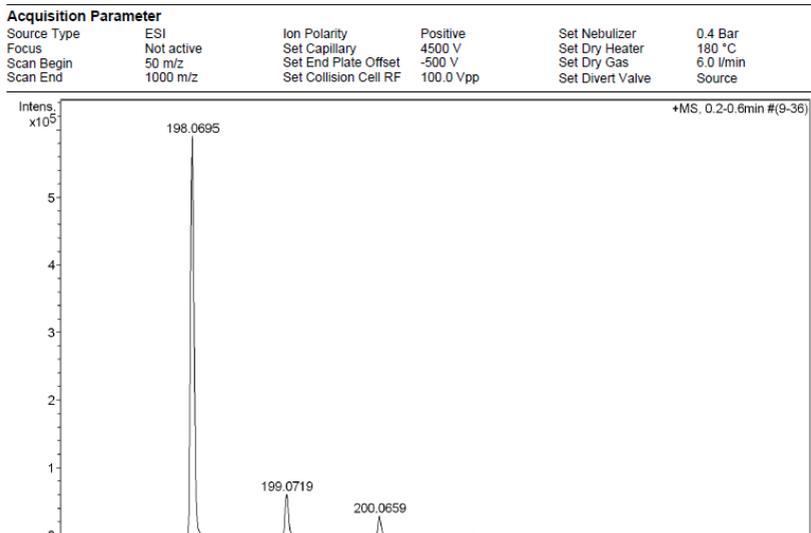
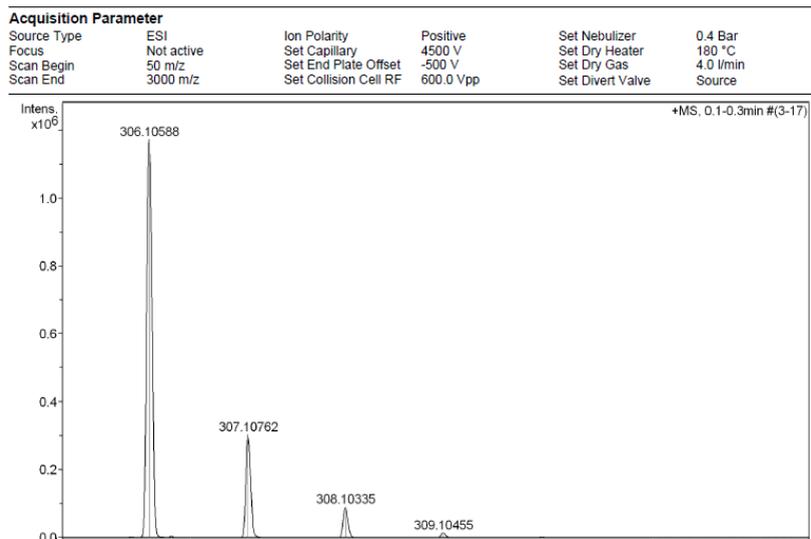
Figura 154. Espectro de massas de alta resolução do composto **33**.**Figura 155.** Espectro de massas de alta resolução do composto **34a**.

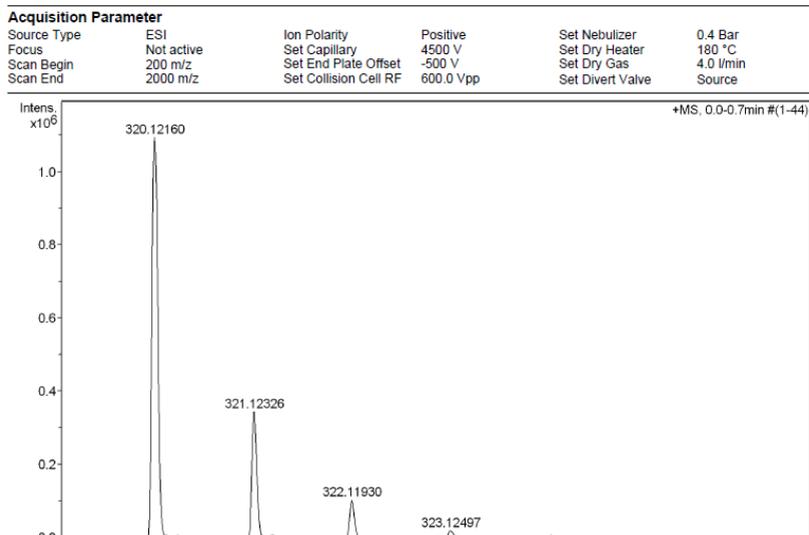
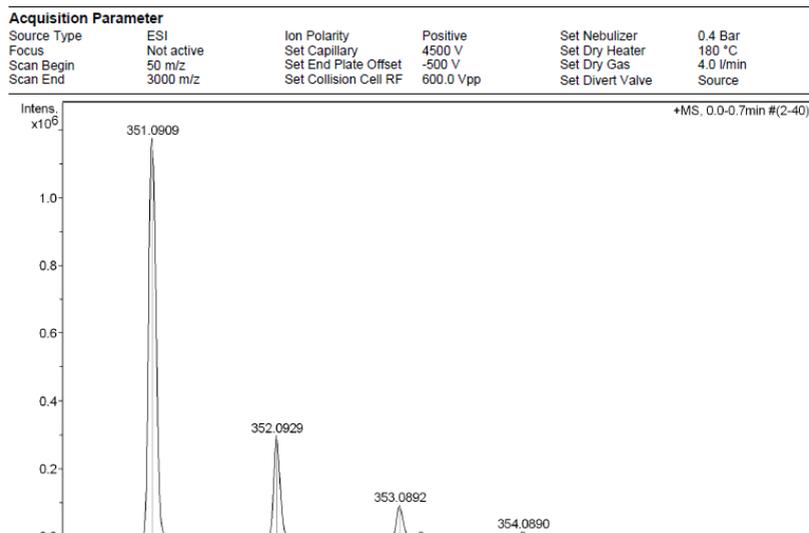
Figura 156. Espectro de massas de alta resolução do composto **34b**.**Figura 157.** Espectro de massas de alta resolução do composto **34c**.

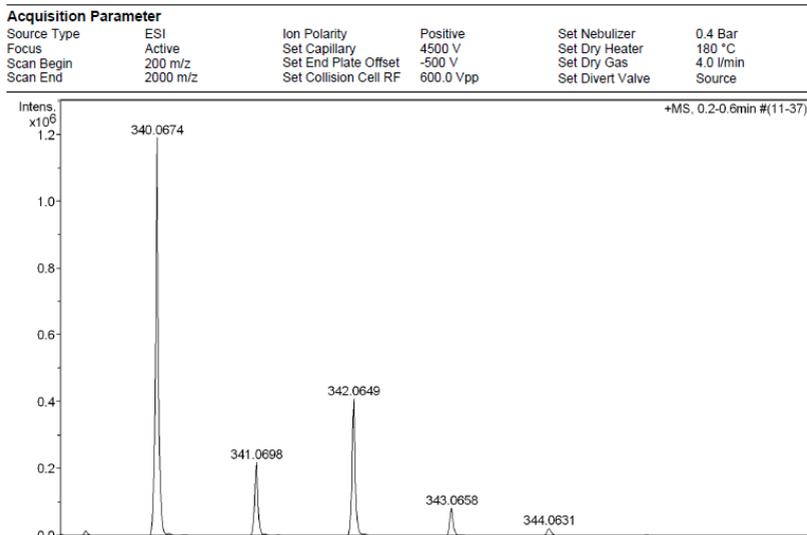
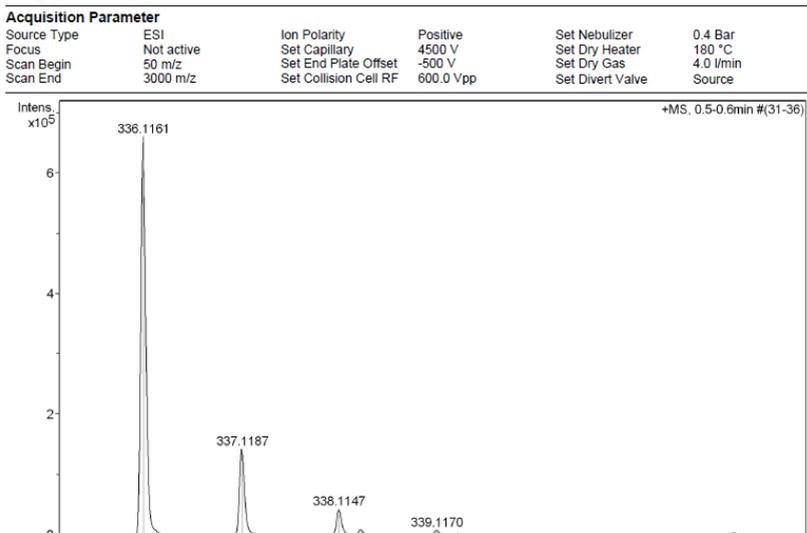
Figura 158. Espectro de massas de alta resolução do composto **34d**.**Figura 159.** Espectro de massas de alta resolução do composto **34e**.

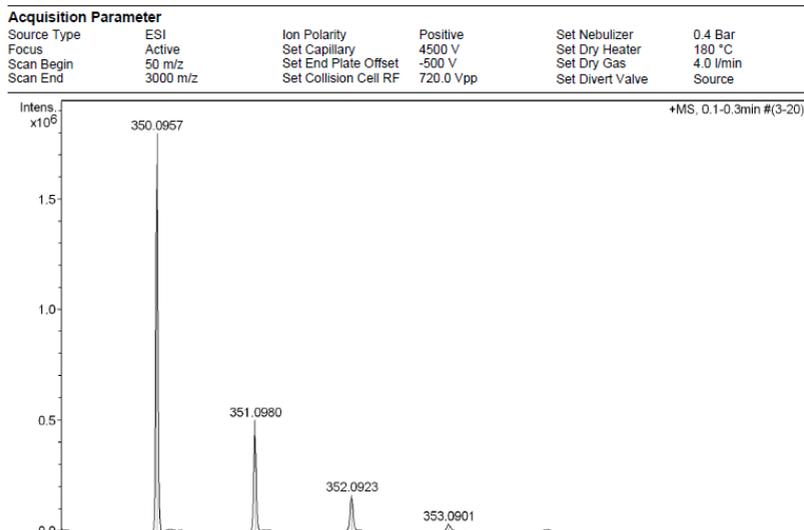
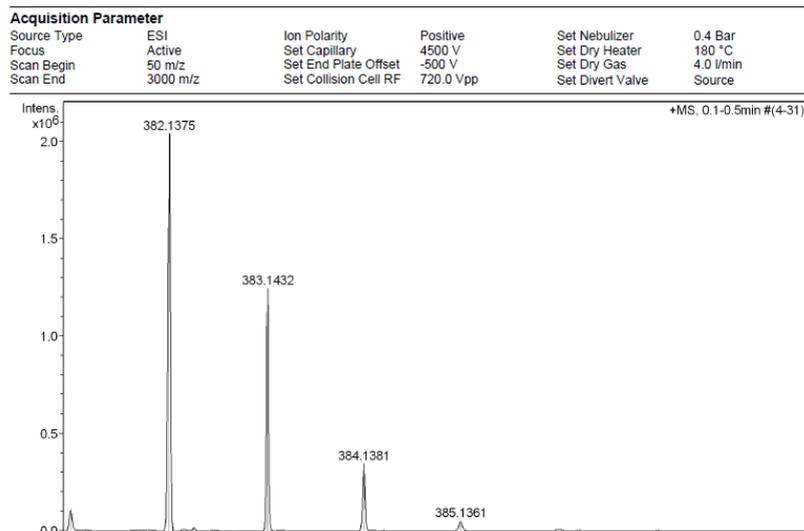
Figura 160. Espectro de massas de alta resolução do composto **34f**.**Figura 161.** Espectro de massas de alta resolução do composto **34g**.

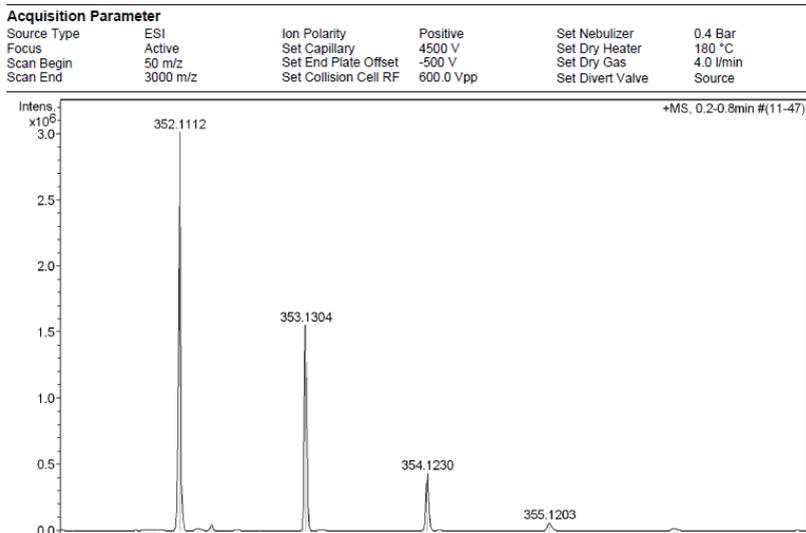
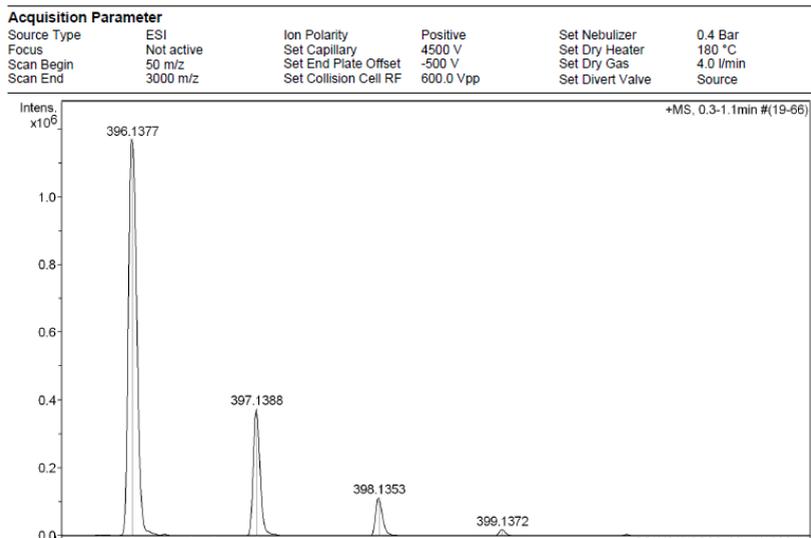
Figura 162. Espectro de massas de alta resolução do composto **34h**.**Figura 163.** Espectro de massas de alta resolução do composto **34i**.

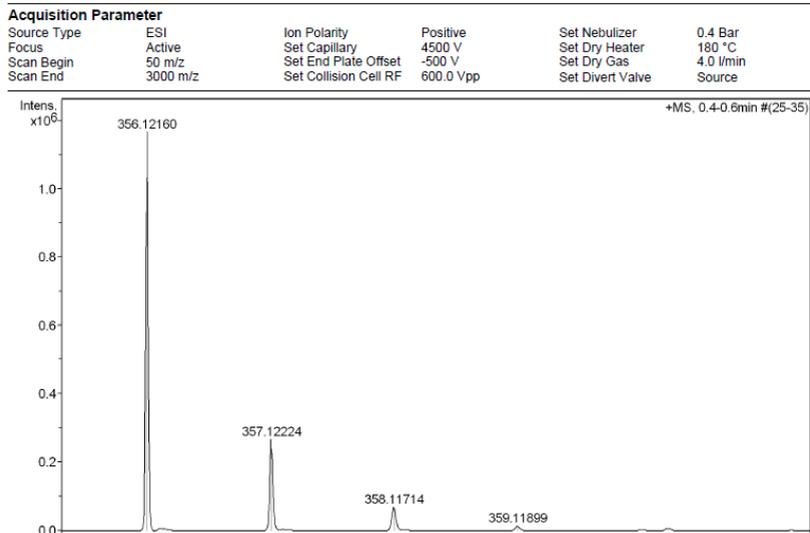
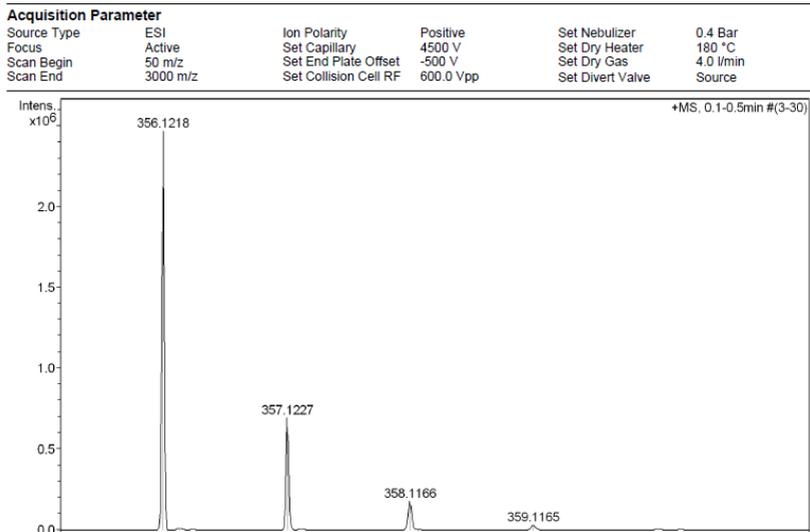
Figura 164. Espectro de massas de alta resolução do composto **34j**.**Figura 165.** Espectro de massas de alta resolução do composto **34k**.

