

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



SYBELLE CHRISTIANNE BATISTA DE LACERDA PEDROSA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDOS DO MECANISMO DE
AÇÃO ANTITUMORAL DE DERIVADOS INDÓLICOS**

Recife

2017

SYBELLE CHRISTIANNE BATISTA DE LACERDA PEDROSA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDOS DO MECANISMO DE
AÇÃO ANTITUMORAL DE DERIVADOS INDÓLICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas na área de Síntese e Planejamento de Fármacos.

Orientadora:

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

Co-Orientador:

Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira

Recife

2017

SYBELLE CHRISTIANNE BATISTA DE LACERDA PEDROSA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDOS DO MECANISMO DE
AÇÃO ANTITUMORAL DE DERIVADOS INDÓLICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas na área de Síntese e Planejamento de Fármacos.

Aprovada em: 30/05/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente e Orientadora)
Universidade Estadual de Pernambuco – UFPE

Prof^a. Dr^a. Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinador Interno)
Universidade Estadual de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Examinador Interno)
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Prof. Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima Souza (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof^a. Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco (UPE)

Recife

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR:

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas dourado

VICE-REITOR:

Prof^a. Dr^a Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE:

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE:

Prof^a. Dr^a. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS:

Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

SUB-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS:

Prof^a. Dr^a. Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS:**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS:**

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Recife

2017

DEDICO

À minha família

Aos meus Pais, Gilda Lacerda (in memoriam) e Otávio Lacerda, por todo carinho e amor, por terem me ensinado os valores da vida e o caminho do bem e por terem me fornecido as oportunidades para que eu pudesse conquistar meus objetivos com humildade e persistência, sempre me incentivando.

À minha irmã Isabelle Lacerda, por estar sempre ao meu lado me apoiando incondicionalmente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo Diogo Pedrosa, por todo amor, compreensão, paciência, suporte e constante encorajamento em todos esses anos juntos.

Ao meu filho Caio, o melhor e maior presente da minha vida que está chegando para tornar a minha vida mais amorosa, plena e me ensinar a ser uma pessoa melhor.

Enfim, sem vocês ao meu lado nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu infinito amor me permitir concluir este trabalho, iluminando-me e concedendo sabedoria e força durante toda a jornada.

Em especial à Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, minha orientadora, pela amizade de todos esses mais de 10 anos, por ter me recebido de volta após um período fora do estado, por sua confiança, por seu exemplo de ser como pessoa, contribuição e incentivo durante todo o ciclo da minha formação da Iniciação Científica ao Doutorado.

Ao Prof. Dr. Jamerson Oliveira por sua dedicação ao trabalho, amizade e paciência durante esses anos.

À Profa. Dra. Sinara Almeida por sua importante colaboração para o êxito deste trabalho.

À Profa. Dra. Elizabeth Lafayette por sua preciosa amizade e parceria em todos os momentos vivenciados durante a pós-graduação.

Aos professores pesquisadores João Ernesto de Carvalho e Ana Lúcia Tasca do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela colaboração na execução dos testes antiproliferativos dos compostos sintetizados deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr., do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, pela colaboração na execução de atividades essenciais para este estudo.

Ao Departamento de Química Fundamental – DQF, em especial à Eliete Barros, por toda sua atenciosidade na obtenção dos espectros deste estudo.

Aos meus amigos do LqIT, Tiago, Anekécia, Willams, Sérgio, Miguel, Cezar e Nayara pelo companheirismo, convivência e apoio durante todo o ciclo da minha formação.

Aos meus companheiros do LqIT, Íris, Allana, Ana Daura, Amélia, Luiz, Sandersonilo, Paula, Keriolaine, Diogo, Edson, Pedro e Bruno pela colaboração e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus coordenadores e colegas professores da UNIVASF, em especial os da UNIFAP pela compreensão e apoio durante todo o doutorado.

Aos meus alunos de ontem, hoje e amanhã, por de uma forma ou de outra serem o estímulo para eu prosseguir com meus estudos, para que possa continuar contribuindo para a formação profissional e científica deles.

Aos colegas da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pelos momentos compartilhados.

Por fim, a Universidade Federal de Pernambuco, aos professores e funcionários do PPGCF pela oportunidade de conviver e adquirir novos conhecimentos importantes a minha formação acadêmica.

A todos, meu muitíssimo obrigada!

“Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática, você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar. ”

(Augusto Cury)

RESUMO

O câncer é caracterizado por crescimento celular descontrolado e capacidade de migração celular do local de origem para outros órgãos, o que pode resultar em morte. Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos nesta patologia e os progressos realizados na terapêutica do câncer, a toxicidade e a resistência aos fármacos tradicionais ainda constituem um grande desafio no tratamento do câncer. Assim, torna-se relevante o desenvolvimento de novos fármacos e pesquisas por novos alvos terapêuticos buscando obter êxito na terapia do câncer. Nesta perspectiva, este trabalho propôs a síntese de dezesseis compostos indólicos-tiossemicarbazonas e a partir destes foram realizadas reações de ciclização obtendo-se dez derivados 4-tiazolidinonas. Além disso, foi verificada a atividade antiproliferativa *in vitro*, analisada a capacidade de interação com o DNA, avaliada a atividade inibitória topoisomerase II α e verificada a capacidade de induzir a morte celular na linhagem tumoral mais sensível do ensaio antiproliferativo. As moléculas foram obtidas através de rotas sintéticas eficazes, rendimentos satisfatórios e ponto de fusão na faixa de pureza. Todas as estruturas foram caracterizadas e comprovadas por espectrometria de massas (MS), infravermelho (IV), métodos espectroscópicos unidimensionais de RMN ^1H e RMN ^{13}C , e técnicas espectroscópicas bidimensionais, como COSY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C e NOESY. Os compostos indólicos-tiossemicarbazonas foram testados quanto à atividade antitumoral *in vitro*, por meio de ensaio antiproliferativo Sulforrodamina B frente às linhagens de células tumorais de mama (MCF-7), ovário (OVCAR-03), ovário resistente a múltiplas drogas (NCI-ADR/RES), pulmão (NCI-H460), cólon (HT-29), rim (786-0), leucemia (K-562) e glioma (U-251). Neste teste, o composto LqIT/LT-51 mostrou-se o mais ativo da série, destacando-se frente às linhagens HT-29 e K-562 com valores de GI₅₀ (concentração molar do composto que inibe 50% do crescimento celular) = 0.01 μM , para ambas as linhagens. Com isso, o derivado LqIT/LT-51 foi conduzido para análise da interação com o DNA por meio da espectroscopia de absorção e emissão da fluorescência. O LqIT/LT-51 mostrou alterações em suas propriedades espectroscópicas após a ligação com DNA, apresentando efeito hipercrômico e sugerindo mudanças na conformação da estrutura do DNA. A constante de ligação (K_b) calculada foi 4.30×10^4 . A supressão da fluorescência (K_{sv}) apresentou o valor de $1.19 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, indicando afinidade pelos pares de base do DNA. A atividade de LqIT/LT-51 como inibidor topoisomerase II α foi visualizada nas concentrações de 50 e 100 μM , e ambas as concentrações produziram inibição enzimática parcial. Na análise da indução da morte celular, o LqIT/LT-51 induziu a morte celular, possivelmente apoptótica nas células de HT-29 de forma concentração-dependente e promoveu a parada do ciclo na fase G2/M. Estes resultados mostraram que o núcleo indol, a tiossemicarbazona e o grupo 1-naftil são promissores *scaffolds* para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial capacidade de atuar em múltiplos alvos terapêuticos do câncer.

Palavras-chave: Indol. DNA. Topoisomerase. Câncer.

ABSTRACT

Cancer is characterized by uncontrolled cell growth and the ability of cell migration from the place of origin to other organs, which can result in death. Despite advances in understanding the mechanisms involved in this disease and the progress achieved in cancer therapy, the toxicity and the resistance to the traditional drugs still constitutes a major challenge in the treatment of cancer. Thus, it is relevant the development of new drugs and researches for new therapeutic targets to achieve success in cancer therapy. In this perspective, this work proposed the synthesis of sixteen indole-thiosemicarbazone compounds and from these cyclic reactions were performed, obtaining ten derivatives presenting the 4-thiazolidinone. In addition, was to verified the in vitro antiproliferative activity, analyzed the capacity of interaction with the DNA, evaluated the topoisomerase II α inhibition activity and was verified the ability to induce cell death in the most sensitive tumor line of the antiproliferative assay. The molecules were obtained by efficient synthetic routes, satisfactory yields and melting point in the purity range. All the structures obtained were characterized by mass spectrometry (MS), infrared (IR), one-dimensional spectroscopic methods of NMR ^1H and NMR ^{13}C , and two-dimensional spectroscopic techniques such as COSY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C and NOESY. The indole-thiosemicarbazones compounds were tested for in vitro antitumor activity by antiproliferative assay Sulforodamine B against breast cancer cell lines (MCF-7), ovary (OVCAR-03), multiple drug resistant ovary (NCI-ADR /RES), lung (NCI-H460), colon (HT-29), kidney (786-0), leukemia (K-562) and glioma (U-251). In this test, the compound LqIT/LT-51 proved to be the most active in the series, highlighting against cell lines HT-29 and K-562 with GI_{50} (Molar concentration of compound which inhibits 50% of cell growth) values = 0.01 μM for both strains. Thus, the LqIT/LT-51 derivative was conducted for DNA binding analysis by fluorescence absorption and emission spectroscopy. The LqIT/LT-51 presented changes in its spectroscopic properties after interaction with DNA, showing hyperchromic effect, suggesting changes in DNA structure. The calculated binding constant (K_b) was 4.30×10^4 . Fluorescence suppression (K_{sv}) showed the value of $1.19 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, indicating affinity for DNA base pairs. The activity of LqIT/LT-51 as topoisomerase II inhibitor was visualized at the concentration of 50 and 100 μM , and both concentrations induced partial enzyme inhibition. The LqIT/LT-51 induced cell death in HT-29 cells in concentration-dependent way possibly through apoptosis and also promoted cell cycle arrest in G2/M phases. These results showed that the indole nucleus, the thiosemicarbazone and the 1-naphthyl group are promising scaffolds for the development of new drugs with potential ability to act in multiple therapeutic targets for cancer.

Keywords: Indole. DNA. Topoisomerase. Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via da síntese de prostaglandinas, tromboxano A ₂ (TXA ₂) e prostaciclina (PGI ₂) produzidos a partir do ácido araquidônico e COX-2. A PGE ₂ desempenha papel na tumorigênese via receptores EP: proliferação celular, angiogênese, apoptose e metástase.	33
Figura 2 – A base molecular da inflamação relacionada ao câncer. Estímulos inflamatórios/infecciosos ou ativação oncogênica ativam fatores de transcrição nas células tumorais. TNF- α (fator de necrose tumoral- α), IL-6 e IL-1 α (interleucina-6 e interleucina-1 α), COX-2 e CCL-2 (proteína quimiotática de monócitos-1) recrutam células inflamatórias envolvidas na proliferação celular, supressão da resposta imune, angiogênese e metástase.	34
Figura 3 – Modo de ligação por intercalação do DNA. O agente intercalador entre os pares de bases do DNA produz alterações conformacionais em sua estrutura.	37
Figura 4 – Brometo de etídio e as interações iônicas e Van der Waals com o DNA.	38
Figura 5 – Modos de interação das moléculas com o DNA. Intercalação entre os pares de bases e ligações aos sulcos menor e maior.	39
Figura 6 – Figura 6. Mecanismo catalítico das topoisomerases tipo I e tipo II. Ataque nucleofílico da enzima à ligação fosfodiéster do DNA.	40
Figura 7 – Estrutura química do derivado tiofeno-2-tiossemicarbazona obtido por hibridação molecular.	46
Figura 8 – Compostos naturais contendo indol.	52
Figura 9 – Estrutura química do agente anticâncer elipticina.	53
Figura 10 – Estrutura química da apaziquone.	53
Figura 11 – Estrutura geral das tiossemicarbazonas.	54
Figura 12 – Estrutura química da triapina®.	58
Figura 13 – Estrutura química do derivado tiazolidinônico com atividade antitumoral.	60
Figura 14 – Espectro de absorção no IV para o composto LqIT/LT-92 (Pastilhas de KBr).	110
Figura 15 – Espectro de COSY ¹ H- ¹ H do derivado LqIT/LT-51.	112
Figura 16 – Espectro de HSQC ¹³ C- ¹ H do derivado LqIT/LT-51.	113
Figura 17 – Espectro 2D RMN NOESY do composto LqIT/LT-90.	116
Figura 18 – Derivado indólico-tiossemicarbazona nas configurações	117

diastereoisoméricas *E* e *Z*

Figura 19 – Espectro de RMN ^1H para o composto LqIT/LT-90, destacando-se os 117
simpletos referentes aos grupos NH hidrazínico, NH aromático e NH indólico
(DMSO- d_6 ; 400 MHz).

Figura 20 – Espectro de RMN ^{13}C para o composto LqIT/LT-90, ilustrando as 119
ressonâncias dos átomos de carbono do grupo azometínico ($\text{CH}=\text{N}$) e tiocarbonila
($\text{C}=\text{S}$) (DMSO- d_6 ; 100 MHz).

Figura 21 – Espectro de absorção no IV para o composto LqIT/LTA-98 (Pastilhas 121
de KBr).

Figura 22 – Espectro de RMN ^1H para o 2-[(5-metóxi-1*H*-indol-3-il- 122
metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-90),
destacando-se os tripleto e duplete referentes aos grupos CH e CH_2 (DMSO- d_6 ;
300 MHz).

Figura 23 – Espectro de RMN ^{13}C para o composto LqIT/LTA-98, ilustrando as 124
ressonâncias dos átomos de carbono do grupo ácido (COOH) e carbonila ($\text{C}=\text{O}$)
do anel 4-tiazolidinona (DMSO- d_6 ; 100 MHz).

Figura 24 – Espectro de absorção no IV para o composto LqIT/LTC-55 (Pastilhas 125
de KBr).

Figura 25 – Espectro de RMN ^1H para o 2-(5-bromo-1*H*-indol-3-il-metileno- 127
hidrazono)-3-(naftaleno-1-il)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-54), destacando-se os
deslocamentos químicos referentes aos grupos $\text{CH}=\text{N}$ e CH_2 (DMSO- d_6 ; 300
MHz).

Figura 26 – Espectro de RMN ^1H para o 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3- 127
(naftaleno-1-il)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-55), destacando-se os deslocamentos
químicos referentes ao hidrogênios metilênicos (CH_2) (DMSO- d_6 ; 300 MHz).

Figura 27 – Espectro de RMN ^{13}C para o composto LqIT/LTC-55, ilustrando as 129
ressonâncias dos átomos de carbono da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e do metileno (CH_2) do
anel 4-tiazolidinona (DMSO- d_6 ; 100 MHz).

Figura 28 – Estrutura dos derivados indólicos LqIT/LT-51, LqIT/LT-50 e 131
LqIT/LT-53.

Figura 29 – Tiossemicarbazonas LqIT/LT-50 e LqIT/LT-51 e suas respectivas 135
ciclizações.

Figura 30 – (a) Espectro de absorção do LqIT/LT-51 (25 μM) com concentrações 136
crescentes de ctDNA (0-100 μM). [ctDNA] = 0 (preto), 10 (vermelho), 20 (verde),

40 (amarelo), 60 (azul), 80 (rosa) e 100 (azul claro) μM . Seta ($\nearrow$) se refere ao efeito hipercrômico. (b) Gráfico correspondente à $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ em função da concentração crescente do ctDNA.

Figura 31 – (a) Espectro de fluorescência do composto LqIT/LT-51 (15 μM) com 139 concentrações crescentes de ctDNA (0-100 μM). $[\text{ctDNA}] = 0$ (preto), 10 (vermelho), 20 (verde), 40 (amarelo), 60 (azul), 80 (rosa) e 100 (azul claro) μM . Seta ($\downarrow$) se refere à supressão da fluorescência. (b) Gráfico correspondente à intensidade relativa de fluorescência da ligação do composto ao ctDNA.

Figura 32 – Ensaio da Inibição da Topoisomerase II do composto LqIT/LT-51. 141

Figura 33 – Indução da morte celular por LqIT/LT-51 em células da linhagem 143 tumoral HT-29.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fármacos antineoplásicos e mecanismos de resistência mediado por células estromais derivados do microambiente tumoral.	43
Tabela 2 – Linhagens celulares tumorais e não tumorais utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> .	69
Tabela 3 – Características físico-químicas e rendimentos para os compostos da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazina-carbotioamidas.	93
Tabela 4 – Derivados tiossemicarbazonas com seus respectivos substituintes, rendimentos e tempo reacional.	95
Tabela 5 – Características físico-químicas e rendimentos para os compostos da série Ácidos 2-[(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos.	103
Tabela 6 – Derivados 4-tiazolidinonas com seus respectivos substituintes, rendimentos e tempos reacionais.	104
Tabela 7 – Características físico-químicas e rendimentos para os compostos da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos.	108
Tabela 8 – Derivados 4-tiazolidinonas não substituídos na posição 5 do anel com seus respectivos substituintes, rendimentos e tempos reacionais.	109
Tabela 9 – Principais frequências de absorção observadas nos espectros de absorção no IV para os compostos da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazina-carbotioamidas.	111
Tabela 10 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ¹ H para tiossemicarbazonas da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazina-carbotioamidas.	118
Tabela 11 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ¹³ C para os compostos da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazina-carbotioamidas.	120
Tabela 12 – Principais frequências de absorção observadas nos espectros de IV para os compostos da série Ácidos 2-[(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos.	121
Tabela 13 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ¹ H para os compostos da série Ácidos 2-[(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos.	123

Tabela 14 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ¹³ H para os compostos da série Ácidos 2-[(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos.	124
Tabela 15 – Principais frequências de absorção observadas nos espectros de IV para os compostos da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos.	126
Tabela 16 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ¹ H para os compostos da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos.	128
Tabela 17 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ¹³ H para os compostos da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos.	129
Tabela 18 – Valores de GI ₅₀ (μM) para os derivados indólicos-tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas.	130
Tabela 19 – Valores de LogP para os derivados indólicos-tiossemicarbazonas.	132
Tabela 20 – Dados da espectroscopia de absorção UV-vis do composto LqIT/LT-51 com o ctDNA (0-100 μM).	137
Tabela 21 – Dados da espectroscopia de emissão de fluorescência do composto LqIT/LT-51 (15 μM) e concentrações crescentes de ctDNA (0-100 μM).	138
Tabela 22 – Porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular de HT-29, após 24 horas de tratamento com (DMSO 0.1%), Colchicina (1.25 nM) e LqTI/LT.51 (5, 10 e 30 μM).	145

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Reação da obtenção do indol a partir do Índigo.	47
Esquema 2 – Formas tautoméricas do indol.	48
Esquema 3 – Síntese de Fisher.	49
Esquema 4 – Obtenção do indol através da Síntese de Madelung.	49
Esquema 5 – Síntese de indóis sob condições suaves (70°C).	50
Esquema 6 – Formas ressonantes do núcleo indólico e a bromação do indol.	50
Esquema 7 – Reação de Mannich.	51
Esquema 8 – Reação de Vilsmeier.	51
Esquema 9 – Formas tautoméricas tiol e tiona para as tiossemicarbazonas.	54
Esquema 10 – Rota sintética de derivados ciclizados da tiossemicarbazona.	54
Esquema 11 – Método direto de obtenção de tiossemicarbazonas a partir de derivados carbonilados.	56
Esquema 12 – Métodos de obtenção de tiossemicarbazidas a partir de reações da hidrazina com ditiocarbamatos, isotiocianatos e ácido tiocarbamoilglicólico.	57
Esquema 13 – Rota sintética empregada na preparação dos compostos indólicos-tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas.	77
Esquema 14 – Mecanismo reacional de adição conduzindo ao intermediário tiossemicarbazida substituído.	78
Esquema 15 – Rota de síntese dos novos compostos indólicos-tiossemicarbazonas.	81
Esquema 16 – Mecanismo de reação catalisada por ácido acético a partir do indol-3-carboxaldeído e tiossemicarbazida, ambos substituídos, para obtenção do derivado indol-tiossemicarbazona.	83
Esquema 17 – (A) Mecanismo de adição tia-Michael seguida de aminólise para obtenção das 4-tiazolidinonas. (B) Esquema da mesma reação iniciada pela aminólise seguida da adição tia-Michael.	97
Esquema 18 – Mecanismo de reação da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona a partir do derivado tiossemicarbazona e cloro acetato de etila.	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOH	Ácido acético
AcOEt	Acetato de etila
AKT	Proteína quinase B
ATP	Adenosina Trifosfato
Ar	Aromático
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDK	Quinase dependente de ciclina
COSY	Espectroscopia Correlacionada
COX	Ciclooxigenase
ctDNA	Ácido desoxirribonucleico de timo bovino
D	Duplete
Dd	Duplo duplete
DI	Densidade de inoculação
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
eq.	Equivalente
EtOH	Etanol
GI₅₀	Concentração molar que inibe 50% do crescimento celular
HaCaT	Linhagem celular não tumoral de queratinócito
HSQC	Correlação Quântica Única Heteronuclear
HT-29	Células de adenocarcinoma de cólon
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
J	Constante de acoplamento
Kb	Constante de ligação intrínseca
K-562	Célula tumoral de leucemia
K_{sv}	Constante Stern–Volmer

LBDD	Planejamento de fármacos baseado no ligante
LqIT	Laboratório de Química e Inovação Terapêutica
m	Multiplete
M	Molar
m-AMSA	Amsacrina
MCF-7	Células de adenocarcinoma de mama
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Espectrometria de massas
MTDD	Planejamento de fármacos baseado em múltiplos alvos terapêuticos
NCI	National Cancer Institute
NCI-ADR/RES	Células tumorais de ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas
NCI-H460	Células tumorais de pulmão
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NCE	Nova entidade química
Ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
OVACAR-03	Célula tumoral de ovário
PBS	Solução tamponada de fosfato
PE	Ficoeritrina
PF	Ponto de Fusão
PGE₂	Prostaglandinas E
Ph	Fenil
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PLD	Fosfolipase D
ppm	Partes por milhão
PS	Fosfatidilserina
QSAR	Estudo de relação estrutura-atividade quantitativa
Rend.	Rendimento
Rf	Razão de frente

RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Simpleto
SBDD	Planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SRB	Sulforrodamina B
t	Tripleto
TCA	Ácido tricloroacético
TER	RNA telomerase
TERT	Transcriptase reversa telomerase
Topo	Topoisomerase
TGI	Concentração molar que inibe o total crescimento celular
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
U-251	Glioma
V/cm	Voltz por centrímetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
v	Estiramento
7-AAD	7-Aminoactinomicina D
786-0	Célula tumoral de rim

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivos Gerais	28
2.2	Objetivos Específicos	28
3	REFERENCIAL TEÓRICO	30
3.1	O Câncer	30
3.2	Perspectivas de novos alvos terapêuticos para o câncer	31
3.3	Interação com o DNA	36
3.4	Topoisomerases	39
3.5	O microambiente tumoral e a resistência aos fármacos anticâncer	41
3.6	Polifarmacologia no tratamento do câncer	44
3.7	Química Medicinal	45
3.8	Indol	47
3.8.1	Atividades biológicas do indol	51
3.9	Tiossemicarbazonas	54
3.9.1	Obtenção direta das tiossemicarbazonas	55
3.9.2	Obtenção indireta das tiossemicarbazonas	56
3.9.3	Atividades biológicas das tiossemicarbazonas	57
3.10	Tiazolidinonas	59
4	MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1	Estudo Químico	62
4.1.1	Métodos de Síntese	63
4.1.2	Procedimento Geral para Obtenção dos derivados hidrazina carbotioamidas substituídos (LqIT/LT)	63
4.1.3	Procedimento Geral para Obtenção da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)- <i>N</i> -hidrazina-carbotioamidas substituídos (LqIT/LT)	64
4.1.4	Procedimento Geral para Obtenção da série Ácidos 2-[(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)-hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos	66
4.1.5	Procedimento Geral para Obtenção da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)-hidrazono)-3-(naftaleno-1-il)-tiazolidin-4-ona substituídos	67
4.2	Estudo Biológico	68
4.2.1	Atividade antiproliferativa por Ensaio de Sulforrodamina B	68

4.2.2	Cultivo celular	69
4.2.3	Preparo das suspensões celulares	70
4.2.4	Preparo dos compostos	70
4.3	Ensaio com o DNA	72
4.3.1	Materiais e Equipamentos	72
4.3.2	Preparação de ctDNA	72
4.3.3	Espectroscopia de absorção no Ultravioleta Visível	72
4.3.4	Espectroscopia de emissão de fluorescência	73
4.4	Atividade Inibitória da Topoisomerase II α	73
4.5	Ensaio de Citometria de Fluxo	74
4.5.1	Cultura celular de HT-29	74
4.5.2	Medição da Externalização de fosfatidilserina	74
4.5.3	Análise do Ciclo Celular	75
4.5.4	Análise Estatística	75
4.6	Determinação do valor de Log P	75
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1	Estudo Químico	77
5.1.1	Esquema Geral de Síntese	77
5.2	Mecanismo reacional dos derivados hidrazina carbotioamidas substituídos (LqIT/LT)	78
5.2.1	Características físico-químicas e resultados espectroscópicos para os derivados indólicos-carbotioamidas substituídos	78
5.3	Mecanismo reacional e rota sintética dos derivados 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazina-carbotioamidas (LqIT/LT)	80
5.3.1	Características físico-químicas e resultados espectroscópicos para os derivados indólicos-carbotioamidas substituídos	82
5.3.2	Características físico-químicas dos derivados indólicos-carbotioamidas	92
5.3.3	Rendimentos reacionais dos derivados indólicos-tiossemicarbazonas	93
5.4	Mecanismos reacional dos Ácidos 2-[(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos	96
5.4.1	Características Físico-químicas e Espectroscópicas para Ácidos 2-[(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos	97
5.4.2	Características Físico-Químicas dos derivados 4-tiazolidínicos	102

5.4.3	Rendimentos reacionais dos derivados 4-tiazolidinonas	103
5.5	Mecanismo reacional dos derivados 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona (LqIT/LTC)	104
5.5.1	Características Físico-químicas e Espectroscópicas para a série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos	105
5.5.2	Características Físico-Químicas dos derivados 4-tiazolidínicos não substituído na posição 5 do anel	108
5.5.3	Rendimentos reacionais dos derivados 4-tiazolidinonas não substituídos na posição 5 do anel	108
5.6	Caracterização estrutural dos derivados 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazina-carbotioamidas (LqIT/LT)	109
5.7	Caracterização estrutural dos Ácidos 2-[(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos	120
5.8	Caracterização estrutural dos derivados da série 2-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos	125
5.9	Estudo Biológico	129
5.10	Atividade Antiproliferativa	129
5.11	Estudo de interação do DNA	135
5.12	Inibição da Topoisomerase II α	140
5.13	Análise da Apoptose	142
5.14	Análise do Ciclo celular	144
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	147

REFERÊNCIAS

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo publicado no periódico *European Journal of Medicinal Chemistry*

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda causa de morte global e foi responsável por 8.8 milhões de óbitos em 2015. Globalmente, quase uma em cada seis mortes é devido ao câncer. Estima-se a ocorrência de 22 milhões de casos novos nas próximas duas décadas (WHO, 2017). No Brasil, as estimativas do INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) para o biênio 2016-2017 apontam a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer.

O planejamento de fármacos antitumorais durante décadas foi baseado na identificação de compostos com atividade citostática ou citotóxica, no entanto apresentando diversos efeitos adversos. Um outro obstáculo para uma terapia bem-sucedida, consiste na resistência a fármacos resultado de uma variedade de alterações farmacocinéticas e moleculares que podem invalidar o tratamento, incluindo absorção e liberação deficiente do fármaco, mutações e supressões dos alvos farmacológicos (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMAN, 2012). Diante disso, são essenciais os esforços na descoberta de novos agentes anticâncer planejados quimicamente para ampliar a terapêutica antineoplásica (JOHNSON et al., 2015).

Um vasto número de antitumorais atualmente utilizados, produzem seus efeitos atuando sobre o DNA (ALI e BHATTACHARYA, 2014; CHEUNG-ONG et al., 2013). O mecanismo de ação ocorre através da intercalação entre os pares de bases da dupla hélice do DNA (ácido desoxirribonucleico). Esse modo de ação interfere na replicação do DNA, transcrição e inibição da expressão gênica, influenciando assim, as funções fisiológicas do DNA e inibindo a proliferação celular (AL-OTAIBI et al., 2017; ZHU, et al., 2014).

Além do DNA, muitos fármacos anticâncer atuam inibindo a topoisomerase (POMMIER e MARCHAND, 2012; POMMIER, 2013). O reconhecimento das enzimas topoisomerasas como alvos biológicos do câncer representa mais uma estratégia terapêutica para o câncer (NITISS, 2009; POMMIER, 2009). As topoisomerasas I e II são alvos de diversos fármacos antineoplásicos capazes de interferirem o complexo DNA-enzima produzindo danos permanentes ao DNA e por fim, desencadear a morte celular apoptótica (GALSKY et al., 2015; YAO et al., 2015). Essas enzimas estão envolvidas na regulação topológica do DNA durante a replicação, transcrição, recombinação e remodelação da cromatina (WANG et al., 2002), sendo importantes para manutenção da integridade genômica. No entanto, em casos patológicos, como o câncer, elas são superexpressas ou

aumentam suas atividades com propósito de garantir a sobrevivência das células cancerígenas e a manutenção da proliferação celular (LARSEN e SKLADANOWSKI, 1998).

Neste contexto, o papel das 4-tiazolidinonas tem se destacado em estudos apresentando interação com o DNA (PAULÍKOVÁ et al., 2012), e também atividades anticancerígenas frente a diferentes tipos de câncer, tais como mama (MCF-7) (HUANG et al., 2006) e cólon (HT29) (OTTANÀ et al., 2005), além de desempenharem papel na inibição das quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (CHEN et al., 2007).

Outros compostos com diversas atuações farmacológicas são os derivados tiossemicarbazonas que possuem atividades biológicas, como antidiabética (KADOWAKI et al., 2013), antibacteriana, antifúngica (BERALDO e GAMBINO, 2004; BHARTI et al., 2010) e antineoplásica (STARIAT et al., 2013; CHELLAN et al., 2012). A notável importância das propriedades anticâncer das tiossemicarbazonas é evidenciada no desenvolvimento do fármaco Triapina® (3-aminopiridina-2-carboxaldeído-tiossemicarbazona), que se mostrou promissor frente alguns tipos de tumores (ZEIDNER et al., 2014; KALINOWSKY, QUACH e RICHARDSON, 2009).

O heterociclo indol também representa um núcleo importante encontrado em muitos compostos ativos, apresentando as seguintes propriedades biológicas: anticancerígena, antituberculose, anti-inflamatória e antiasmática (BISWAL et al., 2012; SHARMA, KUMAR e PATHAK, 2010; WENG et al., 2008). Os derivados indólicos se destacam como anticancerígenos em diversos estudos também exibindo inibição da topoisomerase (KASHYAP et al., 2013; ZHANG et al., 2016).

Nesta perspectiva, baseada em estudos sobre esses *scaffolds*, o presente trabalho propôs a síntese de novos derivados indólicos com a finalidade de avaliar a atividade antiproliferativa e verificar como possível mecanismo de ação a atuação desses compostos em múltiplos-alvos terapêuticos do câncer, tais como o DNA, a enzima topoisomerase II α , a interrupção do ciclo celular e consequentemente a indução da morte celular apoptótica.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver novos candidatos a fármacos com potencial ação antitumoral baseados nos *scaffolds* indólicos e avaliar os seus possíveis mecanismo de ação.

2.2 Objetivos Específicos

Sintetizar, determinar as propriedades físico-químicas e caracterizar estruturalmente os derivados através de métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C), Infravermelho, Espectrometria de Massas e técnicas espectroscópicas bidimensionais, tais como COSY ^1H - ^1H (Espectroscopia Correlacionada) e HSQC ^1H - ^{13}C (Correlação Quântica Única Heteronuclear);

Determinar a configuração diastereoisomérica *Z* ou *E* das moléculas da série indólicos-tiossemicarbazonas, a partir do espectro 2D RMN NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*);

Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* dos compostos sintetizados frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas;

Analisar a interação com o DNA do derivado mais promissor na atividade antiproliferativa, por meio da espectroscopia de absorção UV-visível e emissão de fluorescência;

Avaliar a capacidade de inibição da enzima topoisomerase II α do composto mais ativo na atividade antiproliferativa;

Verificar a indução da morte celular através da exposição de fosfatidilserina e a análise do ciclo celular pelo tratamento do derivado indólico-tiossemicarbazona sobre a linhagem tumoral de cólon (HT-29).

REFERENCIAL TEÓRICO

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O Câncer

O câncer tem se tornando uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. A ocorrência é crescente devido ao envelhecimento e a expansão da população, bem como o aumento da prevalência dos fatores de risco: tabagismo, excesso de peso, sedentarismo e o consumo de álcool (TORRE et al., 2015; WHO, 2017).

Câncer é uma doença que decorre de alterações nos processos de diferenciação e crescimento celular resultando em neoplasia, que significa *crescimento novo*. Ao contrário de alterações no crescimento do tecido ocorridas em processos como hipertrofia e hiperplasia, o desenvolvimento de uma neoplasia tende a ser sem coordenação, relativamente autônomo e não possui controle regulador normal para o crescimento celular (GROSSMAN e PORTH, 2015).

De acordo com a capacidade de invasão ou infiltração em outros órgãos, destruição tecidual e capacidade maligna, as neoplasias se classificam em benignas e malignas. As benignas são compostas de células bem diferenciadas assemelhando-se às células dos tecidos de origem e se caracterizam por crescimento lento e progressivo, que pode paralisar ou regredir.

As malignas, ao contrário, são menos diferenciadas e têm a capacidade de se desprender, entrar na corrente sanguínea ou sistema linfático e formar neoplasias malignas secundárias em outros locais no organismo, ou seja, as metástases (LIU e WICHA, 2010). Diversas evidências indicam que as células neoplásicas capazes de metastizar secretam enzimas proteolíticas na matriz extracelular circundante permitindo percorrer rapidamente pela matriz degradada e acessar um vaso sanguíneo ou linfático (LEE et al., 2011).

As células cancerígenas possuem duas particularidades principais: proliferação rápida e descontrolada e perda de diferenciação. Estes aspectos estão associados a uma série de outras alterações nas funções das células, que distinguem células cancerígenas de suas homólogas normalmente diferenciadas (SWAT et al., 2009; HAYASHIDA et al., 2005).

As características das células cancerígenas compreendem oito capacidades biológicas adquiridas durante os vários estágios de desenvolvimento dos tumores humanos. Essas características estão: a sustentação da sinalização proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, conferindo a imortalidade replicativa, a indução da angiogênese e a ativação da invasão e metástase, subjacentes a estas particularidades estão a instabilidade genômica e a inflamação. Na última década, foram incluídas características

potenciais, tais como a reprogramação do metabolismo energético e resistência à destruição imunológica (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).

A maior parte dos mecanismos carcinogênicos envolve o ciclo celular (ALMEIDA et al., 2005). Este processo de crescimento e divisão celular é dividido em quatro fases: G_1 (*gap* ou intervalo), a fase de pós-mitótica, quando ocorre a síntese de proteínas, RNA (ácido ribonucleico) e o crescimento celular; S, que é a fase durante a qual ocorre a síntese de DNA, dando origem a dois conjuntos separados de cromossomos, um para cada célula-filha; G_2 é a fase pré-mitótica, durante a qual a síntese de RNA e de proteínas continua; e M, fase de mitose ou divisão celular. A fase G_0 é um período de descanso ou fase de repouso na qual a célula não se divide (NURSE, MASUI e HARTWELL, 1998).

A principal função do ciclo celular é garantir que o DNA seja fielmente duplicado durante a fase S e que cópias idênticas dos cromossomos sejam igualmente distribuídas entre as células-filhas durante a mitose (MALUMBRES e BARBACID, 2009). Quando ocorre algum erro ou dano na replicação, reparação do DNA ou alguma anormalidade cromossômica, as células interrompem a progressão do ciclo celular até que ocorra o reparo. No entanto, se o dano ao DNA ou ao cromossomo for extenso e a reparação inviável, a célula inicia o mecanismo de apoptose (MA et al., 2011).

As proteínas controladoras da entrada e progressão das células no ciclo celular são as ciclinas que se conectam a proteínas chamadas quinases dependentes de ciclina (CDK). As CDKs fosforilam proteínas-alvo específicas reguladoras do ciclo celular e são expressas de modo contínuo, mas em uma forma inativa, enquanto as ciclinas são sintetizadas durante fases específicas do ciclo celular e, em seguida, degradadas após o término de sua função (FRACZEK et al., 2008). Os complexos de ciclina-CDK são regulados pela ligação de inibidores de CDK que são importantes na regulação de pontos de controle durante o ciclo celular, os quais identificam e reparam os possíveis erros (SHAPIRO, 2006).

3.2 Perspectivas de novos alvos terapêuticos para o câncer

A terapêutica anticâncer consiste em uma ou mais intervenções, tais como remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia (VIDEIRA, REIS e BRITO, 2014). A quimioterapia surgiu na década de 40 com a utilização das mostardas de nitrogênio que são poderosos agentes alquilantes e antimetabólitos. Após o sucesso inicial desses compostos, vários outros fármacos antitumorais foram desenvolvidos (POVIRK e SHUKER, 1994). Além dessas, outras abordagens farmacológicas têm sido utilizadas: a terapia alvo-direcionada, tais como a

hormonioterapia e a imunoterapia comumente combinada com agentes citotóxicos (CARNEIRO et al., 2015; NGUYEN-NIELSEN et al., 2015).

Avanços foram realizados no tratamento do câncer, mas ainda persistem os efeitos colaterais nas células normais de crescimento rápido, como as do epitélio intestinal, folículos pilosos e as da medula óssea, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (BRANDÃO et al., 2010). Nesse contexto, a busca por novos fármacos antineoplásicos é contínua e baseada na necessidade de alternativas com maior eficácia e menos adversas para os pacientes oncológicos. Assim, o desenvolvimento de fármacos capacidade-alvo direcionados para alvos moleculares específicos envolvidos em vias de sinalização desreguladas torna-se relevante para a terapêutica anticâncer (MARSICO e GORMALLY, 2015; ROSKOSKI JR, 2015; MONROIG et al., 2015).

Outro grande obstáculo da terapia anticâncer se deve a resistência dos alvos terapêuticos. Os progressos realizados ao longo dos últimos anos para compreender os mecanismos de resistência, como a descoberta de mutações, permitiram conhecer diversas possibilidades para superar a resistência e desenvolver novos fármacos antineoplásicos (HU e ZHANG, 2016). Embora os recentes avanços na medicina resultem no aumento da sobrevida dos pacientes oncológicos, a recidiva da doença ainda persiste, sendo este um empecilho para a sobrevivência a longo prazo (SMITH et al., 2013).

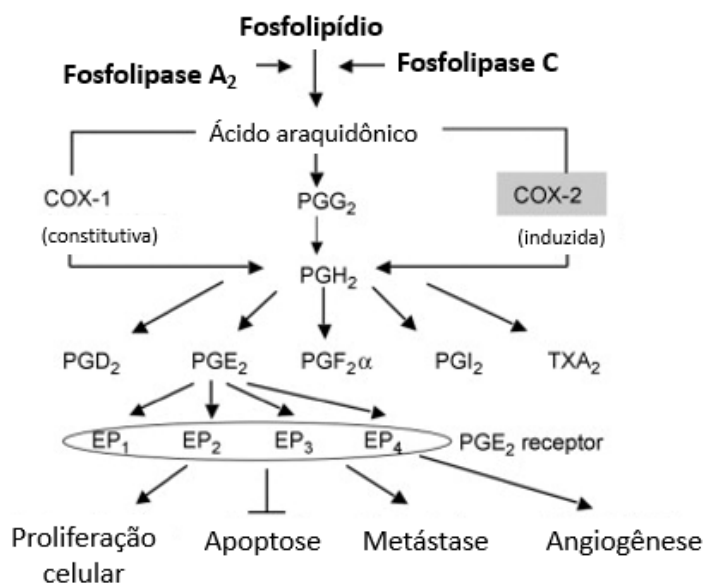
A quimioterapia do câncer afeta tanto os alvos biológicos das células normais, como os presentes nas células cancerígenas que se proliferam rapidamente. Em contraste, a terapia-alvo é destinada a direcionar o fármaco para as células tumorais sem interferir no crescimento das células normais (ARAVIND et al., 2012). Esta modalidade terapêutica ocorre por meio da interação entre o composto bioativo e moléculas-alvo específicas, com o propósito de inibir o crescimento e disseminação das células tumorais com mínimos efeitos citotóxicos (ALIBOLANDI et al., 2015; BALASHANMUGAM et al., 2014).

Dentre as moléculas alvos superexpressas em muitas células tumorais, encontra-se a ciclooxigenase-2 (COX-2) sendo considerada uma potente proteína alvo para a terapêutica do câncer (BHAT et al., 2014; BUSKENS et al., 2003).

As COXs são enzimas conhecidas por converterem o ácido araquidônico em prostaglandinas (PGs). São classificadas em três subtipos: COX-1, COX-2 e COX-3 (SHAMSUDIN et al., 2014). Essas isoformas diferem na sua expressão e funções fisiológicas e patológicas. A COX-1 é expressa continuamente na maioria dos tecidos normais, a COX-3, principalmente no sistema nervoso central, enquanto a COX-2 é induzida. A expressão de COX-2 aumenta quando induzida por estímulos, tais como citocinas pró-inflamatórias, fatores

de crescimento e promotores de tumores, contudo permanece ausente na maioria dos tecidos normais (PENG et al., 2014; TOLBA et al., 2014). As prostaglandinas E (PGE_2) (Figura 1), desempenham funções na tumorigênese, tais como proliferação celular, angiogênese, apoptose e metástase (KONTUREK et al., 2005; VO et al., 2013).

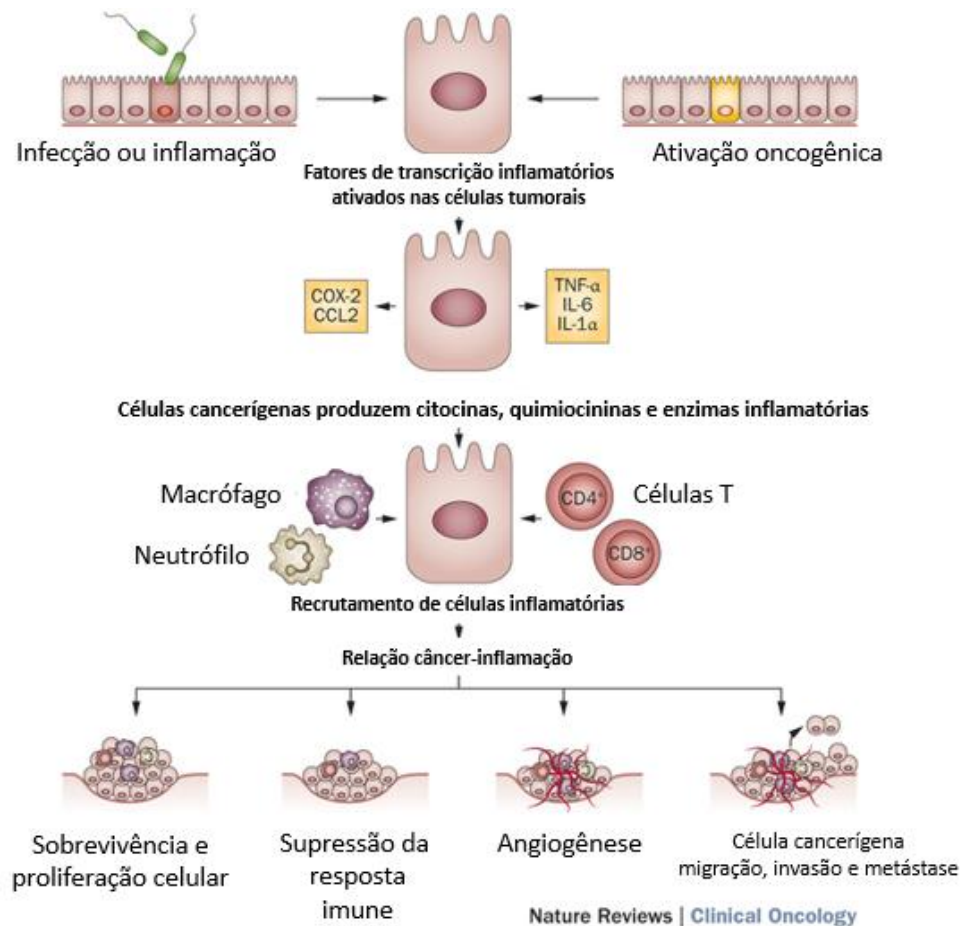
Figura 1 – Via da síntese de prostaglandinas, tromboxano A_2 (TXA_2) e prostaciclina (PGI_2) produzidos a partir do ácido araquidônico e COX-2. A PGE_2 desempenha papel na tumorigênese via receptores EP: proliferação celular, angiogênese, apoptose e metástase.



Por isso, é evidenciado a correlação entre a inflamação crônica, desregulada e persistente com o risco aumentado de neoplasia maligna. Quase 20% dos tumores estão relacionados com a inflamação crônica causada por infecções, exposição a irritantes ou doença auto-imune (KUNDU e SURH, 2008).

Uma outra relação entre inflamação e o câncer se deve à presença de células e mediadores do sistema imune inato na maioria dos tipos de câncer, independentemente de existir inflamação. Isto ocorre em razão das alterações oncogênicas induzirem as vias inflamatórias em células pré-malignas e malignas (Figura 2). Desse modo, não apenas a inflamação pode causar câncer, mas também o câncer é capaz de produzir inflamação (CRUSZ e BALKWILL, 2015).

Figura 2 – A base molecular da inflamação relacionada ao câncer. Estímulos inflamatórios/infecciosos ou ativação oncogênica ativam fatores de transcrição nas células tumorais. TNF- α (fator de necrose tumoral- α), IL-6 e IL-1 α (interleucina-6 e interleucina-1 α), COX-2 e CCL-2 (proteína quimiotática de monócitos-1) recrutam células inflamatórias envolvidas na proliferação celular, supressão da resposta imune, angiogênese e metástase.



Essa associação se confirma em estudos que mostraram pacientes recebendo baixas doses de aspirina (inibidor das COXs) diariamente por mais de cinco anos e obtiveram resultados positivos para o tratamento do câncer (JONSSON et al., 2013). De acordo com Zelenay et al. (2015), a aspirina combinada com imunoterapia promove regressão mais rápida do tumor, em contraste com a imunoterapia isolada.

Outro alvo terapêutico de interesse no desenvolvimento de fármacos anticâncer é a enzima telomerase (SÁNCHEZ-PERIS et al., 2016; CHEN et al., 2016; LI et al., 2016). A reativação ou *up-regulation* da telomerase é observada em pelo menos noventa por cento dos tumores humanos, sugerindo a importância dessa enzima na tumorigênese (SHAY e WRIGHT, 2006).

Os telômeros são estruturas nucleoproteicas, localizadas nas extremidades dos cromossomos, e sendo encurtados a cada ciclo de divisão celular. O encurtamento dos telômeros faz as células pararem a divisão quando um comprimento mínimo é atingindo (limite de Hayflick), por conseguinte as células sofrem senescência replicativa e apoptose (COLGIN e REDDEL, 1999; AIT-AISSA et al., 2016). Os telômeros são sintetizados pela telomerase, um complexo enzimático de ribonucleoproteínas formado por duas subunidades: a proteica catalítica (transcriptase reversa telomerase, TERT) e uma grande subunidade de RNA (RNA telomerase, TER). Esta enzima auxilia a DNA polimerase RNA-dependente na replicação linear dos cromossomos através da síntese *de novo* das repetições teloméricas. Com isso, impede o encurtamento progressivo dos telômeros, que ocorreria na sua ausência completa ou parcial (SARETZKI, 2014).

O fator limitante para a ação enzimática é a expressão da transcriptase reversa telomerase, e a maioria das células somáticas humanas não apresenta atividade da telomerase devido a ausência de TERT (HAHN et al., 1999). A TERT pode também regular o sinal de danos no DNA, mantendo as histonas modificadas e alterar a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *radical oxygen species*), as quais podem resultar na instabilidade genômica (MASUTOMI et al., 2005; SINGHAPOL et al., 2013).

A regulação da telomerase nas células neoplásicas ocorre através de vários mecanismos, incluindo aumento da transcrição de TERT e/ou TER, perda de repressores transcripcionais de TERT, mutações na região promotora do gene TERT (resultando na transativação deste gene), várias quinases fosforilam e aumentam a atividade de TERT e amplificação gênica de TERT e/ou TER. Como consequência da *up-regulation*, as células tumorais alcançam um potencial replicativo ilimitado, conferindo imortalidade (REDEL, 2014).

As células cancerígenas sobrevivem no ambiente de estresse com fornecimento de nutrientes limitado. Os metabólitos de baixo peso molecular gerados na autofagia permitem a sobrevivência celular (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). A autofagia é um processo catabólico mediado por lisossomos para degradação e reciclagem dos componentes citoplasmáticos, sendo importante para manutenção da homeostasia celular.

Geralmente, a autofagia é citoprotetora quando a célula passa por privação de nutrientes ou quimioterapia. No entanto, pode se tornar citotóxica, dependendo da extensão e fluxo da autofagia, e competência apoptótica (MIZUSHIMA et al., 2008; ENG e ABRAHAM, 2011; BOYA et al., 2005; CAREW et al., 2007). Ambas as autofagias citoprotetora e citotóxica podem regular a via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/proteína

quinase B (AKT) para promover a apoptose celular. Estudos recentes têm sugerido uma relação entre fosfolipase D (PLD) e atividade AKT em diversos tipos de câncer (CHAUVIN et al., 2016; BRUNTZ et al., 2014; TOSCHI et al., 2009).

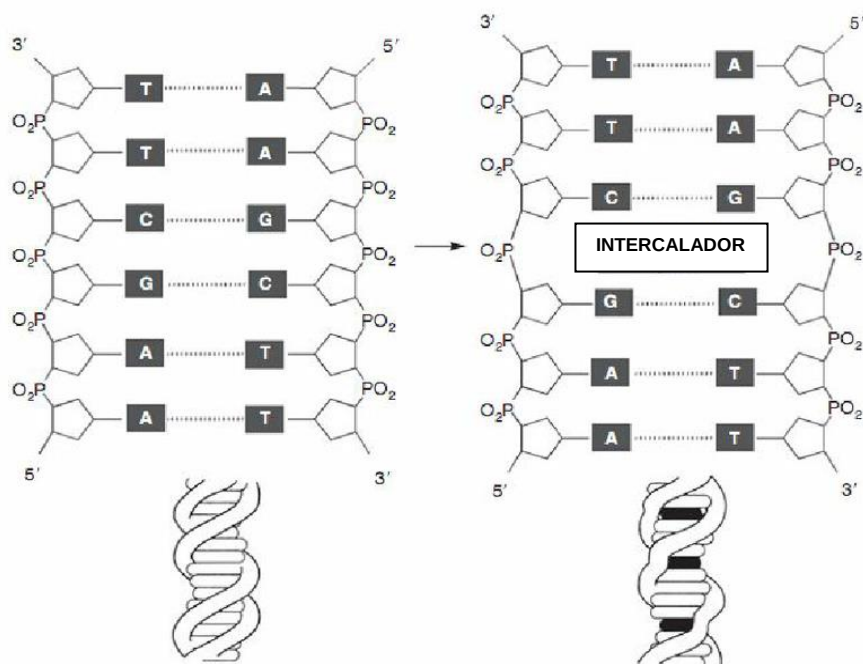
A autofagia também parece regular a migração celular, por ter sua inibição associada à redução da invasão celular, no que se refere às secreções de enzimas proteolíticas autofágicas-dependente durante a metástase (KENIFIC e DEBNATH, 2015). Além disso, existem evidências indicativas que o controle e a modificação do mecanismo de degradação autofágico relaciona-se com a tumorigênese. Dessa maneira, alterando-se a via autofágica no interior da célula pode conduzir a uma nova estratégia para o planejamento de terapias anticâncer mais eficazes (ADHAULIYA et al., 2016).

3.3 Interação com DNA

O DNA é um receptor celular essencial por ser a molécula alvo para a maioria das terapias anticâncer e antivirais (KOIRI et al., 2008). A ligação de moléculas ao DNA pode conduzir alterações nas propriedades estruturais, afetar a sua transcrição, replicação, expressão de informações genéticas nas células e, assim, influenciar a sua função fisiológica (ZHU et al., 2014; MA et al., 2011). Muitos compostos antineoplásicos se ligam ao DNA, alterando a sua replicação e inibindo o crescimento das células cancerígenas. Desta forma, o estudo de agentes como potenciais ligantes ao DNA tem sido amplamente utilizado na concepção de fármacos, em especial, antitumorais, já que um grande número de moléculas atualmente utilizadas exerce seus efeitos anticancerígenos por atuação no DNA (HOSSAIN e KUMAR, 2009).

Geralmente, moléculas variadas podem interagir com o DNA através de três modos: por intercalação entre os pares de bases empilhadas; ligação no sulco principal e secundário do DNA e/ou por interações eletrostáticas (DUSKOVA et al., 2012; ZHANG et al., 2010). A Figura 3 representa o modo de ligação por intercalação no DNA.

Figura 3 – Modo de ligação por intercalação do DNA. O agente intercalador entre os pares de bases do DNA produz alterações conformacionais em sua estrutura.

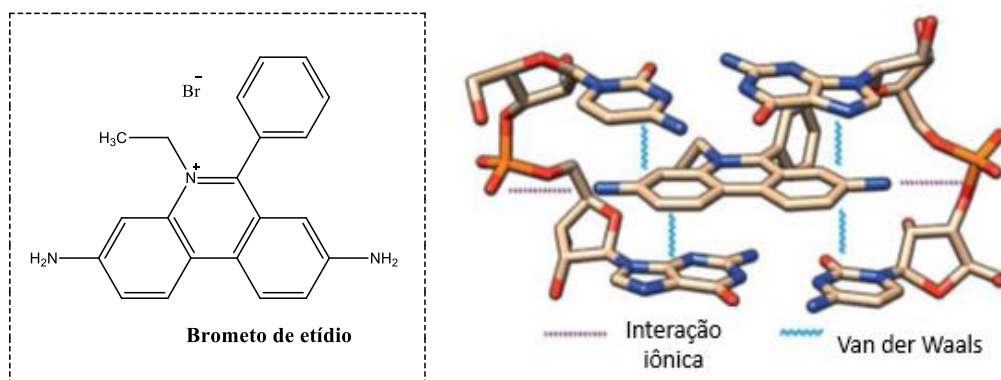


Na bioquímica, a intercalação refere-se ao modo de interação de moléculas orgânicas pequenas com DNA. Este processo envolve compostos possuidores de anéis aromáticos ou heteroaromáticos planares, inseridos entre os pares de bases adjacentes, perpendicularmente ao eixo da hélice sem perturbar o padrão de empilhamento total, devido à ligação de hidrogênio (GRAVES e VELEA, 2000). A intercalação tem início com a transferência da molécula intercaladora do ambiente aquoso para o espaço hidrofóbico situado entre os dois pares de bases adjacentes. Com isso, o DNA é submetido a uma alteração conformacional que envolve a separação vertical entre os pares de bases, no intuito de formar uma cavidade para acomodação do ligante (Figura 3). Dessa forma, a dupla hélice é parcialmente desenrolada levando a distorções do esqueleto açúcar-fosfato e a mudanças de tensão torcionais entre os sucessivos pares de bases (KABIR, HOSSAIN e KUMAR, 2013).

Usualmente, os intercaladores de DNA contêm um sistema poliaromático o qual forma interações de empilhamento π - π de elétrons (modo mais forte de interação) com as bases nucleotídicas, outras interações podem contribuir para formação do complexo ligante-DNA: Van der Waals, ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas entre os grupos catiônicos do ligante e os grupos fosfato do DNA (ZHANG e TANG, 2004; BAGINSKI et al., 1997).

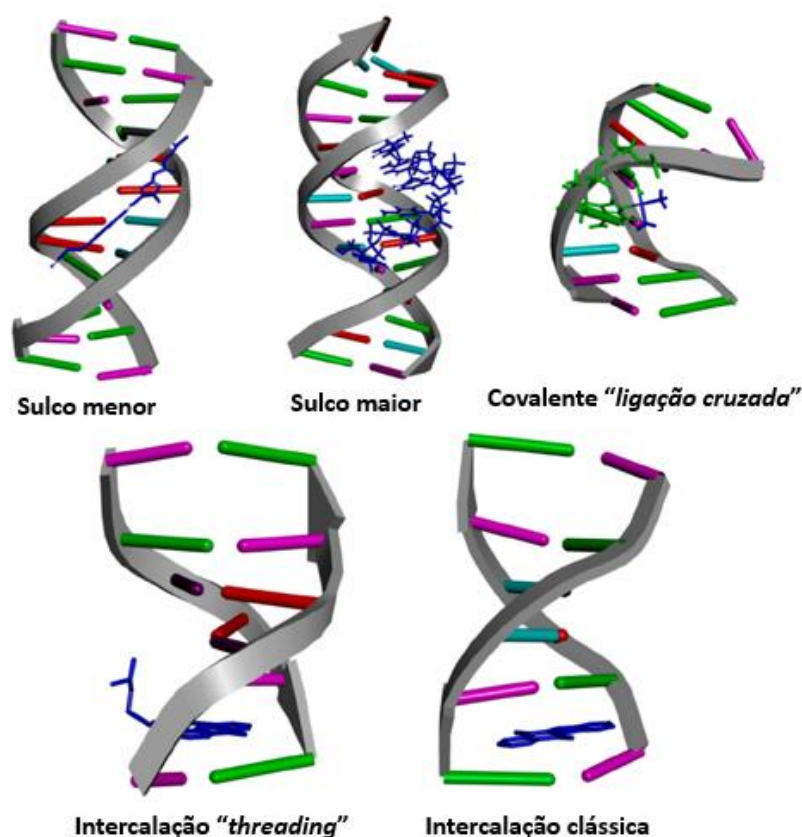
Em geral, as moléculas catiônicas são intercaladoras mais eficientes por interagirem melhor com o fosfato. De fato, a maioria dos agentes intercaladores são carregados positivamente por apresentarem grupos básicos que podem ser protonados sob condições fisiológicas. A interação do brometo de etídio (agente intercalador protótipo) com o DNA é estabilizada através de interações de Van der Waals, de empilhamento π - π de elétrons e interações iônicas entre o cátion quartenário de amônio com os grupos fosfato (Figura 4) (AVEDAÑO e MENÉNDEZ, 2015). As mudanças estruturais ocorridas na intercalação do DNA interferem no reconhecimento e função de proteínas associadas ao DNA, tais como as polimerases, fatores de transcrição, sistemas de reparação e, especialmente, as topoisomerases (BRAÑA et al., 2001).

Figura 4 – Brometo de etídio e as interações iônicas e Van der Waals com o DNA.



O arranjo espacial dos pares de bases através do empilhamento no interior da dupla hélice conduz ao pareamento espacial e a formação dos sulcos maior e menor que servem de sítios de ligação para outras moléculas (ALI e BHATTACHARYA, 2014). As moléculas relativamente grandes, como as proteínas, se ligam preferencialmente ao sulco maior, enquanto que pequenas moléculas se ligam ao sulco menor (IHMEIS e OTTO, 2005), onde a interação com as bases do DNA em ambos os sulcos envolve, em geral, ligação de hidrogênio ou interação eletrostática (KHAN et al., 2012). Quando a molécula se intercala ao DNA, os substituintes laterais podem se instalar nos sulcos maior e/ou menor. Esse tipo de molécula é denominado de “*threading*” intercaladores (RESCIFINA et al., 2014). A Figura 5 mostra as principais formas de interação de moléculas com o DNA. Diferentemente dos intercaladores, os ligantes nos sulcos não induzem a grandes mudanças de conformação do DNA, entretanto, mostraram utilidade na clínica como agentes anticâncer e também antibacteriano (PALCHAUDHURI e HERGENROTHER, 2007).

Figura 5 – Modos de interação das moléculas com o DNA. Intercalação entre os pares de bases e ligações aos sulcos menor e maior.



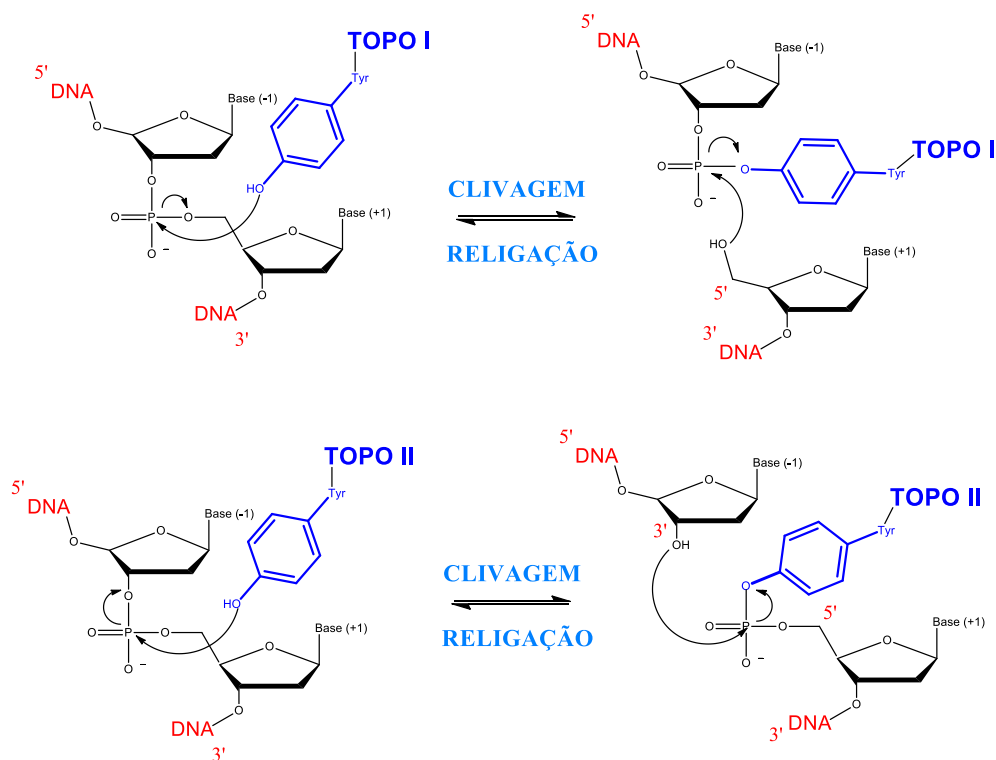
3.4 Topoisomerases

As topoisomerases são enzimas essenciais para processos celulares envolvidos em etapas de replicação do DNA, transcrição, recombinação e remodelamento da cromatina (POMMIER, 2009; WANG, 2006). Em particular, as topoisomerases desempenham papel fundamental ligando-se à dupla hélice do DNA e conduzindo a uma quebra transitória em uma ou nas duas fitas de DNA, passando uma ou ambas as fitas ao longo da abertura do DNA e religando as quebras realizadas (LI et al., 2004).

As topoisomerases são classificadas em: tipo I (Topo I) e tipo II (Topo II), ambas possuem o mesmo mecanismo catalítico, através do ataque nucleofílico da hidroxila do resíduo tirosil à ligação fosfodiéster do DNA (Figura 6) (POMMIER, 2009). Entretanto, a classificação é baseada principalmente pela clivagem das cadeias simples ou da dupla cadeia do DNA (SHERER e SNAPE, 2015): a Topo I age quebrando uma única fita, enquanto que a Topo II atua clivando as duas fitas de forma dependente de ATP (Adenosina Trifosfato) (ROCA, 2009). Essas enzimas são expressas em diferentes níveis nos variados tipos celulares.

A expressão da topoisomerase I é observada nas linhagens celulares de câncer de cólon, enquanto que das topoisomerases II são mais frequentes em linhagens celulares de câncer de mama e ovário (HOLDEN, ROLFSON e WITTEW, 1990).

Figura 6 – Mecanismo catalítico das topoisomerases tipo I e tipo II. Ataque nucleofílico da enzima à ligação fosfodiéster do DNA.



Ambas as classes de topoisomerases foram pesquisadas como alvos terapêuticos para o tratamento do câncer. A Topo I é reconhecida como um dos mais promissores alvos para descoberta de fármacos anticâncer por sua superexpressão em células cancerígenas (CHEN et al., 2016). O protótipo inibidor da topoisomerase I, o fármaco camptotecina isolado da *Camptotheca acuminado* exibiu efeito antineoplásico intenso, porém devido a sua elevada toxicidade ocasionou o desenvolvimento de análogos sintéticos, como o irinotecano e o topotecano (WALL et al., 1966; PIZZOLATO e SALTZ, 2003). Infelizmente, os derivados da camptotecina possuem diversas limitações clínicas, tais como: supressão da medula óssea dose-dependente, inativação rápida do anel lactona hidrolisado em pH fisiológico e resistência de algumas células cancerígenas (BECK et al., 2015; LI e LIU, 2001). Com essas limitações aumenta a busca por desenvolvimento de novos inibidores Topo I não-camptotecina mais potentes e seletivos.

A inibição da topoisomerase II ocorre através da estabilização do complexo enzima-DNA, isto é, bloqueando a religação ou intercalando-se com as cadeias de DNA. Os inibidores de topoisomerase II como, etoposídeo, foram introduzidos em vários esquemas quimioterapêuticos de sarcomas, câncer de pulmão e neoplasias hematológicas (ALBERS et al., 2008; GOORIN et al., 2002).

Alguns fármacos antitumorais utilizados na prática clínica apresentam inibição da topoisomerase II, a doxorubicina e daunorrubicina (classe das antraciclinas), tenoposídeo (classe das epipodofilotoxinas), amsacrina (classe das acridinas) e algumas tiossemicarbazonas (AZAROVA et al., 2007; HUANG et al., 2010).

Existem duas isoformas da Topo II presentes nos mamíferos: a topo II α expressa preferencialmente nas células em proliferação e essencial para a conclusão da mitose; e a topoisomerase II β (Topo II β) presente em todas as células, sendo indispensável ao desenvolvimento celular normal, mas não é essencial para a proliferação celular (NITISS, 2009; TIWARI et al., 2012). Estudos revelaram que a cardiotoxicidade do quimioterápico doxorubicina ocorre por causa da expressão de Topo II β em cardiomiócitos, com isso enfatizando ainda mais a necessidade de terapia Topo II α específica (ZHANG et al., 2012).

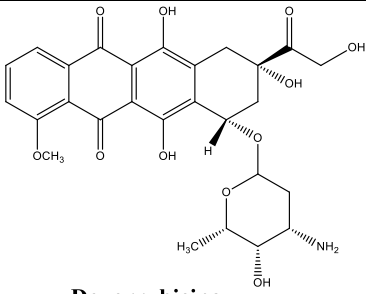
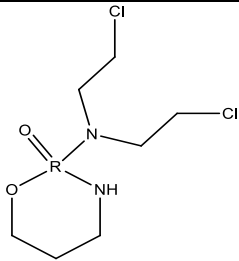
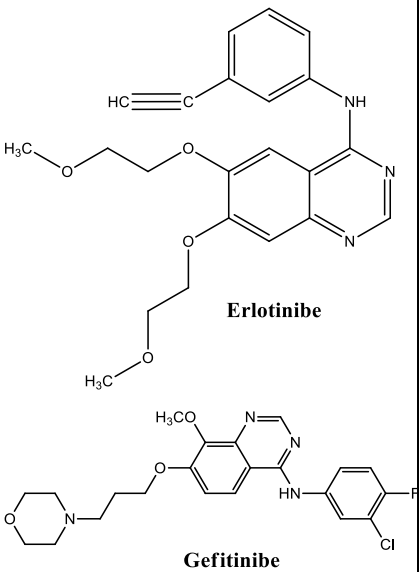
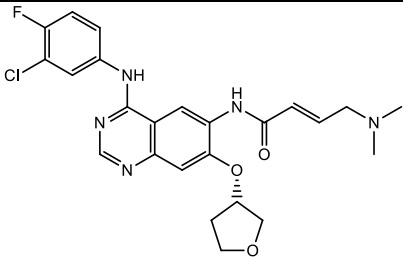
3.5 O microambiente tumoral e a resistência aos fármacos anticâncer

Fisiologicamente, o estroma celular em indivíduos saudáveis é uma barreira física contra a tumorigênese. No entanto, as células neoplásicas produzem várias alterações para convertê-lo em um microambiente tumoral favorável ao seu crescimento. Isto implica na migração de células do estroma, remodelação da matriz extracelular e expansão da vascularização. As diferenças regionais, incluindo acidez e hipóxia também influenciam a sua progressão (MERIC-BERNSTAM e MILLS, 2012; JUNTILA e DESAUVAGE, 2013).

Assim, o microambiente tumoral pode influenciar a resposta farmacológica e mediar a resistência pelos seguintes mecanismos: (a) a partir da sinalização de fatores solúveis ou moléculas de adesão celular; (2) interferir a interação entre o fármaco e o alvo molecular; (3) imunossupressão e (4) crescimento tumoral acelerado. Em adição, a adesão das células cancerígenas às proteínas da matriz extracelular pode suprimir a resposta farmacológica através da sinalização mediada pelo receptor integrina $\beta 1$. Similarmente, os fatores solúveis secretados pelas células do estroma, tais como IL-6 e proteases catépsina, também demonstram diminuir a eficácia terapêutica (OLSON e JOYCE, 2013; SHREE et al., 2011).

A resistência aos antineoplásicos produzida pelo microambiente tumoral pode ser iniciada por múltiplas linhagens de células e componentes estruturais do estroma, incluindo, fibroblastos, células endoteliais, perícitos, fibras musculares lisas, neutrófilos, macrófagos, integrinas, fibronectinas, colágenos, células dendríticas, células *natural-killer* e outros tipos de linfócitos (SAMADI et al., 2015). A Tabela 1 apresenta exemplos de quimioterápicos tradicionais para o tratamento do câncer, segundo o alvo terapêutico, tipo de câncer, mecanismos de resistência envolvendo o microambiente tumoral, bem como a estrutura química (CHEN et al., 2015).

Tabela 1 – Fármacos antineoplásicos e mecanismos de resistência mediado por células estromais derivados do microambiente tumoral.

Fármaco	Estrutura química	Tipo de câncer	Alvo terapêutico	Mecanismo de resistência
Doxorrubicina	 Doxorrubicina	Mieloma múltiplo. Linfoma de Burkitt.	Intercalação do DNA; inibição da topoisomerase II.	Resistência induzida por estroma. Resistência induzida por estroma; fatores parácrinos incluindo IL-6 e Timp-1 das células endoteliais do timo no microambiente tumoral modulam a sobrevivência de células do linfoma após quimioterapia.
Doxorrubicina e Ciclofosfamida	 Ciclofosfamida	Câncer de mama.	Intercalação do DNA; inibição da topoisomerase II e interfere na replicação do DNA.	Resistência induzida por estroma; produção de TNF- α pela células endoteliais e outras células estromais.
Erlotinibe e Gefitinibe	 Erlotinibe Gefitinibe	Câncer de pulmão metastático, câncer colorretal, pancreático, ou cabeça e pescoço.	Inibem o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), pode estimular apoptose e diferenciação de células cancerígenas ausentes de EGFR.	Resistência induzida por estroma.
Afatinibe	 Afatinibe	Câncer de pulmão metastático, câncer de mama e outros cânceres derivados de EGFR/HER.	Inibe irreversivelmente EGFR e HER2.	Expressão no estroma do fator de crescimento fibroblástico (FGF) e <i>up-regulation</i> do receptor de fator de crescimento fibroblástico (FGFR) permitindo a sobrevivência das células cancerígenas resistentes ao afatinibe.

Adicionalmente ao descrito acima, sabe-se que a relação entre o microambiente tumoral, a inflamação crônica e as alterações funcionais do sistema imune permitem a secreção de fatores solúveis, citocinas e outros segundos mensageiros endógenos pelas células cancerígenas e estromais (SWARTZ e LUND, 2012). Deste modo, Wang e Dubois (2010) relataram os mediadores lipídicos conhecidos coletivamente como oxilipinas sendo importantes reguladores do microambiente tumoral. Esses lipídios derivados dos ácidos araquidônico e linoleico influenciam a polaridade das células estromais e modulam a progressão do tumor através de vários mecanismos, tais como ativação de receptores específicos nas células cancerosas que facilitam a proliferação celular, migração e invasão; também induzem a secreção de fatores angiogênicos e fornecem suporte para metástase (WANG e DUBOIS, 2010).

Uma melhor compreensão do envolvimento das oxilipinas no câncer pode nortear o planejamento de novas estratégias terapêuticas anticâncer (APAYA, CHANG e SHYUR., 2016).

3.6 Polifarmacologia no tratamento do câncer

O desenvolvimento de fármacos é um processo complexo e dispendioso (DICKSON e GAGNON, 2004). Devido aos avanços dos estudos moleculares, os esforços para a descoberta de novas moléculas bioativas têm se amplificado. A concepção de "um fármaco um alvo" foi transformada para "um fármaco alvos múltiplos", conhecido como polifarmacologia (HOPKINS, 2008).

Assim, a polifarmacologia surge como novo paradigma na descoberta de fármacos. Os fenômenos polifarmacológicos incluem: (a) um fármaco agindo em múltiplos alvos de uma única doença, ou (b) um fármaco atuando em vários alvos pertencentes a múltiplas doenças. Essas abordagens visam descobrir alvos antes desconhecidos para medicamentos já existentes (também conhecido como reposicionamento) (OPREA e MESTRES, 2012). Para isto é necessário a integração sistemática de diferentes áreas, incluindo modelagem computacional, síntese orgânica, testes farmacológicos *in vitro/in vivo* e estudos clínicos (DAR et al., 2012).

Dessa forma, o conceito da polifarmacologia é particularmente interessante no contexto do câncer e da "*tríade da morte*" envolvida nesta doença. Esta tríade consiste em três eixos principais: crescimento do tumor primário, metástase e resistência à fármacos. Cada um desses eixos é constituído de alvos moleculares independentes e responsáveis pelas características desta patologia. Com isso, para obtenção de um tratamento eficaz, seria

importante o fármaco atuar em múltiplos alvos biológicos. De fato, a combinação de quimioterápicos antineoplásicos atinge diversos alvos. No entanto, a maioria dessas terapias combinatórias atuam em apenas um alvo dos eixos da "tríade da morte". Desse modo, seria benéfico se o agente anticâncer tivesse como alvos os três eixos da tríade com o propósito de aumentar a eficácia terapêutica (JANSSON et al., 2015).

Neste sentido, a abordagem polifarmacológica pode potencializar a eficácia (de forma aditiva ou sinérgica) de agentes clássicos alvo-único, proporcionando uma menor resistência e redução dos efeitos adversos (APAYA et al., 2016).

3.7 Química Medicinal

A Química Medicinal caracteriza-se por estudar as razões moleculares da ação dos fármacos, a relação entre a estrutura química e a atividade biológica/farmacológica, além do planejamento racional de novos fármacos. Em função dos múltiplos fatores envolvidos na resposta terapêutica de um fármaco, torna-se necessário a interdisciplinaridade fundamentada na química orgânica, farmacologia e química computacional (BARREIRO, 2002; BARREIRO, 2015).

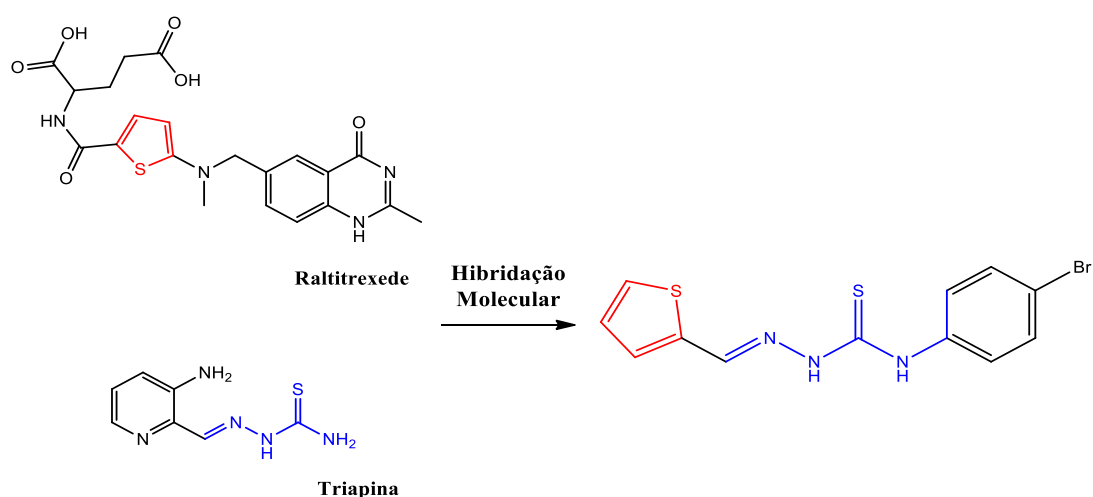
A identificação de compostos bioativos, que possam ser estruturalmente modificadas para adequação de propriedades que conduzam a um elevado potencial terapêutico, é um dos maiores desafios no planejamento racional de novos candidatos a fármacos. Geralmente, o alvo terapêutico é representado por uma enzima ou receptor e o planejamento do novo ligante é realizado introduzindo-se modificações moleculares clássicas no substrato natural e/ou sintético, já conhecido para este receptor (BARREIRO e BALZANI, 2009).

As estratégias clássicas de modificação molecular para o planejamento de ligantes são: bioisosterismo, hibridação molecular, simplificação molecular, química computacional e combinatória (QSAR e modelagem molecular) (SILVA, 2014). Entre as estratégias mais utilizadas encontra-se a hibridação molecular. Essa técnica é baseada no reconhecimento das subunidades farmacofóricas da estrutura química de dois ou mais compostos bioativos conhecidos e que através da fusão dessas subunidades forma-se uma nova entidade química híbrida (NCE, do inglês *new chemical entity*). O composto derivado resultante apresenta o esqueleto molecular que mantém as características das moléculas originais (SAMALA et al., 2014).

Diversos trabalhos envolvendo hibridação molecular foram publicados. Recentemente, nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2015) sintetizou uma nova entidade química

proveniente da hibridação molecular entre a tiossemicarbazona presente na estrutura do fármaco antitumoral Triapina® e o núcleo tiofeno farmacóforo do antineoplásico Raltitrexede, obtendo o derivado tiofeno-2-tiossemicarbazona (Figura 7). Este híbrido apresentou atividade antitumoral *in vivo* e citostática revelando-se um composto promissor candidato a fármaco anticâncer.

Figura 7 – Estrutura química do derivado tiofeno-2-tiossemicarbazona obtido por hibridação molecular.



Outras estratégias fundamentadas no conhecimento das estruturas dos alvos moleculares ou dos complexos ligante-receptor permitem o planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*). Em contraste, quando a estrutura do alvo eleito não é conhecida, métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*) podem ser utilizados. Em muitos casos, o uso integrado de estratégias de SBDD e LBDD pode fornecer informações úteis no planejamento de NCE, por meio da sinergia e complementaridade de conhecimentos entre as estratégias (GUIDO et al., 2008; ANDRICOPULO et al., 2009).

Uma nova abordagem no planejamento de fármacos baseia-se em múltiplos alvos terapêuticos (MTDD, do inglês *multi-target drug design*) e parece ser promissora devido a crescente evidência das doenças complexas multifatoriais, como as neurológicas, infecciosas e o câncer serem consideradas poligênicas e englobarem várias proteínas sinalizadoras. O desenvolvimento do MTDD constitui em duas estratégias: a combinação de farmacóforos de ligantes alvo-único e o *screening* de compostos através da aplicação simultânea de múltiplos

modelos computacionais para identificar moléculas bioativas com diferentes atividades biológicas (BOTTEGONI et al., 2012; LAVECCHIA e CARMEN, 2016).

As principais vantagens do MTDD consistem em atenuar os problemas farmacocinéticos, reduzir as interações entre fármacos e amenizar a resistência farmacológica. Diversos trabalhos mostraram que a estratégia MTDD geralmente exibe um maior sinergismo, em comparação com a associação de vários fármacos (LECOUTEY et al., 2014; SHANG et al., 2014).

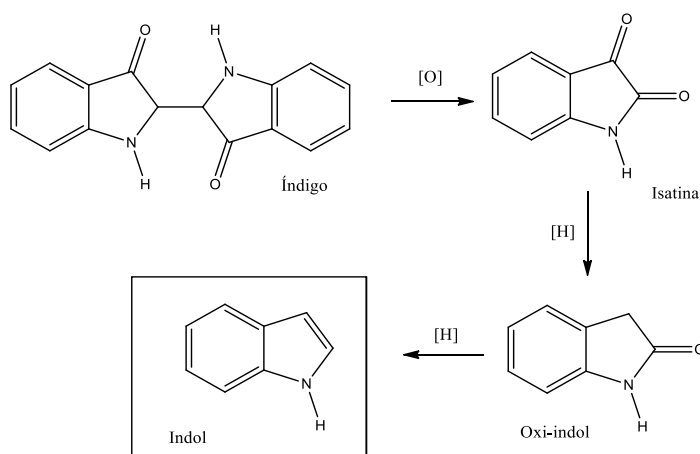
Embora o MTDD seja potencialmente reconhecido na perspectiva da química medicinal, ainda representa um grande desafio para o planejamento de novos fármacos. Isto se deve aos problemas relacionados com a identificação e otimização de uma série de compostos destinados a múltiplos alvos ainda continuarem insolucionáveis (PRATI, ULIASSI e BOLOGNESI, 2014).

3.8 Indol

A química do indol teve início com a investigação da estrutura do índigo, um corante azulado extraído de plantas do gênero *Indigofera*. Em 1866, Baeyer e Knop sintetizaram pela primeira vez o indol a partir da reação de oxidação do índigo, obtendo-se a isatina seguido por duas etapas de redução, formando o intermediário oxi-indol e por fim o indol (Esquema 1) (GRIBBLE, 2007).

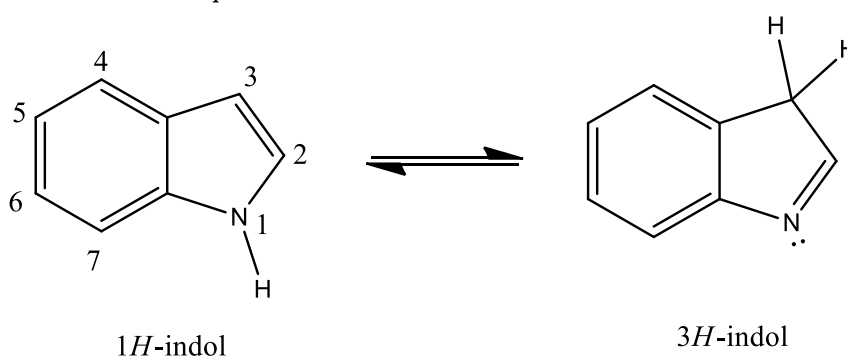
O indol é um sistema aromático que possui dez elétrons π obtidos pela deslocalização do par de elétrons no átomo de nitrogênio. É um composto fracamente básico e seu ácido conjugado é forte ($pK_a = -2.4$) (SARKER e NAHAR, 2009).

Esquema 1 – Reação da obtenção do indol a partir do Índigo.



O anel indólico existe em duas formas tautoméricas: *1H*- e *3H*- indol (Figura 11). O *1H*-indol possui o grupo NH, fracamente ácido com o valor de pKa em 16.82 (25C°), sabe-se que sua ligação com íons metálicos alcalinos e reagentes Grignard forma-se sais por desprotonação (OMOTE et al., 1969). No *3H*-indol o átomo de nitrogênio (*N*-1) é considerado como nitrogênio imínico e o átomo de carbono (C3) torna-se carbono sp³, de modo que o comportamento de *3H*-indol em direção a íons metálicos pode ser diferente do *1H*-indol devido a coordenação do nitrogênio imínico e a ressonância do *1H*-indol não favorecer sua ligação à íons metálicos (YAMAUCHI et al., 1990).

Esquema 2 – Formas tautoméricas do indol.