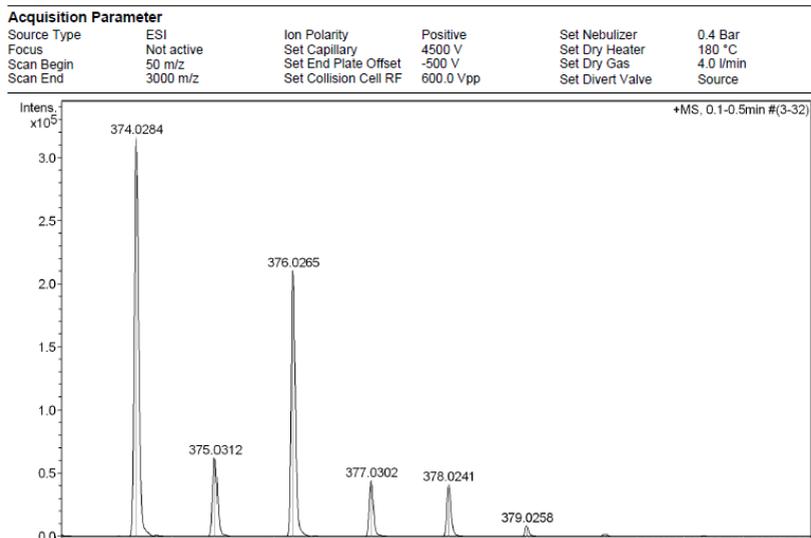
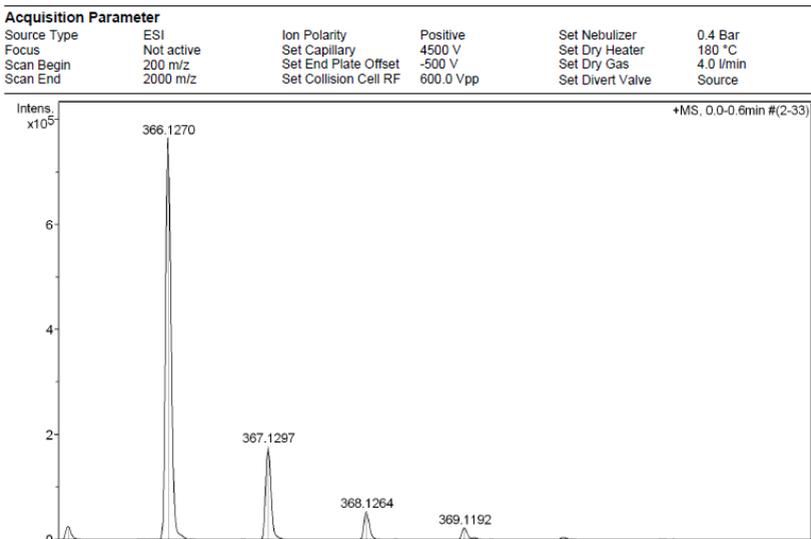
Figura 166. Espectro de massas de alta resolução do composto **34l**.**Figura 167.** Espectro de massas de alta resolução do composto **34m**.

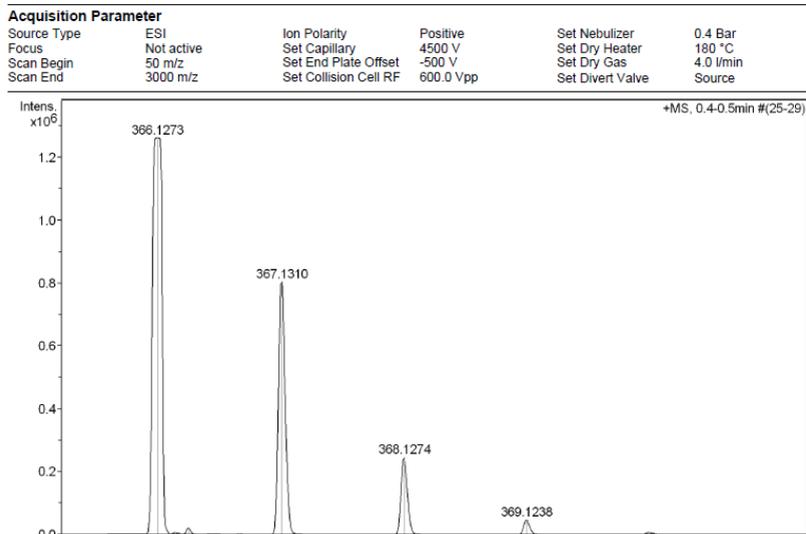
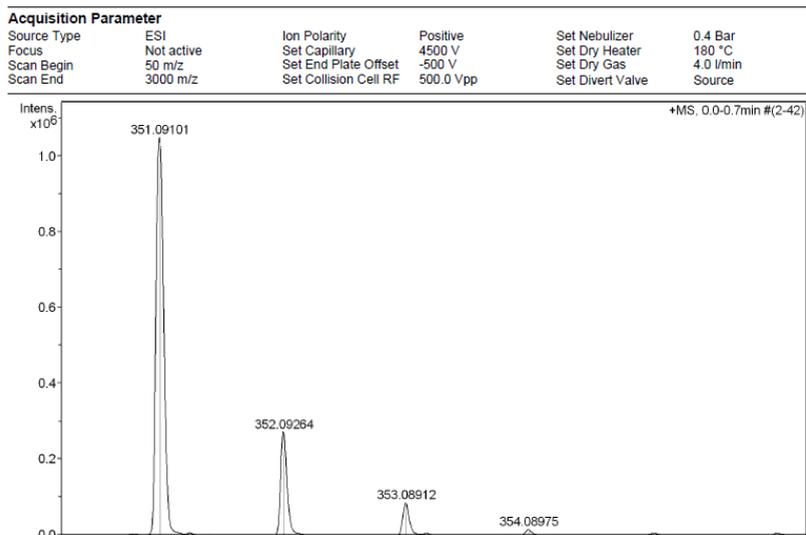
Figura 168. Espectro de massas de alta resolução do composto **34n**.**Figura 169.** Espectro de massas de alta resolução do composto **34o**.

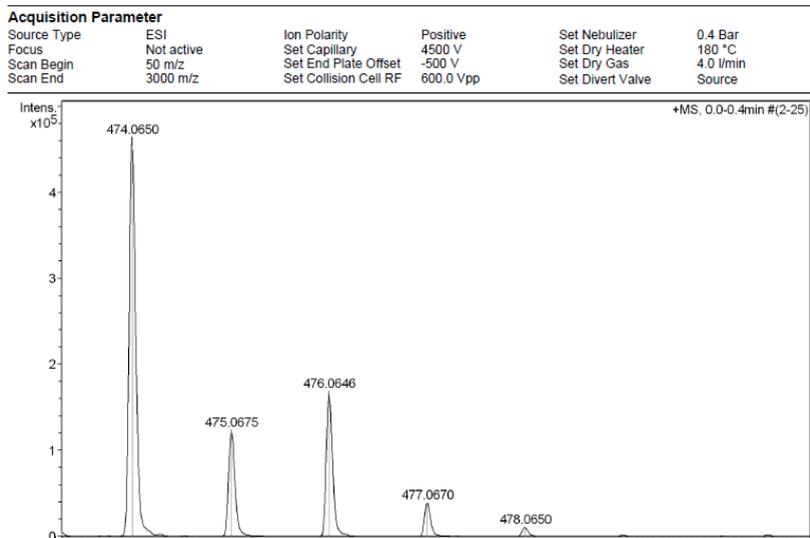
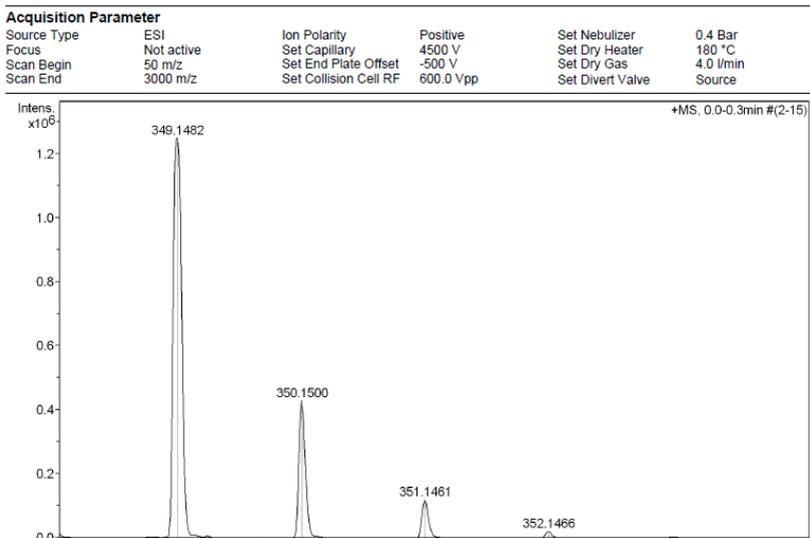
Figura 170. Espectro de massas de alta resolução do composto **34p**.**Figura 171.** Espectro de massas de alta resolução do composto **34q**.

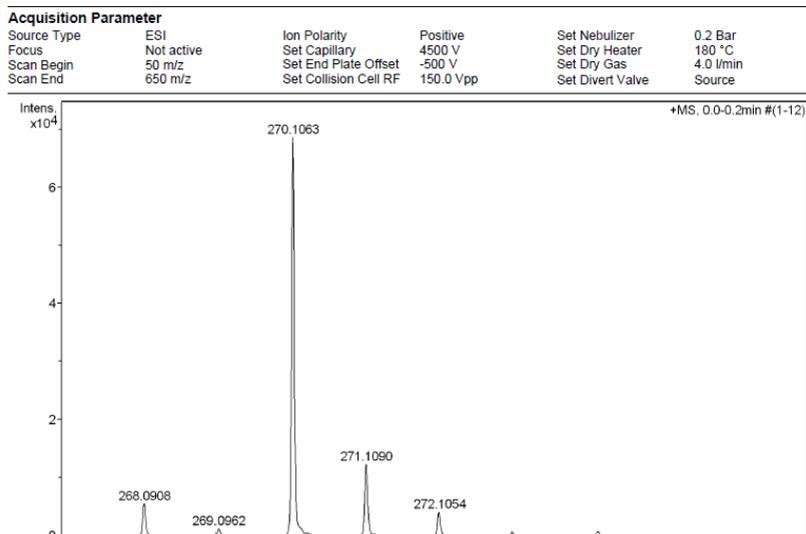
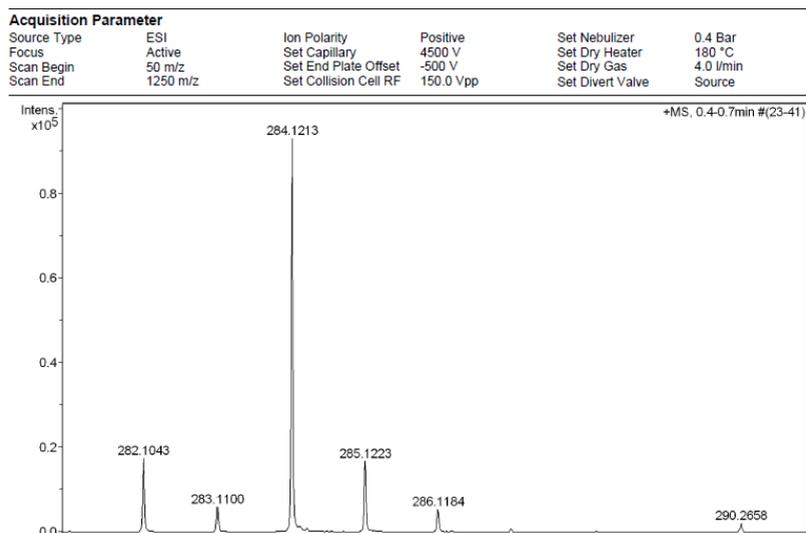
Figura 172. Espectro de massas de alta resolução do composto **35a**.**Figura 173.** Espectro de massas de alta resolução do composto **35b**.

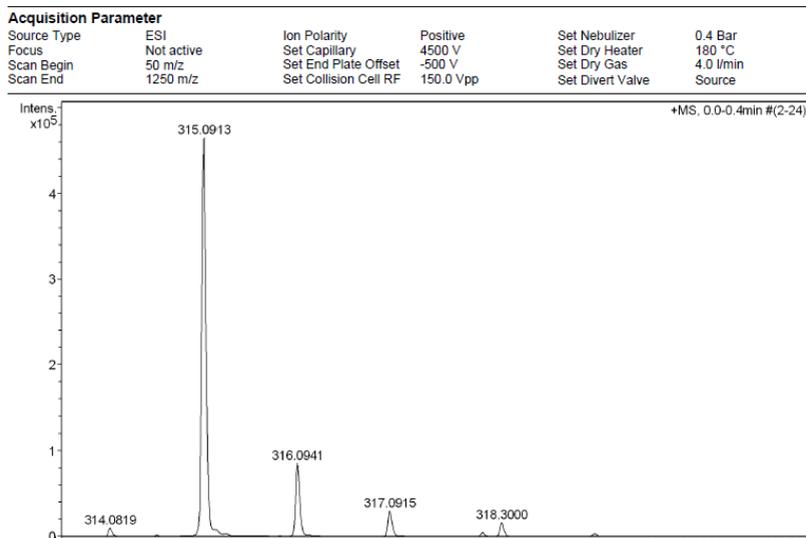
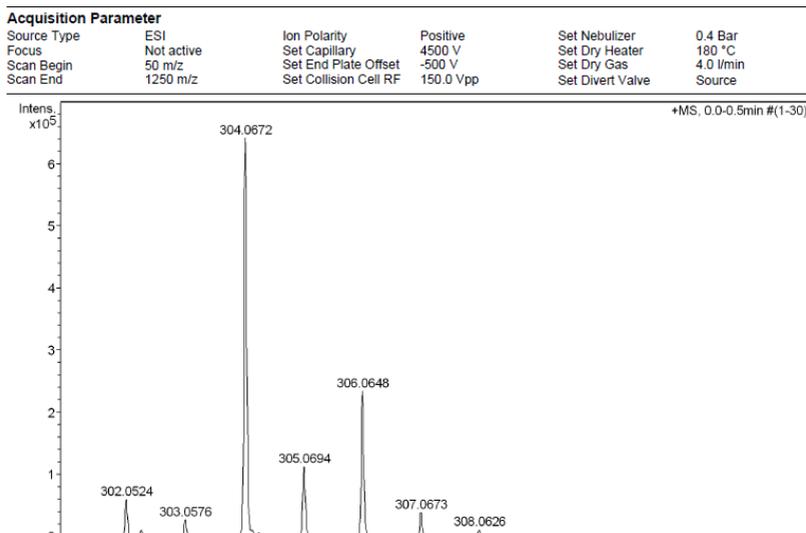
Figura 174. Espectro de massas de alta resolução do composto **35c**.**Figura 175.** Espectro de massas de alta resolução do composto **35d**.

Figura 176. Espectro de massas de alta resolução do composto **35e**.

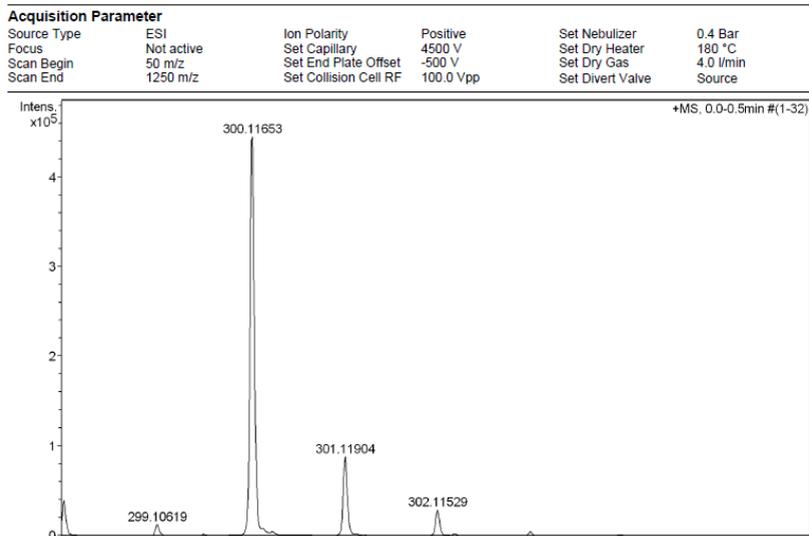


Figura 177. Espectro de massas de alta resolução do composto **35f**.