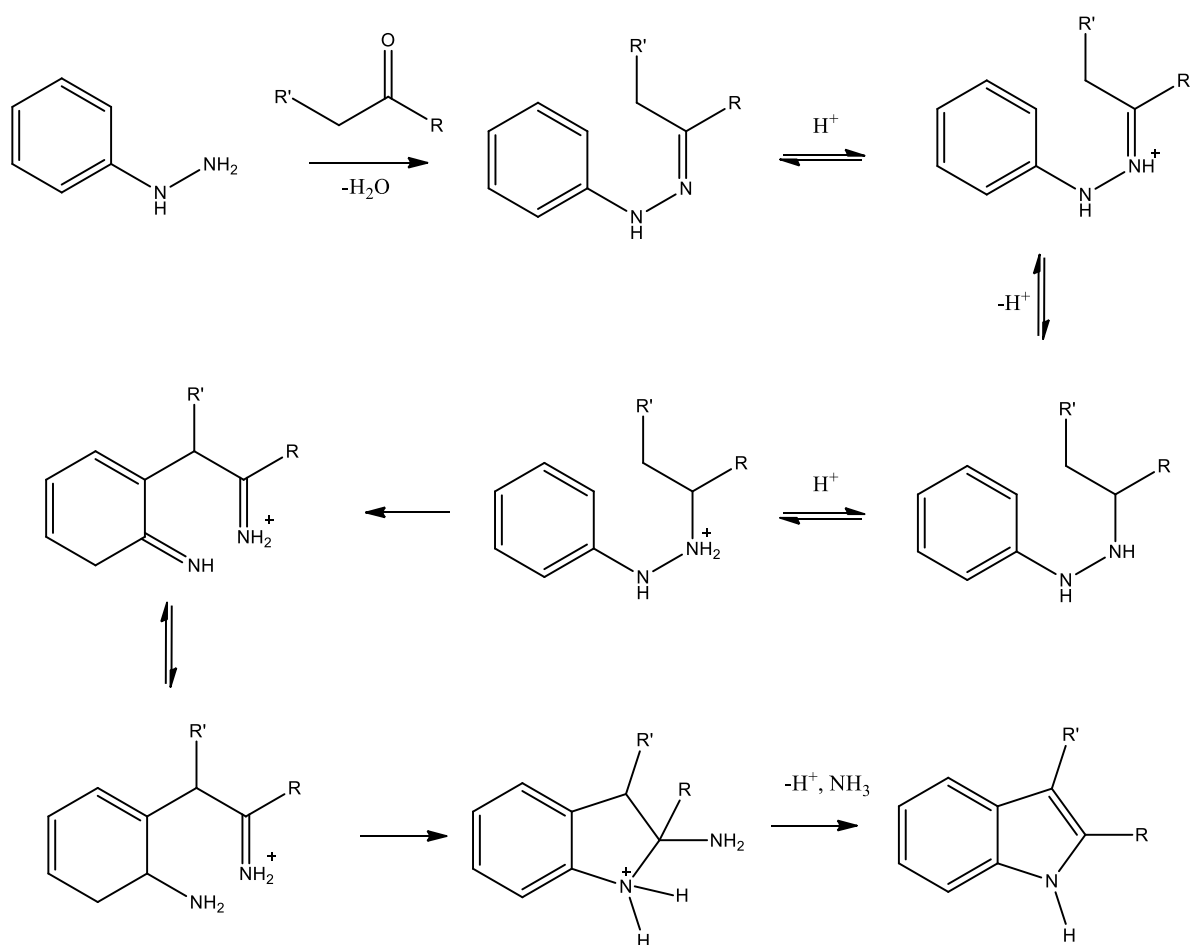


Para a obtenção de derivados indólicos a reação de Fisher é utilizada como método de síntese para uma variedade de intermediários indólicos e compostos biologicamente ativos (JOULE e MILLS, 2010).

A síntese de Fischer (Esquema 3) enoliza a *N*-arilhidrazona em indóis. Em diversas situações, a reação de indolização é realizada por simples aquecimento da cetona ou aldeído e arilhidrazina com o apropriado ácido ou catalisador ácido sem isolar o intermediário hidrazona. A vantagem consiste na inclusão de amplos grupamentos funcionais no anel aromático (HUMPHREY e KUETHE, 2006).

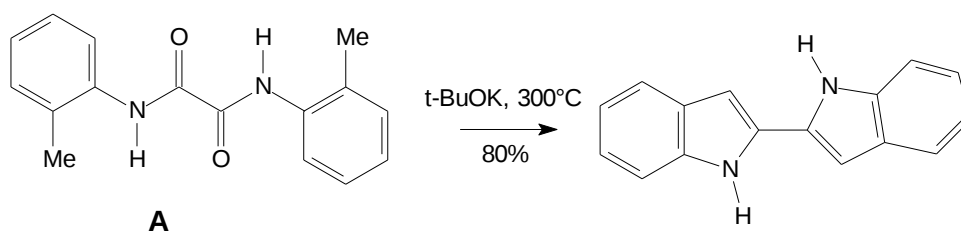
O mecanismo envolve o rearranjo do tautômero enehidrazina a bis- iminobenzilcetona. Ocorrendo ciclização e aromatização com perda de amônia, originando o produto indol (HUGHES, 1993).

Esquema 3 – Síntese de Fisher.



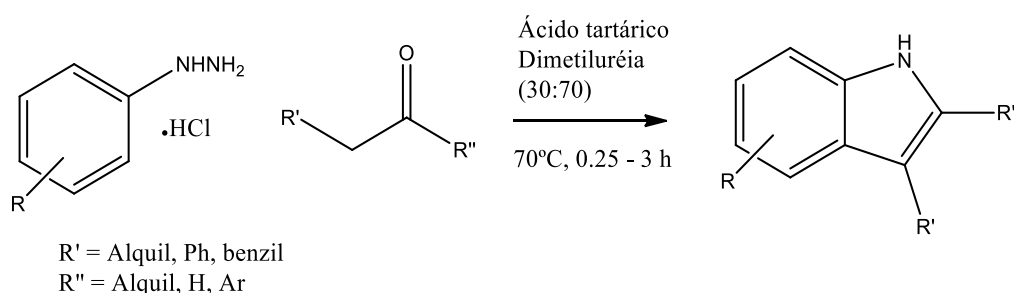
Outro modo de obtenção de indóis consiste na ciclização de Madelung (Esquema 4), uma abordagem usual para síntese de indol sem grupamentos funcionais. Por exemplo, o aquecimento de diamida (**A**) com tert-butóxido de potássio (t-BuOK) como sendo o método de escolha para preparação de 2,2-bis-indolil. O controle das condições reacionais é crucial a fim de otimizar os resultados (KATRITZKY et al., 2008).

Esquema 4 – Obtenção do indol através da Síntese de Madelung.



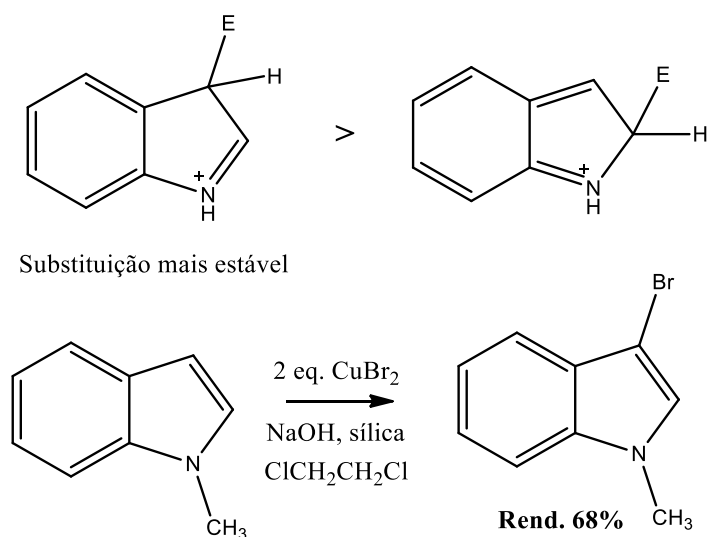
Mais recentemente, Gore e cols. (2012) sintetizaram derivados indólicos apresentando excelentes rendimentos (87-97%) através da reação entre fenilhidrazina e uma variedades de cetonas em condições suaves (70°C) e mistura de ácido tartárico:dimetiluréia (30:70) (Esquema 5).

Esquema 5 – Síntese de indóis sob condições suaves (70°C).



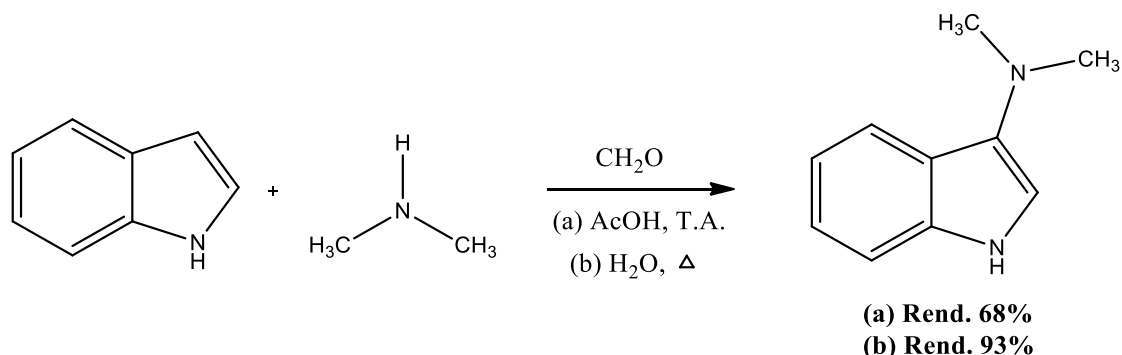
A alta reatividade do indol pode ser observada na substituição eletrofílica que ocorre no anel pirrol de cinco membros devido a maior reatividade comparado ao anel benzeno nessa reação. Como o heterociclo é rico em elétrons, o indol sofre substituição eletrofílica aromática basicamente em C-3 devido ao aumento da densidade de elétrons e a estabilidade de uma de suas formas ressonantes com cargas (JOULE e MILLS, 2010), como por exemplo abaixo, a bromação do indol (Esquema 6).

Esquema 6 – Formas ressonantes do núcleo indólico e a bromação do indol.



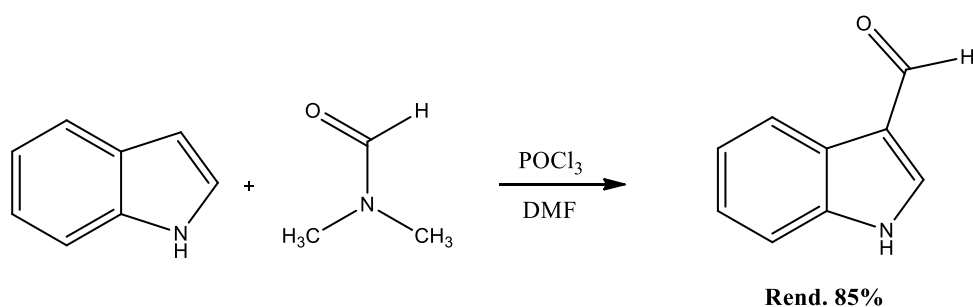
A reação de Mannich é outro exemplo de substituição eletrofílica aromática na qual o indol pode produzir um derivado aminometila em temperatura ambiente, ácido acético e com rendimento reacional de 68% (Esquema 7).

Esquema 7 – Reação de Mannich.



Da mesma forma, utilizando a reação de Vilsmeier-Haack pode-se introduzir um grupo aldeído na posição C-3 do indol (Esquema 8) (SARKER e NAHAR, 2009).

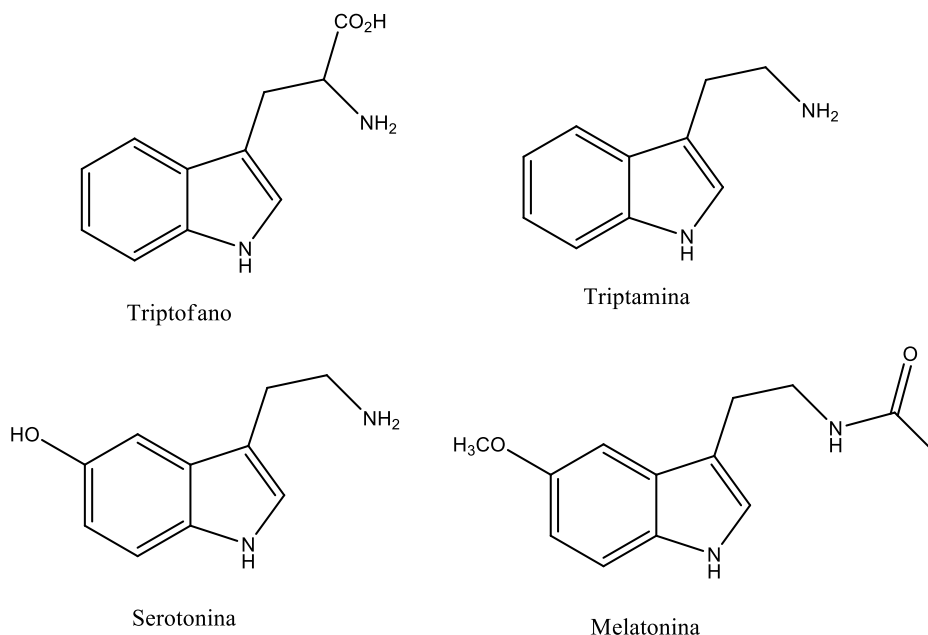
Esquema 8 – Reação de Vilsmeier.



3.8.1 Atividades biológicas do indol

O indol é um heterocíclico aromático constituído por um anel benzeno ligado a um anel pirrol. Este composto orgânico é predominantemente encontrado em produtos naturais de várias plantas e está presente em muitos compostos biologicamente ativos (NICOLAU E SNYDER, 2003). São os compostos heterocíclicos com importância medicinal mais distribuídos na natureza (Figura 8). Exemplos: (a) o triptofano, aminoácido essencial que compõe a maior parte das proteínas, e também é precursor biossintético para vários metabólitos secundários contendo 2,3-di-hidro-indol-triptamina. (b) Em animais, a serotonina (5-hidroxi-triptamina), é um neurotransmissor atuante dos sistemas nervoso, cardiovascular e gastrointestinal. (c) O hormônio melatonina que age controlando o ritmo diurno das funções fisiológicas. Ademais, os indóis possuem a propriedade de mimetizar estruturas peptídicas e assim interagirem reversivelmente com as enzimas, de modo a proporcionar oportunidades para descobertas de novos fármacos com diferentes modos de ação (KAUSHIK et al., 2013).

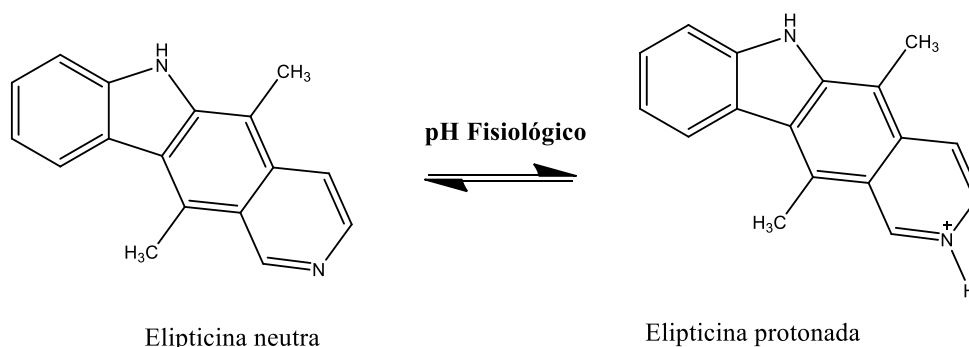
Figura 8 – Compostos naturais contendo indol.



Nesta perspectiva farmacológica dos indóis, temos disponíveis os fármacos antitumorais inibidores da polimerização da tubulina obtidos a partir de produtos naturais ou por semi-síntese. Em 1965, os fármacos vincristina e vinblastina, derivados do *Catharanthus roseus*, foram os primeiros reconhecidos e estão entre os agentes inibidores da polimerização da tubulina mais antigos utilizados na clínica. Muitos esforços são realizados para identificar novos derivados do alcalóide da *vinca* mais ativos e menos citotóxicos. Entre os compostos sintetizados, a vindesina e vinorelbina têm sido aplicados na terapêutica do câncer (DUFLOS, KRUCZYNSKI e BARRET, 2002).

Outro derivado indólico bioativo é o antineoplásico elipticina (Figura 9) que possui o mecanismo de ação baseado principalmente na intercalação do DNA e/ou inibição da topoisomerase II. A elipticina se liga a Topo II e ao complexo de DNA-Topo II na sua forma desprotonada, em contraste com sua forma protonada intercaladora do DNA. A inibição da Topo II está associada com quebras no DNA induzidas por este fármaco (STIBOROVA et al., 2003; CANALS et al., 2005).

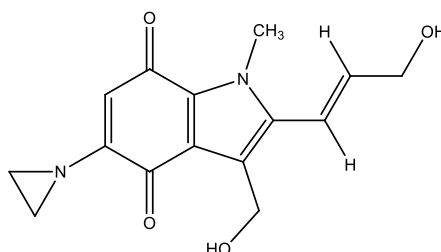
Figura 9 – Estrutura química do agente anticâncer elipticina na forma neutra e desprotonada.



Neste contexto, os compostos heterocíclicos indólicos são considerados bons ligantes ao DNA devido a presença do átomo de nitrogênio possuir um par de elétrons localizado (EBRAHIMI et al., 2013). Interações não covalentes com outras moléculas podem ocorrer através do grupo NH e do empilhamento π - π de elétrons, na porção do anel aromático do indol (SHIMASAKIA et al., 2009), características relevantes relatadas para compostos ligantes ao DNA. Os derivados benzo[c,d]indol-2-(1H)ona, ausentes de cadeias laterais básicas foram revelados como novos intercaladores de DNA e como eficazes agentes antitumorais (LI et al., 2010).

Exemplo semelhante ao descrito acima é o pró-fármaco apaziquone (Figura 10) (indol-quinona), um análogo químico do antineoplásico mitomicina C. No ambiente hipóxico este pró-fármaco é convertido em metabólitos ativos por redutases intracelulares. Os metabólitos ativos alquilam o DNA conduzindo a morte celular apoptótica. Esta atividade é expressa preferencialmente em células cancerígenas (YUTKIN et al., 2012).

Figura 10 – Estrutura química da apaziquone.

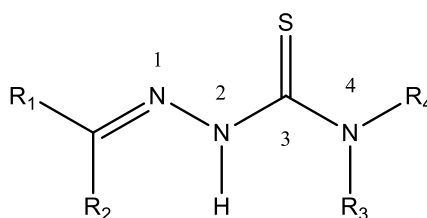


Dessa forma, compostos contendo o núcleo indol constituem uma classe de moléculas terapêuticas importantes, susceptíveis a substituir no futuro muitos medicamentos antineoplásicos existentes (BISWAL et al., 2012).

3.9 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas (Figura 11) são compostos orgânicos nitrogenados pertencentes à família das iminas, também denominadas bases de Schiff. Apresentam vários átomos doadores de hidrogênio e diferentes modos de coordenação, dependendo dos reagentes de partida e das condições de reação para sua obtenção (SILVA, 2013; LOBANA et al., 2009).

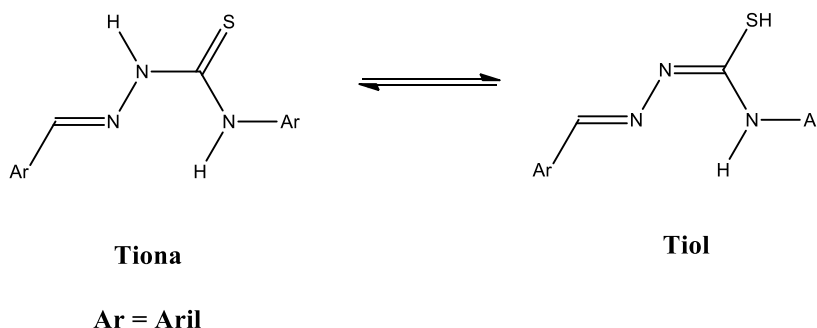
Figura 11 – Estrutura geral das tiossemicarbazonas.



R_1, R_2, R_3 e $R_4 = H$, alquil ou aril

Esses compostos nitrogenados têm alta deslocalização eletrônica, principalmente quando possuem grupos aromáticos ligados ao carbono da imina. Dessa forma, podem existir em equilíbrio tautomérico nas formas tiol ou tiona (Esquema 9) (CASAS et al., 2000). Em virtude do aumento nucleofílico do enxofre tiólico sendo comparado com a tiona, a forma tiol explica a versatilidade de serem 1,3-dinucleófilos, os quais podem realizar reações de adição sendo caracterizados como doadores de Michael.

Esquema 9 – Formas tautoméricas tiol e tiona para as tiossemicarbazonas.

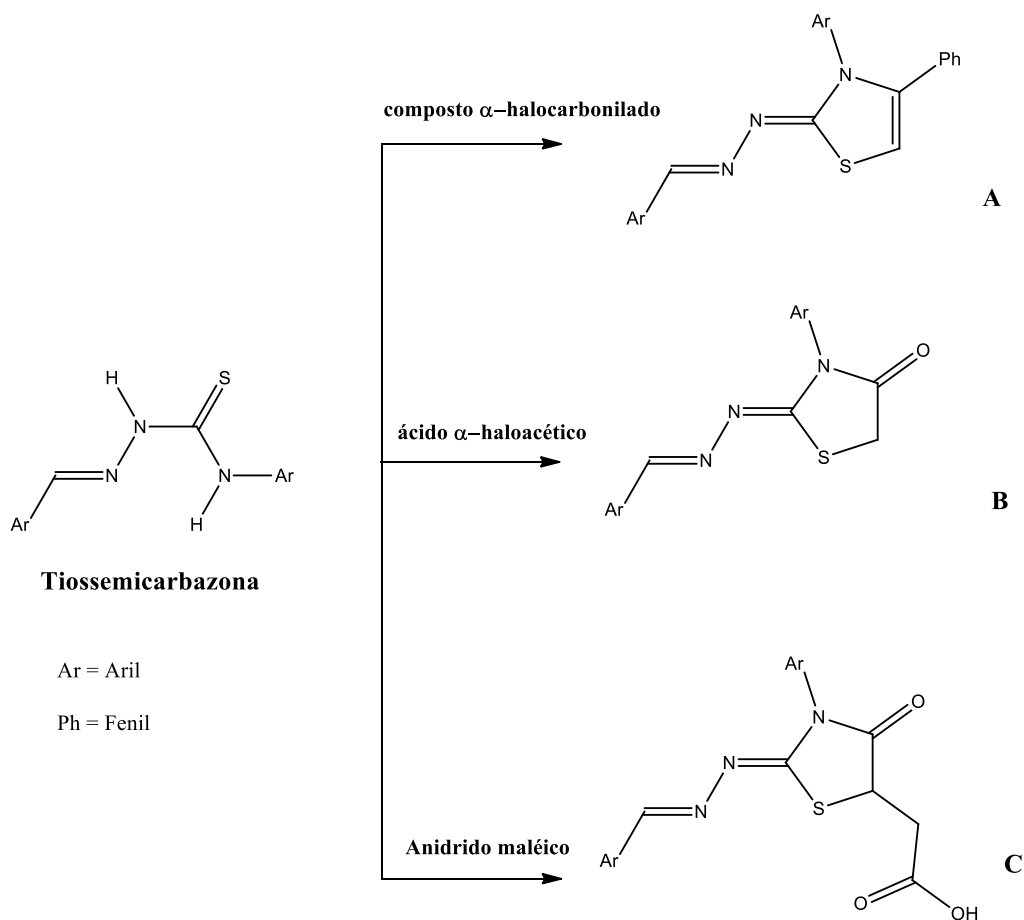


As tiossemicarbazonas podem ser obtidas através de dois métodos: o primeiro de forma direta, a partir de reações quimiosseletivas entre tiossemicarbazidas e aldeídos ou cetonas (SARODINICK et al., 2003; HOLLA et al., 2003); o segundo de forma indireta, onde as tiossemicarbazidas são previamente preparadas a partir de reações da hidrazina,

isotiocianatos (PAPASTAIKOU DI et al., 1995; GÜRSOY, TERZIOGLU e ÖTUK, 1997), ditiocarbamatos (ASHTON et al., 1993), ácidos tiocarbamiltioglicólicos ou dissulfeto de carbono, este último em presença de azidas ou aminas primárias (TENÓRIO et al., 2005).

Além disso, as tiossemicarbazonas podem servir de *scaffold* para a ciclização de uma ampla variedade de heterocíclicos (Esquema 10), particularmente a síntese de tiazóis (A), 4-tiazolidinonas (B) e derivados tiazolidinônicos substituídos na posição 5 por um grupo acetil (C), envolvendo ácido α -haloacético, compostos α -halocarbonilados e anidrido maleico, respectivamente (DAWOOD et al., 2015).

Esquema 10 – Rota sintética de derivados ciclizados da tiossemicarbazona.

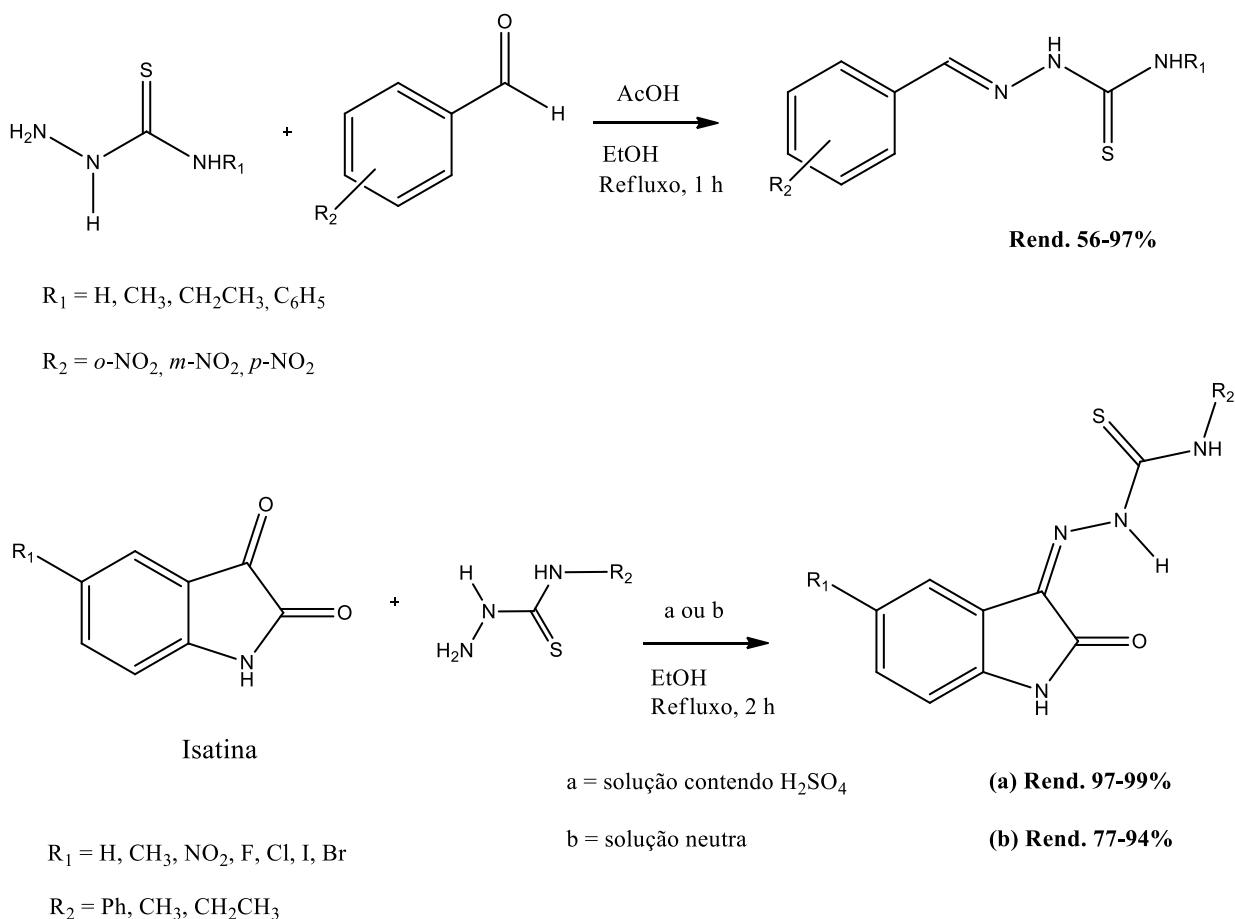


3.9.1 Obtenção direta de tiossemicarbazonas

A obtenção direta das tiossemicarbazonas consiste em quantidades equimolares das tiossemicarbazidas com os derivados carbonilados (aldeídos ou cetonas) (Esquema 11). As condições reacionais requerem refluxo do solvente (metanol, etanol, THF e acetonitrila) e a adição de catalisador ácido (ácido de Brönsted) pode ser necessária quando o composto

carbonílico está ligado a um grupo retirador de elétrons. Geralmente, esta metodologia sintética é simples, rápida e apresenta altos rendimentos (CUNHA, SANTOS e SILVA, 2011; KARAH, 2002; ALI, et al., 2014; TENÓRIO et al., 2005).

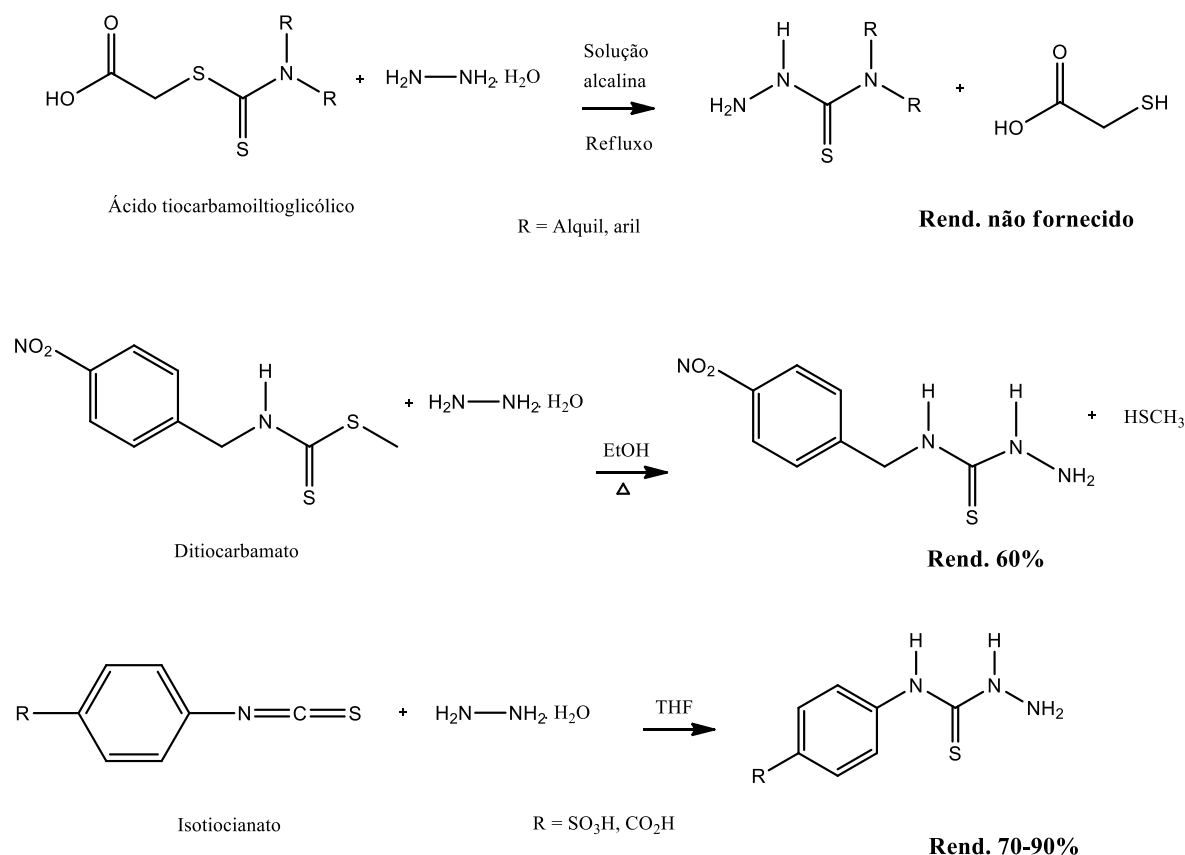
Esquema 11 – Método direto de obtenção de tiossemicarbazonas a partir de derivados carbonilados.



3.9.2 Obtenção indireta de tiossemicarbazonas

A forma indireta de obtenção de tiossemicarbazonas consiste na preparação prévia de tiossemicarbazidas e reação posterior com compostos carbonilados. São três metodologias sintéticas utilizadas para obtenção das tiossemicarbazidas (Esquema 12): o hidrato de hidrazina pode sofrer reações com ácido tiocarbamoilgliocólico em meio alcalino, bem como com ditiocarbamatos e isotiocianatos em meio etanólico, com rendimentos entre 60-90% (AQUINO, 2007; TENÓRIO et al., 2005).

Esquema 12 – Métodos de obtenção de tiossemicarbazidas a partir de reações da hidrazina com ditiocarbamatos, isotiocianatos e ácido tiocarbamoiltioglicólico.



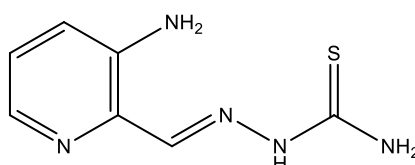
3.9.3 Atividades biológicas de tiossemicarbazonas

As atuações farmacológicas conhecidas para as tiossemicarbazonas são antibacterianas, antimalárica, antivirais e antiinflamatória (BECKFORD et al., 2011; KHANYE et al., 2010; RAWAL et al., 2007 OLIVEIRA et al., 2016). Além da interessante atividade antitumoral (HAVRYLIUK et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015). Entre as razões estruturais que explicariam esse amplo perfil farmacológico destaca-se ao fato desses compostos serem bons agentes quelantes, podendo coordenar-se a metais existentes nas estruturas de enzimas, inativando-as. Além disso, o enxofre presente no tiol nas tiossemicarbazonas pode se envolver em reações redox no interior do organismo (BERALDO, 2004).

Desde o primeiro relato da atividade anti-leucêmica da 2-formil-tiossemicarbazona em 1956 (BROCKMAN et al., 1956), a atividade anticâncer das tiossemicarbazonas tem sido intensamente explorada. O derivado tiossemicarbazônico mais investigado é o composto 3-aminopiridina-2-carboxaldeído-tiossemicarbazona (Triapina®), conhecido como um

promissor agente antitumoral frente a várias linhagens de células cancerígenas, este fármaco atualmente se encontra na fase II de ensaios clínicos para alguns tipos de tumores (ZEIDNER et al., 2014). A triapina[®] (Figura 12) inibe a ribonucleotídeo redutase, uma enzima que catalisa a redução de ribonucleotídeos a 2-desoxiribonucleotídeos durante a síntese do DNA. As tiossemicarbazonas formam complexo com ferro (III) no interior da célula, o qual é reduzido ao correspondente complexo ferro (II). Este complexo pode reagir com oxigênio resultando na produção de ROS capazes de inativar o resíduo tirosil presente na estrutura da enzima (POPOVIC-BIJELIC et al., 2011).

Figura 12 – Estrutura química da triapina[®].



Essa boa versatilidade como ligantes ocorre devido a deslocalização eletrônica e flexibilidade conformacional da cadeia molecular desses compostos nitrogenados, de modo a apresentar alto potencial antitumoral (PRABHAKARAN et al., 2013; MATESANZ, LEITÃO e SOUZA, 2013). Foi relatado que a substituição no nitrogênio terminal (*N*-4) das tiossemicarbazonas aumenta a toxicidade desses derivados (BERNHARDT et al., 2009) e como as propriedades biológicas dependem principalmente dos diferentes grupos nesta posição, cada vez mais tiossemicarbazonas substituídas estão sendo planejadas com satisfatórias atividades biológicas (OUYANG et al., 2016).

A topoisomerase II α é um alvo estabelecido para algumas tiossemicarbazonas. De acordo com estudos de Bisceglie et al. (2015), uma série de quinolina-2-carboxaldeído tiossemicarbazonas mostrou forte afinidade para esta enzima. Os autores correlacionaram a inibição com a atividade antiproliferativa, visto que as tiossemicarbazonas atuam como agentes antiproliferativos bloqueando o ciclo celular na fase G2/M, entre os alvos consistentes com este fato é a enzima topoisomerase II α superexpressa nessas fases do ciclo celular (BISCEGLIE et al., 2014).

O mecanismo de inibição da Topo-II α foi explicado por Huang et al. (2010). Neste estudo, os autores propuseram que as tiossemicarbazonas α -heterocíclico-*N*-4-substituídas inibem a Topo-II α através da ligação ao domínio ATPase da enzima, de modo a interferir na

hidrólise de ATP. Adicionalmente, estudos de modelagem molecular revelaram estes derivados tiossemicarbazônicos interagindo com o sítio ATPase em uma conformação planar com o nitrogênio do heterocíclico, nitrogênio da imina e enxofre.

A coordenação de compostos orgânicos com íons metálicos podem interferir de forma significativa nas propriedades biológicas desses derivados (KUMAR et al., 2016). De fato, a coordenação das tiossemicarbazonas com íons metálicos conduz estes compostos a adotarem uma estrutura planar mais rígida, e como sugerido por Huang et al. (2010) a conformação planar é biologicamente ativa, e, portanto, a formação de complexos induziria a uma inibição Topo-II α mais forte (ZEGLIS et al., 2011).

3.10 Tiazolidinonas

As 4-tiazolidinonas são heterociclos intensamente pesquisados para o planejamento de novos fármacos (TRIPATHI et al., 2014). Diversas propriedades biológicas têm sido relatadas para derivados tiazolidínicos, mostrando atividade fungicida, analgésica, antitumoral, antiulcerativa e bacteriostática (LIU et al., 2014). Atualmente os estudos das 4-tiazolidinonas encontram-se direcionados principalmente para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer (ASATI, MAHAPATRA e BARTHI, 2014).

A maioria das 4-tiazolidinonas bioativas pertencem aos derivados 5-ilideno contendo a ligação dupla exocíclica. Isto reflete no papel importante de substituir o C-5 no anel para aumentar o efeito farmacológico (KAMINSKY, ZIMENKOYSKY e LESYK, 2009; REVELANT et al., 2015).

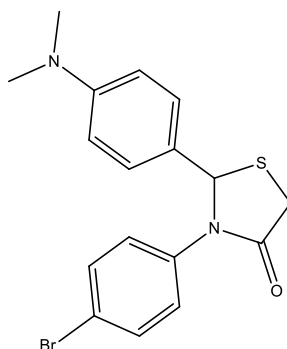
Uma variedade de alvos terapêuticos do câncer para as 5-eno-4-tiazolidinonas foram identificados e podem atuar como: inibidores das proteínas antiapoptóticas, Bcl-2 e a família Bax; inibidores da COX devido a sua potencial atividade anticâncer; inibidores do receptor *insulina-like growth factor-1* (IGF-1); moduladores do receptor de estrogênio (ERR- α); agentes inibidores de SHP-2 (SHP-2, um não-receptor de proteína-tirosina-fosfatase que medeia a sinalização celular através de fatores de crescimento e citocinas atuando na via de sinalização Ras/MAP quinase) e inibidores de TNF- α (LUGOVSKOY et al, 2002; LOOK et al., 1996; LIU et al., 2010; CHISAMORE et al., 2009; GERONIKAKI et al., 2008).

Apesar da elevada afinidade a diferentes alvos moleculares, a apoptose induzida por 4-tiazolidinonas foi mostrada em várias linhagens de células cancerígenas (ONEM-BAYRAN et al., 2012; LI et al., 2007). O mecanismo de ação apoptótico ocorreu através da inibição das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL (CHUMAK et al., 2014).

As 4-tiazolidinonas também exibiram redução do potencial elétrico da membrana mitocondrial em células leucêmicas, sendo este um dos mecanismos mais importantes para a morte mitocondrial mediada por apoptose celular (KUMAR et al., 2015).

A atividade antiproliferativa dos derivados 4-tiazolidinonas foi analisada por Kumar e cols. (2015). Os resultados mostraram que o composto 3-(4-bromofenil)-2-(4-(dimetilamino)fenil)-tiazolidin-4-ona (Figura 13) acumulou a maior parte de células na fase Sub-G1 do ciclo celular de forma dependente da concentração, sugerindo indução da morte celular. A avaliação *in vivo* deste derivado exibiu redução do volume tumoral sem afetar outros órgãos, mostrando múltiplas áreas de necrose e numerosas células apoptóticas.

Figura 13 – Estrutura química do derivado tiazolidinônico com atividade antitumoral.



De acordo com estudos de Wu e cols. (2014), os compostos possuindo este *scaffold* apresentaram potente atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* e a avaliação do efeito anti-migratório revelou a importância desses derivados como agentes anti-metastáticos.

Conforme relatado na literatura os derivados 4-tiazolidinonas apresentam ainda, forte afinidade com o DNA e inibem sua função, fator essencial para a atividade anticâncer. Estes derivados podem interagir com o DNA por três modos: intercalação entre os pares de base, interação eletrostática e ligação no sulco principal e secundário do DNA (PAULIKOVÁ et al, 2012; HASSONA et al. 2015; PINDUR et al., 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudo Químico

Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados foram: etanol absoluto, ácido acético glacial, tolueno, benzeno, metanol, dimetilformamida (DMF), acetato de etila, *n*-hexano, diclorometano anidrido maléico, água destilada, 1-*H*-indol-3-carboxaldeído substituídos, tiosemicarbazidas substituídas, isotiocianatos substituídos, sulfato de sódio anidro, hidrazina, dimetilsulfóxido deuterado, ácido 2-cloroacético e acetato de sódio anidro. Os reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos e suas análises pertencem aos fabricantes Sigma[®], Aldrich[®], Acros[®], Merck[®], Vetec[®] ou Quimis[®].

Placas utilizadas na cromatografia

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram conduzidas em placas de sílica gel 60 F254 da MERCK de 0.25 mm de espessura. A leitura das mesmas foi realizada através de radiação de ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 ou 366 nm ou por meio de vapores de iodo.

Pontos de Fusão

Os pontos de fusão foram medidos no equipamento Fisatom, Modelo 431, em tubos capilares visualizados no sistema óptico com aumento de 4x.

Espectroscopias de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C

A caracterização estrutural foi realizada através espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV) em espectrofotômetro Modelo IFS 66, pastilhas de KBr. Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrofotômetros Varian Modelo Plus 300 e 400 MHz e utilizado como solvente DMSO-d₆. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) indicadas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram designadas da seguinte forma: simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd), tripleto (t), quadruplete (q), multiplete (m). A espectrometria de Massas foi realizada no espectrometro de massa de ionização por dessorção a laser assistida por matriz com tempo de voo (MALDI-TOF-EM), no modelo Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA).

4.1.1 Métodos de Síntese

4.1.2 Procedimento Geral para Obtenção dos derivados hidrazina carbotioamidas substituídos (LqIT/LT)

Em um balão de fundo redondo, com capacidade para 100 mL foram adicionados 1 g de isotiocianato substituído e 15 mL de diclorometano e deixado sob agitação por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado gota-a-gota, hidrazina. Após aproximadamente 15 minutos houve formação de precipitado, a reação permaneceu sob agitação por aproximadamente 1 hora. Ao final da reação, o produto foi filtrado e purificado com sucessivas lavagens com diclorometano.

Síntese do *N*-(naftaleno-2-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-34): A mistura de 1-naftaleno-isotiocianato (1 g, 5.393 mmol), hidrazina (0.16 mL), diclorometano (15 mL) foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-01): 1-fenil-isotiocianato (1 g, 7.396 mmol), hidrazina (0.22 mL), diclorometano (15 mL) foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-45): A reação entre *p*-toluil-isotiocianato (1 g, 6.701 mmol), hidrazina (0.20 mL), diclorometano (15 mL) ocorreu sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(4-etil-fenil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-44): 4-etil-fenil-isotiocianato (1 g, 6.125 mmol), hidrazina (0.19 mL), diclorometano (15 mL) foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(2-etil-fenil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-20): 2-etil-fenil-isotiocianato (1 g, 6.125 mmol), hidrazina (0.19 mL), diclorometano (15 mL) foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

4.1.3 Procedimento Geral para Obtenção da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-hidrazina-carbotioamidas substituídos (LqIT/LT)

Quantidades equimolares da tiossemicarbazida substituída e 1-*H*-indol-3-carboxaldeído substituído na posição 5 ou sem substituição foram adicionados em um balão de fundo redondo com capacidade para 100 mL e dissolvidos em 10 mL etanol e adicionado

gota-a-gota ácido acético glacial como catalisador. A mistura foi agitada à temperatura ambiente, durante 1 hora, onde o término da reação foi confirmado por CCD. Em seguida, ocorreu a precipitação das novas moléculas da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-hidrazina-carbotioamidas (LqIT/LT) que foram purificadas através de sucessivas lavagens com etanol absoluto gelado e água destilada.

Síntese do 2-(5-metóxi-1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-90): A mistura de *N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.479 mmol), 5-metóxi-1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.2591 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foi mantida sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(5-metil-1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-91): *N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.479 mmol), 5-metil-1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.2354 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(5-metóxi-1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-92): *N*-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.340 mmol), 5-metóxi-1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.2348 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(5-metil-1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-93): *N*-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.340 mmol), 5-metil-1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.2133 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(4-etil-fenil)-2-(metóxi-1*H*-indol-3-il-metileno)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-94): A mistura de *N*-(4-etil-fenil)-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.225 mmol), 5-metóxi-1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.2146 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foi mantida sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do *N*-(4-etil-fenil)-2-(metil-1*H*-indol-3-il-metileno)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-95): A mistura de *N*-(4-etil-fenil)-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.225 mmol), 5-

metil-1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.1949 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foi mantida sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(5-metóxi-1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-naftaleno-2-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-96): *N*-(naftaleno-2-il)-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.078 mmol), 5-metóxi-1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.1717 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(5-metil-1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-naftaleno-2-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-97): *N*-(naftaleno-2-il)-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.078 mmol), 5-metil-1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.1718 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-98): A mistura de *N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.479 mmol), 1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.2147 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foi mantida sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(5-bromo-1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-99): *N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.479 mmol), 5-bromo-1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.3314 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(5-bromo-1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-(naftaleno-1-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-50): *N*-(naftaleno-2-il)-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.078 mmol), 5-bromo-1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.2419 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-(naftaleno-1-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-51): *N*-(naftaleno-2-il)-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.078 mmol), 1*H*-indol-3-carboxaldeído (0.1567 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)-N-(p-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-52): N-(p-toluil)-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.340 mmol), 5-bromo-1H-indol-3-carboxaldeído (0.3003 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-(p-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-53): N-(p-toluil)-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.340 mmol), 1H-indol-3-carboxaldeído (0.1945 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foram mantidos sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)-N-fenil-etil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-58): A mistura de N-fenil-etil-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.024 mmol), 5-bromo-1H-indol-3-carboxaldeído (0.2294 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foi mantida sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Síntese do 2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-fenil-etil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-59): A mistura de N-fenil-etil-hidrazina-carbotioamida (0.2 g, 1.024 mmol), 1H-indol-3-carboxaldeído (0.1486 g), etanol (10 mL) e poucas gotas de ácido acético glacial foi mantida sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

4.1.4 Procedimento Geral para Obtenção da série Ácidos 2-[(1H-indol-3-il-metileno)-hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos

Uma solução contendo o derivado indólico substituído e anidrido maléico (4.5 eq.) em 30 mL de tolueno seco foi agitada sob temperatura de refluxo, e 2 mL de DMF foram adicionados até completa solubilização. A mistura foi agitada nas mesmas condições até o término da reação (5-9 horas; acompanhamento por CCD). Após, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, e o produto bruto obtido foi submetido à extração com acetato de etila duas vezes. O combinado orgânico foi tratado com sulfato de sódio anidro e filtrado. Finalmente, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, e o produto puro foi obtido após recristalização em MeOH ou MeOH/H₂O (1:1).

Síntese do Ácido 2-[(5-metóxi-1H-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-90): 2-(5-metóxi-1H-indol-3-il-metileno)-N-fenil-hidrazina-

carbotioamida (LqIT/LT-90) (0.2 g, 0.6165 mmol), anidrido maléico (4.5 eq.) em 30 mL de tolueno foram mantidos sob refluxo por 8 horas.

Síntese do Ácido 2-[(5-metóxi-1H-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-(p-toluil)-tiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-92): 2-(5-metóxi-1H-indol-3-il-metileno)-N-(p-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-92) (0.2 g, 0.5909 mmol), anidrido maléico (4.5 eq.) em 30 mL de tolueno foram mantidos sob refluxo por 6 horas.

Síntese do Ácido 3-(4-etil-fenil)-2-[(5-metil-1H-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxotiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-95): N-(4-etil-fenil)-2-(metil-1H-indol-3-il-metileno)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-95) (0.2 g, 0.5944 mmol), anidrido maléico (4.5 eq.) em 30 mL de tolueno foram mantidos sob refluxo por 9 horas.

Síntese do Ácido 2-[(1H-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-98): 2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-98) (0.2 g, 0.6794 mmol), anidrido maléico (4.5 eq.) em 30 mL de tolueno foram mantidos sob refluxo por 9 horas.

Síntese do Ácido 2-[(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-99): 2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-99) (0.2 g, 0.5358 mmol), anidrido maléico (4.5 eq.) em 30 mL de tolueno foram mantidos sob refluxo por 9 horas.

Síntese do Ácido 2-[(1H-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-(p-toluil)-tiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-53): 2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-(p-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-53) (0.2 g, 0.6485 mmol), anidrido maleico (4.5 eq.) em 30 mL de tolueno foram mantidos sob refluxo por 8 horas.

4.1.5 Procedimento Geral para Obtenção da série 2-(1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3-(naftaleno-1-il)-tiazolidin-4-ona substituídos

Uma solução contendo tiossemicarbazona substituída, ácido 2-cloroacético, e acetato de sódio anidro como catalisador em 20 mL de etanol foi agitada sob refluxo até o término da reação (16-24 horas, acompanhamento por CCD). Após a conclusão da reação, a solução foi resfriada a 0°C e o precipitado foi filtrado com um filtro sob vácuo e o produto obtido purificado com lavagens em metanol quente e água.

Síntese do 2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3-(naftaleno-1-il)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-54): Uma solução contendo 2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)-N-(naftaleno-1-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-50) (0.2 g, 0.4724 mmol), ácido 2-cloroacético e acetato de sódio anidro em 20 mL de etanol foi mantida sob refluxo por 16 horas.

Síntese do 2-(1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3-(naftaleno-1-il)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-55): 2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-(naftaleno-1-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-51) (0.2 g, 0.5980 mmol), ácido 2-cloroacético e acetato de sódio anidro em 20 mL de etanol foram mantidos sob refluxo por 18 horas.

Síntese do 2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3-(p-toluil)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-56): 2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)-N-(p-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-52) (0.2 g, 0.5163 mmol), ácido 2-cloroacético e acetato de sódio anidro em 20 mL de etanol foram mantidos sob refluxo por 24 horas.

Síntese do 2-(1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3-(p-toluil)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-57): Uma mistura 2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-(p-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-53) (0.2 g, 0.6485 mmol), ácido 2-cloroacético e acetato de sódio anidro em 20 mL de etanol foram mantidos sob refluxo por 22 horas.

4.2 Estudo Biológico

4.2.1 Atividade antiproliferativa por Ensaio de Sulforrodamina B

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) consiste em um método simples, sensível, reprodutível e rápido para avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* (VICHAI e KIRTIKARA, 2006). A SRB é uma aminoxantina de cor rosa brilhante e com dois grupos sulfônicos que se ligam às porções terminais dos aminoácidos das proteínas. O teste baseia-se na habilidade da SRB se ligar aos componentes proteicos das células fixadas pelo ácido tricloroacético (TCA), independentemente da atividade metabólica das células. Estima-se indiretamente o número de células presentes corando o total de proteína celular (SKEHAN et al., 1990).

4.2.2 Cultivo celular

A atividade antiproliferativa de nove compostos indólicos-tiossemicarbazonas sintetizados foram avaliados *in vitro* frente a oito linhagens celulares tumorais humanas (Tabela 2), gentilmente cedidas do Frederick Cancer Research & Development Center, National Cancer Institute (NCI, EUA) e a linhagem celular HaCaT (queratinócitos/não-tumoral) foi doada pelo Prof. Dr. Ricardo Coletta da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), local onde foram realizados os experimentos do ensaio antiproliferativo.

As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² com 5 mL de meio “completo” (RPMI 1640 Gibco®), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB-Gibco®) e solução de penicilina:estreptomicina (1000 UI/mL:1000 µg/mL, 1%), mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Tabela 2 – Linhagens celulares tumorais e não-tumoral utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro*.

Linhagem celular	Órgão/Doença	Nome	*DI (x10 ⁴ células/mL)
Linhagens tumorais	SNC; glioma	U251	4.0
	Mama; adenocarcinoma	MCF-7	6.0
	Ovário; adenocarcinoma	NCI-ADR/RES	5.0
	Rim; adenocarcinoma	786-0	5.0
	Pulmão; carcinoma de células não pequenas.	NCI-H460	4.0
	Ovário; adenocarcinoma	OVCAR-3	7.0
	Cólon; adenocarcinoma	HT-29	5.0
	Medula óssea; Leucemia mielóide crônica	K-562	6.0
	Pele (queratinócito)	HaCaT	4.0

*DI: densidade de inoculação.

Após adesão das linhagens celulares, o meio de cultura foi aspirado e o frasco lavado com 500 µL de tampão fosfato (PBS, pH 7.0) para eliminar os resíduos do meio de cultura e, após aspiração do tampão, foram adicionados 500 µL de tripsina-EDTA 2.5 g/L (Vitrocell®), a 37°C, até que as células se desprendessem totalmente. A ação da tripsina foi bloqueada com RPMI (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute médium*) 1640 + SFB 5% e uma alíquota dessa suspensão foi transferida para novos frascos, completando-se o volume para 5 mL.

4.2.3 Preparo das suspensões celulares

Os experimentos para a atividade antiproliferativa dos derivados indólicos-tiossemicarbazonas foram realizados segundo o protocolo descrito por Monks e colaboradores (1991). O crescimento celular foi determinado por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteína celular, utilizando-se o corante proteico SRB (Sigma-Aldrich®). As análises foram baseadas na metodologia de triagem *in vitro* para fármacos anticâncer realizada pelo NCI, EUA, o qual utiliza um painel de 60 linhagens tumorais humanas (NCI60) (MONKS et al., 1991; SHOEMAKER, 2006). Este protocolo inclui a determinação da densidade celular no tempo 0 (T_0) no momento de adição das amostras, com isso é possível calcular a concentração que inibe totalmente o crescimento celular (SHOEMAKER, 2006).

No primeiro dia de experimento, as suspensões celulares foram preparadas com meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L), em suas respectivas densidades de inoculação (Tabela 2). Foram inoculados 100 μ L/compartimento de cada suspensão celular em placas de 96 poços e incubadas deixando-se aderir durante 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido. Simultaneamente, preparou-se uma placa controle (placa T_0), contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento. A placa T_0 não recebe aplicação dos compostos e os valores da leitura desta placa indicam quanto as células cresceram desde o plaqueamento até a adição dos compostos nas placas-teste.

4.2.4 Preparo dos compostos

Uma alíquota de 5 mg de cada composto foi dissolvida em 50 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®). Em seguida, 25 μ L dessa solução-mãe foi dispersa em 950 μ L de meio RPMI 1640 com 5% de SFB e penicilina:estreptomicina (2 mg/L), para preparação da solução de trabalho. Para a adição das células, os compostos foram novamente diluídos em meio de cultura, de modo que a maior concentração de DMSO utilizada foi de 0.25%. As concentrações de DMSO utilizadas não tiveram qualquer efeito inibidor no crescimento destas linhagens celulares.

As placas foram incubadas por 24 horas antes da adição dos compostos e da leitura da placa T_0 . Ao término das 24 horas foi realizado a leitura da placa T_0 e os compostos foram aplicados nas placas-teste em triplicata de quatro concentrações (0.25; 2.5; 25 e 250 μ g/mL), sendo as placas-teste novamente incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido.

Após 48 horas de tratamento, as células aderentes foram fixadas com solução de TCA a 50%, v/v e incubadas durante 1 hora, a 4°C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas em água deionizada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após isso, foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa na capela de fluxo vertical.

Após a secagem, foram adicionados 50 µL/poço do corante SRB a 0.4% (p/v) dissolvido em ácido acético a 1% (v/v) e a seguir as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. As placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% (v/v) para remoção da SRB não ligada. Após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas foi solubilizado com 150 µL/poço de Trizma Base (10 µM, pH 10.5) (Sigma-Aldrich®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

Para a placa controle T_0 , no momento da adição dos compostos, as células inoculadas foram fixadas com a adição de TCA a 50%, v/v (Sigma-Aldrich®) para determinação da quantidade de células presentes no momento em que os compostos foram aplicados, sendo este o valor basal no tempo 0.

Obtiveram três medições de absorbâncias: 48 horas pós-incubação para ambos, placas-teste, ou seja, células tratadas com os compostos (T) e o controle negativo (C) livre dos compostos. E a leitura no início da incubação, portanto, antes da adição das moléculas sintetizadas (T_0). Em todos os experimentos foi incluído um controle positivo, o fármaco antineoplásico doxorubicina (Eurofarma®) (DOX; 0.025; 0.25; 2.5; 25 µg/mL).

A escolha do tempo de incubação 48 horas foi baseado no protocolo NCI60 (NCI/EUA) para o ensaio antiproliferativo *in vitro*.

A proliferação celular foi determinada de acordo com a equação:

$$\text{Proliferação celular} = 100 \times [(T - T_0) / C - T_0] \quad (1)$$

O efeito citostático foi observado quando $T_0 \leq T < C$, enquanto que o efeito citocida ocorreu quando $T < T_0$.

A partir da curva de concentração-resposta para cada linhagem celular, os valores de GI_{50} (concentração molar necessária para inibição de 50% do crescimento celular) e TGI (do inglês, *Total Growth Inhibition*, concentração molar que inibe o total crescimento celular)

foram determinados através de análise de regressão não-linear utilizando o software Origin 8.0® (OriginLab Corporation).

4.3 Ensaios com o DNA

4.3.1 Materiais e Equipamentos

Para a análise das interações com DNA foi utilizado o solvente DMSO na preparação das soluções mãe e tampão Tris-HCl (0.01 M, pH 7.6). O DNA de timo bovino (ctDNA, do inglês *calf thymus*) foi obtido da Sigma (Saint Louis, MO, USA) e utilizado sem purificação adicional. Os aparelhos usados para a análise e obtenção dos espectros de Ultravioleta-visível (UV-vis) e de emissão de fluorescência foram o Espectrofotômetro de UV-vis Ultraspec 3000 PRO e o Espectrofluorímetro de JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão), respectivamente.

4.3.2 Preparação do ctDNA

Titulações de espectros UV-Vis foram realizadas utilizando o tampão Tris 0.01 M, pH 7.6. A solução de ctDNA em tampão Tris foi sonicada durante 5 minutos e a concentração determinada através dos coeficientes de extinção molares $6.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 260 nm (WOLFE et al., 1987). A pureza do DNA foi determinada através da monitorização do valor da relação de A260/A280.

4.3.3 Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta Visível

O derivado indólico-tiossemicarbazona foi dissolvido em DMSO na concentração de 1 mM (solução-mãe) a partir do qual as soluções de trabalho foram elaboradas por diluição utilizando tampão Tris-HCl, com concentrações entre 10 e 80 μM do composto.

Sob concentração otimizada, o derivado foi exposto a concentrações crescentes do ctDNA (0-100 μM). Antes das medições, o sistema foi agitado e incubado à temperatura ambiente durante 10 minutos. As medições foram realizadas em uma cubeta de quartzo retangular com comprimento óptico de 1 cm.

A constante de ligação intrínseca (K_b) foi obtida por ajuste dos dados à equação (MCGHEE e VON HIPPEL, 1974):

$$[\text{DNA}] / (\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}] / (\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f) \quad (2)$$

Onde, ϵ_a é o coeficiente de extinção molar aparente; ϵ_b , o coeficiente de extinção molar do composto ligado ao DNA; e ϵ_f , o coeficiente de extinção molar livre de composto.

O gráfico da equação reduzida da reta $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$ foi utilizado para obtenção do K_b a partir da razão entre a inclinação (slope) e o intercepto $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$. Os dados da ligação com DNA foram obtidos utilizando o software SigmaPlot 10.0[®].

4.3.4 Espectroscopia de Emissão de fluorescência

A medição de fluorescência do derivado indólico-tiossemicarbazona foi realizada em solução de concentração 15 μ M em tampão Tris 0.01M, pH 7.6. Os espectros de emissão foram registrados na região de 310-700 nm utilizando um comprimento de onda de excitação de 220-320 nm. Todas as medições foram realizadas a 25°C em uma cubeta de quartzo retangular com comprimento óptico de 1 cm. As intensidades de fluorescência foram expressas em unidades arbitrárias. As titulações de fluorescência foram realizadas por adição de quantidades crescentes de ctDNA (0-100 μ M) diretamente dentro da solução contendo o composto. As intensidades de fluorescência do derivado exposto a diferentes concentrações de ctDNA foram utilizadas para calcular a constante de Stern-Volmer (K_{sv}), pela seguinte equação (LAKOWICZ, 2006):

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (3)$$

Onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do composto, respectivamente.

K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, e $[Q]$ é a concentração do DNA em μ M.

O gráfico de intensidade de emissão relativa (F_0/F) versus $[Q]$ foi utilizado para obter a constante da regressão linear. Os dados de ligação foram obtidos através do software SigmaPlot 10.0[®].

4.4 Atividade Inibitória da Topoisomerase II

A inibição da topoisomerase II α humana foi determinada utilizando 100 ng de DNA de plasmídeo pUC19 (Sigma[®]) e 4.0 unidades de topoisomerase II α humana recombinante (p170) em tampão (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM ATP e 0.5 mM ditioneitol), na presença ou ausência do derivado indólico-tiossemicarbazona e amsacrina (*m*-AMSA) e assim foram incubados durante 30 minutos a 37°C. As concentrações testadas do derivado foram 50 e 100 μ M, as mesmas testadas para a *m*-AMSA, utilizada como controle positivo. As reações foram concluídas com 1% de docecil sulfato de sódio (SDS, do inglês, *sodium dodecyl sulfate*) e digeridas com proteinase K. Foi realizada a migração das

amostras em eletroforese com gel de agarose (0.8%) a 7 V/cm durante 2 horas no tampão corrida SB (Borato de sódio). Após este período, o gel foi corado com brometo de etídio (1 mg/ml) e fotografado sob luz UV. A análise quantitativa das bandas do gel (DNA relaxado e super-helicoidal) da inibição da topoisomerase II α foi realizada utilizando o software de processamento de imagem (Adobe Photoshop CS4 11.0x2007, San José, CA, EUA).

4.5 Ensaios de Citometria de Fluxo

4.5.1 Cultura celular de HT-29

A linhagem celular HT-29 (adenocarcinoma colorretal humano, epitelial, aderente) proveniente do National Cancer Institute of USA (NCI-USA) foi cultivado com 5 mL do meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF, Gibco®) e penicilina:estreptomicina (100 UI/ml:100 µg/ml). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Para o experimento de citometria de fluxo, as células de HT-29 foram inoculadas em placas de seis poços (2 x 10⁵ células/poço) e incubadas durante 24 horas (antes de realizar o tratamento para favorecer a adesão das células à superfície da placa). O composto foi dissolvido em DMSO e diluído no meio de cultura com uma concentração final não-citotóxica de 0.1% do DMSO.

4.5.2 Medição da Externalização de Fosfatidilserina

A externalização da fosfatidilserina foi analisada por citometria de fluxo utilizando Guava® Kit de Ensaio Nexin (Guava Technologies, Hayward, CA), de acordo com a instruções do fabricante. As células da linhagem HT-29 foram tratadas com o derivado indólico-tiossemicarbazona nas concentrações de 5, 20, 30 e 50 µM em DMSO/RPMI durante 24 horas. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas (Tripsina-EDTA 0.25%), lavadas com PBS e depois ressuspensas (densidade de 1 x 10⁵ células/poço) com 100 µL do tampão de ligação contendo o marcador específico de morte celular, a anexina-V-PE, conjugada com o fluorocromo PE (ficoeritrina) e um intercalador de DNA fluorescente, o 7-AAD (7-Aminoactinomicina D). Em seguida, foram incubadas no escuro durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram analisadas por meio do citômetro de fluxo (Guava Easycyte Mini - Guava Technologies, Hayward, CA). Foram coletados 5.000 eventos, conforme sugerido pelos protocolos de Guava Easycyte kits. Foram realizados dois experimentos em triplicata. As células coradas com anexina-V-PE (anexina-V positiva e 7-AAD negativa) foram consideradas no estágio inicial de morte celular.

4.5.3 Análise do Ciclo Celular

A análise do ciclo celular foi realizada com o reagente Guava® Cell Cycle (Guava Technologies, Hayward, CA), de acordo com as instruções do fabricante. As células da linhagem HT-29 foram privadas de SBF durante 24 horas para sincronização do ciclo celular e depois tratadas com o derivado indólico (5, 10 e 30 μM) e 1.25 nM de colchicina (Sigma-Aldrich) em DMSO/RPMI durante 24 horas. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas (Tripsina-EDTA 0.25%), lavadas com PBS e depois ressuspensas (densidade de 1×10^5 células/poço) com 100 μL do tampão de ligação contendo, o iodeto de propídio (PI). Em seguida, a suspensão foi incubada no escuro durante 20 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, as células foram analisadas por citômetro de fluxo (Guava Easycyte Mini - Guava Technologies, Hayward, CA). Na análise de citometria foram contados 5.000 eventos, conforme sugerido pelos protocolos de Guava Easycyte kits. Foram realizados dois experimentos em triplicata.

4.5.4 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como media $\pm$ desvio padrão e por análise de variância (ANOVA), seguido por teste de Turkey. Valores de P menor que 0.05 ($p < 0.05$) foram considerados como indicativo de significância e representado por: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. Os cálculos foram realizados utilizando o software de estatística GraphPad Prism 7.0 (San Diego California, USA).

4.6 Determinação do Valor de Log P

Os valores de log P dos derivados indólicos-tiossemicarbazonas foram obtidos utilizando o programa ACD/ChemSketch 12.0 (ACD/Labs, Advanced Chemistry Development).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

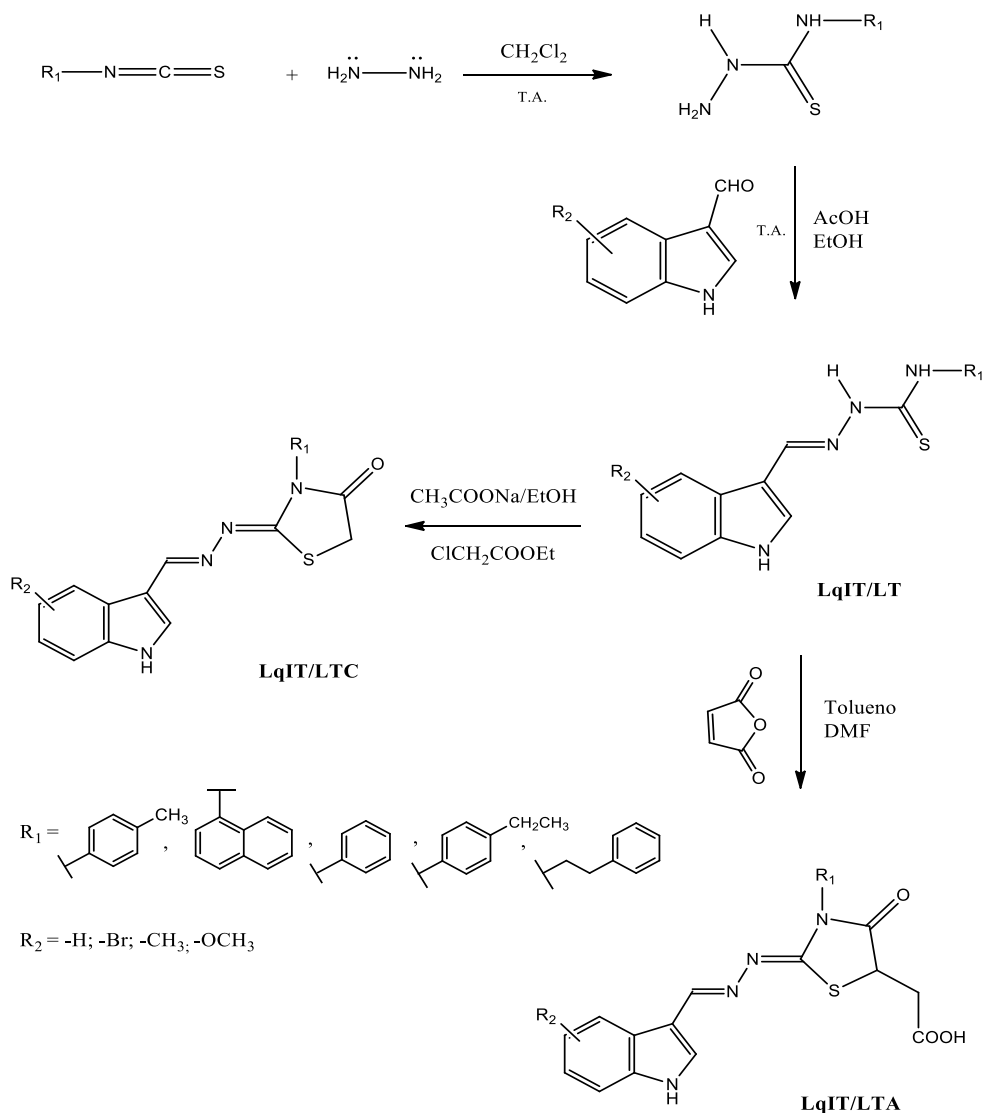
5.1 Estudo Químico

As rotas sintéticas para preparação dos compostos indólicos-tiossemicarbazonas (LqIT/LT) e 4-tiazolidinonas (LqIT/LTC e LqIT/LTA) foram eficazes e obtiveram rendimentos satisfatórios, sendo necessário apenas lavagens com água destilada, etanol ou diclorometano e recristalização com metanol ou ácido acético.

5.1.1 Esquema Geral de Síntese

O esquema abaixo representa a rota de síntese empregada na obtenção dos compostos indólicos-tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas (Esquema 13).

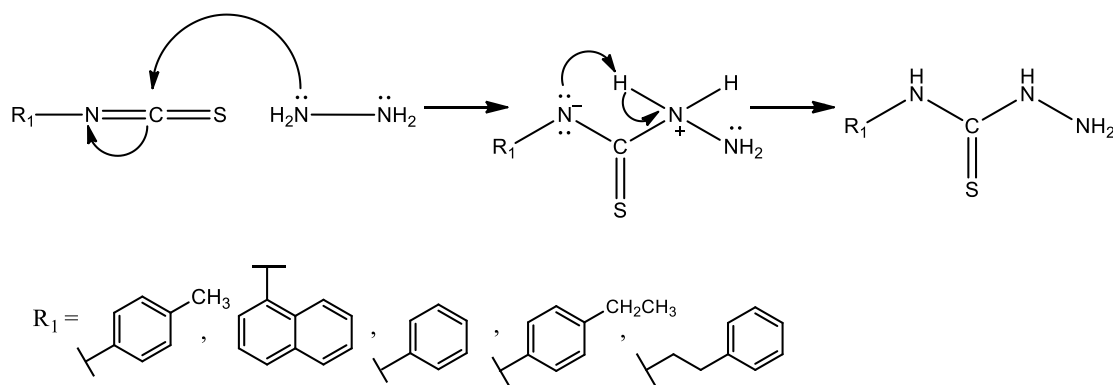
Esquema 13 – Rota sintética empregada na preparação dos compostos indólicos-tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas.



5.2 Mecanismo reacional para formação dos derivados hidrazina carbotioamidas substituídos (LqIT/LT)

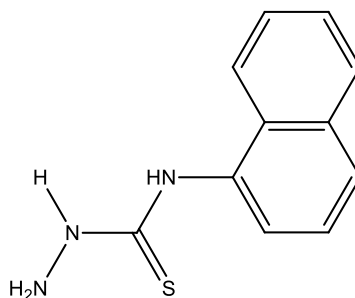
O mecanismo geral representa a formação dos compostos intermediários, ou seja, as tiossemicarbazidas substituídas, e é caracterizado por um ataque simultâneo do nitrogênio da hidrazina ao carbono da tiocarbonila e a deslocalização dos elétrons pi para o nitrogênio vizinho conduzindo a síntese da tiossemicarbazida (Esquema 14). Os rendimentos reacionais variam entre 70 e 90% (TENÓRIO et al., 2005). Como as tiossemicarbazidas tem um potencial tóxico, em virtude da presença do grupamento NH_2 , elas são empregadas na química medicinal como produtos intermediários para a síntese das tiossemicarbazonas (AQUINO, 2007).

Esquema 14 – Mecanismo reacional de adição conduzindo ao intermediário tiossemicarbazida substituído.



5.2.1 Características físico-químicas e resultados espectroscópicos para os derivados hidrazina carbotioamidas substituídos:

N-(naftaleno-2-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-34)

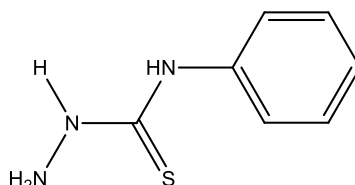


Fórmula Molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$.

Massa Molecular: 217.28g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 68%; PF: 139°C; Rf: 0.59 (*n*-hexano/acetato de etila 9:1)
- RMN ^{13}C (δppm , DMSO- d_6 100MHz): 181.2, 135.2, 133.6, 129.7, 128.0, 125.9, 125.9, 125.3, 125.3, 124.7, 122.6.
- IV ($\nu\text{ cm}^{-1}$ KBr): 3350 (NH_2), 3302 (NH), 3250 (NH), 3048 (CH), 1214 (C-N).

***N*-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-01)**

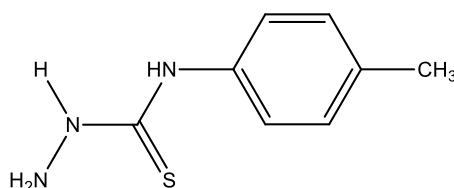


Fórmula Molecular: $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{S}$.

Massa Molecular: 167.23g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 97%; PF: 136-138°C; Rf: 0.44 (*n*-hexano/acetato de etila 7:3)
- RMN ^1H (δppm , DMSO- d_6 300MHz): 9.51 (s, 1H, NH), 9.14 (s, 1H, NH), 7.65-7.63 (m, 2H, fenil), 7.32-7.26 (m, 2H, fenil), 7.11-7.06 (m, 1H, fenil), 4.80 (s, 2H, NH_2).
- IV ($\nu\text{ cm}^{-1}$ KBr): 3395 (NH_2), 3100 (NH), 1650 (LIMA, 2014).

***N*-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-45)**



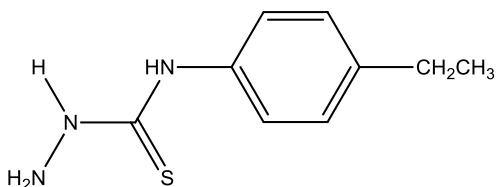
Fórmula Molecular: $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$.

Massa Molecular: 181.26g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 90%; PF: 142°C; Rf: 0.35 (*n*-hexano/acetato de etila 1:1).
- RMN ^1H (δppm , DMSO- d_6 300MHz): 9.57 (s, 1H, NH), 9.03 (s, 1H, NH), 7.49 (d, 2H, fenil, $J = 7.5\text{ Hz}$), 7.10 (d, 2H, fenil, $J = 8.4\text{ Hz}$), 4.75 (s, 2H, NH_2), 2.26 (s, 3H, CH_3).

- RMN ^{13}C (δppm , DMSO- d_6 100MHz): 179.9, 137.1, 133.6, 128.9, 124.0, 20.9.
- IV ($\nu\text{ cm}^{-1}$ KBr): 3247 (NH_2), 3194 (NH), 2922 (NH), 1279 ($\text{C}=\text{S}$). (LIMA, 2014).

***N*-(4-etil-fenil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-44)**



Fórmula Molecular: $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{S}$.

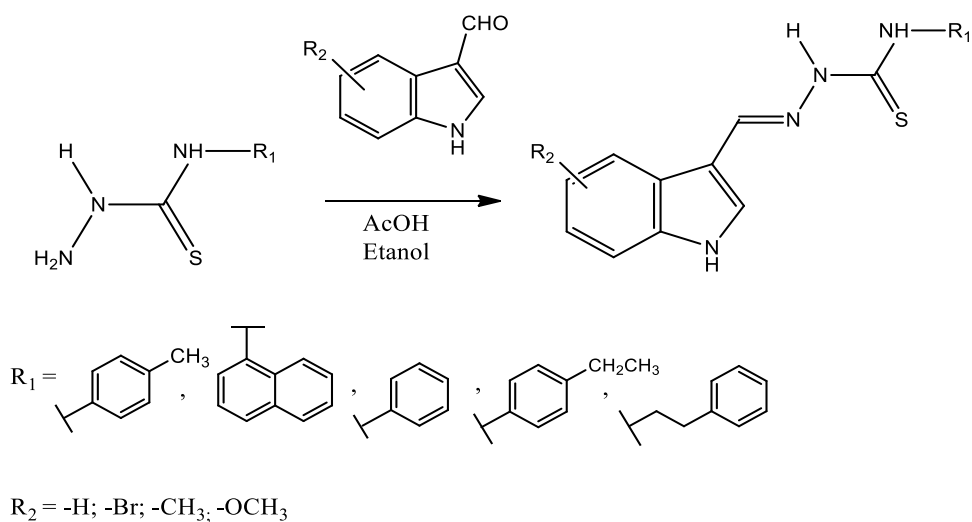
Massa Molecular: 195.28g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 95%; Rf: 0.2 (*n*-hexano/acetato de etila 4:6)
- RMN ^1H (δppm , DMSO- d_6 400MHz): 9.50 (s, 1H, NH), 9.04 (s, 1H, NH), 7.49 (d, 2H, fenil, $J = 8.4\text{ Hz}$) 7.14 (d, 2H, fenil, $J = 8.4\text{ Hz}$), 4.80 (s, 2H, NH_2), 2.55 (q, 2H, CH_2), 1.16 (t, 3H, CH_3).
- IV ($\nu\text{ cm}^{-1}$ KBr): 3279 (NH_2), 3189 (NH), 2960 (NH), 1279 ($\text{C}=\text{S}$) (LIMA, 2014).

5.3 Mecanismo reacional e rota sintética dos derivados 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamidas (LqIT/LT)

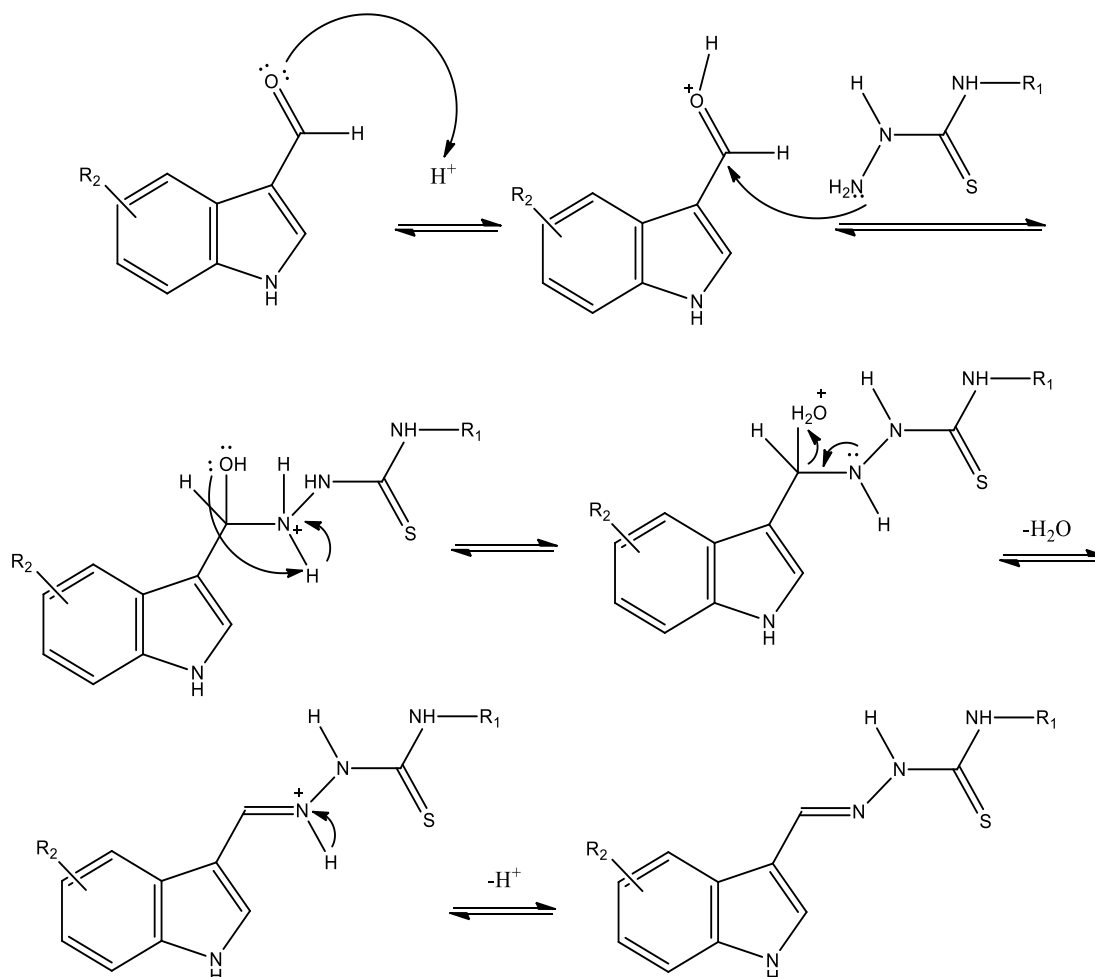
Para obtenção das novas moléculas 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamidas (LqIT/LT) substituídas foi realizada a seguinte rota sintética (Esquema 15).

Esquema 15 – Rota de síntese dos novos compostos indólicos-tiossemicarbazonas.



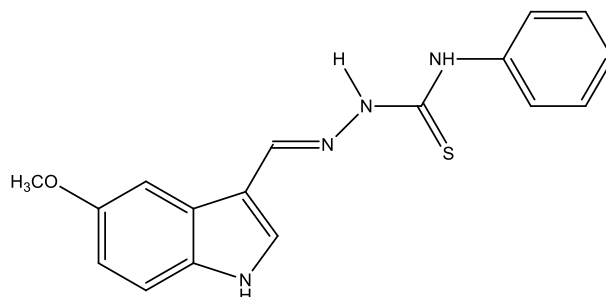
A síntese dos derivados indólicos-tiossemicarbazonas caracteriza-se por uma reação de condensação. O ácido acético atua como catalisador protonando a carbonila da função aldeído do indol formando o íon oxônio. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio *N*-1 da hidrazina ao carbono positivo do aldeído formando um hemiaminal protonado e uma rápida transferência do próton do nitrogênio para o oxigênio (fenômeno denominado prototropismo). Decorrente a isto, ocorre a deslocalização dos elétrons do nitrogênio com posterior eliminação de água. Por fim, o nitrogênio que agora se encontra positivo é desprotonado pela molécula de água gerando um composto com a função imina (ligação azometínica), formando o derivado indólico-tiossemicarbazona (Esquema 16).

Esquema 16 – Mecanismo de reação catalisada por ácido acético a partir do indol-3-carboxaldeído e tiossemicarbazida, ambos substituídos, para obtenção do derivado indol-tiossemicarbazona.



5.3.1 Características físico-químicas e resultados espectroscópicos para os derivados indólicos-tiossemicarbazonas substituídos:

2-(5-metóxi-1H-indol-3-il-metileno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-90)

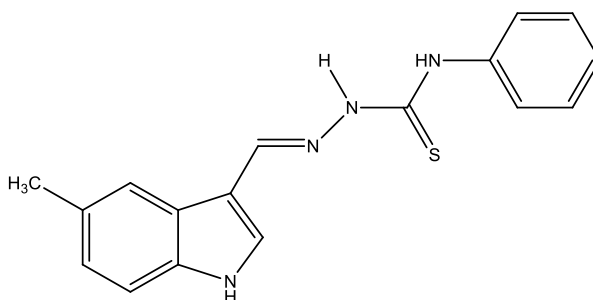


Fórmula Molecular: C₁₇H₁₆N₄OS.

Massa Molecular: 324.40g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 35%; PF: 206-208°C; Rf: 0.59 (*n*-hexano/acetato de etila 1:1).
- RMN ¹H (δppm, DMSO-d₆ 400MHz): 11.62 (s, 1H, NH), 11.56 (s, 1H, NH-indol), 9.66 (s, 1H, NH-Ar), 8.41 (s, 1H, CH=N), 7.86 (d, 1H, pos. 7 indol, J=2.8Hz), 7.75 (d, 2H, pos. 2,6 fenil, J=8Hz), 7.67 (s, 1H, pos. 2 indol), 7.36 (d, 2H, pos. 3,5 fenil, J=8.4Hz), 7.33 (s, 1H, pos. 4 indol), 7.15 (t, 1H, pos. 4 fenil, J=7.2Hz), 6.85 (dd, 1H, pos. 6 indol, J=2.8Hz e 2.4Hz), 3.79 (s, 3H, OCH₃).
- RMN ¹³C (δppm, DMSO-d₆ 100MHz): 173.9, 154.5, 141.2, 139.2, 131.9, 131.6, 128.17, 124.6, 124.5, 123.7, 112.6, 112.5, 110.7, 103.4, 55.0.
- IV (ν cm⁻¹ KBr): 3339 (NH), 1545 (C=N), 1489 (N-CS-N), 1211 (C=S).