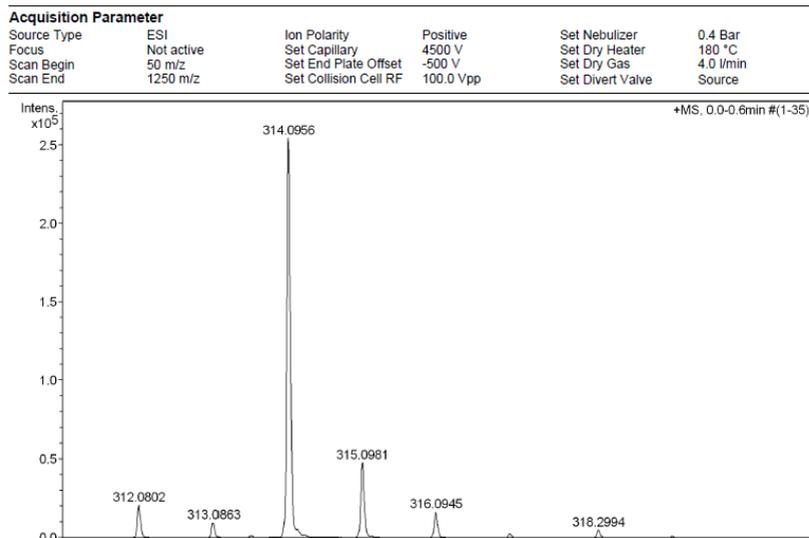


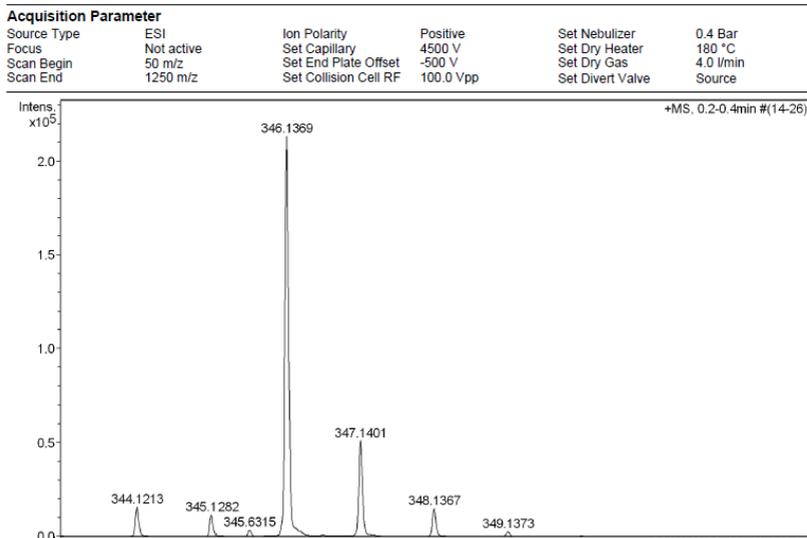
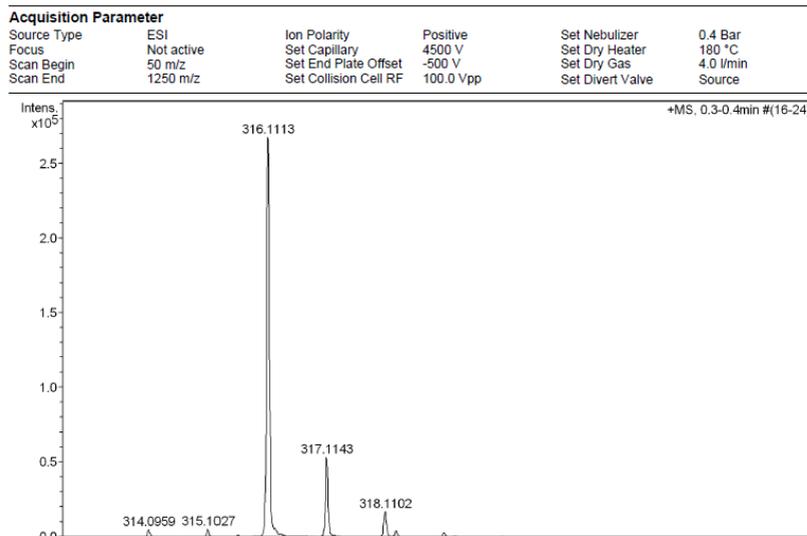
Figura 178. Espectro de massas de alta resolução do composto **35g**.**Figura 179.** Espectro de massas de alta resolução do composto **35h**.

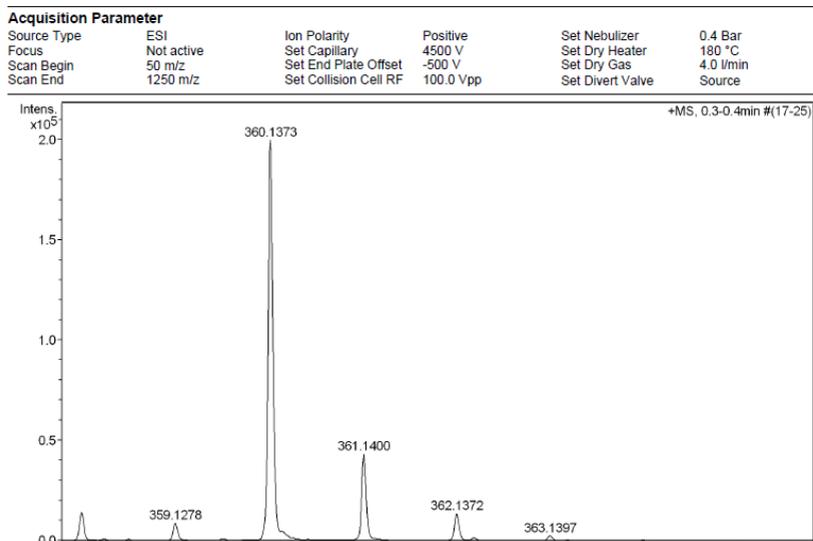
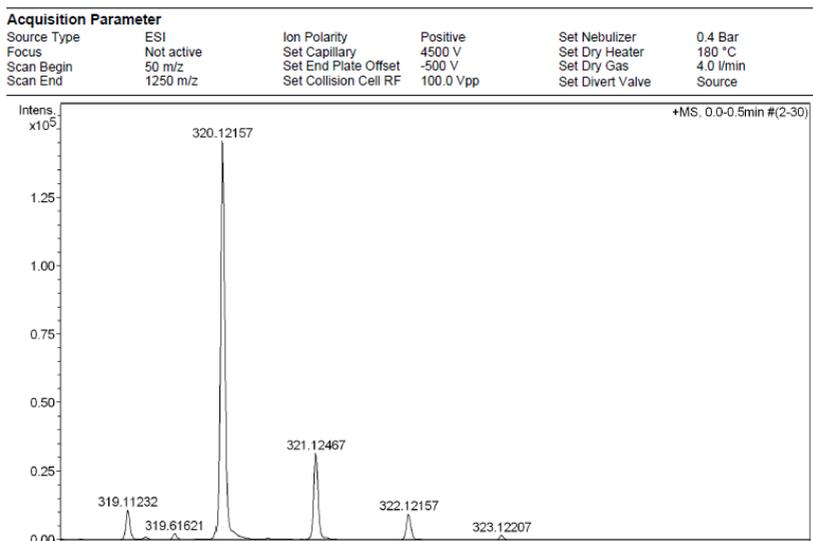
Figura 180. Espectro de massas de alta resolução do composto **35i**.**Figura 181.** Espectro de massas de alta resolução do composto **35j**.

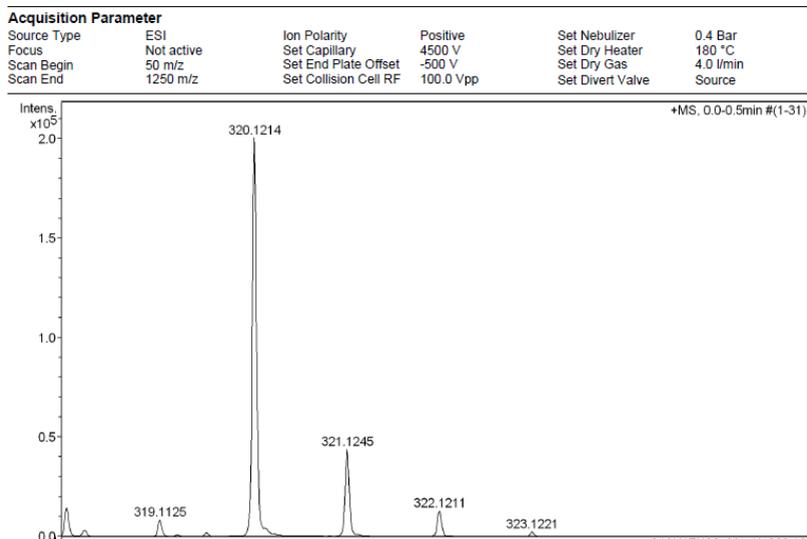
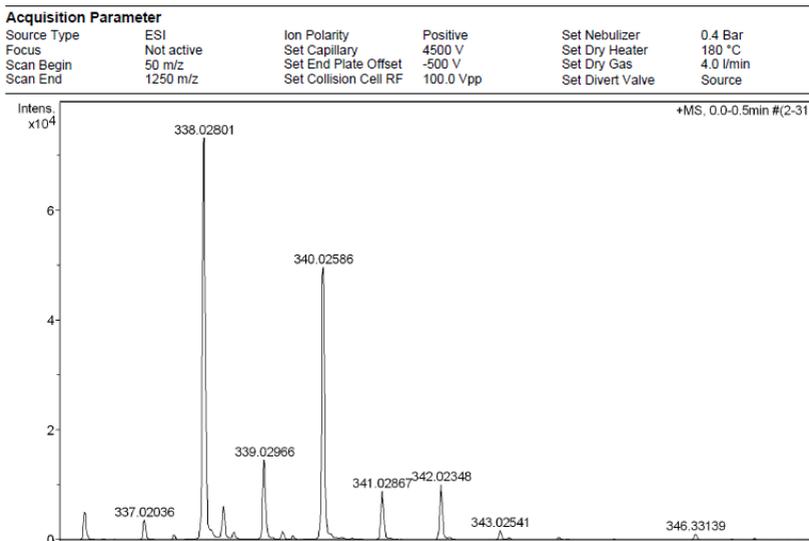
Figura 182. Espectro de massas de alta resolução do composto **35k**.**Figura 183.** Espectro de massas de alta resolução do composto **35l**.

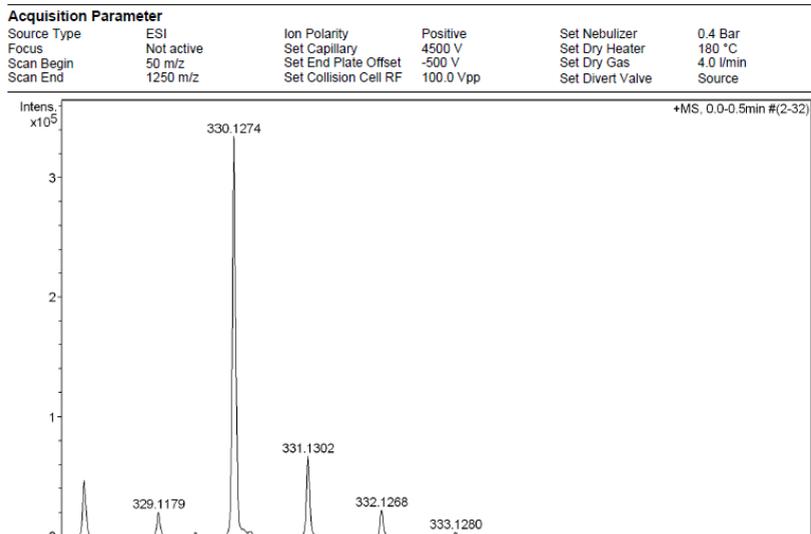
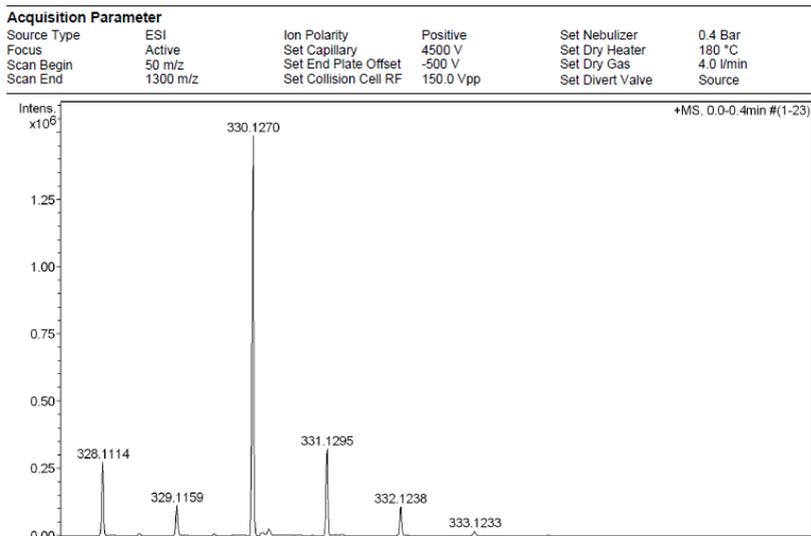
Figura 184. Espectro de massas de alta resolução do composto **35m**.**Figura 185.** Espectro de massas de alta resolução do composto **35n**.

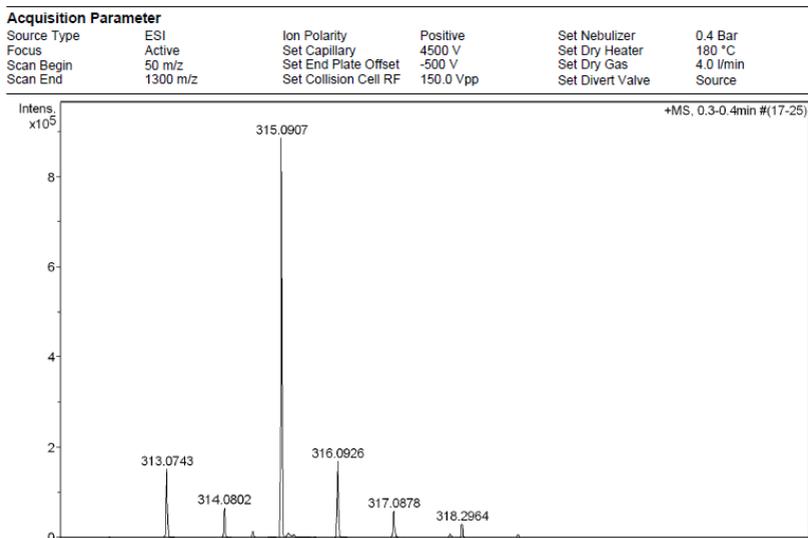
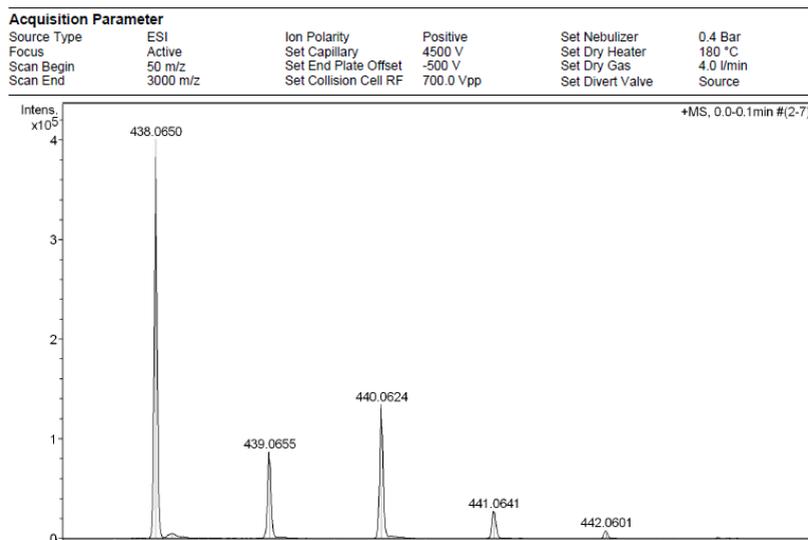
Figura 186. Espectro de massas de alta resolução do composto **35o**.**Figura 187.** Espectro de massas de alta resolução do composto **35p**.