2-(5-metil-1H-indol-3-il-metileno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-91)

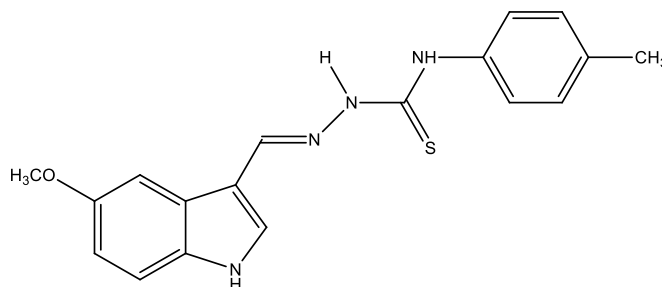


Fórmula Molecular: C₁₇H₁₆N₄S.

Massa Molecular: 308.40g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 89.4%; PF: 221-223°C; Rf: 0.88 (*n*-hexano/acetato de etila 4:6).
- RMN ^1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.62 (s, 1H, NH), 11.58 (s, 1H, NH-indol), 9.65 (s, 1H, NH-Ar), 8.40 (s, 1H, CH=N), 7.97 (s, 1H, pos. 2 indol), 7.87 (s, 1H, pos. 4 indol), 7.73 (d, 2H, pos. 2,6 fenil, $J=8.4\text{Hz}$), 7.38 (t, 2H, pos. 3,5 fenil, $J=7.2\text{Hz}$), 7.33 (d, 1H, pos. 7 indol, $J=8\text{Hz}$), 7.17 (t, 1H, pos. 4 fenil, $J=7.2\text{Hz}$), 7.04 (d, 1H, pos. 6 indol, $J=8\text{Hz}$), 2.42 (s, 3H, CH_3).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 174.0, 141.1, 139.2, 135.3, 131.1, 129.3, 128.2, 124.6, 124.3, 124.16, 124.12, 121.2, 111.6, 110.4, 21.3.
- IV ($\nu \text{ cm}^{-1}$ KBr): 3336 (NH), 1546 (C=N), 1485 (N-CS-N), 1249 (C=S).

2-(5-metóxi-1H-indol-3-il-metileno)-N-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-92)

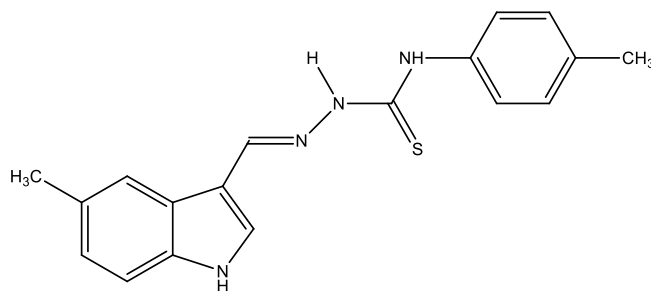


Fórmula Molecular: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{OS}$.

Massa Molecular: 338.43g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 83.8%; PF: 210-211°C; Rf: 0.88 (*n*-hexano/acetato de etila 4:6).
- RMN ^1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.57 (s, 2H, NH), 9.57 (s, 1H, NH-Ar), 8.39 (s, 1H, CH=N), 7.85 (s, 1H, pos. 2 indol), 7.66 (s, 1H, pos. 4 indol), 7.58 (d, 2H, pos. 3,5 fenil, $J=8.4\text{Hz}$), 7.33 (d, 1H, pos. 7 indol, $J=8.8\text{Hz}$), 7.16 (d, 2H, pos. 2,6 fenil, $J=8.4\text{Hz}$), 6.86 (d, 1H, pos. 6 indol, $J=8.8\text{Hz}$), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 2.29 (s, 3H, CH_3).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 174.0, 154.5, 141.1, 136.6, 133.7, 131.9, 131.5, 128.6, 124.5, 123.9, 112.6, 112.5, 110.7, 103.4, 55.0, 25.5.
- IV ($\nu \text{ cm}^{-1}$ KBr): 3264 (NH), 1553 (C=N), 1439 (N-CS-N), 1198 (C=S).

2-(5-metil-1H-indol-3-il-metileno)-N-(*p*-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-93)

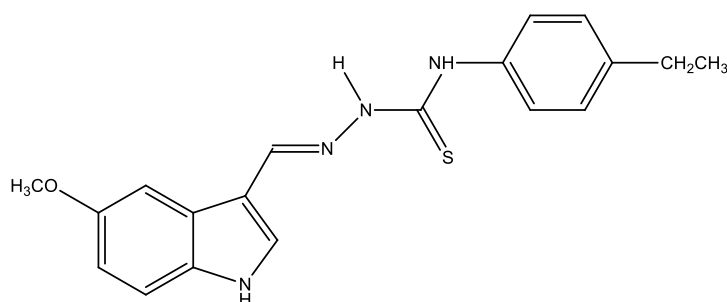


Fórmula Molecular: $C_{18}H_{18}N_4S$.

Massa Molecular: 322.43g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 38.1%; PF: 224-225°C; Rf: 0.83 (*n*-hexano/acetato de etila 4:6).
- RMN 1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.56 (s, 2H, NH), 9.56 (s, 1H, NH-Ar), 8.39 (s, 1H, CH=N), 7.95 (s, 1H, pos. 2 indol), 7.86 (s, 1H, pos. 4 indol), 7.57 (d, 2H, pos. 3,5 fenil, $J=8$ Hz), 7.32 (d, 1H, pos. 7 indol, $J=8.4$ Hz), 7.19 (d, 2H, pos. 2,6 fenil, $J=8$ Hz), 7.04 (d, 1H, pos. 6 indol, $J=8.4$ Hz), 2.41 (s, 3H, CH_3 -indol), 2.31 (s, 3H, CH_3).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 174.1, 141.0, 136.6, 135.3, 133.8, 131.0, 129.3, 128.6, 124.3, 124.2, 124.1, 121.1, 111.6, 110.4, 21.3, 20.5.
- IV (ν cm^{-1} KBr): 3343 (NH), 1543 (C=N), 1488 (N-CS-N), 1211 (C=S).

***N*-(4-etil-fenil)-2-(metóxi-1H-indol-3-il-metileno)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-94)**



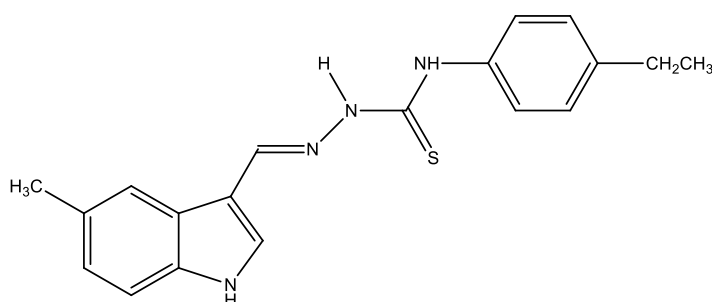
Fórmula Molecular: $C_{19}H_{20}N_4OS$.

Massa Molecular: 352.48g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 68.6%; PF: 213-214°C; Rf: 0.80 (*n*-hexano/acetato de etila 4:6).

- RMN ^1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.56 (s, 2H, NH), 9.57 (s, 1H, NH-Ar), 8.36 (s, 1H, CH=N), 7.85 (d, 1H, pos. 2 indol $J=2.8\text{Hz}$), 7.65 (s, 1H, pos. 4 indol), 7.60 (d, 2H, pos. 3,5 fenil $J=8.4\text{Hz}$), 7.35 (d, 1H, pos. 7 indol, $J=8.8\text{Hz}$), 7.20 (d, 2H, pos. 2,6 fenil, $J=8.4\text{Hz}$), 6.86 (d, 1H, pos. 6 indol, $J=8.8\text{Hz}$), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 2.59 (q, 2H, CH_2), 1.95 (t, 3H, CH_3).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 174.0, 154.4, 141.1, 140.0, 136.8, 131.9, 131.5, 127.4, 124.5, 123.9, 112.6, 112.5, 110.7, 103.4, 55.0, 27.6, 15.6.
- IV ($\nu \text{ cm}^{-1}$ KBr): 3317 (NH), 1547 (C=N), 1499 (N-CS-N), 1206 (C=S).

***N*-(4-etil-fenil)-2-(metil-1H-indol-3-il-metileno)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-95)**

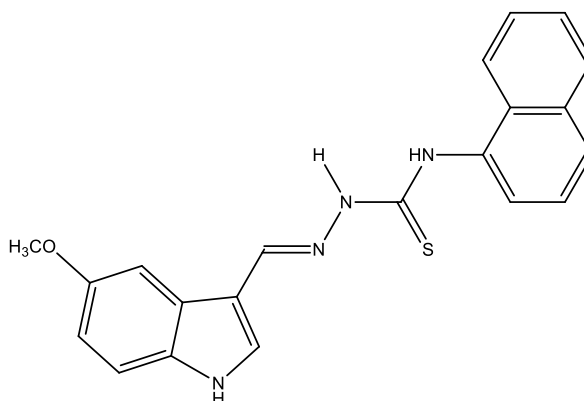


Fórmula Molecular: $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{S}$.

Massa Molecular: 336.45g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 69.5%; PF: 214-215°C; Rf: 0.35 (*n*-hexano/acetato de etila 1:1).
- RMN ^1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.57 (s, 2H, NH), 9.57 (s, 1H, NH-Ar), 8.39 (s, 1H, CH=N), 7.96 (s, 1H, pos. 4 indol), 7.86 (d, 1H, pos. 2 indol, $J=2.8\text{Hz}$), 7.60 (d, 2H, pos. 3,5 fenil, $J=8.4\text{Hz}$), 7.32 (d, 1H, pos. 7 indol, $J=8.4\text{Hz}$), 7.22 (d, 2H, pos. 2,6 fenil, $J=8.4\text{Hz}$), 7.05 (d, 1H, pos. 6 indol, $J=8.4\text{Hz}$), 2.59 (q, 2H, CH_2), 2.42 (s, 3H, CH_3 -indol), 1.19 (t, 3H, CH_3).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 174.1, 141.0, 140.2, 136.8, 135.3, 131.1, 129.3, 127.4, 124.3, 124.2, 124.1, 121.2, 111.6, 110.4, 27.6, 21.3, 15.6.
- IV ($\nu \text{ cm}^{-1}$ KBr): 3327 e 3158 (NH), 1542 (C=N), 1493 (N-CS-N), 1250 (C=S).

***2*-(5-metóxi-1H-indol-3-il-metileno)-N-naftaleno-2-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-96)**

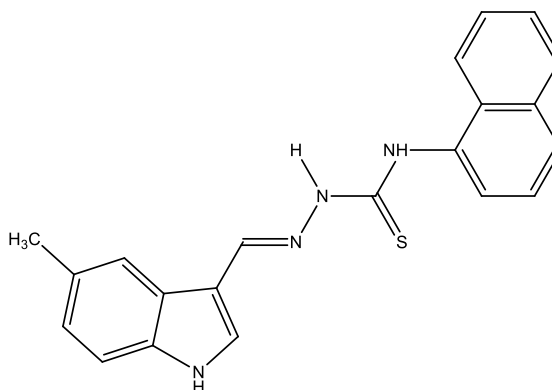


Fórmula Molecular: $C_{21}H_{18}N_4OS$.

Massa Molecular: 374.46g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 40%; PF: 205-206°C; Rf: 0.55 (*n*-hexano/acetato de etila 1:1).
- RMN 1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.71 (s, 1H, NH), 11.57 (s, 1H, NH-indol), 9.90 (s, 1H, NH-Ar), 8.48 (s, 1H, CH=N), 8.02-7.97 (m, 2H, naftil), 7.89 (d, 1H, pos. 2 indol, $J=4$ Hz), 7.86 (s, 1H, pos. 4 indol), 7.76-7.54 (m, 5H, naftil), 7.34 (d, 1H, pos. 7 indol, $J=8.4$ Hz), 6.85 (d, 1H, pos. 6 indol, $J=8.8$ Hz), 3.66 (s, 3H, OCH_3 -indol).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 176.0, 154.5, 141.6, 135.2, 133.6, 132.0, 131.7, 130.0, 128.1, 126.3, 126.1, 126.0, 125.6, 125.3, 124.6, 122.5, 112.5, 112.3, 110.8, 103.9, 55.2.
- IV (ν cm^{-1} KBr): 3349 (NH), 1550 (C=N), 1488 (N-CS-N), 1203 (C=S).

2-(5-metil-1H-indol-3-il-metileno)-N-naftaleno-2-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-97)

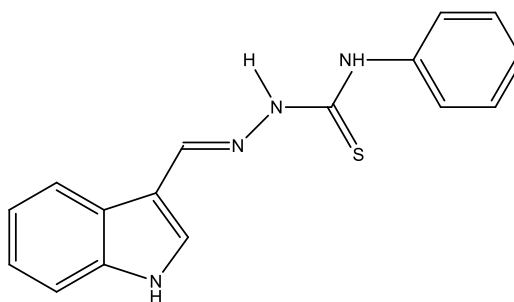


Fórmula Molecular: $C_{21}H_{18}N_4S$.

Massa Molecular: 358.46g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 38.8%; PF: 206-208°C; Rf: 0.76 (*n*-hexano/acetato de etila 4:6)
- RMN ^1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.72 (s, 1H, NH), 11.59 (s, 1H, NH-indol), 9.90 (s, 1H, NH-Ar), 8.48 (s, 1H, CH=N), 8.06 (s, 1H, pos. 2 indol), 8.04-7.98 (m, 2H, naftil), 7.89 (s, 1H, pos. 4 indol), 7.86-7.84 (m, 2H, naftil), 7.59-7.55 (m, 3H, naftil), 7.33 (d, 1H, pos. 7 indol, $J=8.4\text{Hz}$), 7.03 (d, 1H, pos. 6 indol, $J=8.4\text{Hz}$), 2.33 (s, 3H, CH_3 -indol).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 175.7, 141.5, 135.4, 135.1, 133.7, 131.8, 129.7, 129.4, 128.2, 126.2, 126.0, 125.3, 125.1, 124.3, 124.2, 122.3, 121.2, 111.6, 110.5, 21.3.
- IV ($\nu \text{ cm}^{-1}$ KBr): 3350 (NH), 1551 (C=N), 1489 (N-CS-N), 1222 (C=S).

2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-98)

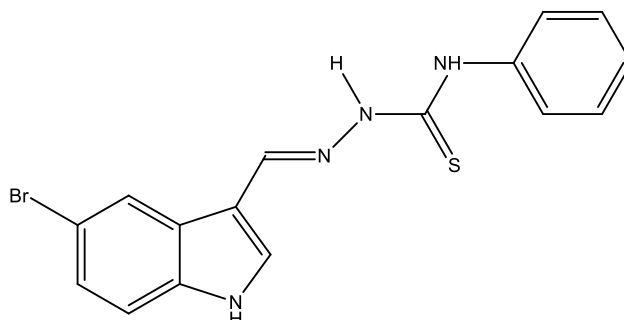


Fórmula Molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{S}$.

Massa Molecular: 294.37g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 38%; PF: 215-216°C; Rf: 0.76 (*n*-hexano/acetato de etila 4:6)
- RMN ^1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.69 (s, 1H, NH), 11.60 (s, 1H, NH-indol), 9.62 (s, 1H, NH-Ar), 8.43 (s, 1H, CH=N), 8.23 (d, 1H, pos. 4 indol, $J=7.6\text{Hz}$), 7.91 (d, 1H, pos. 2 indol, $J=2.8\text{Hz}$), 7.66 (d, 2H, pos. 5,6 fenil, $J=8\text{Hz}$), 7.44 (d, 1H, pos. 7 indol, $J=7.6\text{Hz}$), 7.38 (t, 2H, pos. 5,6 indol, $J=7.6\text{Hz}$), 7.23-7.14 (m, 3H, pos. 3,4,5 fenil).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 174.4, 141.2, 139.2, 137.0, 131.3, 128.1, 124.9, 124.8, 124.0, 122.6, 121.8, 120.7, 111.8, 110.9.
- IV ($\nu \text{ cm}^{-1}$ KBr): 3413 (NH), 1556 (C=N), 1499 (N-CS-N), 1247 (C=S).

2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)-N-fenil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-99)

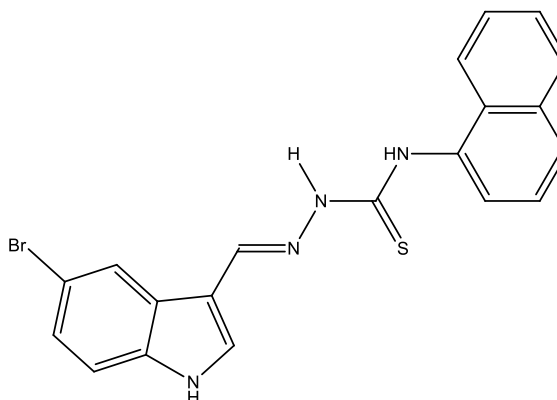


Fórmula Molecular: $C_{16}H_{13}BrN_4S$.

Massa Molecular: 373.27g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 66.8%; PF: 220-222°C; Rf: 0.63 (*n*-hexano/acetato de etila 4:6)
- RMN 1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.86 (s, 1H, NH), 11.63 (s, 1H, NH-indol), 9.75 (s, 1H, NH-Ar), 8.39 (s, 1H, CH=N), 8.37 (s, 1H, pos. 2 indol), 7.97 (d, 1H, pos. 4 indol, $J=2.8$ Hz), 7.71 (d, 2H, pos. 2,6 fenil, $J=8.4$ Hz), 7.41 (d, 1H, pos. 7 indol, $J=8.8$ Hz), 7.38 (t, 2H, pos. 3,5 fenil, $J=7.6$ Hz), 7.34 (d, 1H, pos. 6 indol, $J=8.8$ Hz), 7.18 (t, 1H, pos. 4 fenil, $J=7.6$ Hz).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 174.4, 140.5, 139.3, 135.7, 132.3, 128.1, 125.7, 125.4, 124.7, 124.2, 123.8, 113.9, 113.3, 110.6.
- IV (ν cm^{-1} KBr): 3345 (NH), 1545 (C=N), 1483 (N-CS-N), 1212 (C=S).

2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)-N-(naftaleno-1-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-50)

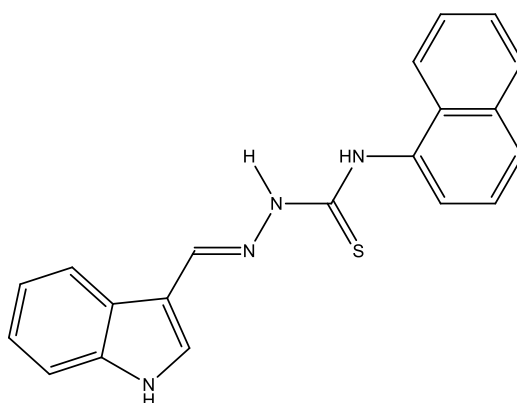


Fórmula Molecular: $C_{20}H_{15}BrN_4S$.

Massa Molecular: 423.33 g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 77%; PF: 205-207°C; Rf: 0.54 (CHCl₃/MeOH 9.5:0.5)
- RMN ¹H (δppm, DMSO-d₆ 400MHz): 11.88 (s, 1H, NH), 11.69 (s, 1H, NH-indol), 9.99 (s, 1H, NH-Ar), 8.46 (s, 2H, indol), 8.00 (s, 1H, CH=N), 8.00-7.43 (m, 7H, naftil), 7.41 (s, 1H, indol), 7.33 (m, 1H, indol).
- RMN ¹³C (δppm, DMSO-d₆ 100MHz): 176.2, 140.9, 135.8, 135.4, 133.65, 132.5, 130.1, 128.0, 126.4, 126.2, 125.9, 125.6, 125.6, 125.3, 125.3, 123.8, 122.6, 113.8, 113.3, 110.7.
- IV (ν cm⁻¹ KBr): 3320 (NH), 3200 (NH), 3164 (NH), 1228 (C=S).
- MS (m/z): calculado: 422.0201; encontrado: 423.3289.

2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-(naftaleno-1-il)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-51)



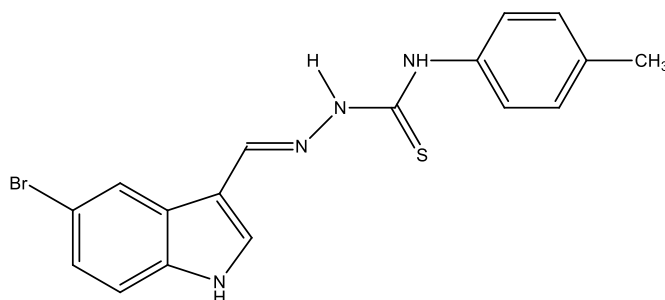
Fórmula Molecular: C₂₀H₁₆N₄S.

Massa Molecular: 334.43 g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 95%; PF: 185-187°C °C; Rf: 0.44 (CHCl₃/MeOH 9:1).
- RMN ¹H (δppm, DMSO-d₆ 400MHz): 11.67 (s, 2H, NH), 9.84 (s, 1H, NH-Ar), 8.47 (s, 1H, CH=N), 8.35 (d, 1H, indol, J=7.2Hz), 8.03-7.95 (m, 2H, naftil), 7.92 (d, 1H, indol, J=2.7Hz), 7.89 (d, 1H, J= 8.2Hz, naftil), 7.69 (d, 1H, J= 7.2Hz, indol), 7.63-7.51 (m, 3H, naftil), 7.46 (d, 1H, J= 8.1Hz, naftil), 7.20 (t, 1H, J= 7.5Hz, indol), 7.09 (t, 1H, J= 7.5Hz, indol).
- RMN ¹³C (δppm, DMSO-d₆ 100MHz): 176.2, 141.3, 137.0, 135.7, 133.68, 131.3, 130.3, 128.0, 126.5, 126.0, 125.9, 125.8, 125.4, 124.0, 122.9, 122.6, 122.1, 120.5, 111.7, 111.0.
- IV (ν cm⁻¹ KBr): 3319 (NH), 3158 (NH), 1243 (C=S).

- MS (m/z): calculado: 344.1096; encontrado: 344.4328.

2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)-N-(p-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-52)

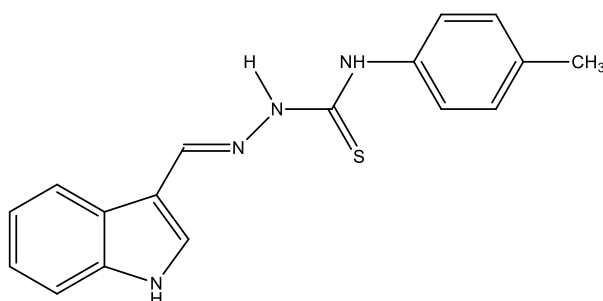


Fórmula Molecular: $C_{17}H_{15}BrN_4S$.

Massa Molecular: 387.30g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 58.67%; PF: 223-224°C; Rf: 0.8 (*n*-hexano/acetato de etila 2:8)
- RMN 1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.84 (s, 1H, NH), 11.58 (s, 1H, NH-indol), 9.66 (s, 1H, NH-Ar), 8.37 (s, 1H, CH=N), 8.34 (s, 1H, pos. 2 indol), 7.97 (s, 1H, pos. 4 indol), 7.55 (d, 2H, pos. 3,5 fenil, $J=8.4$ Hz), 7.41 (d, 1H, pos. 7 indol, $J=8.8$ Hz), 7.34 (dd, 1H, pos. 6 indol, $J=8.8$ Hz), 7.19 (d, 1H, pos. 2,6 fenil, $J=8$ Hz), 2.30 (s, 3H, CH_3).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 174.4, 140.3, 136.7, 135.7, 133.9, 132.2, 128.6, 125.7, 125.2, 124.3, 123.8, 113.9, 113.3, 110.6, 20.5.
- IV (ν cm^{-1} KBr): 3283 (NH), 1553 (C=N), 1513 (N-CS-N), 1192 (C=S).

2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-(p-toluil)-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-53)

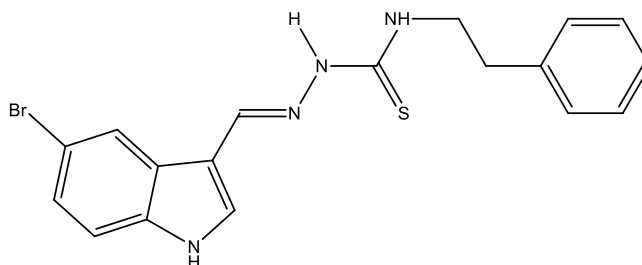


Fórmula Molecular: $C_{17}H_{16}N_4S$.

Massa Molecular: 308.40g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 32%; PF: 195-197°C; Rf: 0.55 (CHCl₃/MeOH 9:1)
- RMN ¹H (300 MHz, DMSO) δ: 11.66 (s, 1H, NH), 11.49 (s, 1H, NH-indol), 9.50 (s, 1H, NH-Ar), 8.39 (s, 1H, CH=N), 8.20 (d, 1H, J= 7.5Hz, indol), 7.88 (d, 1H, J= 2.7Hz, indol), 7.44 (d, 1H, J= 7.5Hz, indol), 7.48 (d, 2H, J= 8.4Hz, fenil), 7.23-7.11 (m, 2H, indol), 7.17 (d, 2H, J= 8.1Hz, fenil), 3.43 (s, 3H, CH₃).
- RMN ¹³C (DMSO, 75MHz) δ: 174.6, 141.2, 137.1, 136.7, 134.2, 131.2, 128.7, 128.7, 125.1, 125.1, 124.1, 122.7, 121.8, 120.7, 111.9, 111.0, 20.6.
IV (ν cm⁻¹ KBr): 3409 (NH), 3314 (NH), 3164 (NH), 1245 (C=S).
- MS (m/z): calculado: 308.1096; encontrado: 308.4007.

2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)-N-fenil-etil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-58)

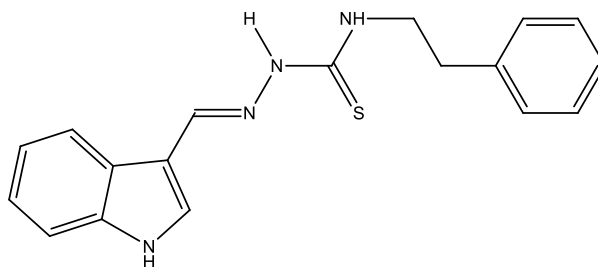


Fórmula Molecular: C₁₈H₁₇BrN₄S.

Massa Molecular: 401.32 g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 86% PF: 220-222°C; Rf: 0.46 (CHCl₃/MeOH 9:1).
- RMN ¹H (δppm, DMSO-d₆ 300MHz): 11.81 (s, 1H, NH), 11.25 (d, 1H, J= 3Hz, NH-indol), 8.25 (s, 1H, CH=N), 8.27 (d, 1H, J= 3.9Hz, indol), 7.98 (d, 1H, J= 2.4Hz, indol), 7.87 (d, 1H, J= 5.4Hz, NH), 7.43-7.40 (m, 1H, indol), 7.35-7.21(m, 5H, fenil), 7.21-7.17 (m, 1H, indol), 3.82 (t, 2H, J= 5.7Hz, CH₂), 2.38 (t, 2H, J= 6.9Hz, CH₂).
- RMN ¹³C (δppm, DMSO-d₆ 100MHz): 176.0, 140.1, 139.2, 135.7, 132.0, 128.5, 128.5, 128.4, 128.4, 126.1, 125.5, 125.3, 123.6, 113.8, 113.3, 110.7, 44.9, 34.8.
- IV (ν cm⁻¹ KBr): 3420 (NH), 3365 (NH), 3200 (NH), 1240 (C=S).
- MS (m/z): calculado: 400.0357; encontrado: 401.3234.

2-(1H-indol-3-il-metileno)-N-fenil-etil-hidrazina-carbotioamida (LqIT/LT-59)



Fórmula Molecular: $C_{18}H_{18}N_4S$.

Massa Molecular: 322.46 g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 95%; PF: 197-199°C °C; Rf: 0.51 ($CHCl_3$ /MeOH 9:1).
- RMN 1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.60 (s, 1H, NH), 11.22 (s, 1H, NH-indol), 8.28 (s, 1H, CH=N), 7.98 (d, 1H, indol, $J=5.4$ Hz), 7.84 (d, 1H, indol, $J=7.8$ Hz), 7.79 (d, 1H, $J=2.7$ Hz, NH), 7.42 (d, 1H, $J=8.1$ Hz, indol), 7.39-7.18 (m, 5H, fenil), 7.15-7.10 (m, 2H, indol), 3.85 (quart., 2H, $J=7.2$ Hz, CH_2), 2.95 (t, 2H, $J=7.8$ Hz, CH_2).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 175.8, 140.6, 139.2, 137.0, 131.0, 128.5, 128.5, 128.4, 128.4, 126.2, 123.8, 122.6, 121.8, 129.5, 111.7, 111.0, 44.7, 34.8.
- IV (ν cm^{-1} KBr): 3365 (NH), 3256 (NH), 3200 (NH), 1235 (C=S).
- MS (m/z): calculado: 322.1252; encontrado: 322.4273.

5.3.2 Características físico-químicas dos derivados indólicos-tiossemicarbazonas

As características físico-químicas dos compostos da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamidas são apresentadas na Tabela 3. Os derivados indólicos-tiossemicarbazonas mostraram ponto de fusão na faixa de pureza e rendimentos reacionais entre 35 a 95%.

Tabela 3 – Características físico-químicas e rendimentos para os compostos da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamidas.

Compostos	Rend. (%)	PF °C	Aspecto	Rf / eluente
LqIT/LT-90	35.0	206-208	Sólido amarelo	0.59 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 1:1)
LqIT/LT-91	89.4	221-223	Sólido amarelo	0.88 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 4:6)
LqIT/LT-92	83.8	210-211	Sólido amarelo	0.88 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 4:6)
LqIT/LT-93	38.1	224-225	Sólido amarelo	0.83 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 4:6)
LqIT/LT-94	68.6	213-214	Sólido amarelo	0.80 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 4:6)
LqIT/LT-95	69.5	214-215	Sólido amarelo	0.35 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 1:1)
LqIT/LT-96	40.0	205-206	Sólido amarelo	0.55 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 1:1)
LqIT/LT-97	38.8	206-208	Sólido amarelo	0.76 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 4:6)
LqIT/LT-98	38.0	215-216	Sólido amarelo	0.76 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 4:6)
LqIT/LT-99	66.8	220-222	Sólido amarelo	0.63 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 4:6)
LqIT/LT-50	77.0	205-206	Sólido branco	0.54 (CHCl ₃ /MeOH 9.5:0.5)
LqIT/LT-51	95.0	185-187	Sólido amarelo	0.44 (CHCl ₃ /MeOH 9:1)
LqIT/LT-52	58.6	223-224	Sólido branco	0.8 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 2:8)
LqIT/LT-53	32.0	195-197	Sólido amarelo	0.55 (CHCl ₃ /MeOH 9:1)
LqIT/LT-58	86.0	220-222	Sólido branco	0.46 (CHCl ₃ /MeOH 9:1)
LqIT/LT-59	73.0	197-199	Sólido branco	0.51 (CHCl ₃ /MeOH 9:1)

5.3.3 Rendimentos reacionais dos derivados indólicos-tiossemicarbazonas

Os compostos indólicos-tiossemicarbazonas obtiveram rendimentos reacionais entre 35-95% (Tabela 4). O LqIT/LT-51 apresentou o melhor rendimento (95%), em contraste com o LqIT/LT-50 (77%) substituído com bromo na posição 5 do indol. A presença do halogênio aumentou a eletrofilia da carbonila do aldeído indólico favorecendo o ataque da hidrazina como visualizado com o LqIT/LT-99 (66.8%), e também com os outros derivados halogenados. A substituição por metóxi contribuiu para o rendimento do LqIT/LT-92 (83.8%), mas não do LqIT/LT-90 (35%). O *p*-toluil provavelmente aumentou a nucleofilia da hidrazina (efeito indutivo positivo), favorecendo o ataque. Isto já não foi observado com o LqIT/LT-93 que por possuir o grupo metila diminuiu a eletrofilia da carbonila do indol, ao contrário do composto LqIT/LT-91, onde foi necessário maior tempo reacional e adição de

mais quantidade de catalisador ao meio reacional para otimizar o rendimento. Ali et al. (2014), mostraram os derivados tiossemicarbazonas substituídos obtidos a partir da isatina possuindo flúor, nitro e metila apresentando rendimentos entre 77-94% e os menores valores foram obtidos com os grupos retiradores de elétrons (flúor e nitro).

Tabela 4 – Derivados tiossemicarbazonas com seus respectivos substituintes, rendimentos e tempo reacional.

Composto	R ₁	R ₂	Rend. (%)	Tempo (h.)
----------	----------------	----------------	-----------	------------

Reaction scheme: Thiosemicarbazide + Indole-3-carbaldehyde derivative $\xrightarrow{\text{AcOH, EtOH, T.A. 1-2 horas}}$ Thiosemicarbazone derivative

LqIT/LT-90	OCH ₃		35.0	1
LqIT/LT-91	CH ₃		89.4	2
LqIT/LT-92	OCH ₃		83.8	1
LqIT/LT-93	CH ₃		38.1	1
LqIT/LT-94	OCH ₃		68.6	1
LqIT/LT-95	CH ₃		69.5	1
LqIT/LT-96	OCH ₃		40.0	1
LqIT/LT-97	CH ₃		38.8	1
LqIT/LT-98	H		38.0	1
LqIT/LT-99	Br		66.8	1
LqIT/LT-50	Br		77.0	1
LqIT/LT-51	H		95.0	1
LqIT/LT-52	Br		58.6	1
LqIT/LT-53	H		32.0	1
LqIT/LT-58	Br		86.0	1
LqIT/LT-59	H		73.0	1

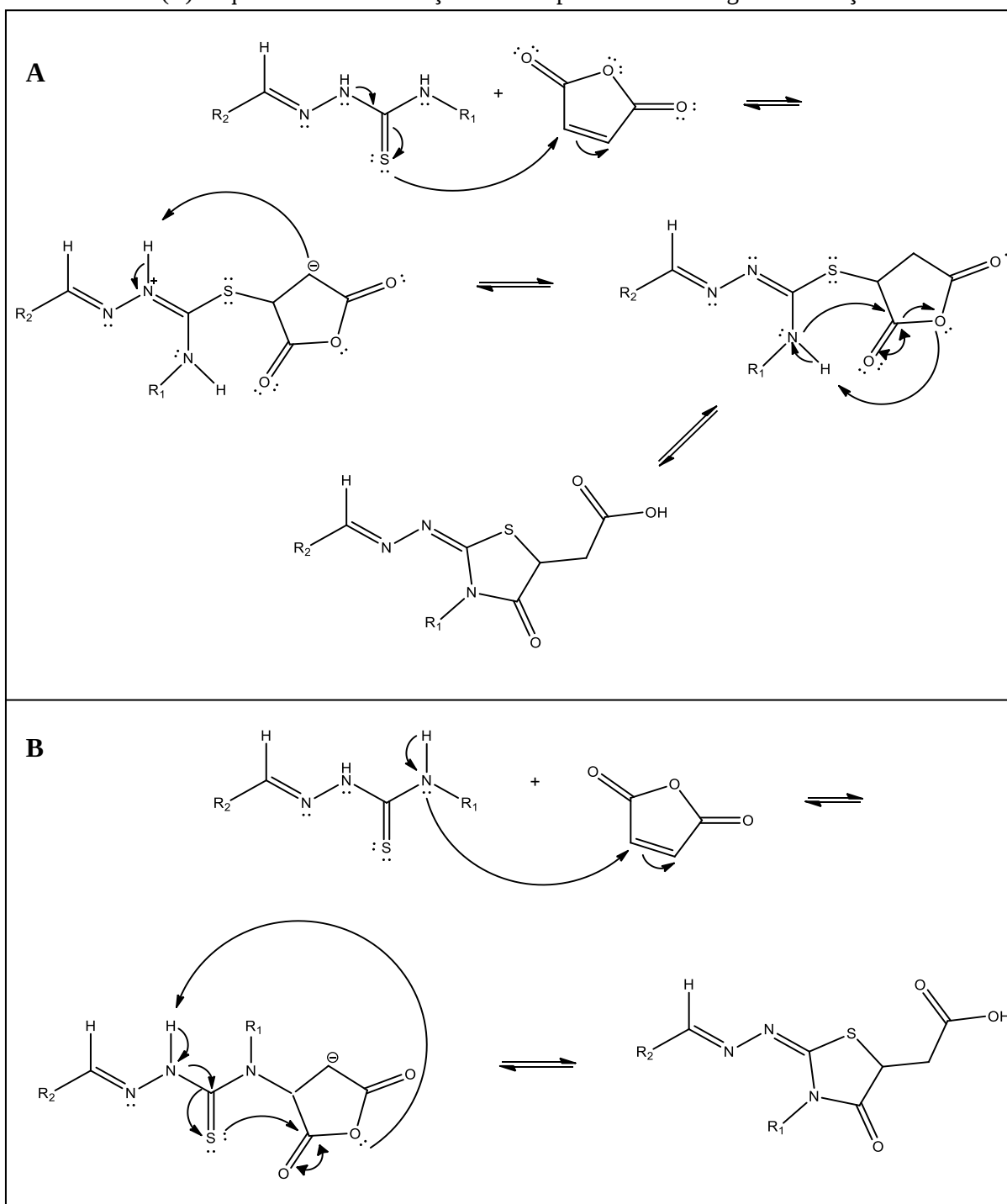
5.4 Mecanismos reacionais da formação dos Ácidos 2-[(1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos

A reação de Michael envolve a adição de um nucleófilo (doador de Michael) a um eletrófilo (aceptor de Michael), este último apresentando uma insaturação entre os carbonos α e β referente a um grupo retirador de elétrons, de modo que diversos nucleófilos foram utilizados concomitantemente com muitos aceptores de Michael (LING et al., 1996) e dentre estas modificações temos a reação denominada tia-Michael a qual envolve um nucleófilo de enxofre como doador de Michael. Esta reação surge como uma das mais importantes metodologias para se obter a formação da ligação C-S (TROST e KEELEY, 1975).

A reação de tia-Michael pode ser visualizada por dois caminhos (Esquema 17), adição tia-Michael em um dos carbonos da função C=C, seguido de aminólise na carbonila adjacente ou aminólise inicial com consequente adição tia-Michael no carbono vizinho. Isto acontece devido à reatividade do anidrido maléico e seus derivados frente à dinucleófilos (BHARTI et al., 2003). Semelhantemente à tiouréia, as tiossemicarbazonas são versáteis 1,3-dinucleófilos. Ademais, as tiossemicarbazonas apresentam as formas tautoméricas tiol e tiona em equilíbrio, observável nas vibrações da espectroscopia de absorção do infravermelho (ANTONINI et al., 1977), essa característica molecular é responsável pela etapa de adição tia-Michael ao anidrido maléico.

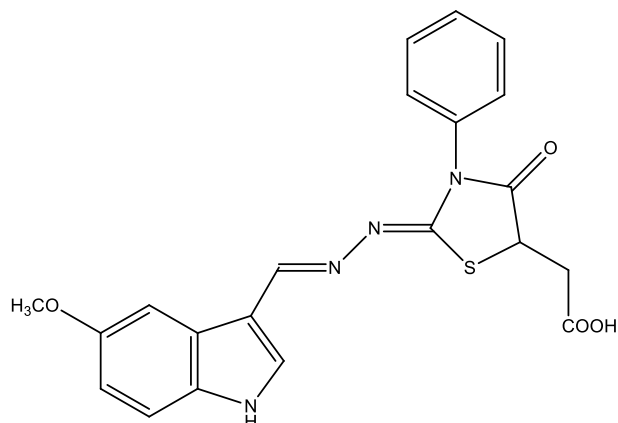
Assim, o mecanismo reacional para a formação dos derivados 4-tiazolidinonas com o grupamento ácido na posição 5 do anel ocorreu com o deslocamento do par de elétrons do nitrogênio induzindo o ataque nucleofílico do enxofre a qualquer um dos carbonos α - β insaturados do anidrido maléico. Em seguida, ocorre a protonação do intermediário enolato para sua estabilização eletrônica (AQUINO, 2007). Por uma proximidade espacial entre o grupamento amina e a carbonila do núcleo anidrílico há um ataque intramolecular do nitrogênio ao carbono da carbonila (aminólise), rearranjando a molécula para a formação do heterociclo substituído na posição 5 (Esquema 17).

Esquema 17 – (A) Mecanismo de adição tia-Michael seguida de aminólise para obtenção das 4-tiazolidinonas. (B) Esquema da mesma reação iniciada pela aminólise seguida da adição tia-Michael.



5.4.1 Características Físico-químicas e Espectroscópicas para Ácidos 2-[(1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos

Ácido 2-[(5-metóxi-1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-90)

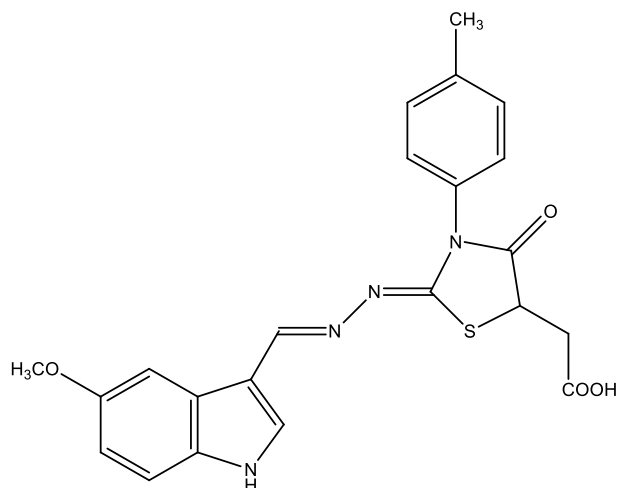


Fórmula Molecular: $C_{21}H_{18}N_4O_4S$.

Massa Molecular: 422.46g/mol.

- Sólido laranja; Rendimento: 28.3%; PF: 254-255°C; Rf: 0.65 (*n*-hexano/acetato de etila 2:8)
- RMN 1H (δ ppm, DMSO- d_6 300MHz): 12.86 (s, 1H, OH), 11.52 (s, 1H, NH-indol), 8.43 (s, 1H, CH=N), 7.48 (s, 1H, pos. 4 indol), 7.71 (s, 1H, pos. 2 indol), 7.53 (t, 1H, pos. 4 fenil, $J=5.4$ Hz), 7.47 (d, 2H, pos. 2,6 fenil, $J=5.1$ Hz), 7.42 (d, 2H, pos. 3,5 fenil, $J=5.4$ Hz), 7.36 (d, 1H, pos. 7 indol, $J=6.6$ Hz), 6.86 (d, 1H, pos. 6 indol, $J=6.3$ Hz), 4.55 (t, 1H, CH, $J=4.8$ Hz), 3.84 (s, 3H, CH_3O), 3.13 (d, 2H, CH_2 , $J=6$ Hz).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 173.6, 171.8, 160.9, 154.6, 153.5, 135.3, 132.0, 131.8, 129.0, 128.5, 128.2, 125.1, 123.8, 112.6, 111.6, 103.8, 53.20, 42.44, 37.09.
- IV (ν cm^{-1} KBr): 3384 (NH-indol), 1720 (C=O), 1609 (NC=O), 1562 e 1487 (C=N), 1261 (N-N=C), 1235 (NCS).

Ácido 2-[(5-metóxi-1H-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-(*p*-toluil)-tiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-92)

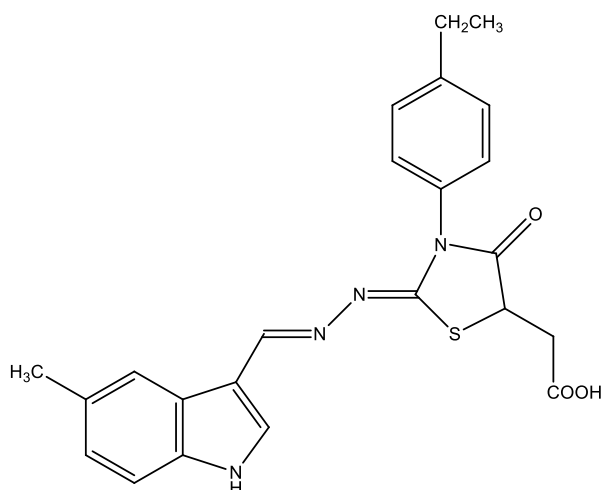


Fórmula Molecular: $C_{22}H_{20}N_4O_4S$.

Massa Molecular: 436.48g/mol.

- Sólido verde claro; Rendimento: 35.8%; PF: 256-257°C; Rf: 0.54 (*n*-hexano/acetato de etila 2:8).
- RMN 1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 12.76 (s, 1H, OH), 11.52 (s, 1H, NH-indol, $J=2.4$ Hz), 8.42 (s, 1H, CH=N), 7.84 (d, 1H, pos. 2 indol, $J=2.4$ Hz), 7.70 (d, 1H, pos. 4 indol, $J=2.8$ Hz), 7.35-7.26 (m, 5H, Ar-H), 7.23-7.16 (dd, 1H, indol, $J=2.8$ Hz, $J=2.4$ Hz), 4.54 (t, 1H, CH, $J=3.9$ Hz), 3.84 2.38 (s, 3H, OCH $_3$) 3.11 (d, 2H, CH $_2$, $J=3.9$ Hz), 2.38 (s, 3H, CH $_3$).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 173.6, 171.8, 161.0, 154.6, 153.4, 138.0, 132.7, 131.9, 131.8, 129.4, 127.9, 125.1, 112.6, 111.6, 103.8, 55.19, 42.3, 37.1, 20.7.

Ácido 3-(4-etil-fenil)-2-[(5-metil-1H-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxotiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-95)

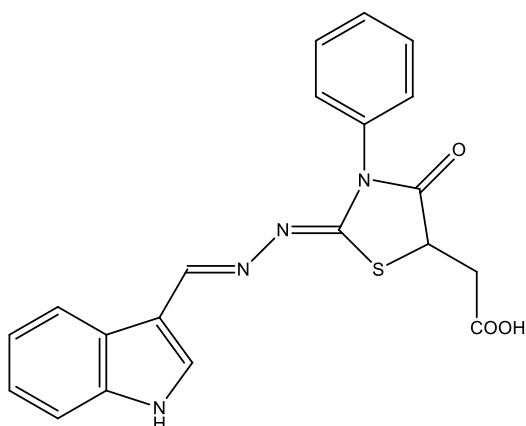


Fórmula Molecular: $C_{23}H_{22}N_4O_3S$.

Massa Molecular: 434.51g/mol.

- Sólido marrom; Rendimento: 31%; PF: 260-262°C; Rf: 0.59 (*n*-hexano/acetato de etila 2:8)
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 173.7, 171.7, 160.5, 153.7, 144.1, 135.4, 133.0, 131.9, 129.3, 128.2, 127.9, 124.7, 124.1, 121.8, 111.6, 111.4, 42.3, 36.9, 27.8, 21.5, 15.4.
- IV (ν cm^{-1} KBr): 3320 (NH-indol) 1723 (C=O), 1608 (NC=O), 1582 e 1509 (C=N), 1394 (NCS), 1253 (N-N=C).

Ácido 2-[(1H-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acético
(LqIT/LTA-98)



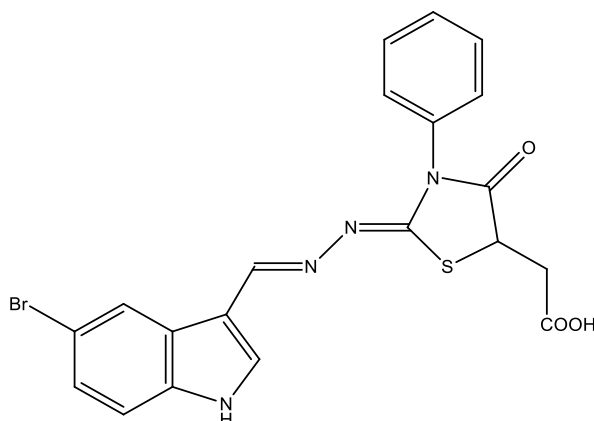
Fórmula Molecular: $C_{20}H_{16}N_4O_3S$.

Massa Molecular: 392.43g/mol.

- Sólido bege; Rendimento: 56.4%; PF: 248-250°C; Rf: 0.7 (*n*-hexano/acetato de etila 2:8)
- RMN 1H (δ ppm, DMSO- d_6 400MHz): 11.65 (d, 1H, NH-indol, $J=2.4$ Hz), 8.42 (s, 1H, CH=N), 8.18 (d, 1H, pos. 4 indol, $J=6$ Hz), 7.77 (d, 1H, pos. 2 indol, $J=2.8$ Hz), 7.52-7.38 (m, 6H, Ar-H), 7.23-7.16 (m, 2H, Ar-H), 4.54 (t, 1H, CH, $J=3.9$ Hz), 3.13 (d, 2H, CH_2 , $J=3.9$ Hz).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 173.7, 171.7, 160.6, 154.0, 137.2, 135.4, 132.2, 129.0, 128.6, 128.2, 124.5, 122.8, 121.9, 120.9, 112.0, 111.8, 42.4, 36.9.

- IV (ν cm⁻¹ KBr): 3410 (NH-indol), 1719 (C=O), 1613 (NC=O), 1579 e 1427 (C=N), 1389 (NCS), 1364 (N-N=C).

Ácido 2-[(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-99)

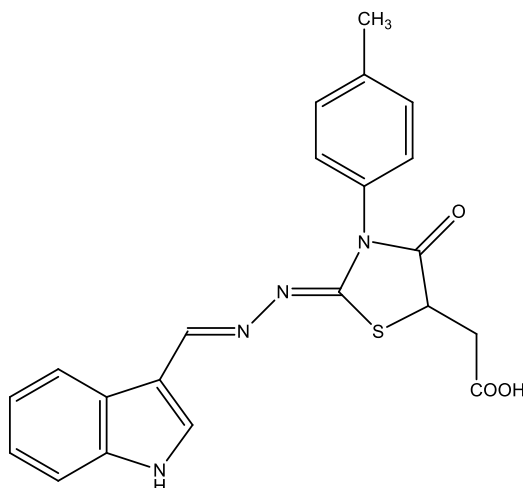


Fórmula Molecular: C₂₀H₁₅BrN₄O₃S.

Massa Molecular: 471.33g/mol.

- Sólido bege; Rendimento: 57.1%; PF: 252-254°C; Rf: 0.47 (*n*-hexano/acetato de etila 2:8)
- RMN ¹H (δ ppm, DMSO-d₆ 300MHz): 12.79 (s largo, 1H, CO₂H), 11.84 (d, 1H, NH-indol, J=2.4Hz), 8.42 (s, 1H, CH=N), 8.35 (d, 1H, indol, J=4Hz) 7.82 (d, 1H, pos. 2 indol, J=3Hz), 7.56-7.32 (m, 7H, Ar-H), 4.58 (t, 1H, CH, J=6Hz), 3.15 (d, 2H, CH₂, J=6Hz).
- RMN ¹³C (δ ppm, DMSO-d₆ 100MHz): 173.6, 171.4, 161.0, 153.5, 135.8, 134.4, 133.2, 129.0, 128.5, 128.1, 126.1, 125.2, 124.2, 114.0, 113.4, 111.3, 42.5, 36.9.
- IV (ν cm⁻¹ KBr): 3410 (NH-indol), 1716 (C=O), 1614 (NC=O), 1573 e 1524 (C=N), 1387 (NCS), 1351 (N-N=C).

Ácido 2-[(1H-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-(*p*-toluil)-tiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-53)



Fórmula Molecular: $C_{21}H_{18}N_4O_3S$.

Massa Molecular: 406.46g/mol.

- Sólido amarelo; Rendimento: 19%; PF: 251-253°C; Rf: 0.52 (*n*-hexano/acetato de etila 2:8)
- RMN 1H (δ ppm, DMSO- d_6 300MHz): 12.74 (s largo, 1H, CO₂H), 11.66 (d, 1H, NH-indol, $J=2.4$ Hz), 8.43 (s, 1H, CH=N), 8.22 (dd, 1H, pos. 4 indol, $J= 3.6, 2.1$ Hz), 7.78 (d, 1H, pos. 2 indol, $J=2.4$ Hz), 7.44 (dd, 1H, pos. 7 indol $J= 1.8, 3.6$ Hz), 7.34-7.16 (m, 6H, Ar-H) 4.53 (t, 1H, CH, $J=6.3$ Hz), 3.13 (d, 2H, CH₂, $J=6$ Hz), 2.38 (s, 3H, CH₃).
- RMN ^{13}C (δ ppm, DMSO- d_6 100MHz): 136.7, 134.7, 123.7, 116.8, 101.4, 100.1, 95.8, 95.1, 92.4, 90.9, 87.4, 85.7, 84.94, 83.8, 75.0, 74.8, 5.3, - 0.05, - 16.2.
- IV (ν cm⁻¹ KBr): 3615 (NH-indol), 1724 (C=O), 1608 (NC=O), 1562 e 1513 (C=N), 1365 (NCS), 1249 (N-N=C).

5.4.2 Características físico-químicas dos derivados 4-tiazolidinonas

As características físico-químicas dos compostos da série Ácidos 2-[(1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos são apresentadas na Tabela 5. Os derivados 4-tiazolidinonas mostraram ponto de fusão na faixa de pureza e rendimentos reacionais entre 19 a 57%.

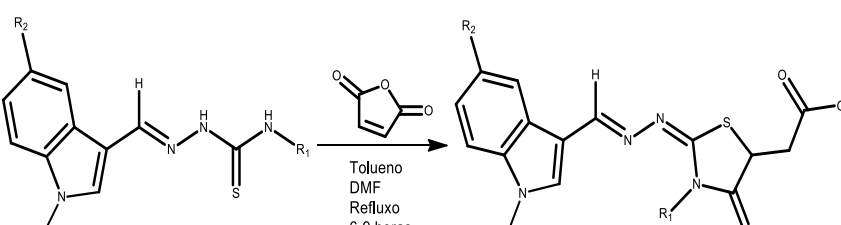
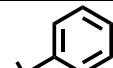
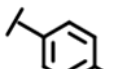
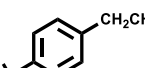
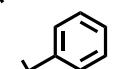
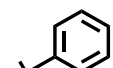
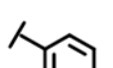
Tabela 5 – Características físico-químicas e rendimentos para os compostos da série Ácidos 2-[(1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos.

Compostos	Rend. (%)	PF °C	Aspecto	Rf / eluente
LqIT/LTA-90	28	254-255	Sólido amarelo	0.65 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 2:8)
LqIT/LTA-92	35	254-255	Sólido verde claro	0.54 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 2:8)
LqIT/LTA-95	31	260-262	Sólido marrom	0.59 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 2:8)
LqIT/LTA-98	56	248-250	Sólido bege	0.70 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 2:8)
LqIT/LTA-99	57	252-254	Sólido bege	0.47 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 2:8)
LqIT/LTA-53	19	251-253	Sólido amarelo	0.53 (<i>n</i> -Hex/AcOEt 2:8)

5.4.3 Rendimentos reacionais dos derivados 4-tiazolidinonas

Os derivados 4-tiazolidinonas obtiveram rendimentos reacionais entre 19-57% (Tabela 6). Dawood et al. (2015), sintetizaram 4-tiazolidinonas substituídos com núcleos cumarínicos obtidos a partir do anidrido maleico e ácido acético (15 mL), e tempo reacional entre 8-10 horas, no entanto, obtiveram rendimentos entre 65-68%. O ácido acético utilizado na metodologia de síntese otimizou o rendimento por aumentar a nucleofilia do enxofre (forma tiol), e isto favorece o ataque nucleofílico do enxofre a qualquer um dos carbonos α - β insaturados do anidrido maléico. As moléculas LqIT/LTA-90 e LqIT/LTA-53 apresentaram os menores rendimentos 28% e 19%, respectivamente. Isto pode ser explicado devido a ocorrência de perdas no processo de recristalização dos compostos (falhas no *work-up*), mesmo com os seus substituintes (metóxi) contribuindo para a nucleofilia do enxofre. Em contraste, o LqIT/LTA-98 e o LqIT/LTA-99 que apesar de não possuírem grupos químicos favoráveis para nucleofilia, apresentaram os melhores rendimentos (56 e 57%), contudo foi necessário um maior tempo reacional para conclusão das respectivas reações.

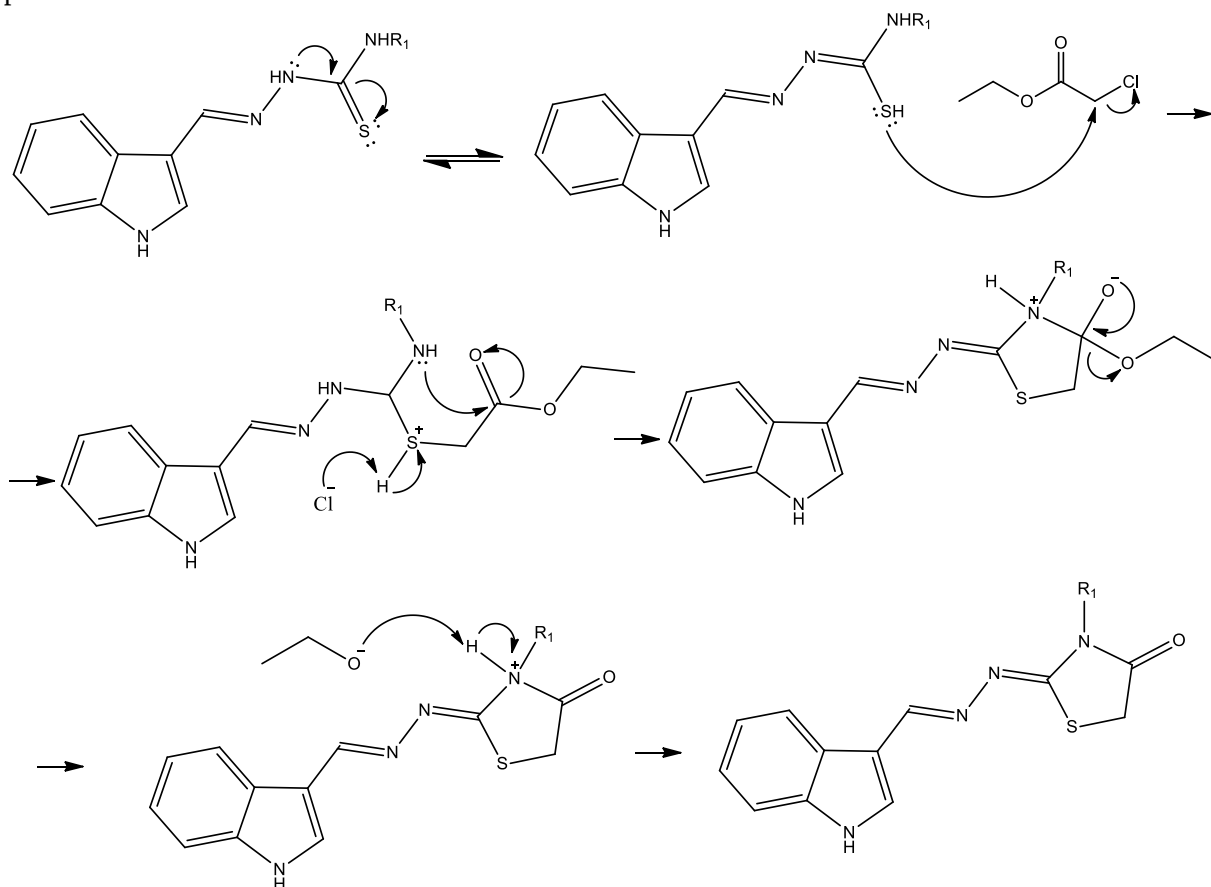
Tabela 6 – Derivados 4-tiazolidinonas com seus respectivos substituintes, rendimentos e tempos reacionais.

Composto	R ₁	R ₂	Rend. (%)	Tempo (h.)
				
LqIT/LTA-90		OCH ₃	28	8
LqIT/LTA-92		CH ₃	35	6
LqIT/LTA-95		CH ₃	31	9
LqIT/LTA-98		H	56	9
LqIT/LTA-99		Br	57	9
LqIT/LTA-53		H	19	8

5.5 Mecanismo reacional dos derivados 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona (LqIT/LTC)

A formação da 4-tiazolidinona ocorre em duas etapas: a primeira etapa é através do mecanismo de S-alquilação que se inicia pela condensação do cloroacetato de etila com o átomo de enxofre a partir da forma tiol. Na segunda etapa, ocorre um ataque intramolecular do par de elétrons livre do nitrogênio (N-4) na carbonila da função éster, seguido da liberação de etanol, o qual leva a formação do heterociclo não substituído na posição 5 do anel (Esquema 18) (JOLLY et al., 1990; ALVES et al., 1993; GÜRSOY et al., 1997; ABBADY et al., 2003).

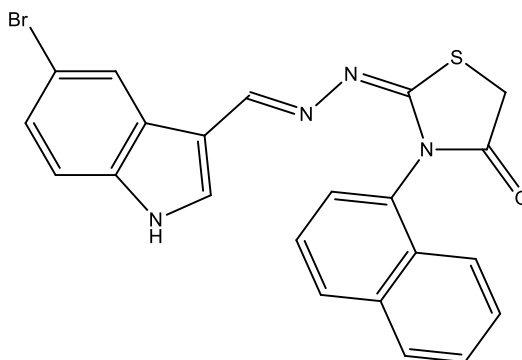
Esquema 18 – Mecanismo de reação da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona a partir do derivado tiossemicarbazona e cloro acetato de etila.



As propriedades eletrônicas e estéricas do substituinte na posição *N*-4 das tiossemicarbazonas parece ser um fator determinante para a formação do anel 4-tiazolidinona. Estudos anteriores sobre estes compostos revelaram que substituintes, tais como fenil ou alquil conduzem a formação da 4-tiazolidinona por perda de etanol (KÜÇÜGÜZEL et al., 2006).

5.5.1 Características Físico-químicas e Espectroscópicas para a série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos

2-(5-bromo-1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3-(naftaleno-1-il)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-54)

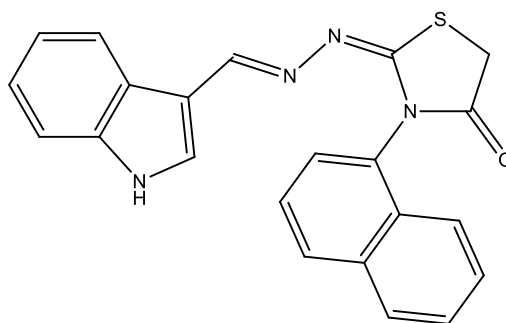


Fórmula Molecular: $C_{22}H_{15}BrN_4OS$.

Massa Molecular: 463.35g/mol.

- Sólido bege; Rendimento: 35%; PF: 280-282°C; Rf: 0.58 ($CHCl_3$ /MeOH 9:1).
- RMN 1H (δ ppm, DMSO- d_6 300MHz): 11.79 (s, 1H, NH), 8.40 (m, 1H, indol), 8.24 (m, 1H, indol), 8.07 (s, 1H, CH=N), 8.07 (m, 1H, naftil), 7.76-7.57 (m, 5H, naftil), 7.42 (m, 1H, naftil), 7.35 (m, 1H, indol), 7.32 (m, 1H, indol), 4.18-4.41 (m, 2H, CH_2).
- IV (ν cm^{-1} KBr): 3345 (NH), 3053 (NH), 2977 (NH), 1707 (CO).
- MS (m/z) calculado: 462.0150; encontrado: 463.3497.

2-(1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3-(naftaleno-1-il)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-55)



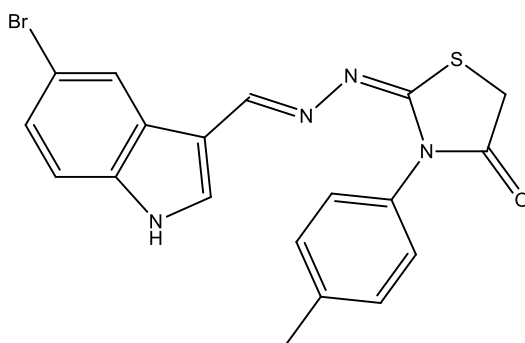
Fórmula Molecular: $C_{22}H_{16}N_4OS$.

Massa Molecular: 384.45g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 45%; PF: 265-267°C; Rf: 0.59 ($CHCl_3$ /MeOH 9.5:0.5).
- RMN 1H (δ ppm, DMSO- d_6 300MHz): 11.62 (s, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, =CH-), 8.23 (d, 1H, J= 8.4Hz, indol), 8.23 (d, 1H, pos. 2 indol, J=2.1Hz), 8.08 (d, 1H, J= 8.1Hz, indol), 7.79-7.76 (m, 1H, naftil), 7.69-7.58 (m, 5H, naftil), 7.44 (m, 1H, naftil), 7.20 (m, 2H, indol), 4.38 (d, 1H, J= 17.1Hz, CH_2), 4.21 (d, 1H, J= 17.4Hz, CH_2).

- RMN ^{13}C (δppm , DMSO- d_6 100MHz): 172.3, 161.5, 153.8, 137.1, 133.9, 132.0, 132.0, 139.3, 129.3, 128.3, 127.1, 127.1, 126.5, 125.8, 124.4, 122.6, 122.4, 121.9, 120.7, 111.9, 111.7, 32.4.
- IV ($\nu\text{ cm}^{-1}$ KBr): 3394 (NH), 1613 (CO).
- MS (m/z) calculado: 384.1045; encontrado: 384.4536.

2-(5-bromo-1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3-(p-toluil)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-56)

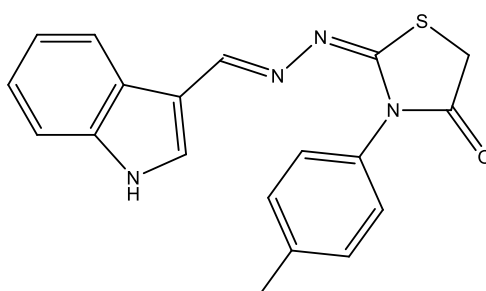


Fórmula Molecular: $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{BrN}_4\text{OS}$.

Massa Molecular: 427.32g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 32%; PF: 295°C; Rf: 0.56 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9.5:0.5).
- RMN ^1H (δppm , DMSO- d_6 300MHz): 11.83 (s, 1H, NH), 8.40 (m, 2H, indol), 7.82 (s, 1H, CH=N), 7.43 (d, 2H, J= 8.7Hz, fenil), 7.35-7.24 (d, 2H, indol), 7.28 (d, 2H, J= 8.7Hz, fenil), 4.11 (s, 2H, CH_2), 2.37 (s, 3H, CH_3).
- RMN ^{13}C (δppm , DMSO- d_6 100MHz): 171.98, 153.2, 138.05, 135.7, 135.7, 133.1, 132.5, 129.4, 129.4, 129.4, 127.9, 127.9, 127.9, 127.9, 127.9, 125.1, 114.0, 113.4, 111.4.
- IV ($\nu\text{ cm}^{-1}$ KBr): 3255 (NH), 1608 (CO).
- MS (m/z) calculado: 426.0150; encontrado: 427.3176.

2-(1H-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3-(p-toluil)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-57)



Fórmula Molecular: C₁₉H₁₆N₄OS.

Massa Molecular: 348.42g/mol.

- Sólido branco; Rendimento: 72%; PF: 274-276°C; Rf: 0.57 (CHCl₃/MeOH 9.5:0.5).
- RMN ¹H (δppm, DMSO-d₆ 300MHz): 11.64 (s, 1H, NH), 8.42 (s, 1H, CH=N), 8.22 (d, 1H, J= 6.6Hz, indol), 7.77 (d, 1H, J= 2.4Hz, indol), 7.45 (d, 1H, J= 6.6Hz, indol), 7.32 (d, 2H, J= 8.4Hz, fenil), 7.25 (d, 2H, J= 8.4Hz, fenil), 7.21-7.14 (m, 2H, indol), 4.07 (s, 2H, CH₂), 2.38 (s, 3H, CH₃).
- RMN ¹³C (δppm, DMSO-d₆ 100MHz): 172.0, 154.4, 153.7, 138.0, 137.1, 123.6, 132.0, 129.4, 129.4, 129.4, 129.4, 127.9, 127.9, 127.9, 127.9, 124.4, 122.6, 120.7, 32.1.
- IV (ν cm⁻¹ KBr): 3405 (NH), 1722 (CO).
- MS (m/z) calculado: 348.1045; encontrado: 348.4215.

5.5.2 Características Físico-Químicas dos derivados 4-tiazolidínicos não substituídos na posição 5 do anel

As características físico-químicas dos compostos da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos são apresentadas na Tabela 7. Os derivados 4-tiazolidínicos mostraram ponto de fusão na faixa de pureza e rendimentos reacionais entre 35 a 72%.

Tabela 7 – Características físico-químicas e rendimentos para os compostos da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos.

Compostos	Rend. (%)	PF °C	Aspecto	Rf / eluente
LqIT/LTC-54	35	280-282	Sólido branco	0.58 CHCl ₃ /MeOH 9:1
LqIT/LTC-55	45	265-267	Sólido branco	0.59 CHCl ₃ /MeOH 9.5:0.5
LqIT/LTC-56	32	295	Sólido branco	0.56 CHCl ₃ /MeOH 9.5:0.5
LqIT/LTC-57	72	274-276	Sólido branco	0.57 CHCl ₃ /MeOH 9.5:0.5

5.5.3 Rendimentos reacionais dos derivados 4-tiazolidinonas não substituídos na posição 5 do anel

Os derivados 4-tiazolidinonas apresentaram rendimentos reacionais entre 35-72% (Tabela 8). Essa diferença de rendimento é justificada pela presença de substituintes que diminuem a nucleofilia do enxofre não facilitando a S-alquilação entre o átomo de enxofre e o

carbono metilênico do cloroacetato de etila. Isto pode ser visualizado com os compostos LqIT/LTC-54 e LqIT/LTC-56 que exibiram rendimentos de 35% e 32%, respectivamente, e ambos possuem o bromo substituído reduzindo a nucleofilia do tiol. O LqIT/LTC-57 substituído com o grupo *p*-toluol apresentou o maior rendimento (72%), no entanto, sendo necessário um maior tempo reacional.

Aquino (2007), obteve os derivados 4-tiazolidinonas com rendimentos entre 50-86%, sendo os compostos com os maiores rendimentos substituídos por grupamentos metila e metóxi e os menores rendimentos apresentando o grupo nitro e o átomo flúor. Benmohammed et al. (2014), sintetizaram os derivados 4-tiazolidinonas com rendimentos entre 91-80% utilizando o bromoacetato de etila. O incremento do rendimento reacional pode ser explicado em razão do bromo do éster ser um melhor grupo de partida comparando-se ao cloro, com isso favoreceu o ataque nucleofílico do enxofre.

Tabela 8 – Derivados 4-tiazolidinonas não substituídos na posição 5 do anel com seus respectivos substituintes, rendimentos e tempos reacionais.

Composto	R ₁	R ₂	Rend. (%)	Tempo (h.)
LqIT/LTC-54		Br	35	16
LqIT/LTC-55		H	45	18
LqIT/LTC-56		Br	32	24
LqIT/LTC-57		H	72	22

5.6 Caracterização estrutural dos derivados 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamidas (LqIT/LT)

Todas as tiossemicarbazonas podem apresentar-se em tautomerização tiona-tiol por possuírem o grupo tiona e um próton adjacente ao grupo tiona. A ausência do estiramento ν

(S-H) em $2500\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ e a presença do estiramento ν (N-H) em $3100\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ no espectro de infravermelho dos compostos sugere que todos os derivados permanecem na forma tiona no estado sólido (BHARTI et al., 2003). A confirmação da forma tautomérica tiona foi observada pela presença das bandas de absorção em intensidades variando entre fraca, média e forte a $1192\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ devido à deformação axial ν (C=S). No espectro de absorção do IV foi possível observar os estiramentos referentes a C=N na região entre $1537\text{--}1556\text{ cm}^{-1}$ corroborando com estudos anteriores destes derivados (HARIBABU et al., 2016). As bandas de absorção estendendo-se de aproximadamente $1513\text{--}1439\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas ao estiramento (ν) do grupo N-CS-N (ALVES et al., 1993; ERGENÇ et al., 1999).

Conforme apresentado na Tabela 9 é possível visualizar as principais bandas de absorção do espectro de infravermelho para os compostos indólicos-tiossemicarbazonas sintetizados, e a Figura 14 mostra o espectro de absorção no IV para o composto LqIT/LT-94.

Figura 14 – Espectro de absorção no IV para o composto LqIT/LT-92 (Pastilhas de KBr).

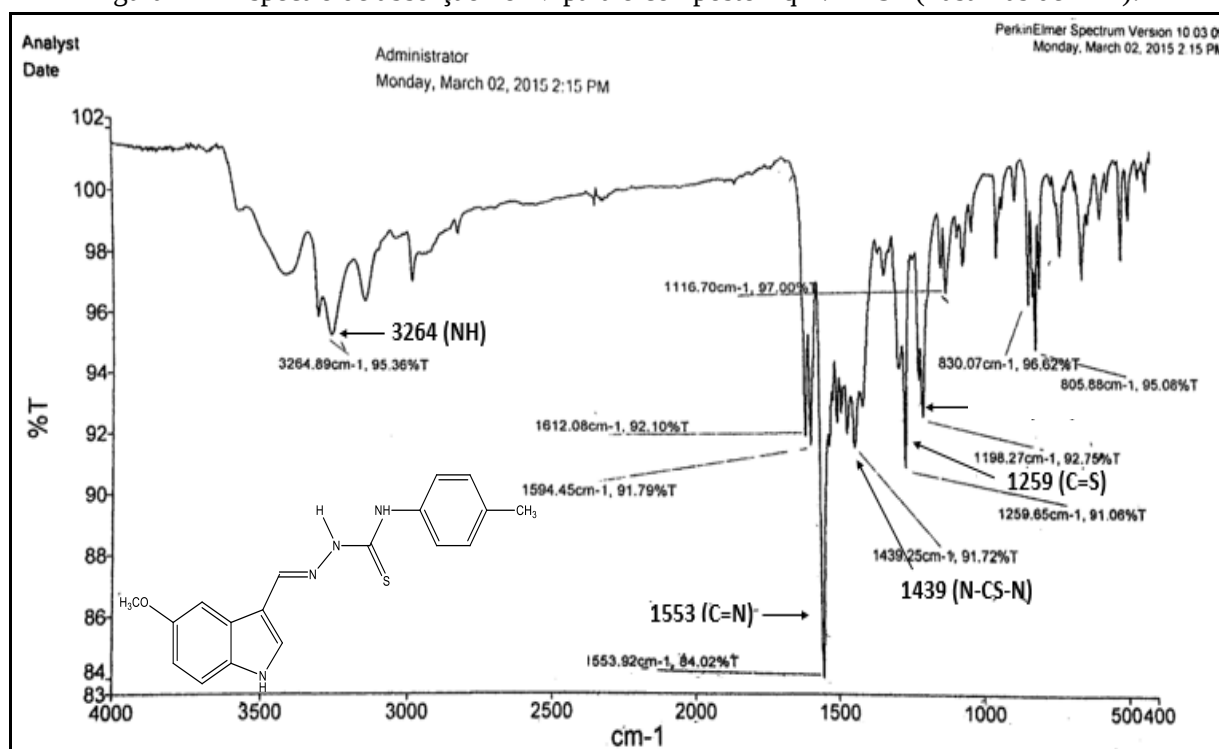


Tabela 9 – Principais frequências de absorção observadas nos espectros de absorção no IV para os compostos da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamidas.

Compostos	NH (v)	C=N (v)	N-CS-N (v)	C=S (v)
LqIT/LT-90	3339 (m)	1545 (F)	1489 (m)	1211 (F)
LqIT/LT-91	3336 (m)	1546 (F)	1485 (m)	1249 (m)
LqIT/LT-92	3264 (m)	1553 (F)	1439 (m)	1198 (f)
LqIT/LT-93	3343 (m)	1543 (F)	1488 (m)	1211 (F)
LqIT/LT-94	3317 (m)	1547 (F)	1499 (m)	1206 (F)
LqIT/LT-95	3327(m) e 3158 (m)	1542 (F)	1493 (m)	1250 (F)
LqIT/LT-96	3349 (m)	1550 (F)	1488 (m)	1203 (F)
LqIT/LT-97	3350 (m)	1551 (F)	1489 (m)	1222 (m)
LqIT/LT-98	3413 (m)	1556 (F)	1499 (m)	1247 (f)
LqIT/LT-99	3345 (m)	1545 (F)	1483 (m)	1212 (F)
LqIT/LT-50	3320 (m) e 3164 (m)	1541 (F)	1493 (m)	1228 (F)
LqIT/LT-51	3319 (m) e 3158 (m)	1547 (F)	1468 (m)	1243 (m)
LqIT/LT-52	3283 (m)	1553 (F)	1513 (m)	1192 (m)
LqIT/LT-53	3334 (m) e 3164 (m)	1546 (F)	1489 (m)	1245 (m)
LqIT/LT-58	3340 (F) e 3365 (m)	1537 (F)	1504 (m)	1240 (m)
LqIT/LT-59	3256 (m) e 3365 (m)	1541 (F)	1494 (m)	1235 (m)

F = forte; m = média; f = fraco

Na caracterização estrutural dos derivados indólicos-tiosemicarbazonas foi possível diferenciar os simpletos apresentados no espectro RMN ^1H sendo pertencentes ou não ao NH do anel indólico. No presente estudo, estes picos foram confirmados através da análise do espectro de COSY ^1H - ^1H do composto LqIT/LT-51 (Figura 15). Neste, observou-se a correlação do hidrogênio NH do indol, com o hidrogênio da posição 2 do anel indólico, foi visualizado também a correlação entre o hidrogênio do grupo azometina (HC=N) com o hidrogênio da posição 4 do núcleo indol. A confirmação do pico da azometina (HC=N) foi evidenciada por meio do espectro HSQC ^1H ^{13}C do mesmo composto (Figura 16), onde foi analisada a correlação entre os deslocamentos químicos em 8.48 δ ppm com 141.00 δ ppm, estes respectivos deslocamentos estão de acordo com diversos trabalhos relatados na literatura (BENMONHAMMED et al., 2014; HARIBABU et al., 2016).

Figura 15 – Espectro de COSY ^1H - ^1H do derivado LqIT/LT-51.

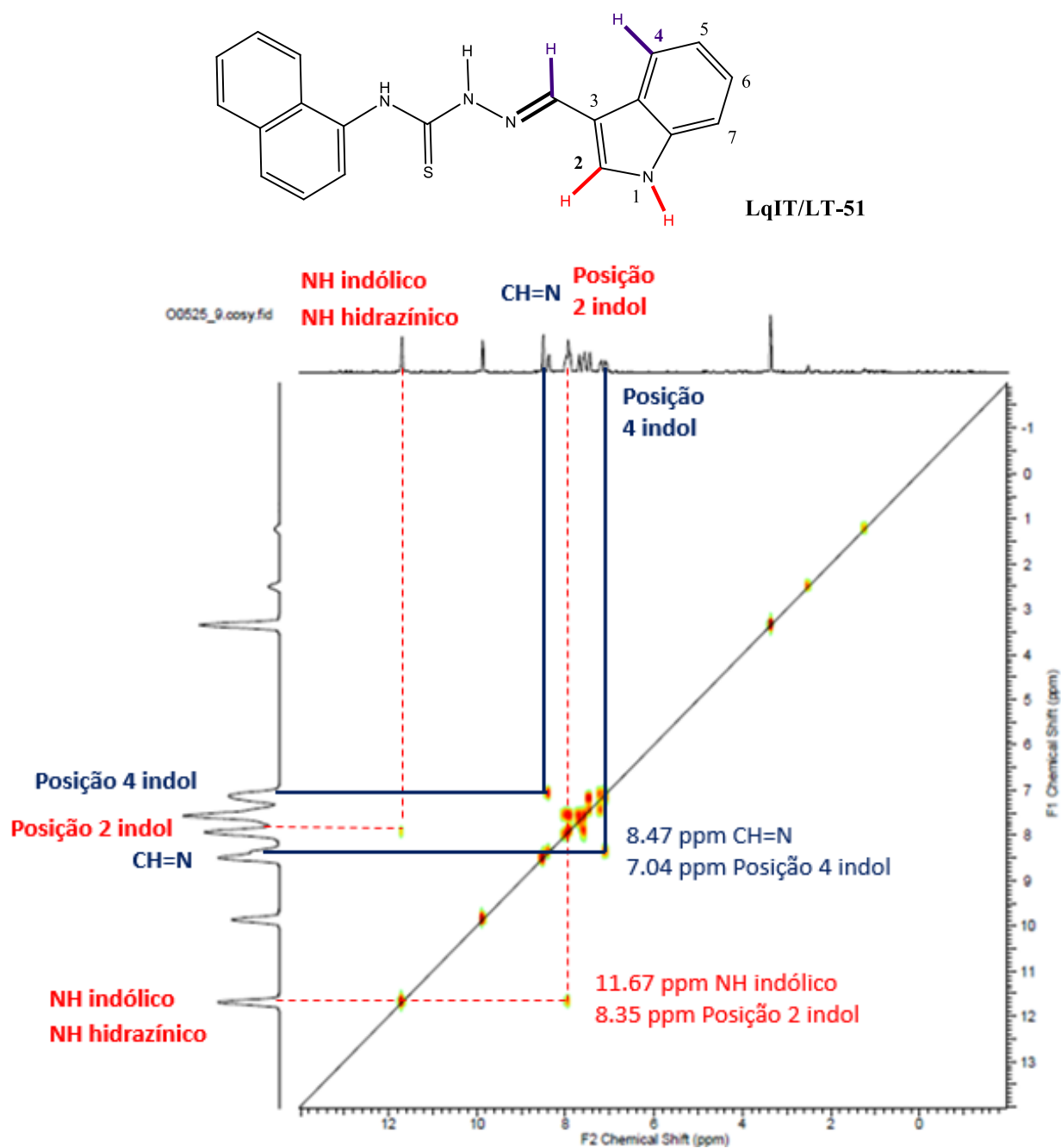
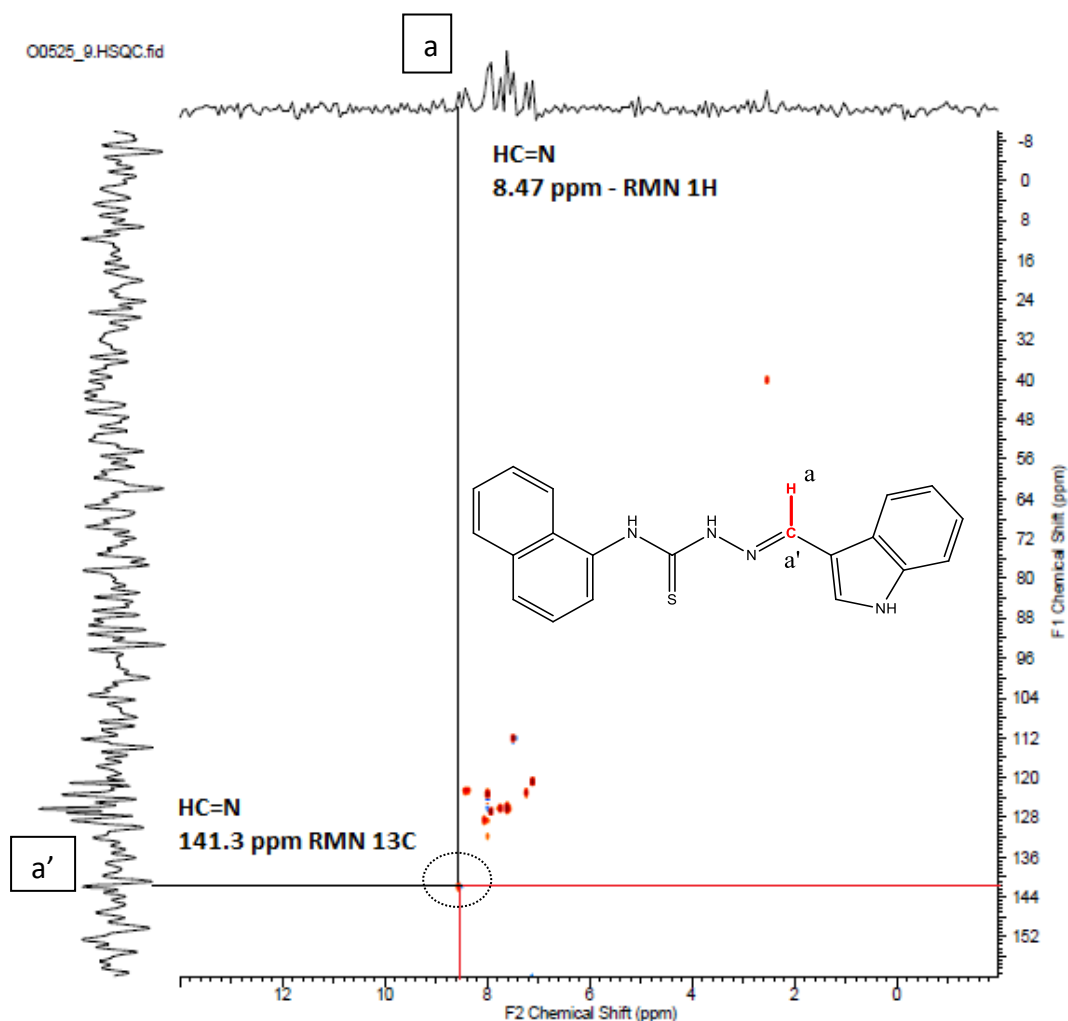


Figura 16 – Espectro de HSQC ^{13}C - ^1H do derivado LqIT/LT-51.