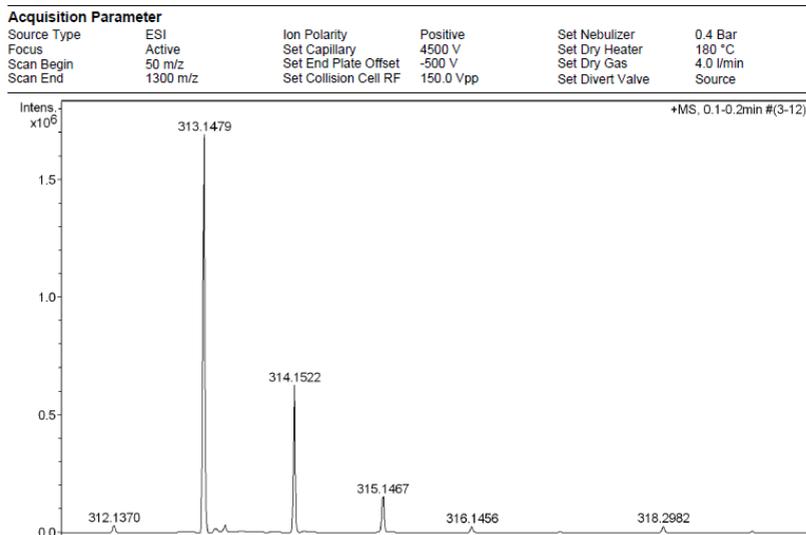
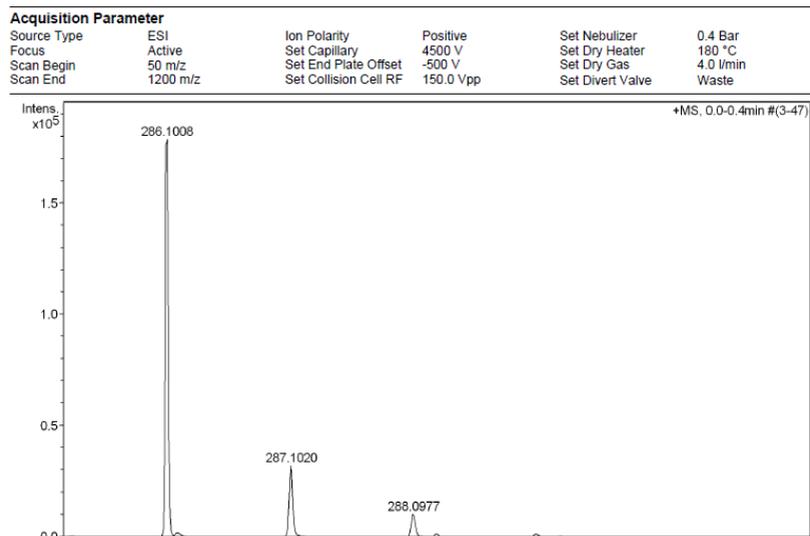
Figura 188. Espectro de massas de alta resolução do composto **35q**.**Figura 189.** Espectro de massas de alta resolução do composto **36a**.

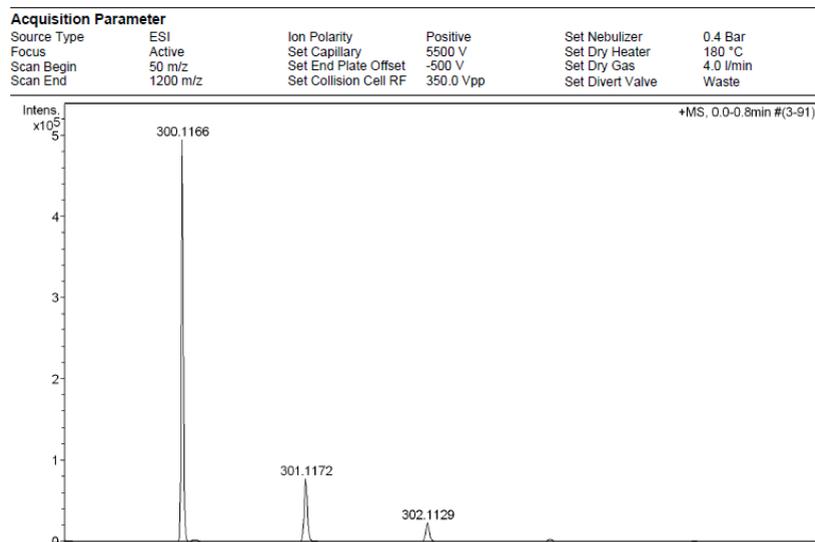
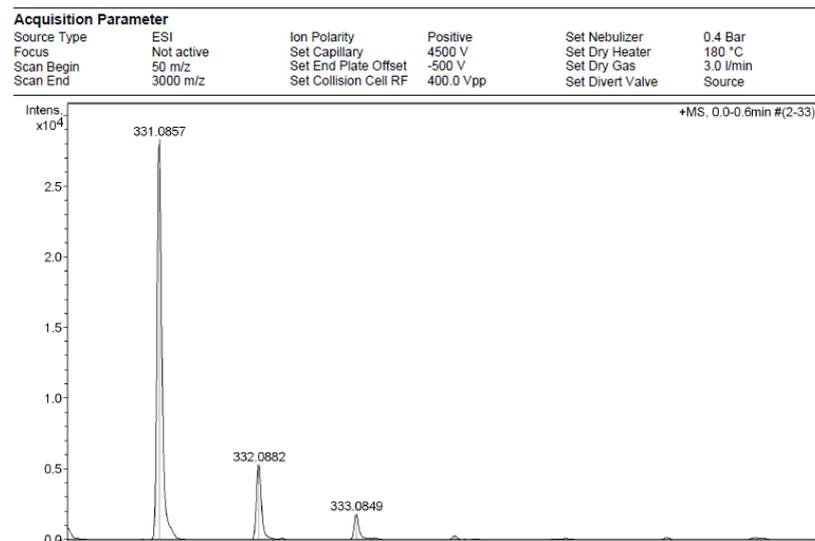
Figura 190. Espectro de massas de alta resolução do composto **36b**.**Figura 191.** Espectro de massas de alta resolução do composto **36c**.

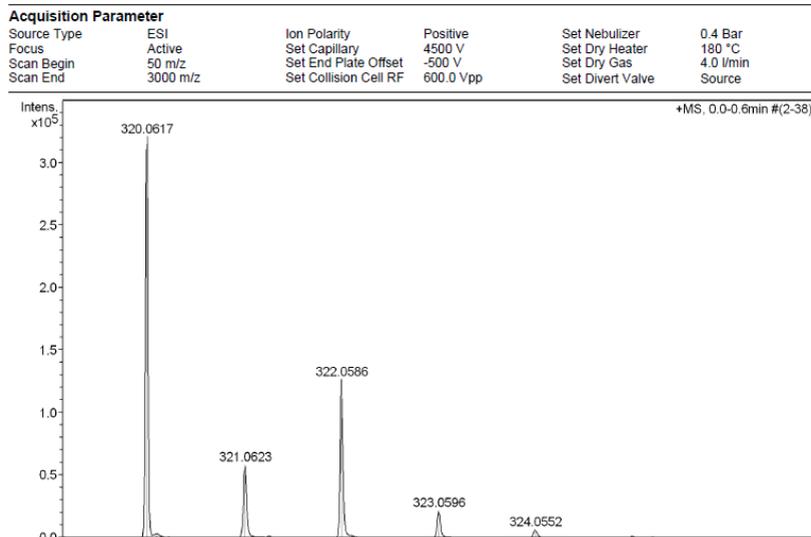
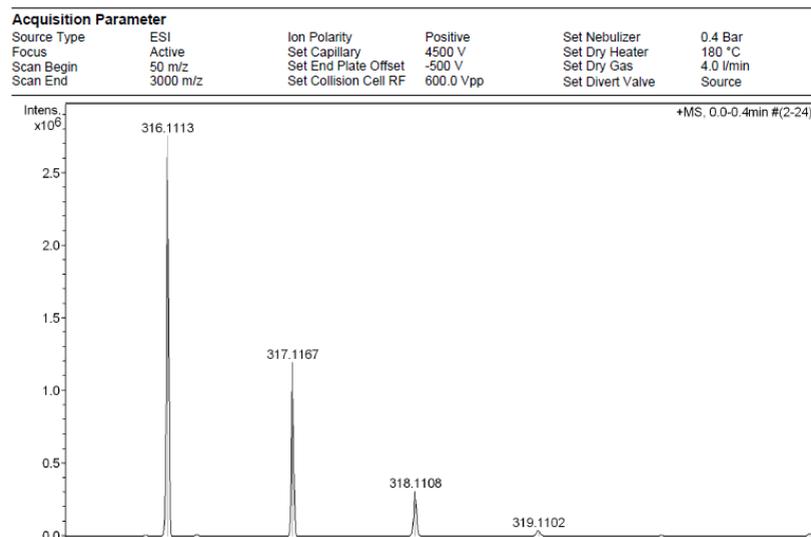
Figura 192. Espectro de massas de alta resolução do composto **36d**.**Figura 193.** Espectro de massas de alta resolução do composto **36e**.

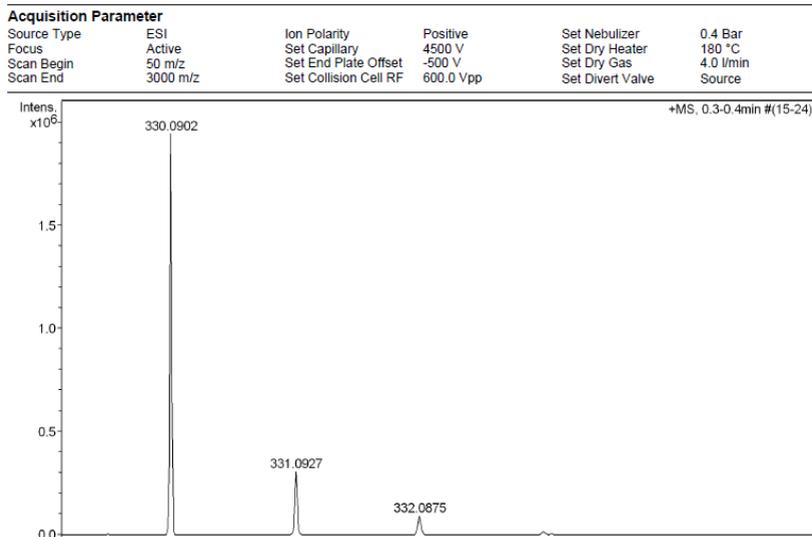
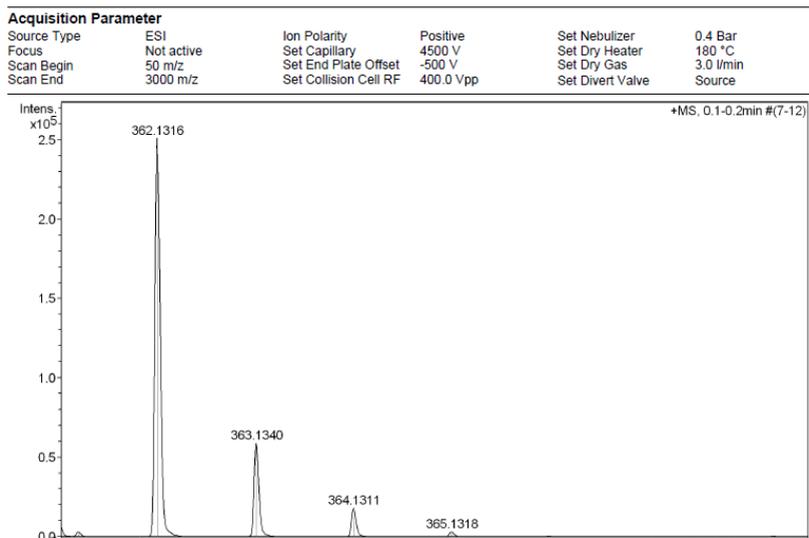
Figura 194. Espectro de massas de alta resolução do composto **36f**.**Figura 195.** Espectro de massas de alta resolução do composto **36g**.

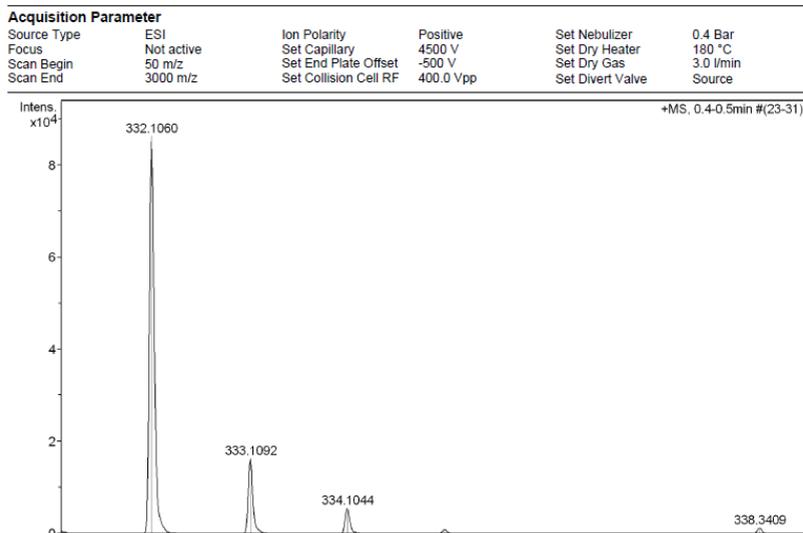
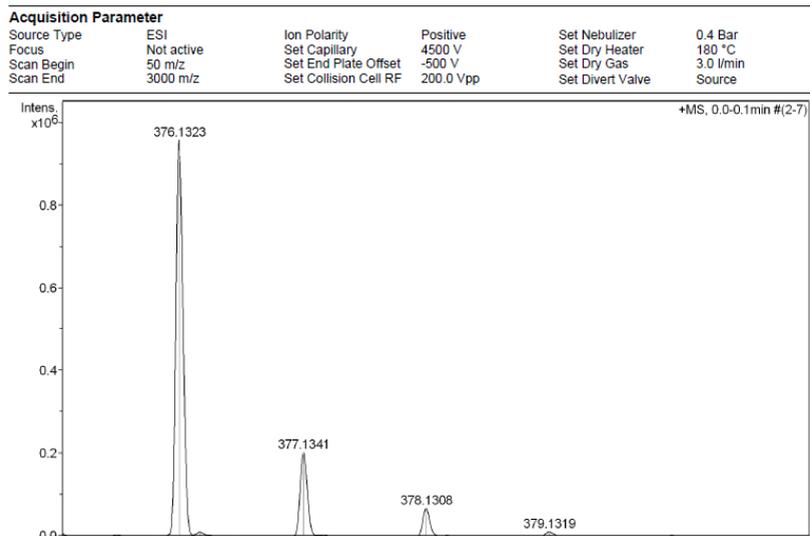
Figura 196. Espectro de massas de alta resolução do composto **36h**.**Figura 197.** Espectro de massas de alta resolução do composto **36i**.

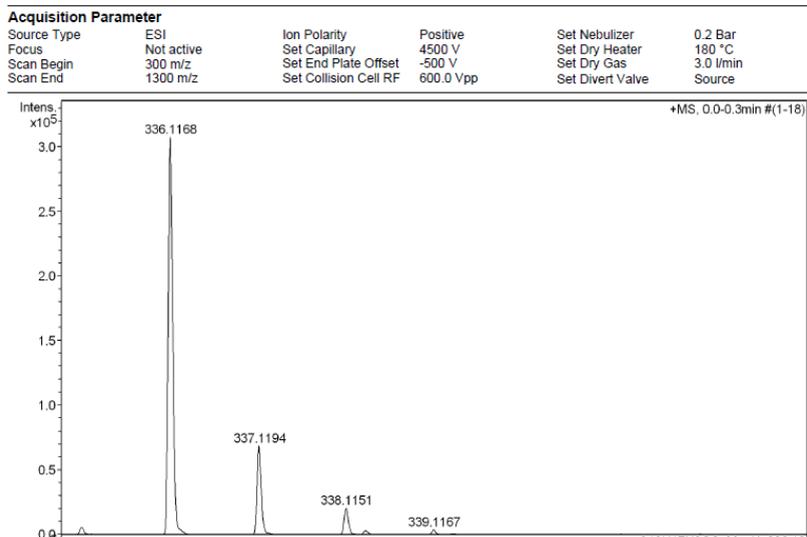
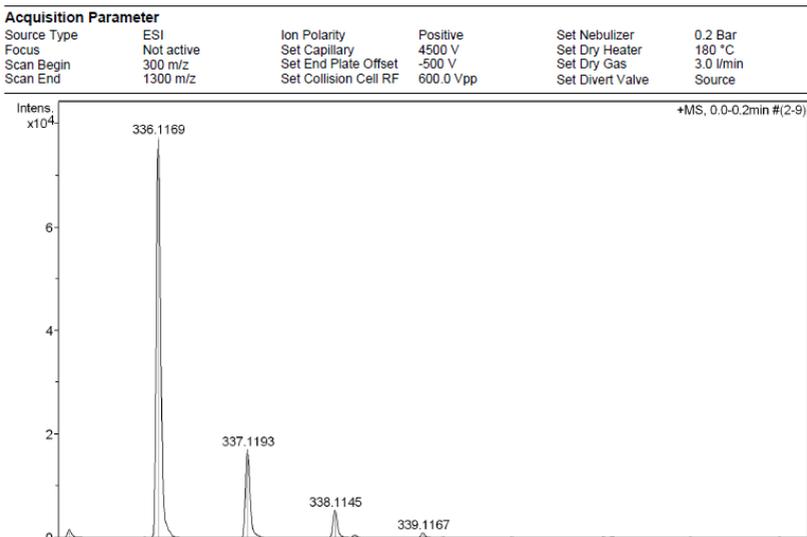
Figura 198. Espectro de massas de alta resolução do composto **36j**.**Figura 199.** Espectro de massas de alta resolução do composto **36k**.