Assim, nos espectros de RMN ^1H , o simpleto presente entre 11.56–11.86 δ ppm foi atribuído ao hidrogênio do grupo NH hidrazínico. Já para o hidrogênio característico da função azometina (HC=N), o deslocamento químico foi demonstrado em campo magnético com valores entre 8.22–8.48 δ ppm, de acordo com estudos envolvendo tiossemicarbazonas (PINGAEW et al., 2013; DILOVIĆ et al., 2008). O hidrogênio NH indólico foi observado em 11.22–11.69 δ ppm. Além disso, em todas as estruturas, os hidrogênios indólicos e aromáticos apareceram entre 6.85–8.37 δ ppm. O deslocamento químico do próton NH aromático apareceu na região entre 9.50–9.99 δ ppm, exceto para os compostos LqIT/LT-58 e LqIT/LT-59, onde foi observado simpletos em 7.87 e 8.47 δ ppm, respectivamente. Isto ocorreu em virtude da presença do grupamento espaçador entre a posição *N*-4 das tiossemicarbazonas e o anel fenil produzir efeito indutivo positivo. Dessa forma, o deslocamento químico para o NH aromático destes derivados surgiu em campo magnético mais alto, ou seja, mais blindado de elétrons.

Eventualmente, podem ocorrer situações nas quais dois, ou mais, núcleos de hidrogênios em um dado campo magnético, solvente e ambientes químicos diferentes apareçam equivalentes em deslocamento químico. No caso das estruturas LqIT/LT-51, LqIT/LT-92, LqIT/LT-93, LqIT/LT-94 e LqIT/LT-95 foi observado que o hidrogênio ligado ao nitrogênio indólico e o hidrogênio do nitrogênio hidrazínico apresentaram-se em simpletos com os deslocamentos químicos equivalentes. Nestes casos, há uma equivalência acidental apesar de serem visivelmente não equivalentes do ponto de vista estrutural. A equivalência acidental de deslocamento químico pode ser detectada pelo uso de um instrumento de campo magnético maior, pela troca de solvente e temperatura (SILVERTEIN, 2013).

Como as tiossemicarbazonas aromáticas podem ser consideradas bases de Schiff, elas podem existir nas formas isoméricas *Z* ou *E*, dependendo do substituinte do aldeído utilizado na síntese (KARABATSOS et al., 1964) que nos compostos sintetizados deste trabalho foi o núcleo indol. Como regra geral, as tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos tendem a formar preferencialmente o isômero *E*, termodinamicamente mais estável, enquanto que nas derivadas de cetonas assimétricas a proporção entre *E* e *Z* depende da estrutura dos substituintes ligados à carbonila (COSTA et al., 2003).

Em alguns casos, a presença do isômero *Z* pode ser promovida por ligações de hidrogênio intramoleculares, especialmente relacionada com os anéis de piridina e quinolina, entre o hidrogênio hidrazínico e nitrogênio do anel. Por exemplo, se pelo menos um átomo de hidrogênio estiver presente no nitrogênio terminal (*N*-4), ocorre uma ligação de hidrogênio intramolecular com o nitrogênio imínico (azometina). Este padrão é geralmente associado com uma configuração *E* estericamente mais favorável. Ao contrário, quando o nitrogênio terminal é completamente substituído e se torna uma amina terciária, o hidrogênio hidrazínico forma uma ligação de hidrogênio intramolecular com o nitrogênio da quinolina ou piridina, forçando a ligação C=N a uma configuração *Z* (OTA et al., 1998; BISCIGLIE et al., 2015). Em outros casos, o impedimento estérico é o fator principal em equilíbrio entre os isômeros (WEST et al., 1992; ALI et al., 2012).

Diante disto, todos os compostos sintetizados foram obtidos na configuração *E*, e isto foi confirmado através da espectroscopia de RMN ^1H , o qual foi observado o sinal do grupo NH na faixa de 9-12 δ ppm, em comparação ao isômero *Z* que possui o sinal característico de NH variando em 14-15 ppm (SERDA et al., 2013). Além disso, nos experimentos de síntese dos derivados indólicos-tiossemicarbazonas foi analisado o aparecimento de apenas uma mancha na CCD, indicando a presença de apenas uma forma

isomérica *E* gerada, confirmado posteriormente por espectroscopia 2D RMN NOESY (do inglês, *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*).

Neste trabalho, o composto LqIT/LT-90 foi o escolhido para elucidação do isomerismo dos derivados obtidos. Com isso, através do espectro NOESY (Figura 17) foi observado o sinal NOE entre os hidrogênios do NH hidrazínico (=N–NH–) em 11.62 δ ppm e da azometina (–CH=N–) em 8.41 δ ppm. Entretanto, não foi detectado o sinal referente a interação espacial entre o hidrogênio da posição 2 do indol e o hidrogênio da azometina (–CH=N) como mostrado na Figura 18. No entanto, foi visualizado no espectro de COSY ^1H - ^1H do derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 (ver Figura 15), a correlação entre o hidrogênio azometínico e o hidrogênio da posição 4 indol ($^5J_{\text{H,H}}$) (OTA, et al., 1998; KAISER, 2000). Logo, sendo indicativo da configuração *E* como principal produto dos derivados sintetizados desta série, e assim corroborando com estudos de cristalografia de difração de raio-X e espectroscopia 2D NOESY de tiossemicarbazonas que confirmam a preferência da configuração *E* para estes compostos (LIU et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

Figura 17 – Espectro 2D RMN NOESY do composto LqIT/LT-90.

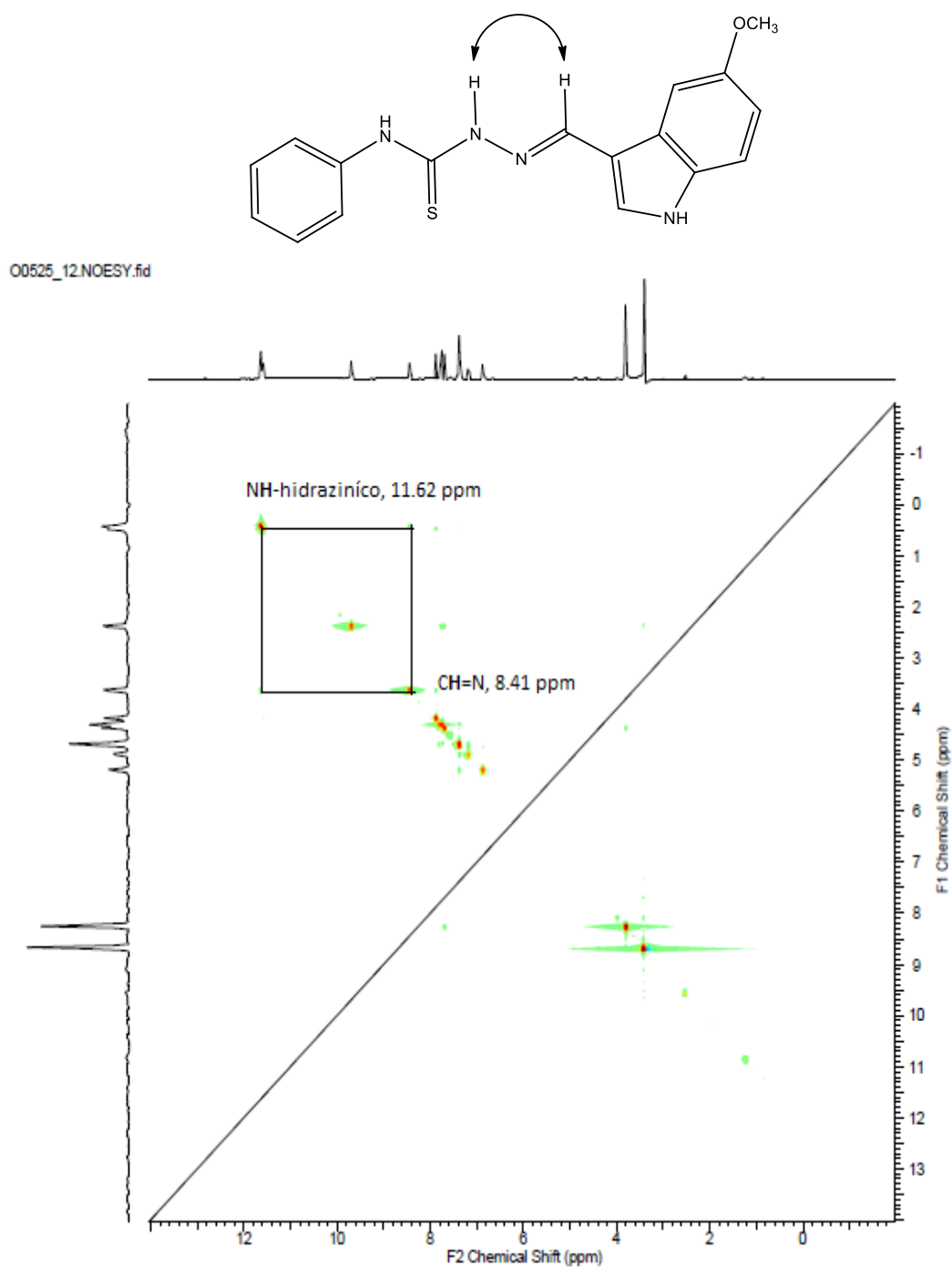
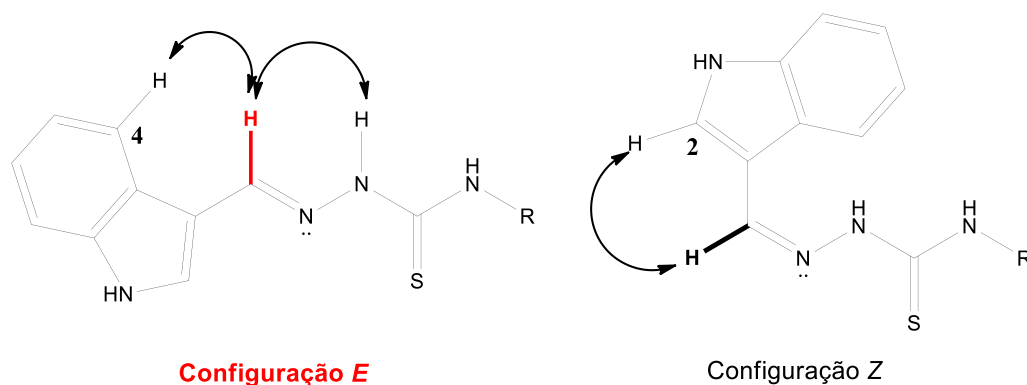


Figura 18 – Derivado indólico-tiossemicarbazona nas configurações diastereoisoméricas *E* e *Z*.



Para uma melhor visualização dos resultados, a Tabela 10 apresenta os principais deslocamentos químicos dos espectros de RMN 1H para os compostos indólicos-tiossemicarbazonas sintetizados, e a Figura 19 ilustra o espectro de RMN 1H para o derivado LqIT/LT-91.

Figura 19 – Espectro de RMN 1H para o composto LqIT/LT-90, destacando-se os simpletos referentes aos grupos NH hidrazínico, NH aromático e NH indólico (DMSO- d_6 ; 400 MHz).

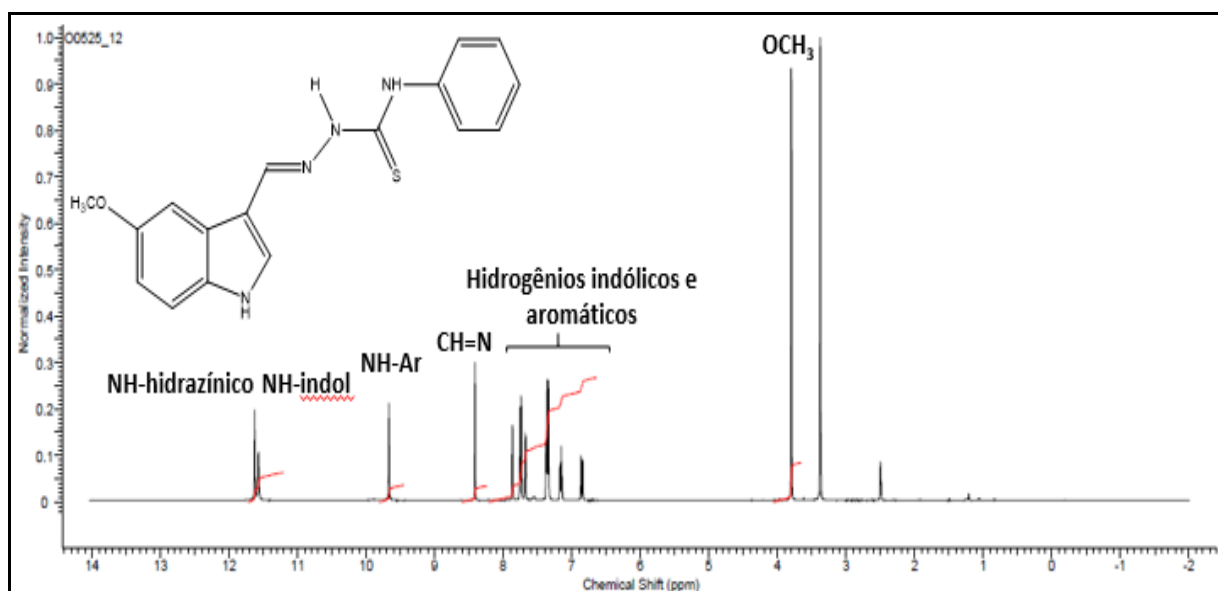


Tabela 10 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^1H para tiossemicarbazonas da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamidas.

Compostos	NH	NH (Indol)	NH-Ar	CH=N	Outros
LqIT/LT-90	11.62	11.56	9.66	8.41	3.79 (OCH ₃)
LqIT/LT-91	11.62	11.58	9.65	8.40	2.42 (CH ₃)
LqIT/LT-92	11.57	11.57	9.57	8.39	3.79 (OCH ₃)
LqIT/LT-93	11.56	11.56	9.56	8.39	2.41 (CH ₃)
LqIT/LT-94	11.56	11.56	9.57	8.36	3.79 (OCH ₃)
LqIT/LT-95	11.57	11.57	9.57	8.39	2.42 (CH ₃)
LqIT/LT-96	11.71	11.57	9.90	8.48	3.66 (OCH ₃)
LqIT/LT-97	11.72	11.59	9.90	8.48	2.33 (CH ₃)
LqIT/LT-98	11.69	11.60	9.62	8.43	-
LqIT/LT-99	11.86	11.63	9.75	8.39	-
LqIT/LT-50	11.88	11.69	9.99	8.00	-
LqIT/LT-51	11.67	11.67	9.84	8.47	-
LqIT/LT-52	11.84	11.58	9.66	8.37	2.30 (CH ₃)
LqIT/LT-53	11.66	11.49	9.50	8.39	3.43 (CH ₃)
LqIT/LT-58	11.81	11.25	7.87	8.25	2.38 e 3.82 (CH ₂)
LqIT/LT-59	11.60	11.22	8.47	8.22	2.95 e 3.85 (CH ₂)

Na espectroscopia de RMN ^{13}C todas as moléculas em DMSO mostraram deslocamentos químicos em concordância com as prováveis estruturas. Todos os compostos apresentaram dois sinais em 173.9-176.2 e 139.7-141.6 δ ppm atribuídos à tiocarbonila e ao carbono azometínico, respectivamente. Estes resultados estão compatíveis com os encontrados na literatura (AFRASIABI et al., 2004; CHEN et al., 2004). Os picos referentes aos carbonos metilênicos do grupamento espaçador dos compostos LqIT/LT-58 e LqIT/LT-59 apresentaram-se no deslocamento químico na região entre 34.8 e 44.9 δ ppm e, 33.8 e 44.7 δ ppm, respectivamente. Em adição, os sinais variando entre 103.4-140.2 δ ppm foram devidos aos átomos de carbono dos anéis indólicos e fenílicos presentes nas estruturas.

A Tabela 11 exhibe os principais deslocamentos químicos no espectro de RMN ^{13}C para os compostos indólicos-tiossemicarbazonas e a Figura 20 apresenta os sinais referentes

as ressonâncias dos carbonos da azometina e tiocarbonila na espectroscopia de RMN ^{13}C para o composto LqIT/LT-91.

Figura 20 – Espectro de RMN ^{13}C para o composto LqIT/LT-90, ilustrando as ressonâncias dos átomos de carbono do grupo azometínico ($\text{CH}=\text{N}$) e tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$) (DMSO-d_6 ; 100 MHz).

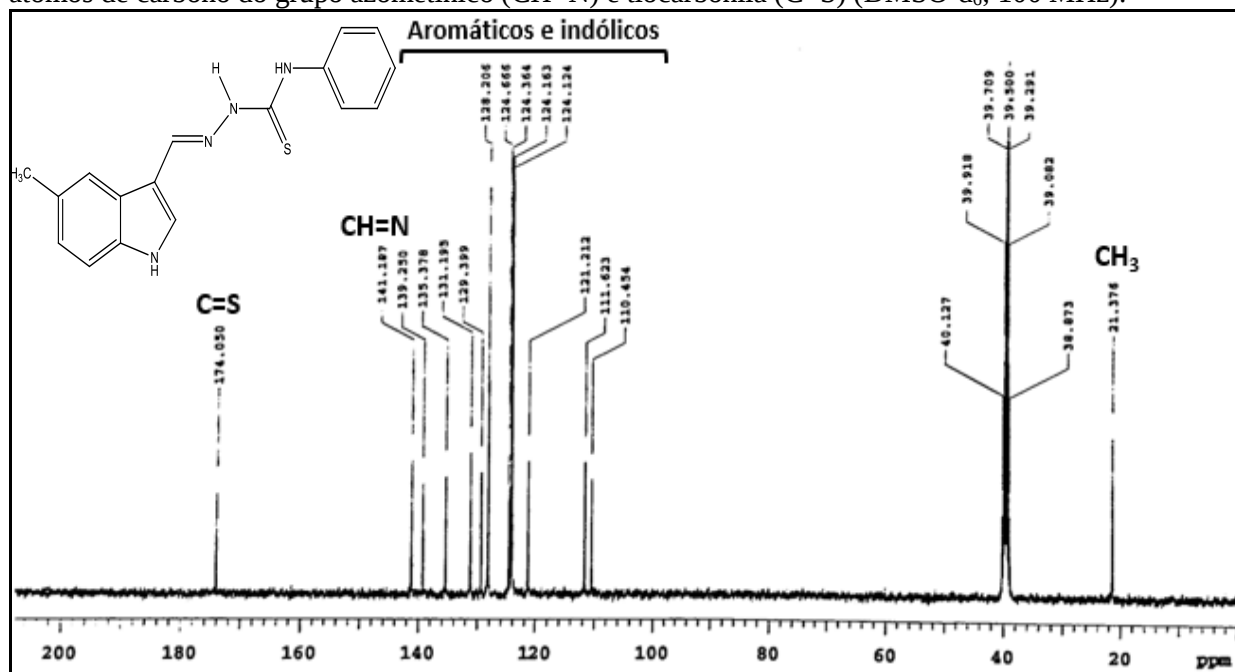


Tabela 11 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^{13}C para os compostos da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamidas.

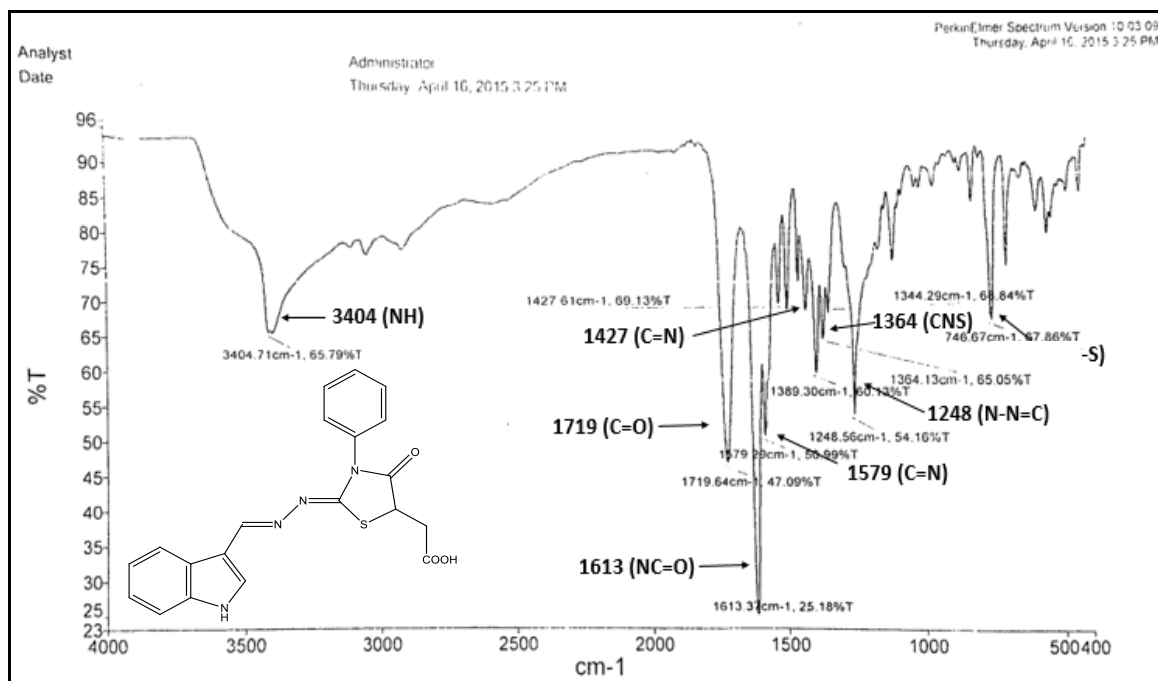
Compostos	C=S	CH=N	Outros
LqIT/LT-90	173.9	141.2	55.0 (OCH ₃)
LqIT/LT-91	174.0	141.1	21.3 (CH ₃)
LqIT/LT-92	174.0	141.1	55.0 (OCH ₃) e 20.5 (CH ₃)
LqIT/LT-93	174.1	141.0	21.3 (CH ₃ -indol) e 20.51 (CH ₃)
LqIT/LT-94	174.0	141.1	55.0 (OCH ₃), 55.0 (CH ₂) e 15.6 (CH ₃)
LqIT/LT-95	174.1	141.0	27.6 (CH ₂), 21.3 (CH ₃ -indol) e 15.6 (CH ₃)
LqIT/LT-96	176.0	141.6	55.2 (OCH ₃)
LqIT/LT-97	175.7	141.5	21.3 (CH ₃)
LqIT/LT-98	174.4	141.2	-
LqIT/LT-99	174.4	140.5	-
LqIT/LT-50	176.2	140.9	-
LqIT/LT-51	176.2	141.3	-
LqIT/LT-52	174.4	140.3	20.5 (CH ₃)
LqIT/LT-53	174.6	141.2	20.6 (CH ₃)
LqIT/LT-58	176.0	140.1	34.82 e 44.98 (CH ₂)
LqIT/LT-59	175.8	139.7	34.88 e 44.71 (CH ₂)

5.7 Caracterização estrutural dos Ácidos 2-[(1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos

Na espectroscopia de absorção no infravermelho, o estiramento da carbonila na posição 4 do anel tiazolidinona foi detectado na faixa de 1608-1614 cm^{-1} , ressaltando a confirmação da ciclização dos derivados tiossemicarbazonas. Também foi observada uma banda de média intensidade na região de 1365-1394 cm^{-1} aparecendo no espectro de absorção do IV de todas as 4-tiazolidinonas, correspondente à deformação angular do grupo funcional NCS (EL-GENDY et al., 1990). Duas bandas, uma na região de 1427-1524 cm^{-1} e outra em 1562-1582 cm^{-1} , foram atribuídas às vibrações de estiramento da função C=N, azometina e exocíclica, respectivamente, para todas as estruturas químicas obtidas (AQUINO, 2007). A Figura 21 ilustra o espectro de absorção no IV do derivado LqIT/LTA-98, sendo possível

observar a banda de absorção de intensidade forte correspondente a NC=O do anel 4-tiazolidinona, confirmatório da ciclização.

Figura 21 – Espectro de absorção no IV para o composto LqIT/LTA-98 (Pastilhas de KBr).



A Tabela 12 mostra os resultados das principais frequências de absorção observadas nos espectros de absorção do IV para os compostos da série ácidos 2-[(1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos.

Tabela 12 – Principais frequências de absorção observadas nos espectros de IV para os compostos da série Ácidos 2-[(1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos.

Compostos	C=O (v)	NC=O (v)	C=N (v)	NCS (v)	N-N=C (v)
LqIT/LTA-90	1720 (m)	1609 (F)	1583 (m) e 1562 (F)	1389 (m)	1211(m)
LqIT/LTA-95	1723 (m)	1608 (F)	1509 (m) e 1582 (F)	1394 (m)	1253 (m)
LqIT/LTA-98	1719 (m)	1613 (F)	1427 (f) e 1579 (m)	1364 (m)	1248 (m)
LqIT/LTA-99	1716 (m)	1614 (F)	1524 (m) e 1573 (F)	1387 (m)	1351 (m)
LqIT/LTA-53	1724 (m)	1608 (F)	1513 (m) e 1562 (F)	1365 (m)	1249 (m)

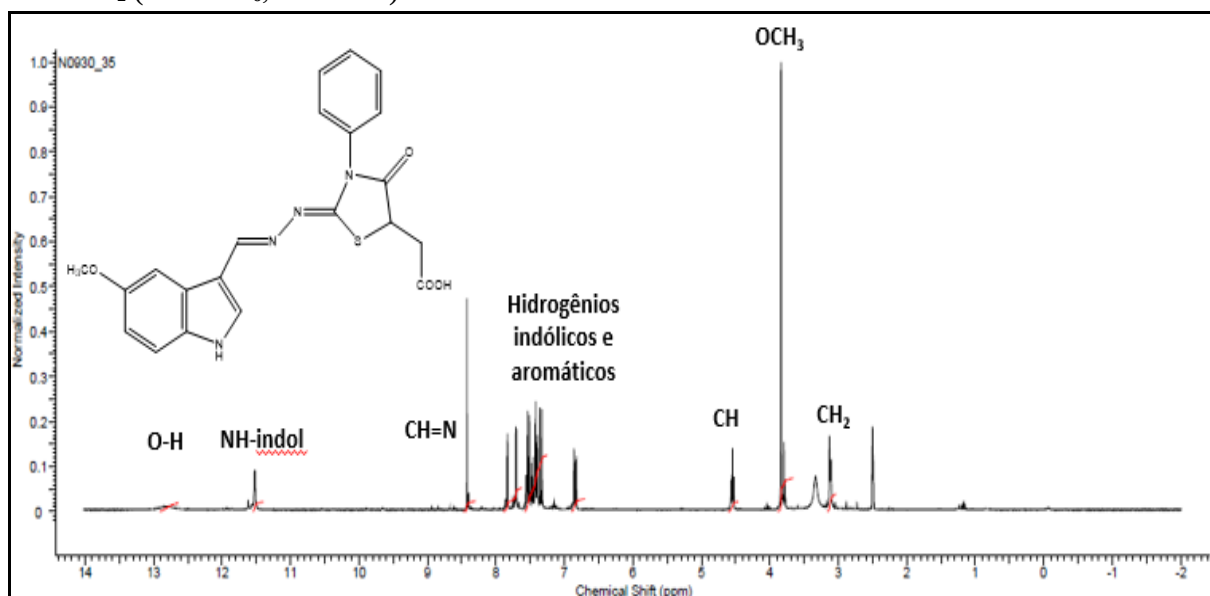
F = forte; m = média; f = fraco

No estudo de RMN ¹H, a formação do heterociclo foi indicada pelos sinais característicos dos hidrogênios do grupo SCH do anel 4-tiazolidinona, que foram identificados como um tripleto entre 4.53 a 4.58 δ ppm, devido ao acoplamento com os hidrogênios metilênicos do grupo acetil, os quais mostraram sinais desdobrados em duplete

ou dois duplos dupletos entre 3.13-3.15 δ ppm. Resultados semelhantes foram apresentados em estudos anteriores (VERÇOSA et al., 2009). Conforme ilustrado na Figura 22, o espectro de RMN ^1H da estrutura LqIT/LTA-90 exibe o deslocamento químico característico para o próton da função OH em 12.81 δ ppm, assim, evidenciando a reação de ciclização da tiossemicarbazona e a substituição na posição 5 do anel por um grupo ácido.

Entretanto, o composto LqIT/LTA-98 não apresentou o sinal largo característico referente ao hidrogênio do grupamento ácido carboxílico entre 13.2-10.0 ppm no espectro de RMN ^1H , e isto ocorre em razão da possível velocidade de troca rápida intermolecular entre os hidrogênios ácidos das moléculas. Contudo, na espectroscopia vibracional de absorção do IV foi observada uma discreta banda de absorção do OH da função ácida na faixa aproximada de 3500 cm^{-1} contíguo a banda do NH, com isso sugerindo a presença do grupamento ácido na posição 5 do anel 4-tiazolidinona nos compostos sintetizados (SILVERTEIN, 2013).

Figura 22 – Espectro de RMN ^1H para o 2-[(5-metóxi-1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acético (LqIT/LTA-90), destacando-se os tripleto e duplete referentes aos grupos CH e CH_2 (DMSO-d_6 ; 300 MHz).



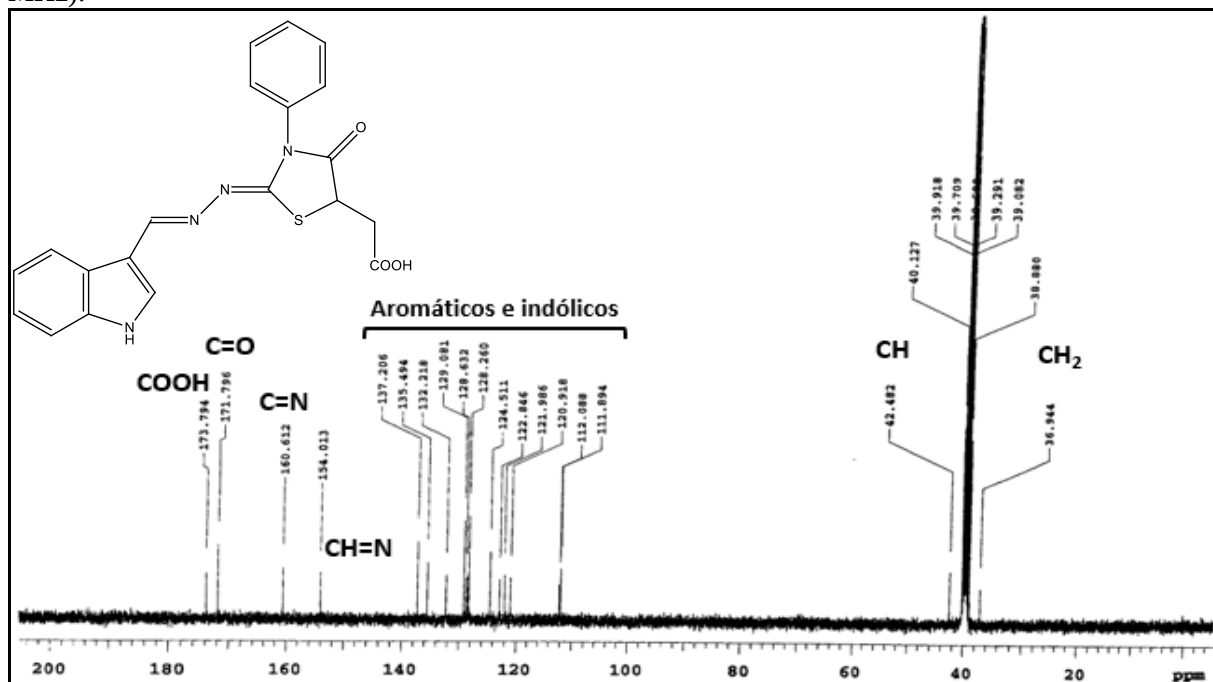
Os resultados analisados dos espectros de RMN ^1H para os principais deslocamentos químicos dos compostos 4-tiazolidinonas substituídos na posição 5 do anel podem ser visualizados na Tabela 13.

Tabela 13 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^1H para os compostos da série Ácidos 2-[(1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos.

Compostos	COOH	NH (Indol)	CH=N	CH	CH ₂
LqIT/LTA-90	12.86	11.52	8.43	4.55	3.13
LqIT/LTA-92	12.76	11.52	8.42	4.54	3.13
LqIT/LTA-98	-	11.65	8.42	4.54	3.13
LqIT/LTA-99	12.79	11.84	8.42	4.58	3.15
LqIT/LTA-53	12.74	11.66	8.43	4.53	3.13

Nos espectros de RMN ^{13}C foram analisados os deslocamentos químicos referentes aos carbonos dos grupos COOH e NC=O, entre 136.7-173.7 δ ppm e 134.7-171.8 δ ppm, respectivamente, confirmando a formação do heterociclo (SEEBACHER et al., 2004). Os compostos ainda apresentaram um importante sinal entre 123.7-161.0 ppm relativo ao carbono da função C=N exocíclica, além da ressonância do átomo de carbono da função azometina (CH=N) com deslocamento químico em 153.5-116.8 δ ppm, em concordância com estudo realizado por Verçosa et al (2009). Os demais sinais, especificamente os dos carbonos indólicos, aromáticos, metilênicos e metilas, estão de acordo com as estruturas propostas. A Figura 23 mostra o espectro de RMN ^{13}C para o composto LqIT/LTA-98, destacando as ressonâncias dos átomos de carbono do grupo ácido (COOH) e carbonila (C=O) do anel 4-tiazolidinona e o (C=N) da azometina e exocíclica.

Figura 23 – Espectro de RMN ^{13}C para o composto LqIT/LTA-98, ilustrando as ressonâncias dos átomos de carbono do grupo ácido (COOH) e carbonila (C=O) do anel 4-tiazolidinona (DMSO-d_6 ; 100 MHz).



A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos dos principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^{13}C para os compostos da série ácidos 2-[(1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos.

Tabela 14 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^{13}H para os compostos da série Ácidos 2-[(1*H*-indol-3-il-metileno)hidrazono]-4-oxo-3-fenil-tiazolidin-5-il acéticos substituídos.

Compostos	COOH	NC=O	C=N	CH=N	Outros
LqIT/LTA-90	173.6	171.8	160.9	153.5	154.6 (C-O)
LqIT/LTA-92	173.6	171.8	161.0	153.4	154.6 (C-O)
LqIT/LTA-95	173.7	171.7	160.5	153.5	-
LqIT/LTA-98	173.7	171.7	160.6	154.0	-
LqIT/LTA-99	173.6	171.7	161.0	153.5	42.5 (CH) e 36.9 (CH ₂)
LqIT/LTA-53	136.7	134.7	123.7	116.8	-

5.8 Caracterização estrutural dos derivados da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos

Os derivados ciclizados exibiram bandas na espectroscopia de absorção do infravermelho variando em $1398\text{--}1362\text{ cm}^{-1}$ característica da vibração de NCS, assim, confirmando o fechamento do anel tiazolidinona (EL GENDY et al. 1990; ULOSOY et al., 2002). As bandas de absorção de intensidade moderada e forte foram observadas em $1571\text{--}1579\text{ cm}^{-1}$ e $1608\text{--}1613\text{ cm}^{-1}$ correspondentes ao C=N (DESAI e DODYIA, 2014). Conforme observado na Figura 24, o espectro de absorção do IV apresentou a absorbância da carbonila (NC=O) na região entre $1701\text{--}1722\text{ cm}^{-1}$, condizente com a absorção de C=O em anéis γ -lactamas (amidas cíclicas com 5 átomos) que absorvem entre 1700 e 1750 cm^{-1} em média intensidade (SILVERTEIN, 2013). A Tabela 15 apresenta as principais frequências de absorção dos espectros do infravermelho para os compostos da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos.

Figura 24 – Espectro de absorção no IV para o composto LqIT/LTC-55 (Pastilhas de KBr).

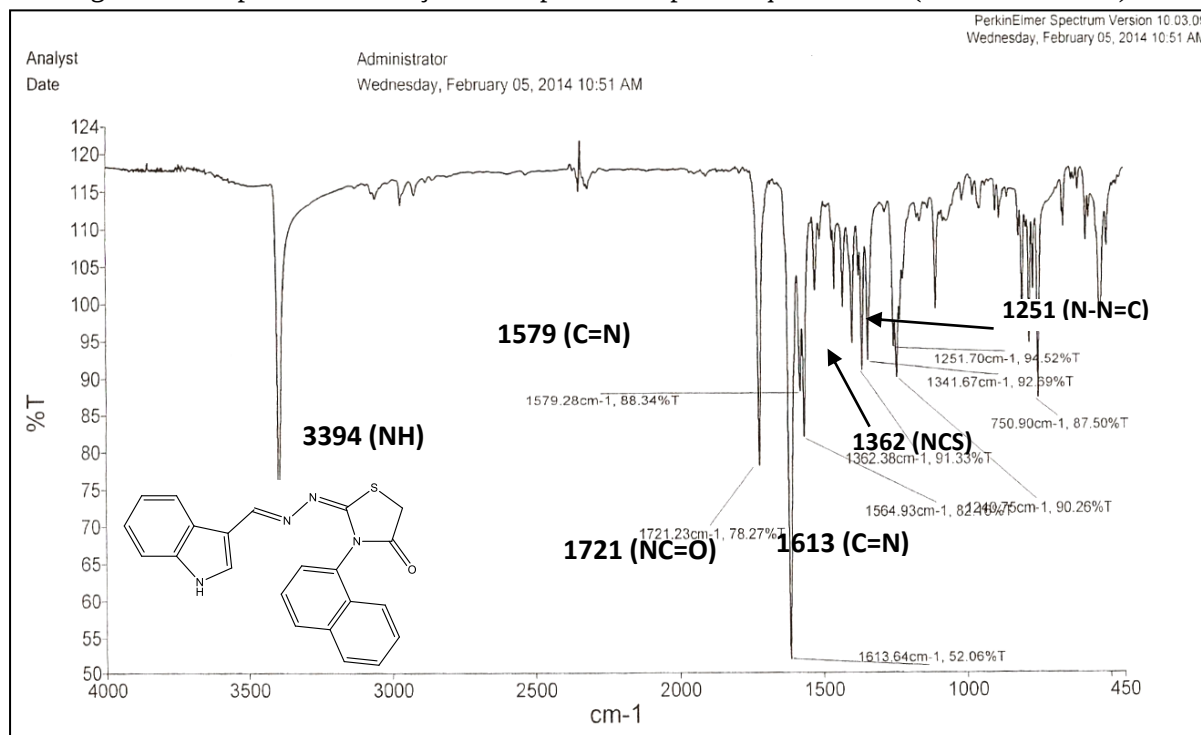


Tabela 15 – Principais frequências de absorção observadas nos espectros de IV para os compostos da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos.

Compostos	NH (v)	NC=O (v)	C=N (v)	NCS (v)	N-N=C (v)
LqIT/LTC-54	3345 (m)	1707 (F)	1572 (m) e 1608 (F)	1398 (m)	1236 (f)
LqIT/LTC-55	3394 (F)	1721 (F)	1579 (m) e 1613 (F)	1362 (f)	1251 (f)
LqIT/LTC-56	3255 (m)	1701 (F)	1571 (m) e 1608 (F)	1386 (m)	1245 (m)
LqIT/LTC-57	3405 (F)	1722 (F)	1578 (F) e 1613 (F)	1383 (F)	1248 (F)

F = forte; m = média; f = fraco

No espectro de RMN ^1H do composto LqIT/LTC-54 (Figura 25) foi possível observar apenas um simpleto referente ao NH do indol em 11.79 δ ppm e o deslocamento químico na região entre 4.41-4.33 δ ppm referente ao grupamento metileno (SCH_2) presente na posição 5 do heterociclo, desdobrado em multipeto que em virtude de problemas na homogeneidade do campo magnético apresentou leve distorção no sinal (VERÇOSA et al., 2009).

Os demais derivados ciclizados mostraram deslocamentos entre 4.07-4.35 δ ppm (ERGENÇ et al., 1994). Todos os sinais correspondentes aos hidrogênios metilênicos foram desdobrados em simpletos ou multipeto, exceto no espectro RMN ^1H do composto LqIT/LTC-55 (Figura 26) que os deslocamentos químicos foram sinais apresentados como dois dupletos em 4.32-4.38 δ ppm e 4.21-4.16 δ ppm. Isto ocorreu devido ao acoplamento entre os hidrogênios metilênicos não-equivalentes geminais, H_1 e H_2 não estarem relacionados por simetria (proquiralidade), e são diastereotópicos, de modo que mostram sinais distintos no RMN ^1H . Este fenômeno não foi observado nos demais derivados 4-tiazolidinonas não substituídos pela falta do carbono assimétrico (KÜÇÜGÜZEL et al., 2006; KÜÇÜGÜZEL et al., 2002). Além disso, os prótons da função azometina $\text{CH}=\text{N}$ foram observados na região entre 7.82–8.42 δ ppm (BENMOHAMMED et al., 2014).

Figura 25 – Espectro de RMN ^1H para o 2-(5-bromo-1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3-(naftaleno-1-il)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-54), destacando-se os deslocamentos químicos referentes aos grupos $\text{CH}=\text{N}$ e CH_2 (DMSO- d_6 ; 300 MHz).