Figura 200. Espectro de massas de alta resolução do composto **36l**.

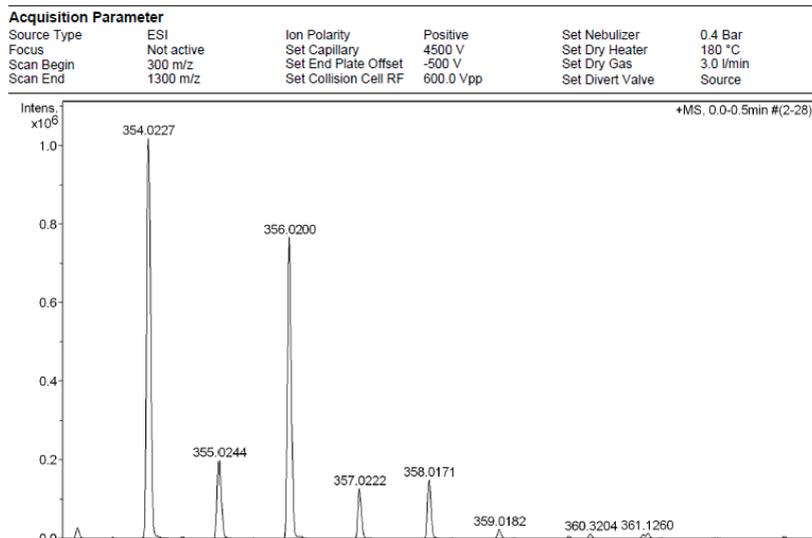


Figura 201. Espectro de massas de alta resolução do composto **36m**.

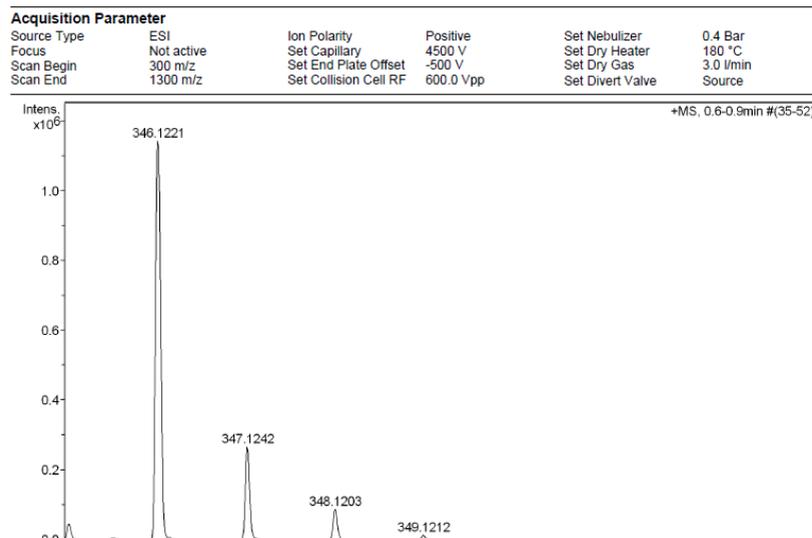


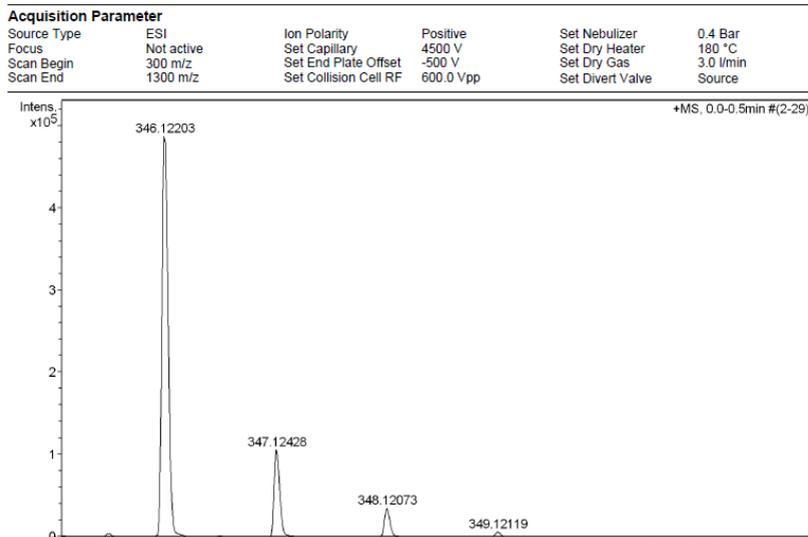
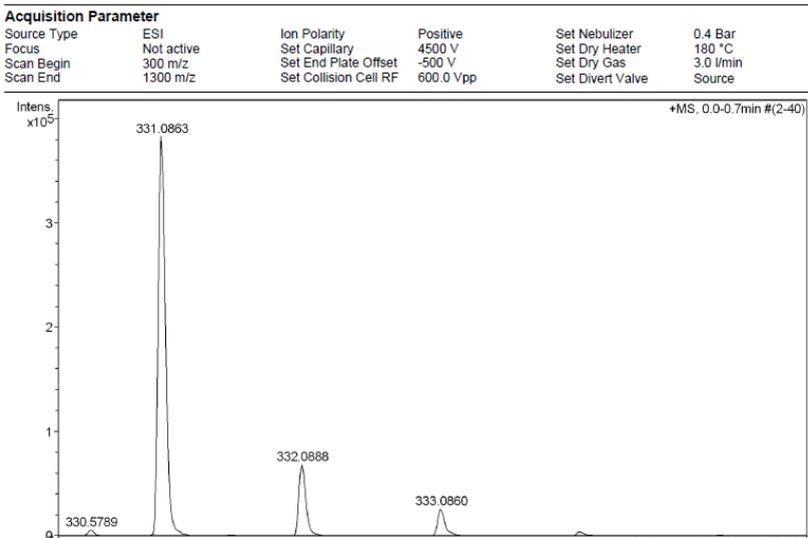
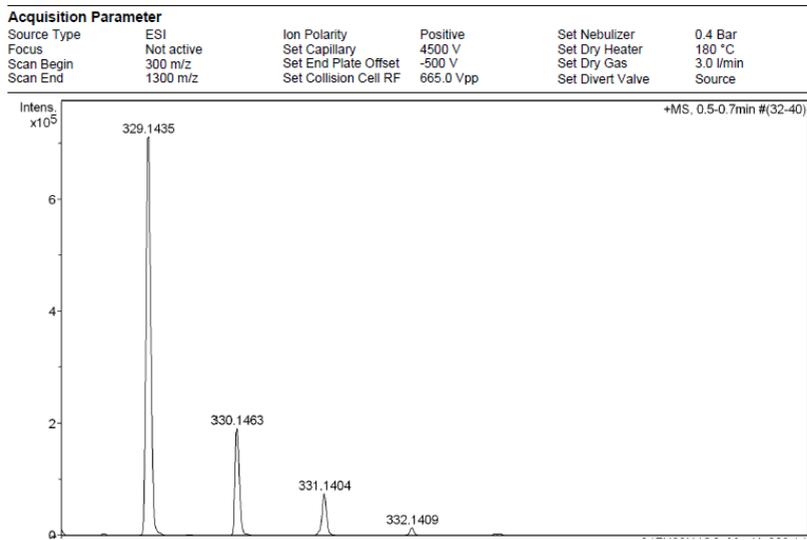
Figura 202. Espectro de massas de alta resolução do composto **36n**.**Figura 203.** Espectro de massas de alta resolução do composto **36o**.

Figura 204. Espectro de massas de alta resolução do composto **36p**.

**APÊNDICE III- Superfície do HOMO e LUMO das
tiosemicarbazonas 35a-q.**

Figura 205. LUMO do composto 35a.

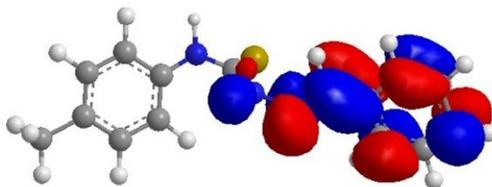


Figura 206. HOMO do composto 35a.

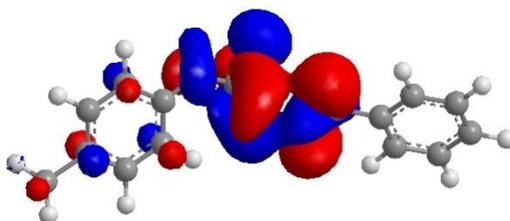


Figura 207. LUMO do composto 35b.

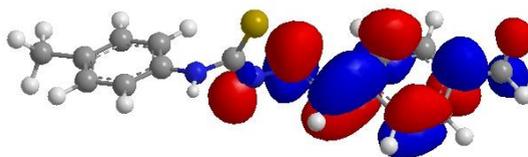


Figura 208. HOMO do composto 35b.

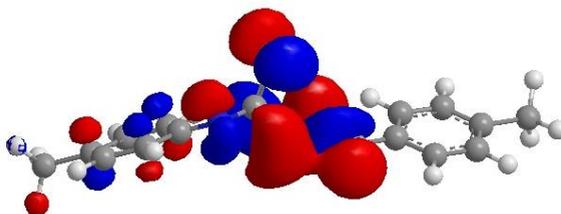


Figura 209. LUMO do composto 35c.

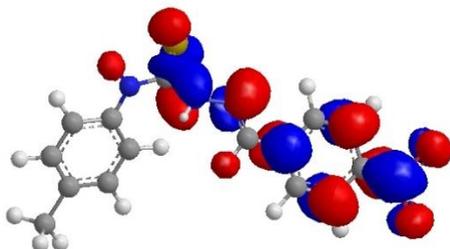


Figura 210. HOMO do composto 35c.

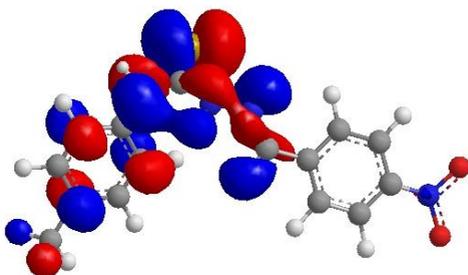


Figura 211. LUMO do composto 35d.

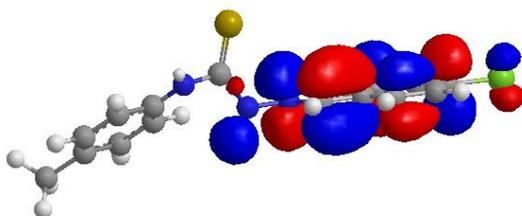


Figura 212. HOMO do composto 35d.

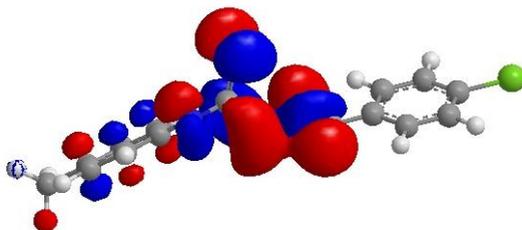


Figura 213. LUMO do composto 35e.

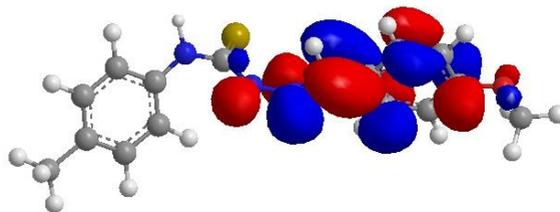


Figura 214. HOMO do composto 35e.

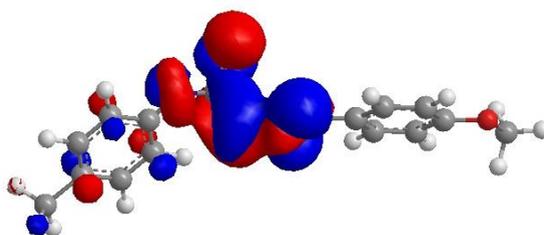


Figura 215. LUMO do composto 35f.

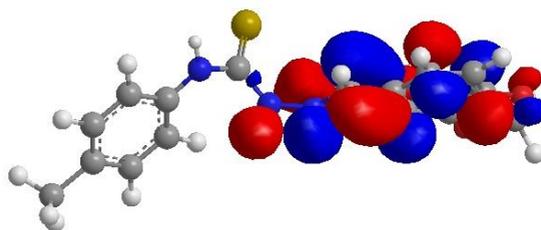


Figura 216. HOMO do composto 35f.

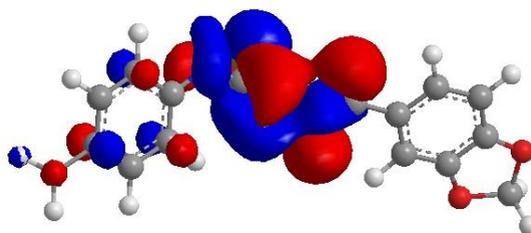


Figura 217. LUMO do composto 35g.

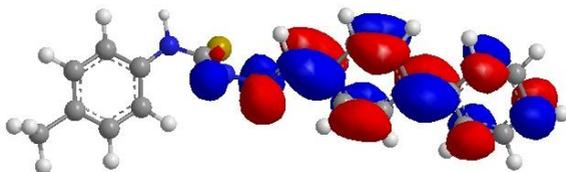


Figura 218. HOMO do composto 35g.

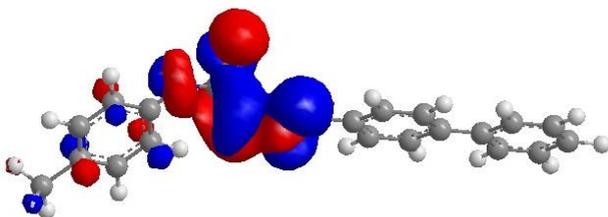


Figura 219. LUMO do composto 35h.

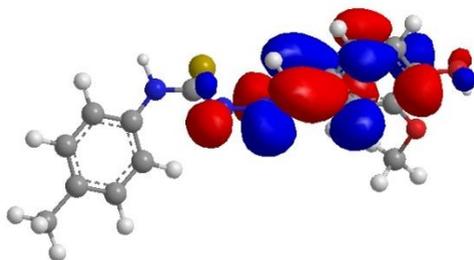


Figura 220. HOMO do composto 35h.

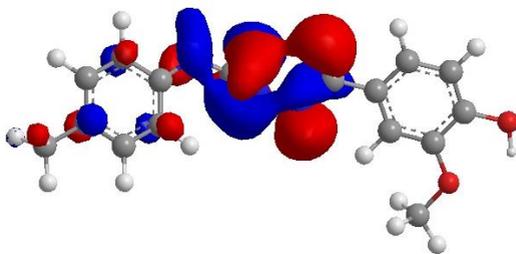


Figura 221. LUMO do composto 35i.

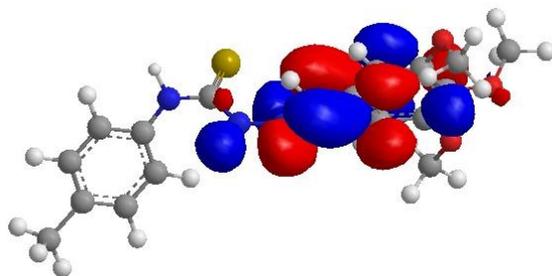


Figura 222. HOMO do composto 35i.

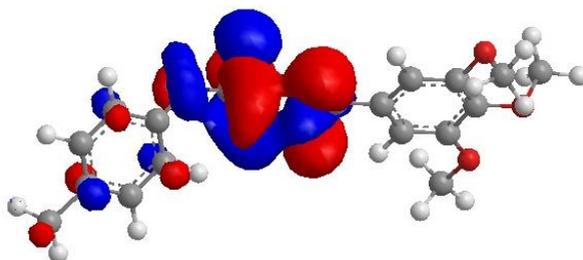


Figura 223. LUMO do composto 35j.

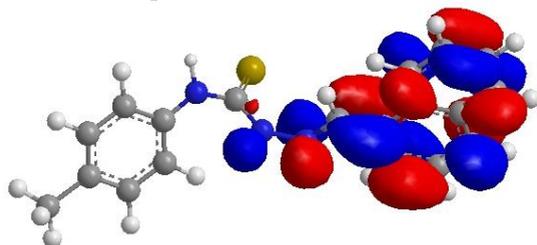


Figura 224. HOMO do composto 35j.

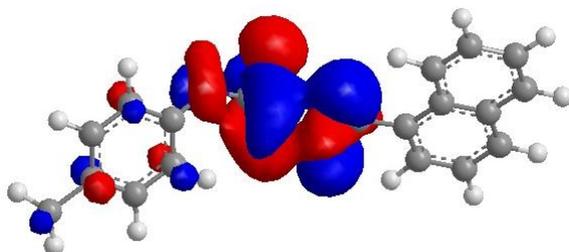


Figura 225. LUMO do composto 35k.

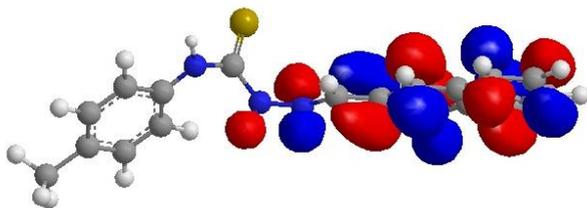


Figura 226. HOMO do composto 35k.

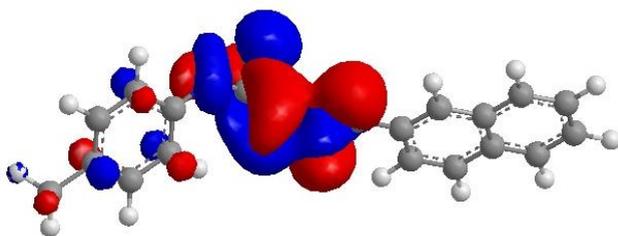


Figura 227. LUMO do composto 35l.

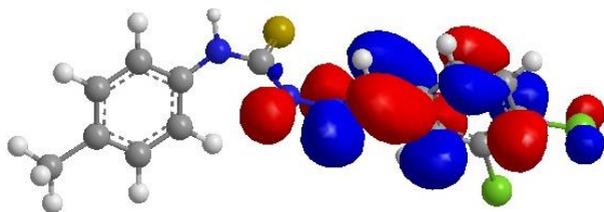


Figura 228. HOMO do composto 35l.

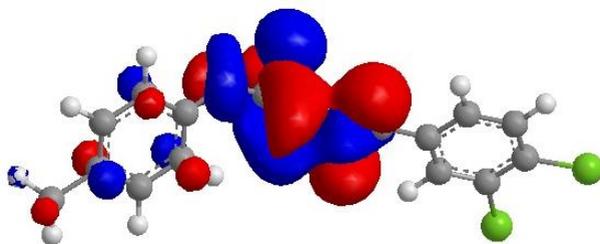


Figura 229. LUMO do composto 35m.

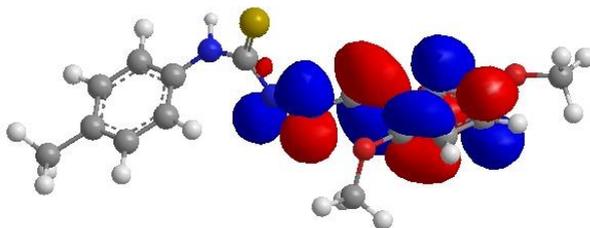


Figura 230. HOMO do composto 35m.

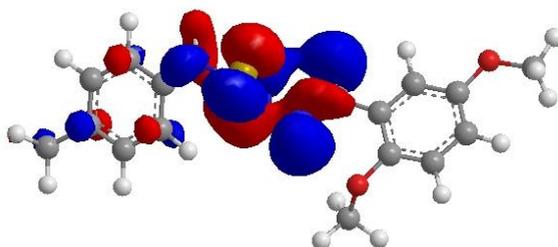


Figura 231. LUMO do composto 35n.

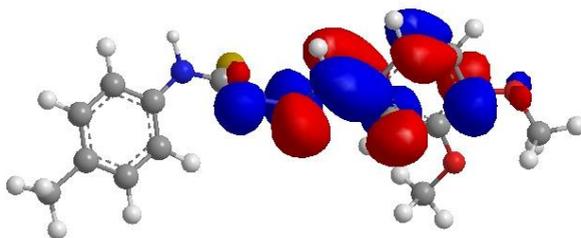


Figura 232. HOMO do composto 35n.

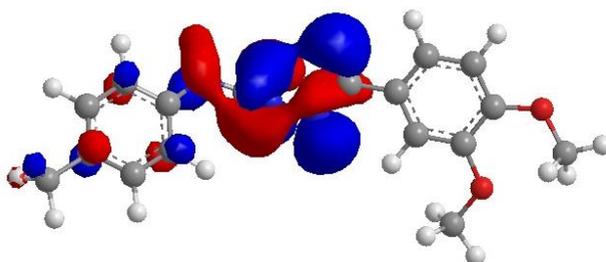


Figura 233. LUMO do composto 35o.

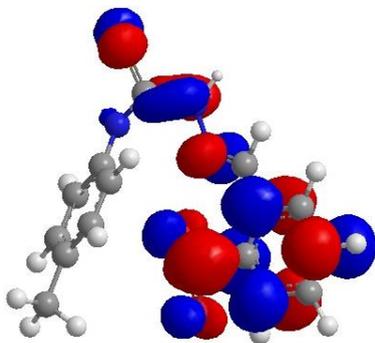


Figura 234. HOMO do composto 35o.

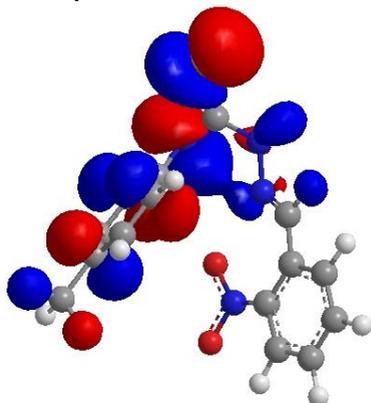


Figura 235. LUMO do composto 35p.

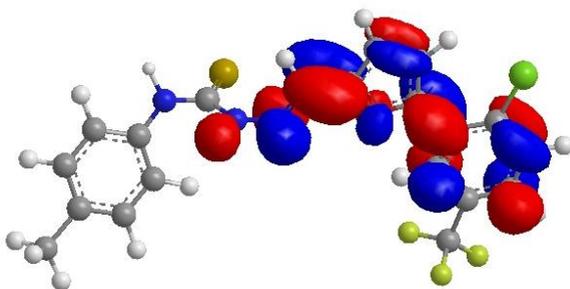


Figura 236. HOMO do composto 35p.

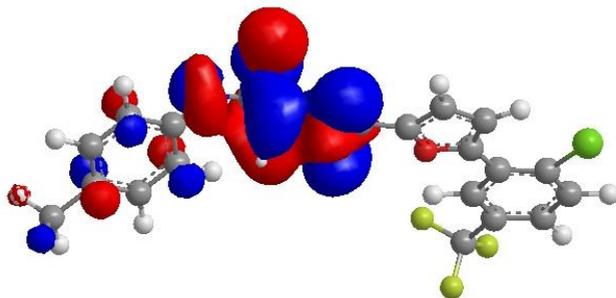


Figura 237. LUMO do composto 35q.

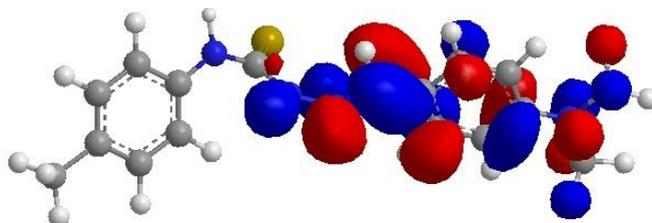
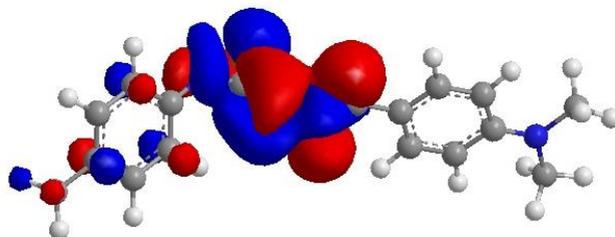


Figura 238. HOMO do composto 35q.



APÊNDICE IV- Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das amidas.

Figura 239. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **81a**.

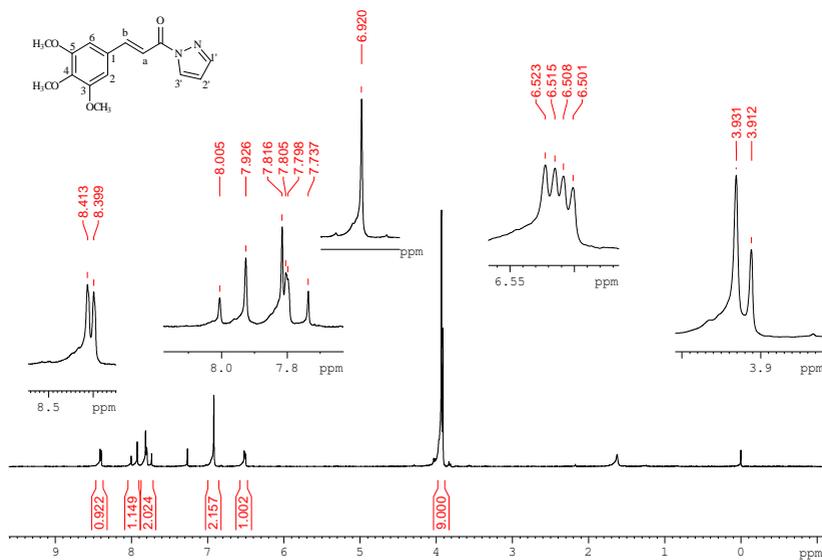


Figura 240. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **81a**.

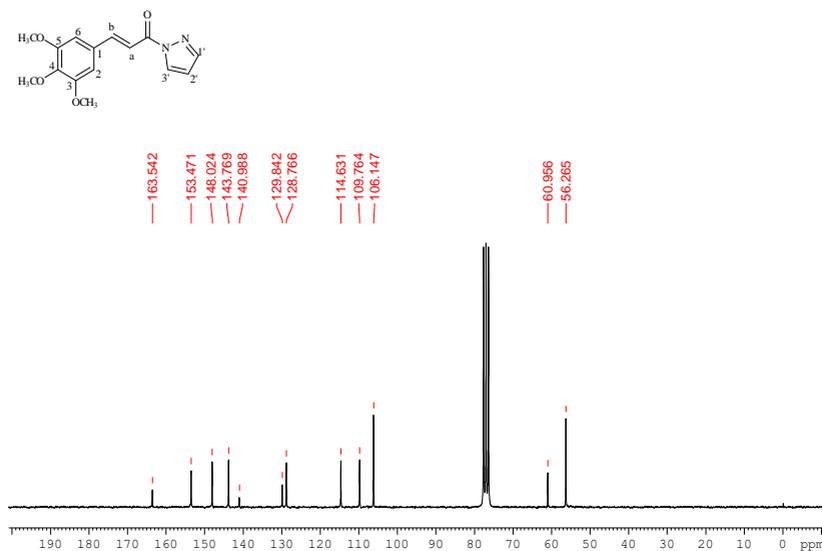


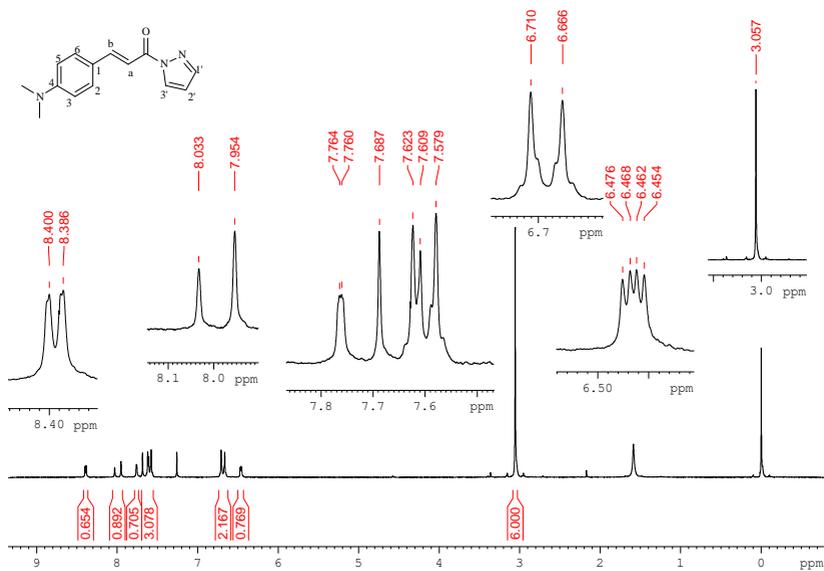
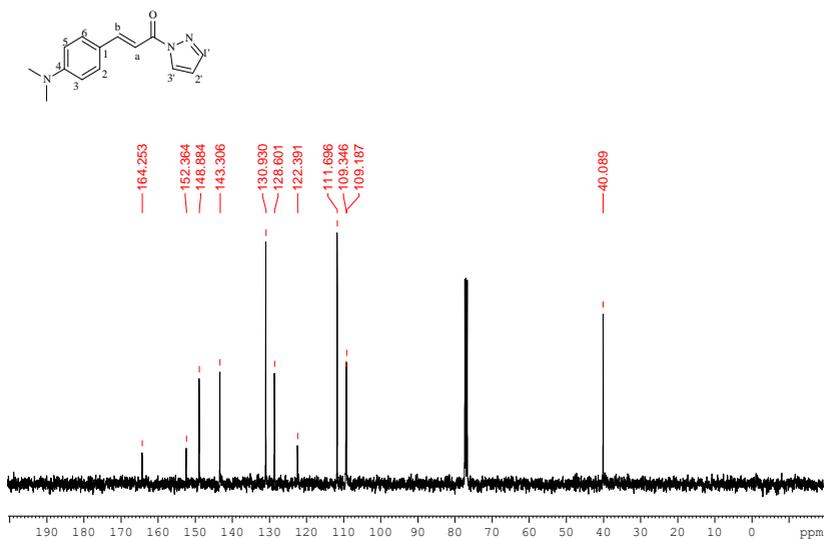
Figura 241. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **81b**.**Figura 242.** Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **81b**.

Figura 243. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **81c**.

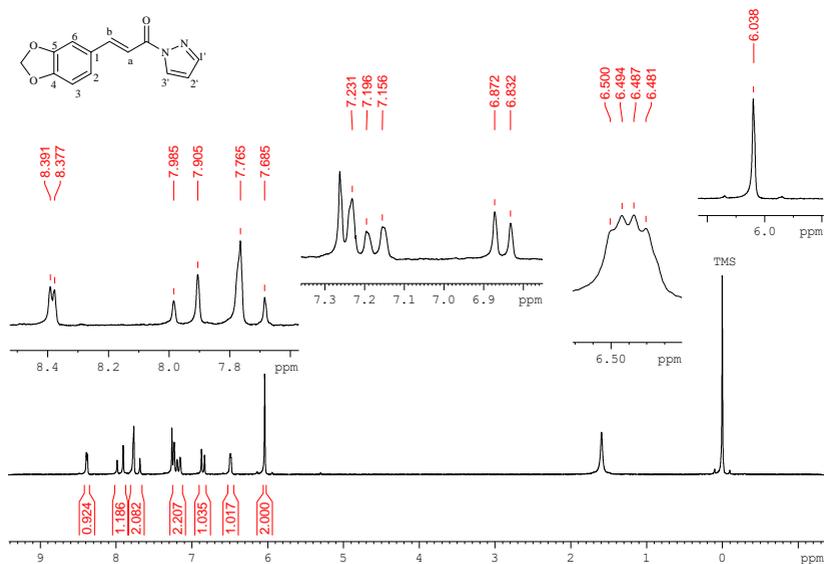


Figura 244. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **81c**.

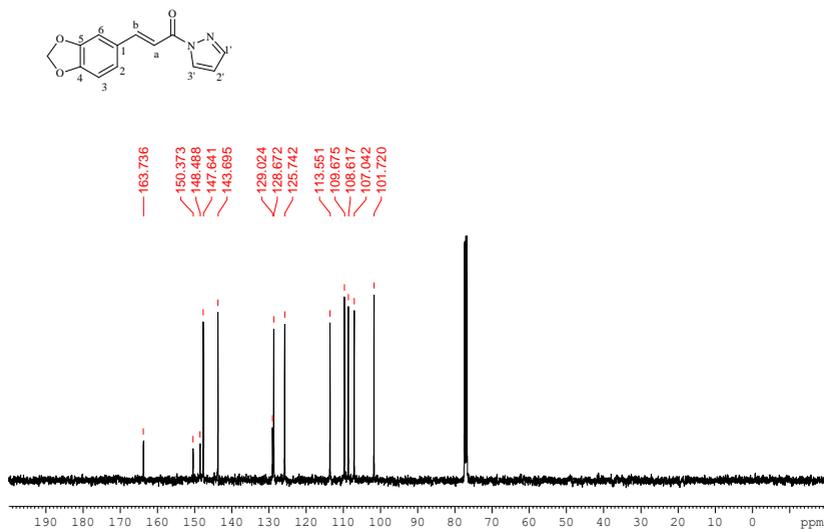


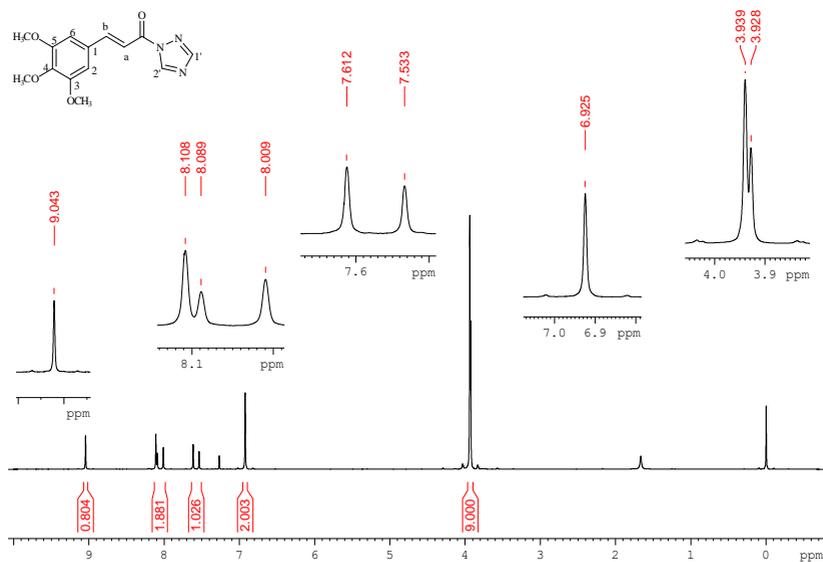
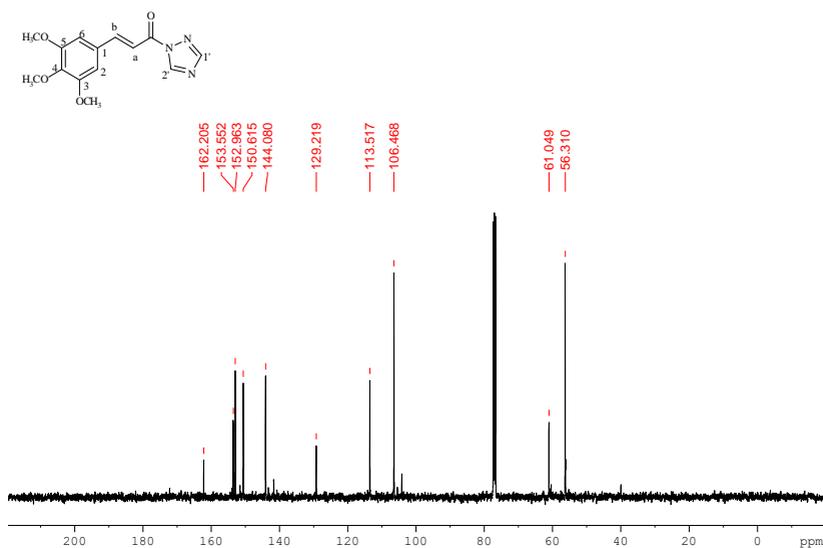
Figura 245. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **82a**.**Figura 246.** Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **82a**.

Figura 247. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **82b**.

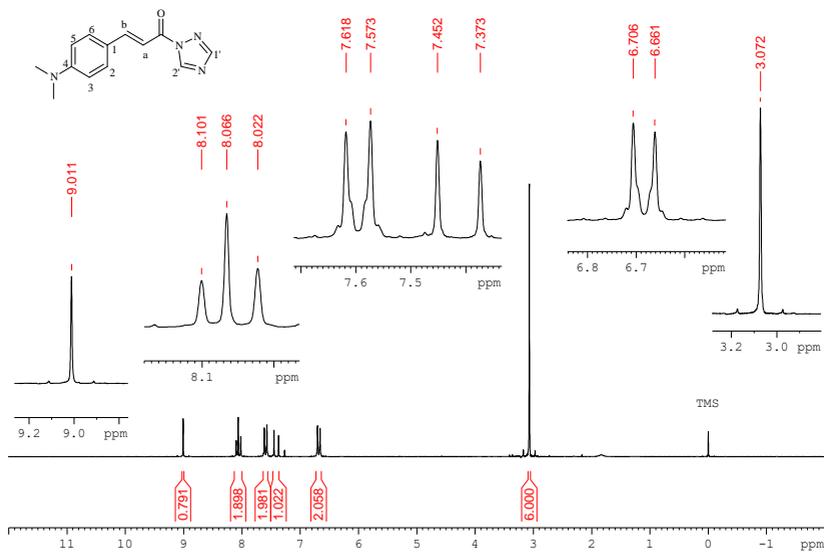


Figura 248. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **82b**.

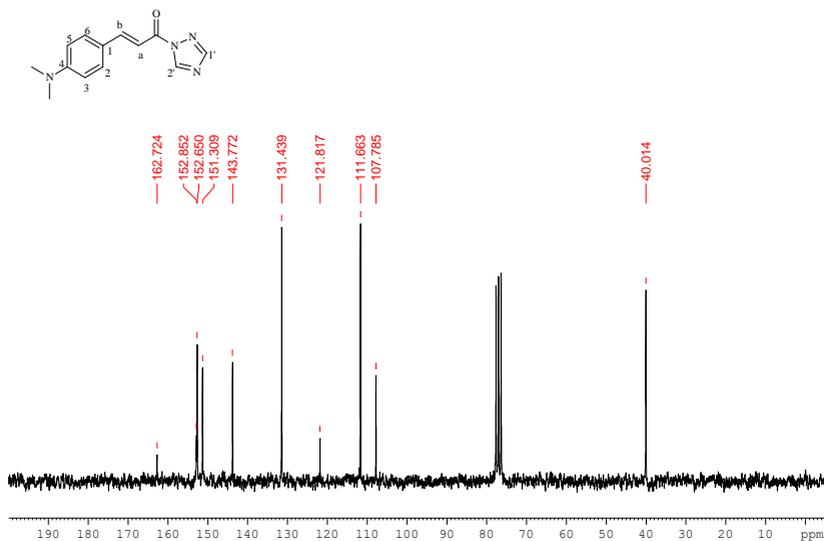


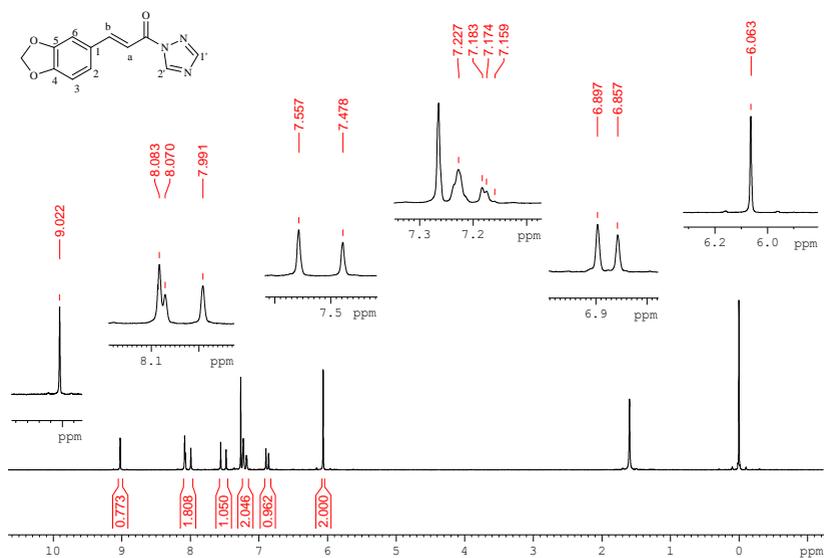
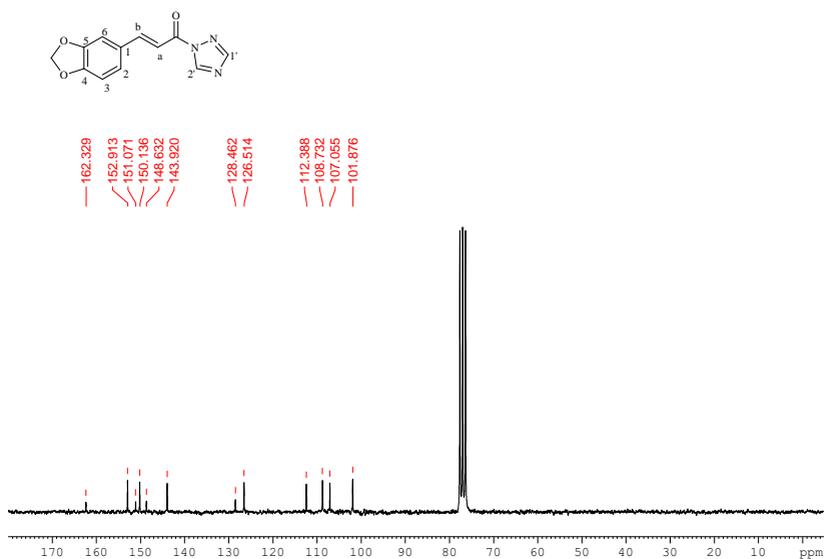
Figura 249. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **82c**.**Figura 250.** Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **82c**.

Figura 251. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **83a**.

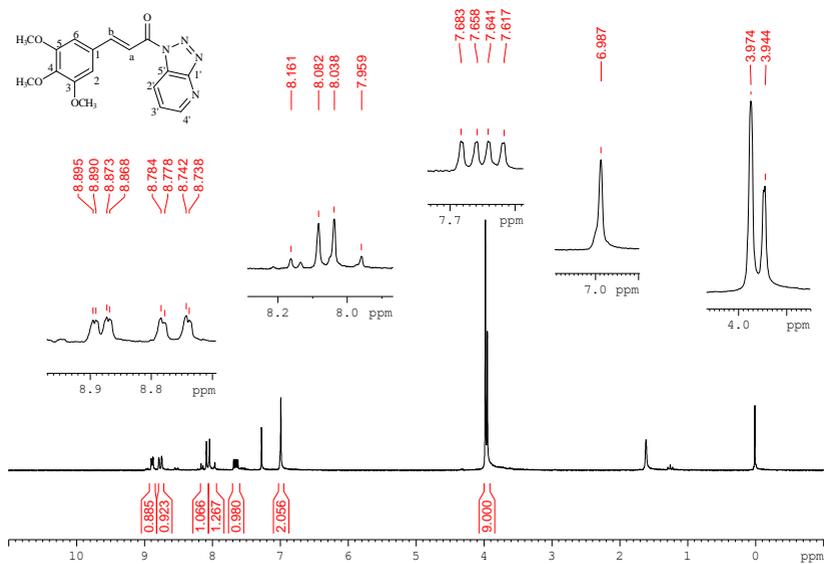


Figura 252. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **83a**.

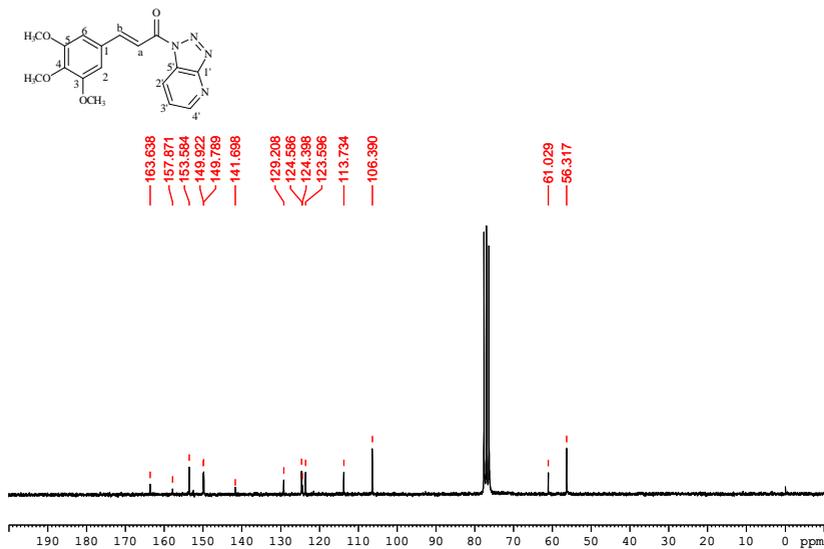


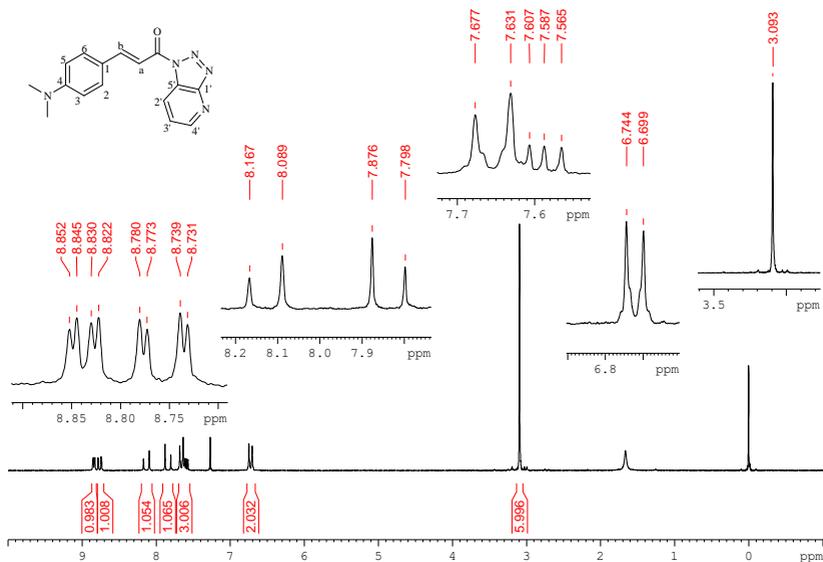
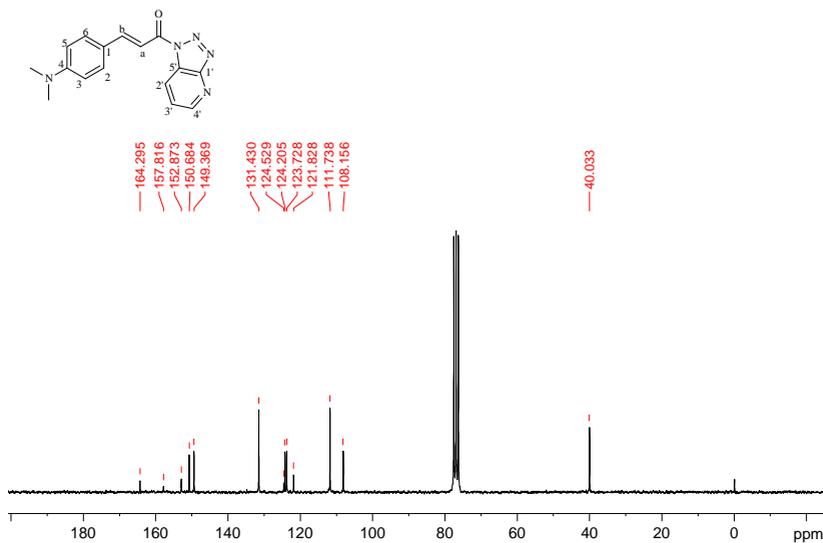
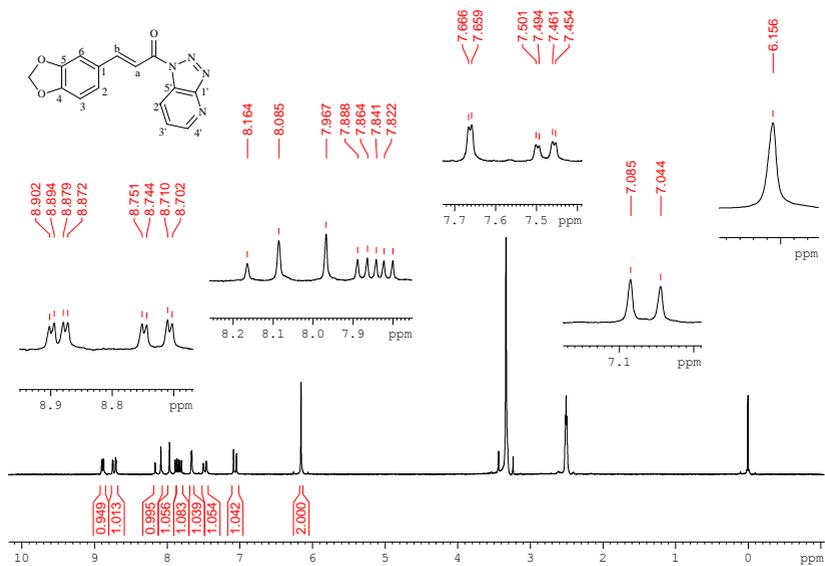
Figura 253. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **83b**.**Figura 254.** Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **83b**.

Figura 255. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **83c**.

APÊNDICE V- Espectros de massas de alta resolução das amidas.

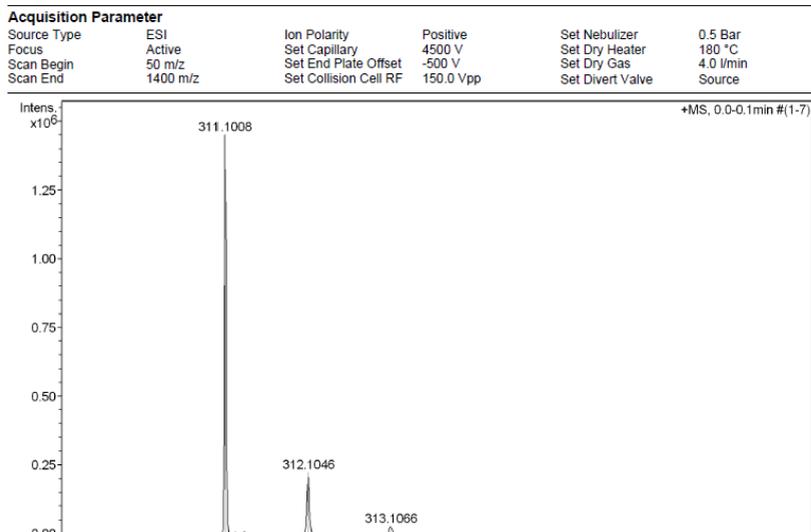
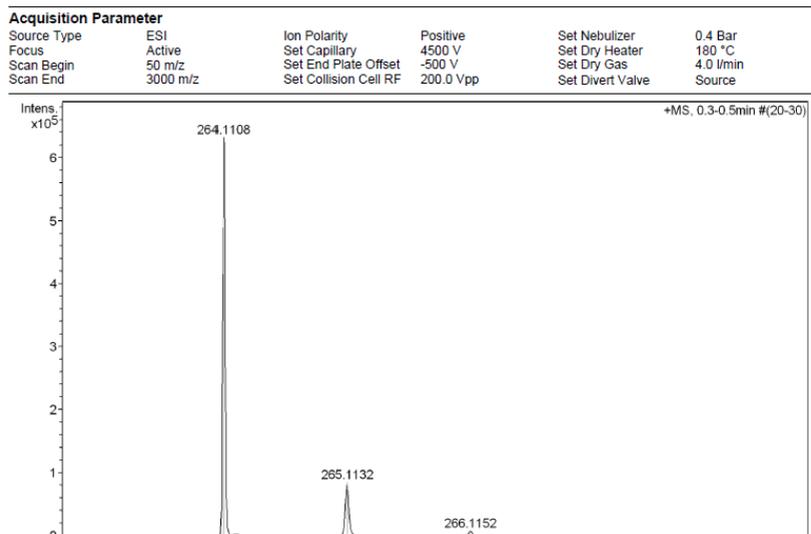
Figura 256. Espectro de massas de alta resolução do composto **81a**.**Figura 257.** Espectro de massas de alta resolução do composto **81b**.

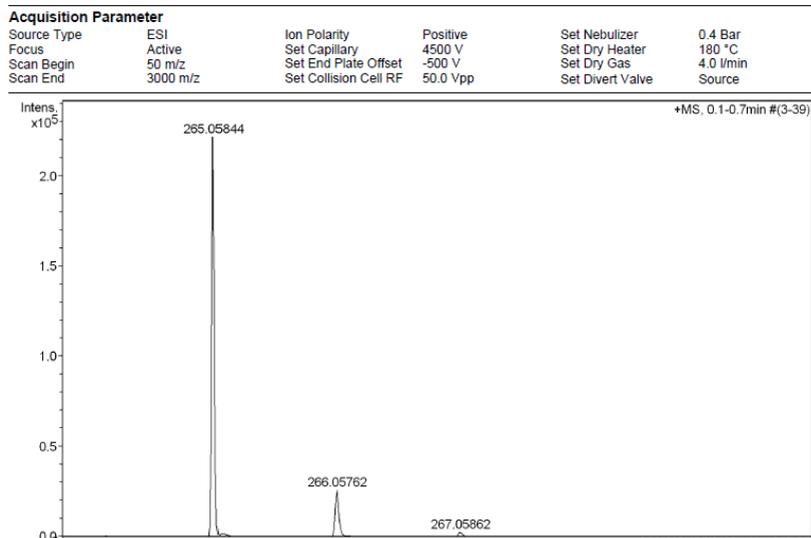
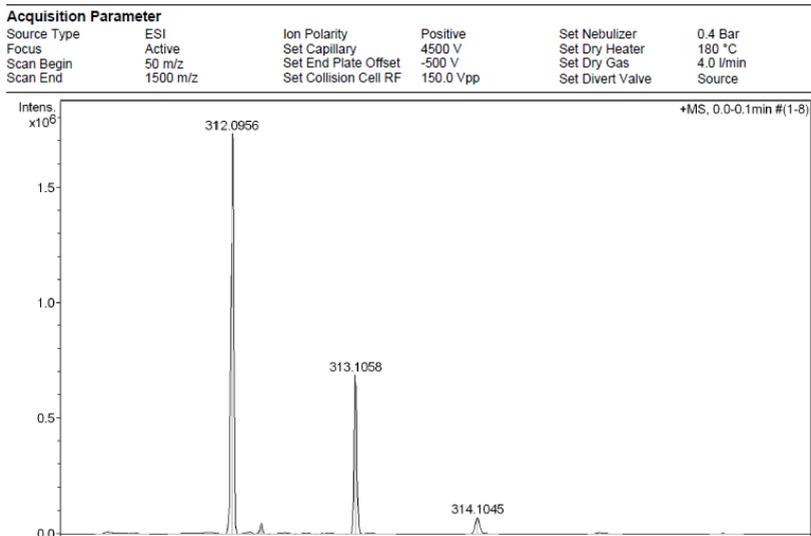
Figura 258. Espectro de massas de alta resolução do composto **81c**.**Figura 259.** Espectro de massas de alta resolução do composto **82a**.

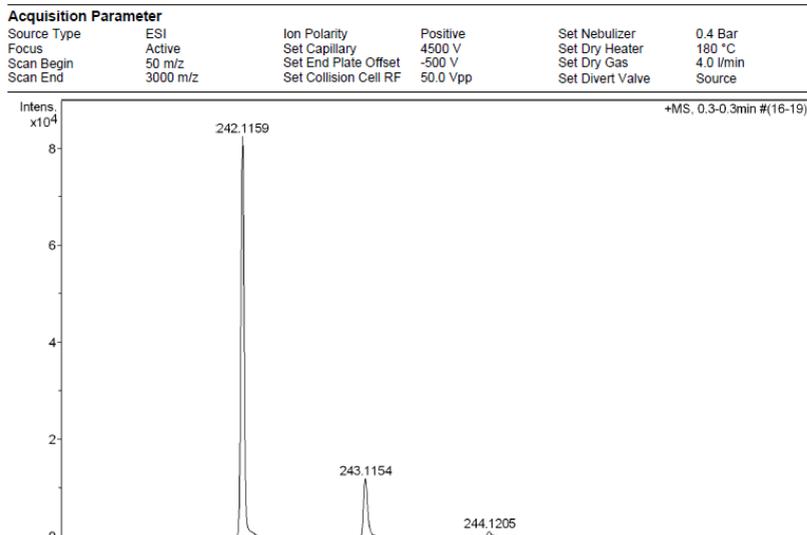
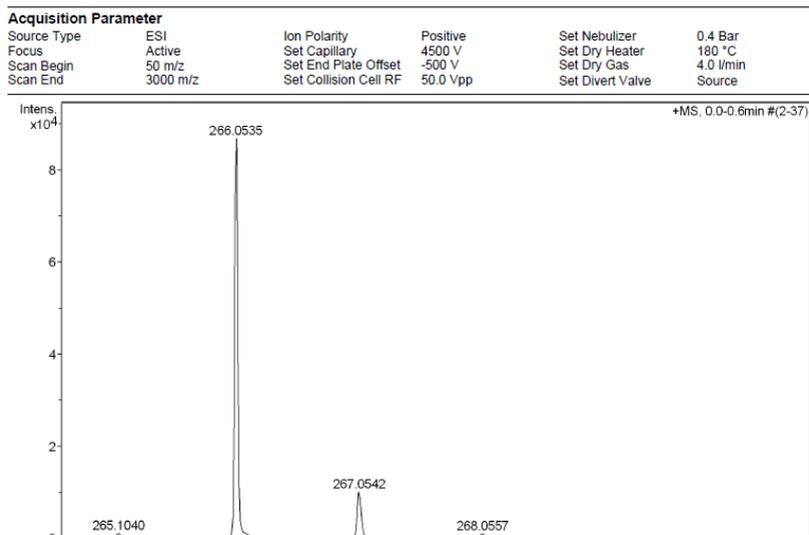
Figura 260. Espectro de massas de alta resolução do composto **82b**.**Figura 261.** Espectro de massas de alta resolução do composto **82c**.

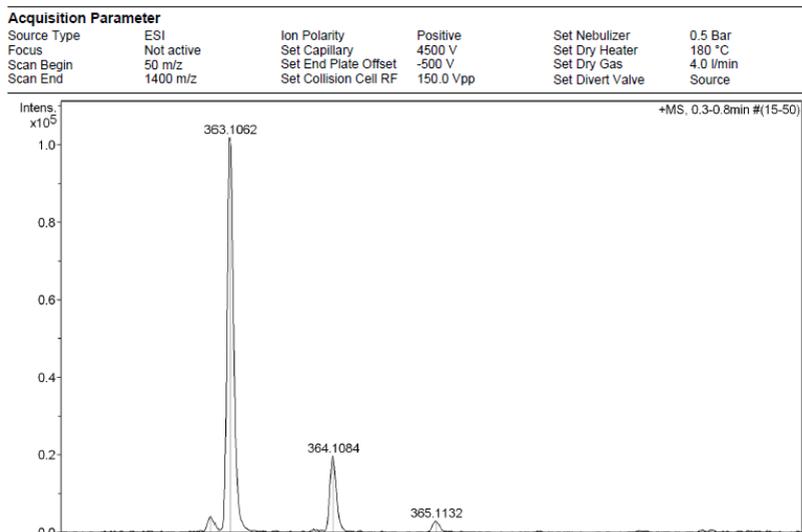
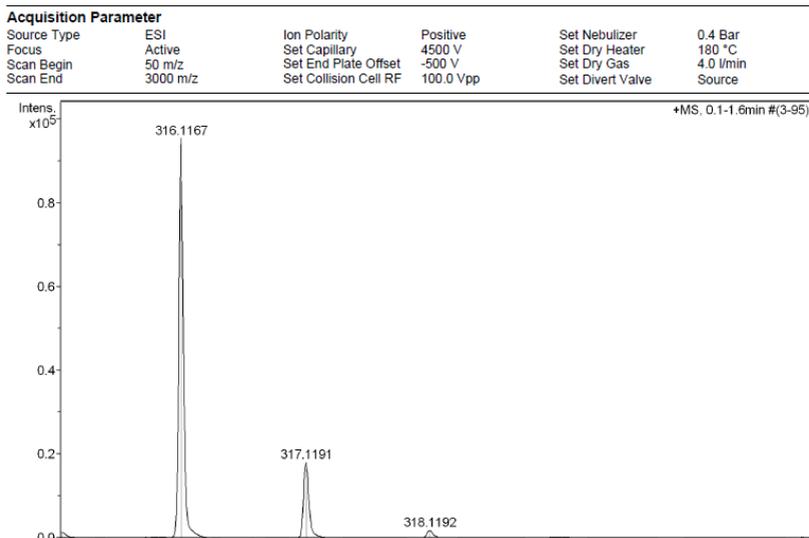
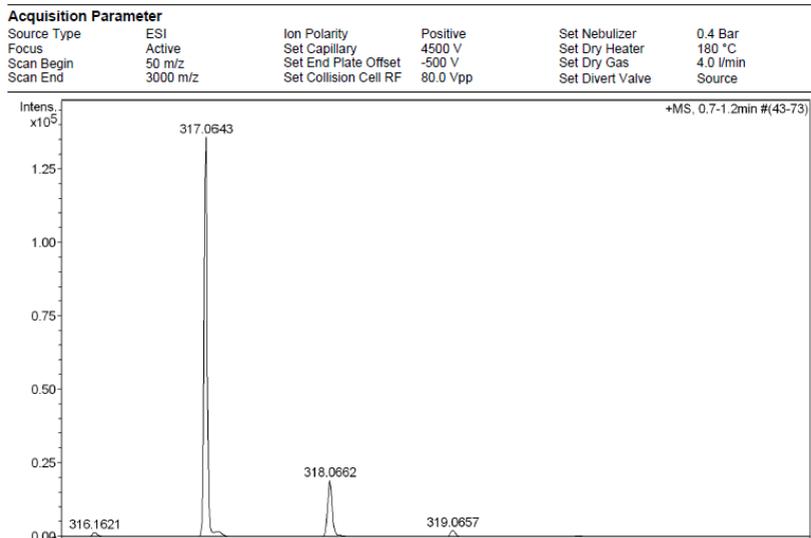
Figura 262. Espectro de massas de alta resolução do composto **83a**.**Figura 263.** Espectro de massas de alta resolução do composto **83b**.

Figura 264. Espectro de massas de alta resolução do composto **83c**.

**APÊNDICE VI- Artigos publicados e em fase de submissão
relacionados à tese.**

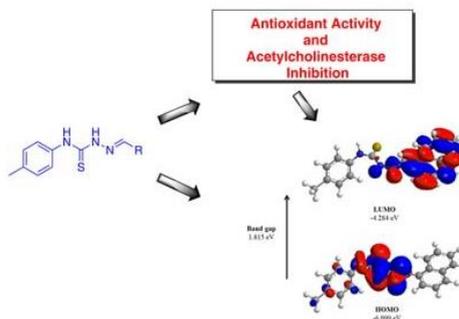
Figura 265. Artigo aceito e publicado na revista JBACS.

J. Braz. Chem. Soc. **2018**, *29(2)*, 343-352

Synthesis, Antioxidant Activity, Acetylcholinesterase Inhibition and Quantum Studies of Thiosemicarbazones

Larissa Sens; Aldo S. de Oliveira; Alessandra Mascarello; Inês M. C. Brighente; Rosendo A. Nunes; Ricardo J. Nunes

[How to cite this article](#)



The current study investigated the antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition and quantum studies of thiosemicarbazones.

<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170146>

Published online: August 4, 2017

[Share](#) [PDF](#) [Supplementary Information](#)

Figura 266. Artigo em fase de submissão.



Bioorganic & Medicinal Chemistry
journal homepage: www.elsevier.com

Synthetic thiosemicarbazones as a new class of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase A (PtpA) inhibitors

Larissa Sens^{a,*}, Ana Caroline Arruda de Souza^b, Lucas Antonio Pacheco^a, Alessandra Mascarello^a, Ricardo José Nunes^b and Hernán Terenzi^b

^aLaboratório Estrutura e Atividade, Departamento de Química, LEAT-CFM-UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^bCentro de Biologia Molecular Estrutural, Departamento de Bioquímica, CEBIME-UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received
Received in revised form
Accepted
Available online

Keywords:
Tuberculosis
PtpA
Inhibitors
Thiosemicarbazones

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis, the causative agent of tuberculosis, secretes two protein tyrosine phosphatases, PtpA and PtpB. Inhibition of these enzymes attenuates the growth of *M. tuberculosis*. We report, for the first time, thiosemicarbazones as a novel class of PtpA inhibitors. Compounds were synthesized and biologically evaluated, revealing potent and selective inhibitors. Enzyme kinetic assays showed that compound 19 is the first non-competitive PtpA inhibitor to be reported and, therefore, a molecule of great interest. As it does not act within the enzyme's active site, it has better selectivity over the many protein tyrosine phosphatase homologues.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.