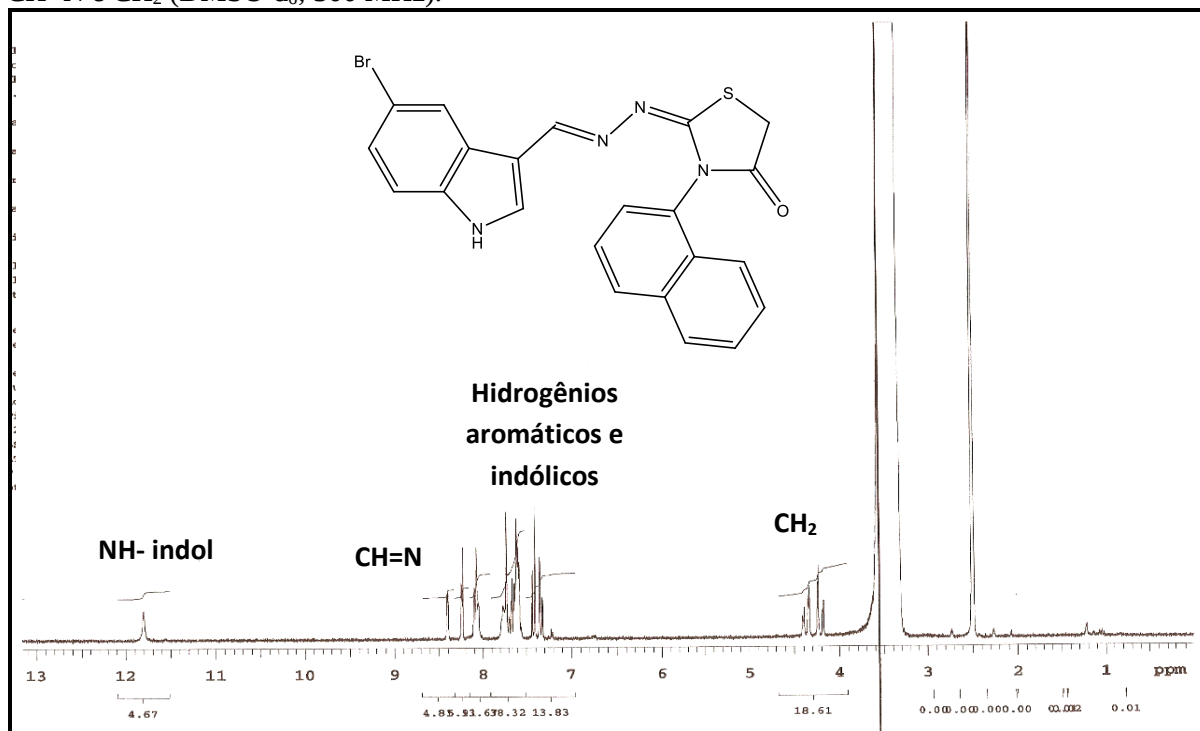
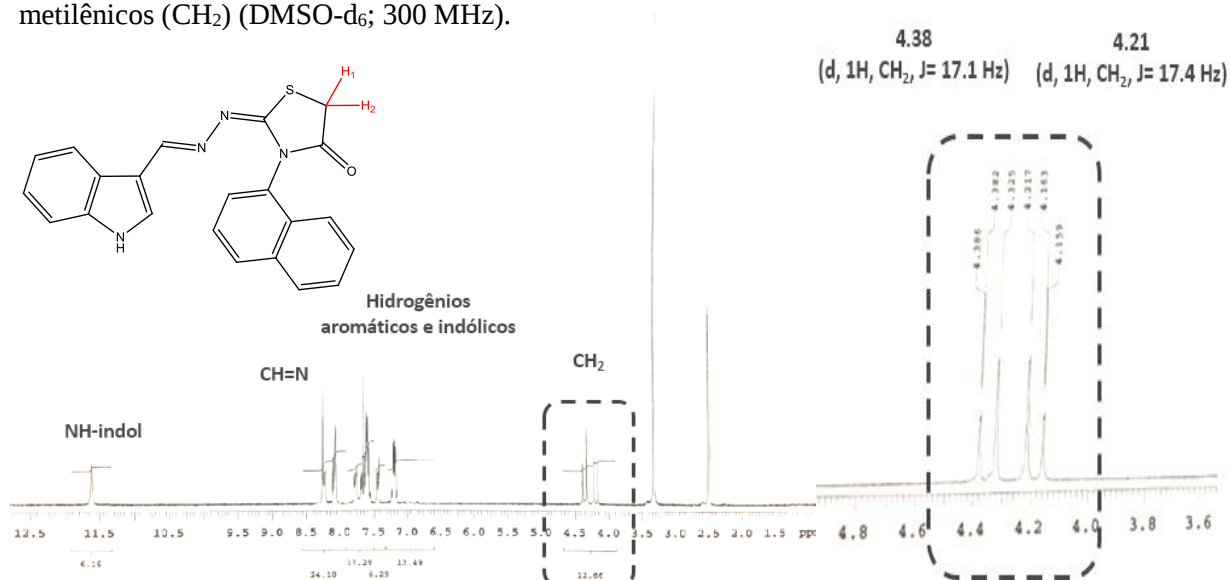


Figura 26 – Espectro de RMN ^1H para o 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-3-(naftaleno-1-il)-tiazolidin-4-ona (LqIT/LTC-55), destacando-se os deslocamentos químicos referentes ao hidrogênios metilênicos (CH_2) (DMSO- d_6 ; 300 MHz).



Para uma melhor visualização dos resultados obtidos na espectroscopia de RMN ^1H , a Tabela 16 mostra os principais deslocamentos químicos observados para os compostos 4-tiazolidinonas.

Tabela 16 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^1H para os compostos da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos.

Compostos	CH=N	SCH ₂	Outros
LqIT/LTC-54	8.07	4.41-4.33	-
LqIT/LTC-55	8.27	4.38-4.21	-
LqIT/LTC-56	7.82	4.11	2.37 (CH ₃)
LqIT/LTC-57	8.42	4.07	2.38 (CH ₃)

A espectroscopia de RMN ^{13}C para os derivados 4-tiazolidinonas não substituídos na posição 5 apresentou o carbono do grupo carbonila (C=O), metilênico (SCH₂), (C=N) azometínico e exocíclico nos deslocamentos químicos variando entre 171.9-172.3 δ ppm, 32.1-32.4 δ ppm, 153.2-153.8 δ ppm, 154.4-161.5 δ ppm, respectivamente. Estes resultados corroboram com os estudos de Küçükgül et al. (2002), evidenciando o fechamento do anel das estruturas ciclizadas a partir dos compostos tiosemicarbazonas. A Figura 27 representa o espectro de RMN ^{13}C para o composto LqIT/LTC-55, mostrando as ressonâncias dos átomos de carbono da carbonila (C=O) e do metileno (SCH₂) do anel 4-tiazolidinona. Os deslocamentos químicos referentes aos carbonos aromáticos e indólicos estão de acordo com os respectivos compostos. Os principais sinais referentes as ressonâncias dos carbonos, obtidos na espectroscopia de RMN ^{13}C dos compostos 4-tiazolidinonas podem ser observados na Tabela 17.

Figura 27 – Espectro de RMN ^{13}C para o composto LqIT/LTC-55, ilustrando as ressonâncias dos átomos de carbono da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e do metileno (CH_2) do anel 4-tiazolidinona (DMSO-d_6 ; 100 MHz).

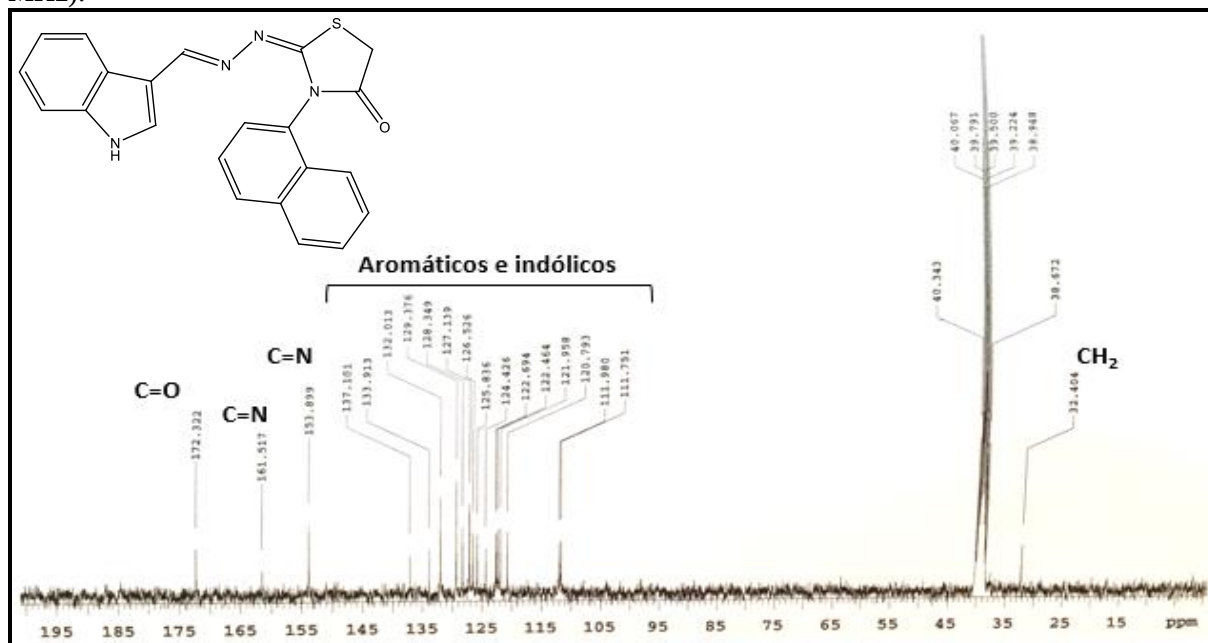


Tabela 17 – Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^{13}H para os compostos da série 2-(1*H*-indol-3-il-metileno-hidrazono)-tiazolidina-4-ona substituídos.

Compostos	NC=O	C=N	CH=N	SCH ₂
LqIT/LTC-55	172.3	161.5	153.8	32.4
LqIT/LTC-56	171.9	-	153.2	-
LqIT/LTC-57	172.0	154.4	153.7	32.1

5.9 Estudo Biológico

5.10 Atividade Antiproliferativa

Os compostos sintetizados nesse estudo, pertencentes às classes das tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas, foram avaliados para sua atividade antiproliferativa *in vitro* frente a 7 linhagens celulares tumorais humanas derivadas de 7 tipos de isolados clínicos de câncer (SNC, mama, ovário, renal, pulmão, cólon e leucemia), de acordo com os protocolos estabelecidos pelo NCI (BOYD e PAULL, 1995). A linhagem celular não-tumoral HaCaT (queratinócito humano imortalizado) foi inserida na avaliação da atividade antiproliferativa para simular células humanas normais, uma vez que as células imortalizadas

compartilham com as células tumorais a característica de mitose rápida, no entanto, ausente de oncogenes.

Este ensaio *in vitro* permite avaliar a atividade antitumoral através da exposição de células tumorais humanas, em fase exponencial de crescimento com diferentes concentrações dos compostos sintetizados. Além disso, observar se essas moléculas induziram a interrupção na taxa de crescimento sem morte celular (atividade citostática), se provocou a morte celular (atividade citocida) ou estimulou a proliferação celular.

A atividade antiproliferativa é representada pelo GI_{50} (concentração molar do composto que inibe 50% do crescimento celular). Desse modo, foi verificado para todos os compostos testados que o valor da média de GI_{50} variou entre 1.01 μM (LqIT/LT-51) - 84.65 μM (LqIT/LTC-57). Os resultados de GI_{50} para todas as moléculas nas linhagens avaliadas estão resumidos na Tabela 18.

Tabela 18 – Valores de GI_{50} (μM) para os derivados indólicos-tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas.

Linhagens	LT-50	LT-51	LT-53	LTC-54	LTC-55	LTC-56	LTC-57	LT-58	LT-59	DOX
U251 (glioma)	7.32	0.92	8.11	48.81	72.52	54.71	90.16	7.49	77.90	0.08
MCF-7 (mama)	0.95	<0.726	2.52	6.06	34.88	59.52	>100	6.81	15.54	0.04
K-562 (leucemia)	6.18	0.01	0.16	12.41	38.57	0.01	>100	2.12	0.17	0.42
786-0 (rim)	6.56	<0.726	3.99	29.09	62.08	39.85	79.14	7.58	76.29	0.06
NCI/ADR- res (ovário, resistência)	6.99	<0.726	11.72	>100	>100	96.60	>100	8.48	>100	0.05
OVCAR-3 (ovário)	1.60	<0.726	3.88	5.12	25.74	98.50	>100	8.22	>100	0.12
HT-29 (cólon)	6.56	0.01	1.45	27.34	96.86	>100	>100	7.87	>100	0.13
HaCaT* (queratinócito humano)	6.15	<0.726	0.99	6.23	62.98	54.00	>100	8.85	>100	0.51

* Linhagem celular não-tumoral.

Neste estudo, foi adotado o critério de potência para os compostos testados, os mesmos parâmetros empregados por Fortes et al. 2016, onde os compostos com $GI_{50} \leq 3 \mu M$

foram considerados como altamente ativos e aqueles que possuíram valores de GI_{50} entre 3-6 μM foram analisados como possuindo boa atividade. Os compostos com GI_{50} entre 6-12 μM foram considerados com moderada atividade. E os que apresentaram valores de GI_{50} entre 12-24 μM , com baixa atividade e aqueles com GI_{50} superior a 24 μM , considerados inativos.

Das moléculas sintetizadas, os derivados indólicos-tiossemicarbazonas exibiram promissora atividade antiproliferativa, destacando os derivados LqIT/LT-50, LqIT/LT-51 e LqIT/LT-53 (Figura 28), os quais apresentaram valores de média de GI_{50} = 5.29, 1.01 e 3.81 μM , respectivamente. O composto LqIT/LT-51 foi o mais ativo da série, se destacando frente às linhagens de cólon (HT-29) e leucemia (K-562) com valores de GI_{50} = 0.01 μM , para ambas as linhagens. Já o composto LqIT/LT-50 demonstrou atividade frente as linhagens de mama (MCF-7, GI_{50} = 0.95 μM) e ovário (OVCAR3 GI_{50} = 1.60 μM).

Os compostos LqIT/LT-50 e LqIT/LT-51 apresentam características relevantes em suas estruturas. Além do esqueleto da tiossemicarbazona, ambas as moléculas possuem ainda o grupamento 1-naftil substituído na posição *N*-4 da tiossemicarbazona e o núcleo do indol (presente também nos demais derivados), evidenciando apenas uma diferença, o átomo de bromo como substituinte deste núcleo heterociclo na posição 5 do anel. A importância do grupamento naftil está relacionado ao aumento da lipofilicidade do composto (Tabela 19), o que facilitaria o transporte através das membranas biológicas, assim, permitindo a interação do composto com seu alvo biológico (CONGIU e ONNIS, 2013). Adicionalmente, no composto LqIT/LT-51, verifica-se a ausência da substituição do núcleo indol pelo átomo de bromo quando comparado ao LqIT/LT-50.

Figura 28 – Estrutura dos derivados indólicos LqIT/LT-51, LqIT/LT-50 e LqIT/LT-53.

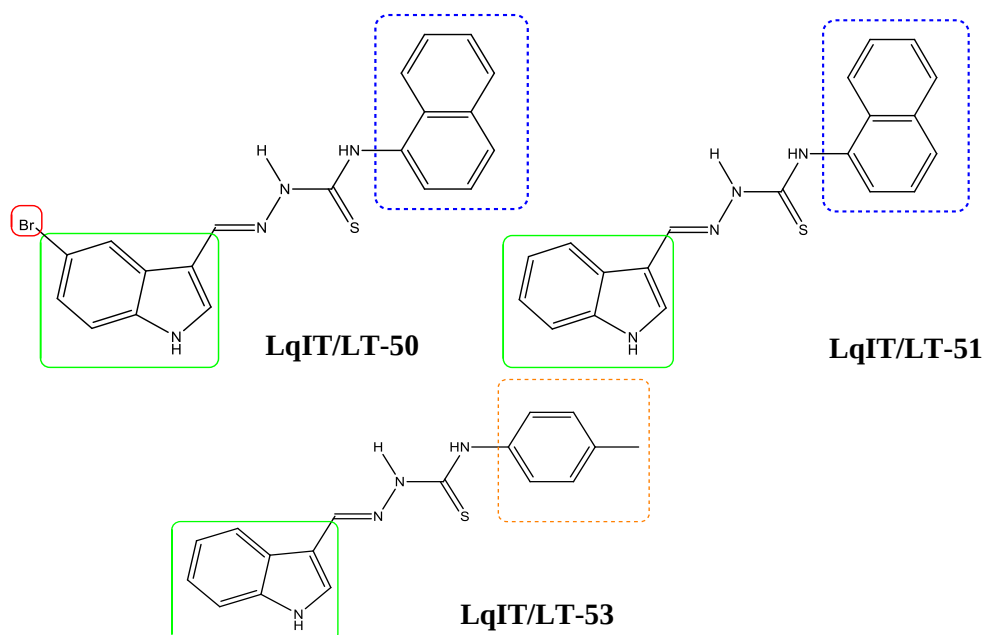


Tabela 19 – Valores de LogP para os derivados indólicos-tiossemicarbazonas.

Composto	R ₁	R ₂	LogP
LqIT/LT-50	Br		5.25
LqIT/LT-51	H		4.42
LqIT/LT-53	Br		3.91
LqIT/LT-58	Br		4.60
LqIT/LT-59	H		3.77
LqIT/LTC-54	Br		5.63
LqIT/LTC-55	H		4.80
LqIT/LTC-56	Br		5.12
LqIT/LTC-57	H		4.29

Estudos demonstram a importância da substituição por halogênios no anel indol para um aumento da atividade antiproliferativa (SALEH et al., 2014; SAITO et al., 2011). No entanto, neste trabalho, este não parece ter sido o fator principal para o incremento da atividade antiproliferativa. O fato se deve a relevância da presença do núcleo indol na relação estrutura-atividade, e isto é corroborado através dos números, onde cerca de 80% das moléculas candidatas a fármacos possuem em sua estrutura núcleos heterociclos, dentre eles o indol (MACK et al., 2010). O composto LqIT/LT-53, de maneira semelhante ao LqIT/LT-51, evidencia a ausência da substituição na posição 5 do núcleo indol. A diferença entre esses compostos é observada no nitrogênio 4 da tiossemicarbazona pela presença da substituição 1-naftil, o qual é possível correlacionar a existência deste grupamento com efeito estérico. O LqIT/LT-53 apresentou atividade citostática frente as linhagens K-562 (GI_{50} = 0.16 μ M) e HT-29 (GI_{50} = 1.45 μ M).

As demais tiossemicarbazonas avaliadas, LqIT/LT-58 e LqIT/LT-59, revelaram resultados paradoxais. Enquanto o LqIT/LT-58 (média de GI_{50} > 7.17 μ M) apresentou atividade citostática moderada para a grande maioria das linhagens testadas, o LqIT/LT-59 (média de GI_{50} > 41.73 μ M) foi inativo frente a 7 linhagens tumorais. Ambos os compostos foram altamente ativos para a linhagem K-562 onde foi possível observar resultados como GI_{50} = 2.12 μ M para o LqIT/LT-58 e GI_{50} = 0.17 μ M para o LqIT/LT-59, onde nesse último caso a atividade antiproliferativa foi específica para essa linhagem. A introdução de um grupo espaçador alifático de dois carbonos entre o *N*-4 da tiossemicarbazona e o anel fenil, como encontrado em ambos os derivados, parece não ter exercido efeitos positivos para a atividade antiproliferativa. Tal resultado também pode ser observado nos trabalhos de Oliveira et al. (2015) onde esta substituição não favoreceu ao incremento da atividade citostática dos derivados 2-tiofeno-tiossemicarbazonas.

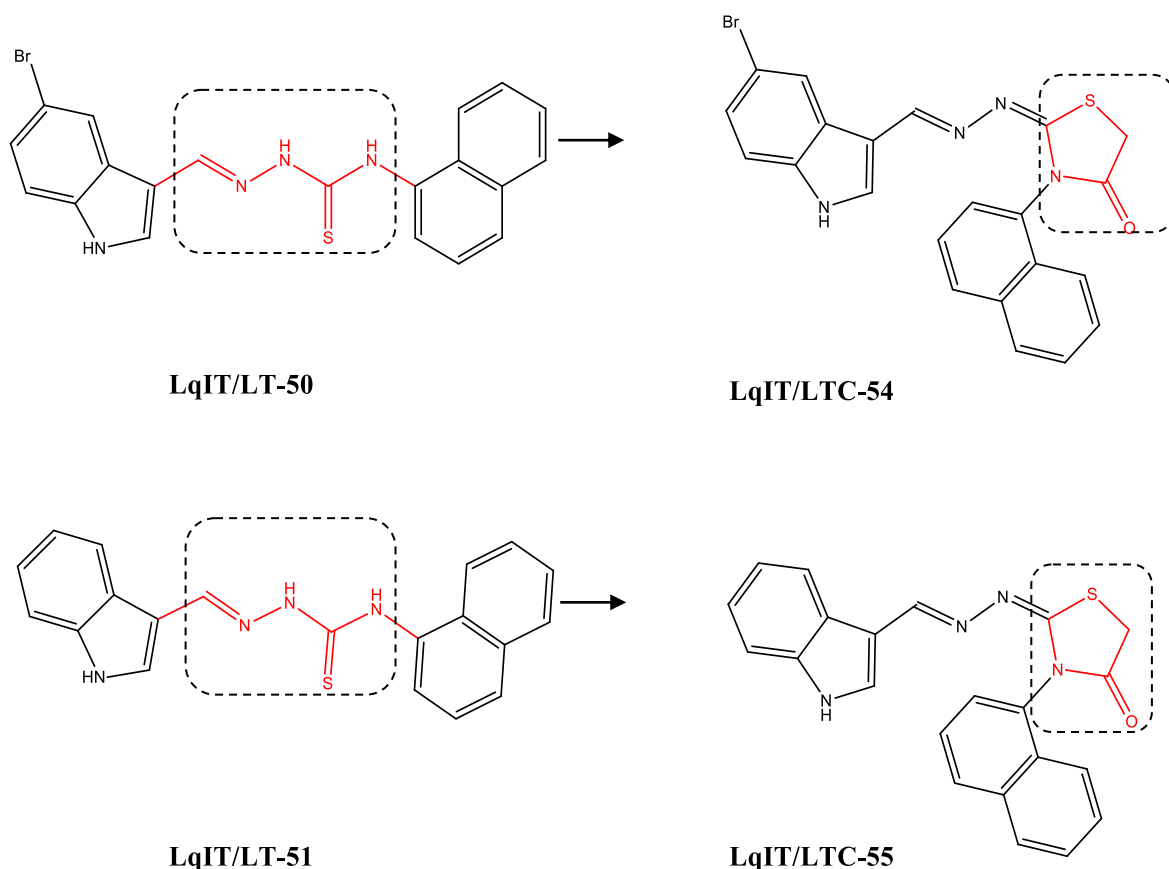
Complementarmente, dados na literatura revelam as tiossemicarbazonas possuindo como alvo biológico o ferro. Este metal está relacionado em sua maior quantidade às células cancerígenas, tais como as células leucêmicas (LE e RICHARDSON, 2002; GOU et al., 2016). O aumento de ferro nas células neoplásicas reside no fato destas demandarem seu maior consumo pela presença de enzimas envolvidas com a síntese de DNA e a proliferação celular requererem este metal como co-fator (ANDREWS, 1999). Assim, neste trabalho foi possível observar que todos os compostos tiossemicarbazonas testados apresentaram os melhores valores de GI_{50} frente as células leucêmicas (Tabela 15) quando comparado com as outras linhagens tumorais testadas.

As 4-tiazolidinonas avaliadas neste estudo são produtos de uma modificação bioisostérica não clássica empregada como técnica no planejamento de fármacos. No entanto, essa modificação estrutural não foi benéfica para a atividade antiproliferativa dos derivados avaliados neste estudo. Os compostos LqIT/LTC-54 e LqIT/LTC-55 (Figura 29) são bioisósteros não clássicos do LqIT/LT-50 e LqIT/LT-51, respectivamente. É possível observar, através dos valores da média de GI_{50} (LqIT/LTC-54 > 19.29 μ M *versus* LqIT/LT-50 > 5.29 μ M e LqIT/LTC-55 > 56.23 μ M *versus* LqIT/LT-51 > 1.01 μ M) que o comprometimento dos átomos do sistema NNS da tiossemicarbazona para a formação do anel da 4-tiazolidinona causou uma diminuição drástica na resposta biológica. Adicionalmente, é possível notar uma boa atividade antiproliferativa do composto LqIT/LTC-54 para as linhagens MCF-7 (GI_{50} = 6.06 μ M) e OVCAR3 (GI_{50} = 5.12 μ M), no entanto, ainda inferiores aos resultados encontrados para o composto LqIT/LT-51 (ver tabela 15). Já o composto LqIT/LTC-55 foi inativo para todas as linhagens testadas. Os compostos LqIT/LTC-56 e LqIT/LTC-57 são bioisósteros não clássicos do LqIT/LT-53 os quais possuem em sua estrutura a substituição *p*-toluil. Mais uma vez, pode ser observado a inatividade dos compostos frente a todas as linhagens tumorais testadas, à exceção da linhagem de K-562 em que o composto LqIT/LTC-56 apresentou um valor de GI_{50} = 0.01 μ M.

As 4-tiazolidinonas se apresentam como estruturas privilegiadas no desenvolvimento de novas moléculas com atividade anticâncer (RASHID et al., 2014; SALA et al., 2013). Entretanto, a formação deste núcleo heterociclo a partir de derivados tiossemicarbazonas parecem não exercerem aumento da atividade biológica, como apresentado nos trabalhos de Costa et al. (2015), corroborando com os resultados do presente estudo, onde os derivados LqIT/LTC-54 – LqIT/LTC-57 se mostraram inativos frente as linhagens testadas.

Esses resultados podem ser justificados pela conservação do sistema NNS das tiossemicarbazonas serem importantes como centros doadores de ligação de hidrogênio com o alvo biológico (PAPE et al., 2016). De fato, isto é constatado com trabalhos de Bisciglie et al. (2015), em que a formação de complexos metálicos com tiossemicarbazonas produziu a perda do equilíbrio tautomérico tiol-tiona e, consequentemente, a diminuição da atividade antiproliferativa *in vitro*.

Figura 29 – Tiossemicarbazonas LqIT/LT-50 e LqIT/LT-51 e suas respectivas ciclizações.



Além disso, a ciclização da tiossemicarbazona leva a restrição da conformação molecular. A formação de um anel tiazolidinona, a presença de um grupo funcional rígido ($=N-N=$) e o impedimento estérico por grupamentos volumosos, tais como *p*-toluil, 1-naftil e o indol impossibilitaram a alteração conformacional da molécula.

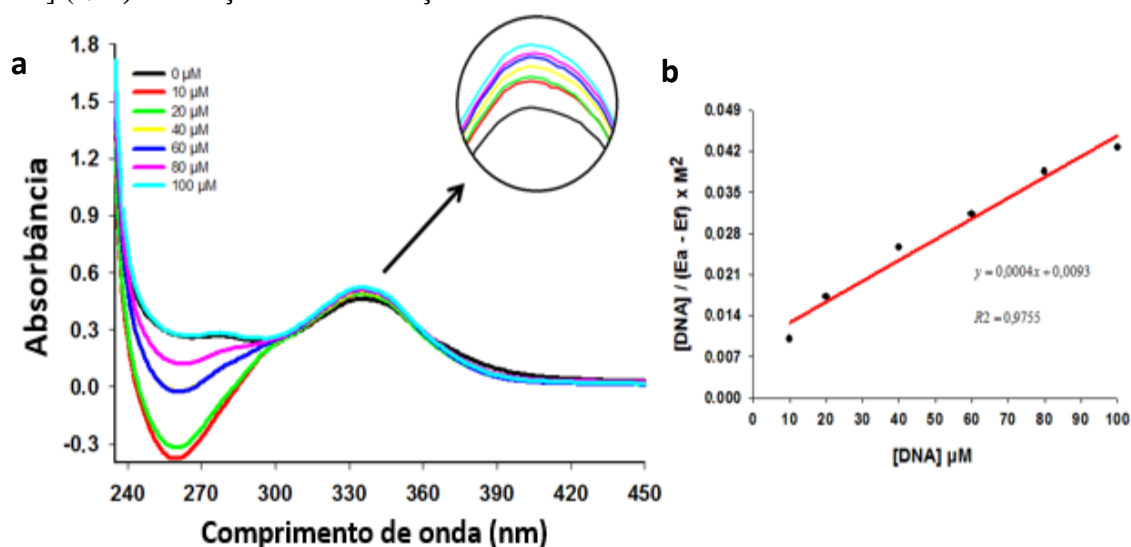
A estratégia de planejamento de fármacos por rigidificação molecular contribui para a seletividade do fármaco ao seu receptor biológico, visto que a restrição da conformação direciona o composto bioativo para um alvo específico (PATRICK, 2013). No presente estudo, o aumento da atividade com os derivados não ciclizados sugere que a maior flexibilidade conformacional das tiossemicarbazonas possa favorecer a interação com diversos alvos biológicos, e, por conseguinte, resultados satisfatórios no ensaio antiproliferativo *in vitro*.

5.11 Estudo de interação do DNA

Moléculas pequenas se ligam ao DNA e alteram e/ou inibem o seu funcionamento, o que o torna um alvo terapêutico para vários fármacos em uso clínico ou que estão em ensaios

clínicos avançados (SIRAJUDDIN, ALI e BADSHAH, 2013). Nesta perspectiva, como o derivado indólico-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 foi o mais promissor da série no ensaio antiproliferativo *in vitro*, foi também avaliado quanto a sua interação com ctDNA, monitorada através de espectrofotometria de absorção UV-Visível. A Figura 30 apresenta o espectro de absorção do LqIT/LT-51 com a concentração de 25 μM na ausência e presença de ctDNA (0-100 μM).

Figura 30 – (a) Espectro de absorção do LqIT/LT-51 (25 μM) com concentrações crescentes de ctDNA (0-100 μM). [ctDNA] = 0 (preto), 10 (vermelho), 20 (verde), 40 (amarelo), 60 (azul), 80 (rosa) e 100 (azul claro) μM . Seta (↗) se refere ao efeito hiperacrômico. (b) Gráfico correspondente à $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ em função da concentração crescente do ctDNA.



O LqIT/LT-51 apresentou o pico máximo de absorção em 334 nm. A adição de ctDNA à solução não resultou em alterações características no comprimento de onda no pico máximo de absorção, isto é, não apresentou efeito batocrômico (desvio para o vermelho) ou efeito hipsocrômico (desvio para o azul). Entretanto, foi observado que a presença e os níveis crescentes da concentração de ctDNA aumentou a absorção (efeito hiperacrômico), apresentando valor de hipercromicidade em torno de 13% na concentração de 100 μM de ctDNA (Tabela 15). Shahabadi e Heidari (2012) mostraram resultados similares entre a interação do DNA e o fármaco metformina exibindo efeito hiperacrômico de 9.7%.

Os efeitos hipocrômico e hiperacrômico são característicos da alteração da conformação da dupla hélice do DNA, após a ligação com o composto (LAFAYETTE et al., 2013). Geralmente, o hipocromismo combinado com o desvio para o vermelho são considerados como indicação da intercalação de pequenas moléculas ao DNA devido ao empilhamento dos cromóforos entre as bases nucleotídicas (ALMEIDA et al., 2015;

SIRAJUDDIN, ALI e BADSHAH, 2013; WANG et al., 2011). A presença de um único efeito hipercrômico sugere uma forma diferente de intercalação entre o derivado LqIT/LT-51 e o DNA. O hipercromismo reflete as mudanças na conformação da estrutura do DNA que ocorre após sua interação com o fármaco (KASHANIAN e DOLATABADI, 2009). A força da interação causa desorganização da estrutura helicoidal do DNA, provocando desnaturação da estrutura e resultando no aumento da absorbância (ALEKSIC e KAPETANOVI, 2014).

O modelo de McGhee e Von Hippel (1974) foi utilizado para estimar o valor da constante de ligação (K_b) do espectro. O composto LqIT/LT-51 liga-se ao ctDNA com o valor da constante de ligação em $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Tabela 20). Os valores da constante de ligação para intercaladores típicos e corantes orgânicos interagindo com o DNA estão na faixa de 10^4 a 10^6 M^{-1} (IHMEIS e OTTO, 2005) e indicam uma ligação de força moderada com o DNA (JANGIR et al., 2012).

Tabela 20 – Dados da espectroscopia de absorção UV-vis do composto LqIT/LT-51 com o ctDNA (0-100 μM).

Composto	λ_{max} livre	λ_{max} ligado	Coefficiente de extinção molar (ϵ, M^{-1})	Hipercr. (%) ^a	$K_b (\text{M}^{-1})$ ^b
LqIT/LT-51	334 nm	334 nm	18.440	13	4.3×10^4

^a. Hipercromismo resultante da formação do complexo entre o composto LqIT/LT-51 (25 μM) e ctDNA (100 μM) em comparação com os ligantes livres.

^b. K_b , constante de ligação obtida entre o LqIT/LT-51 e o ctDNA (0-100 μM).

Diversos estudos de interação com o DNA revelaram que o aumento da afinidade da ligação com o ctDNA é resultado da influência positiva dos grupos doadores de hidrogênio (HASSAN et al., 2016; PAKRAVAN e MASOUDIAN, 2015; BENNER et al., 2014). E isto é confirmado em virtude da presença dos grupos NH na estrutura da hidrazina-carbotioamida do composto LqIT/LT-51, influenciando moderadamente a constante de ligação ao ctDNA.

Os derivados de hidrazina e semicarbazida foram sintetizados e analisados para verificação da interação com o DNA por métodos de espectroscopia do UV-Vis e técnicas de IV, evidenciando a importância significativa desses *scaffolds* para a ligação ao DNA (JANARDAN et al., 2014).

Recentemente, Almeida et al. (2015) mostrou a intercalação do derivado 2-(acridina-9-il-metileno)-N-(naftaleno-1-il)hidrazina-carbotioamida com a constante de ligação no valor de $8.47 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, onde foi possível evidenciar a relevância da presença do anel 1-naftil e do grupo hidrazina-carbotioamida na interação com o DNA. Além disso, a relação entre a presença estrutural do anel acridínico e o composto LqIT/LT-51 apresentar o heterociclo indol

e o grupo 1-naftil, corroboram com a importância da planaridade do anel aromático para o aumento da afinidade com o DNA (RESCIFINA et al., 2014).

A interação do LqIT/LT-51 com DNA foi confirmada através da espectroscopia de emissão da fluorescência utilizando o aumento ou diminuição da intensidade da fluorescência para se obter o comprimento de onda o qual o derivado emite luz e a partir deste resultado verificar a supressão da fluorescência do composto após a ligação com o DNA. Os estudos de fluorescência podem fornecer informações sobre a ligação de pequenas moléculas com biomacromoléculas em nível molecular, tais como mecanismo de ligação e a constante de supressão da fluorescência (GENG et al., 2013; BI et al., 2012).

Os espectros de fluorescência foram monitorados com concentração fixa do composto LqIT/LT-51 (15 μM) e concentrações crescentes de ctDNA (0-100 μM). A Tabela 21 apresenta os dados de emissão da fluorescência do derivado indólico-tiossemicarbazona com propriedades de emissão e excitação nos comprimentos de onda de 435 e 335 nm, respectivamente. Os resultados mostraram a diminuição da emissão da fluorescência do composto LqIT/LT-51 na presença do ctDNA (Tabela 21).

A supressão da intensidade da fluorescência na presença do DNA pode ser observada quando estão envolvidos ligantes do sulco (JOSHI et al., 2014; MATTI et al., 2013), interações eletrostáticas (PAU e GUCHHAIT, 2011), ligações de hidrogênio (LU et al., 2010) ou interações hidrofóbicas (CUI et al., 2011; KURBANOGU et al., 2016).

Tabela 21 – Dados da espectroscopia de emissão de fluorescência do composto LqIT/LT-51 (15 μM) e concentrações crescentes de ctDNA (0-100 μM).

Composto	λ excitação	λ emissão	K_{sv} (M^{-1}) ^a
LqIT/LT-51	335 nm	435 nm	1.19×10^3

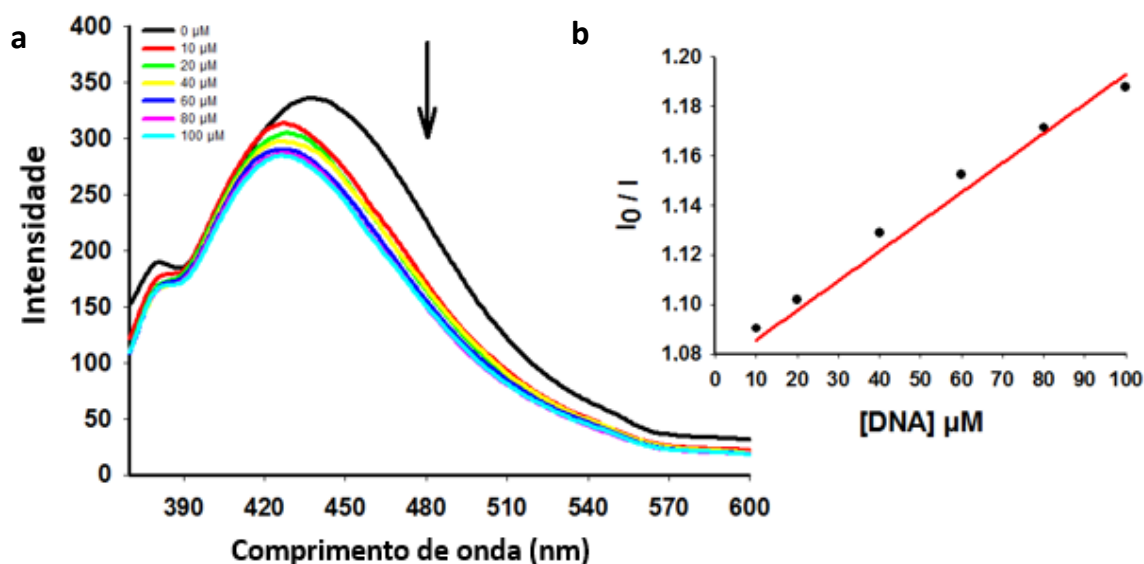
^a. K_{sv} , Stern-Volmer, constante de supressão da fluorescência obtida a partir da extinção da fluorescência do ctDNA por LqIT/LT-51.

A análise quantitativa da fluorescência foi determinada através do gráfico da intensidade relativa da fluorescência *versus* a concentração do ctDNA (Figura 31), obtendo-se a K_{sv} pela equação de Stern-Volmer (LAKOWICZ, 2006). O derivado LqIT/LT-51 apresentou $K_{sv} = 1.19 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, confirmando a interação com o ctDNA (SIRAJUDDIN, ALI e BADSHAH, 2013).

De acordo com estudos de Lafayette (2016), o derivado indólico 3-amino-5-(1*H*-indol-3-ilmetileno)-2-tioxi-tiazolidin-4-ona apresentou o maior valor para supressão da emissão

com $K_{sv} = 1.81 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, assim assegurando a participação do grupamento NH indólico na interação com os pares de bases nucleotídicas do DNA.

Figura 31 – (a) Espectro de fluorescência do composto LqIT/LT-51 (15 μM) com concentrações crescentes de ctDNA (0-100 μM). [ctDNA] = 0 (preto), 10 (vermelho), 20 (verde), 40 (amarelo), 60 (azul), 80 (rosa) e 100 (azul claro) μM . Seta ($\downarrow$) se refere à supressão da fluorescência. (b) Gráfico correspondente à intensidade relativa de fluorescência da ligação do composto ao ctDNA.



Alguns intercaladores possuem substituintes volumosos próximos a porção intercaladora, estes substituintes são acomodados no sulco maior e no sulco menor quando ligados ao DNA. Este tipo de intercalação é denominado “*threading*” (RESCIFINA et al., 2014). O composto LqIT/LT-51 possui na sua estrutura o grupamento volumoso 1-naftil substituído na posição *N*-4. Além disso, apresenta o sistema NNS da tiossemicarbazona e o NH do núcleo indol, os quais podem atuar como centros de ligação de hidrogênio. Dessa forma, poderia sugerir uma intercalação “*threading*” para esta molécula.

Em adição a isto, o derivado indólico-tiossemicarbazona apresentou na análise da espectroscopia de absorção do UV-vis, efeito hipercrômico sem deslocamento do comprimento de onda e K_b na faixa de 10^4 , indicativo de intercalação, mas uma forma diferente de intercalação (KASHANIAN e DOLATABADI, 2009). No entanto, a confirmação do tipo da interação apenas poderá ser afirmada com a realização do estudo de espectroscopia do dicroísmo circular, onde é possível observar se ocorreu alterações na estrutura da dupla hélice e/ou na região dos sulcos do DNA.

Fenômenos que conduzem a supressão da emissão da fluorescência refletem a interação entre o composto e o ctDNA, e isto é condizente com os resultados apresentados na

análise da espectroscopia de absorção (GAO et al., 2010). Ambas as constantes Stern–Volmer (K_{sv}) e de ligação (K_b) do LqIT/LT-51 indicam extinção estática, devido a formação do complexo entre o composto sintetizado e o ctDNA. De modo complementar, a redução da emissão de fluorescência do LqIT/LT-51 foi acompanhada por uma mudança aparente no comprimento de onda máximo na gama de 8 nm ($\Delta\lambda = 8$ nm), caracterizando sua ligação ao ctDNA (CUI et al., 2014).

5.12 Inibição da Topoisomerase II α

A topoisomerase II é reconhecida como um importante alvo biológico para descoberta de novos fármacos anticâncer (NITISS, 2009). Com a evidente participação do núcleo indol e do grupo 1-naftil presentes na estrutura do composto LqIT/LT-51 nos resultados da atividade antiproliferativa *in vitro* e interação com o DNA. Este derivado indólico-tiossemicarbazona foi selecionado para o estudo da capacidade de inibição da topoisomerase II α , com a finalidade de investigar um possível mecanismo de ação para esse novo composto. Neste sentido, o LqIT/LT-51 foi testado no ensaio do DNA de plasmídeo pUC19. Este teste consiste em avaliar a atividade enzimática topoisomerase II α na ausência e na presença da molécula sintetizada, seguido por análise de eletroforese em gel de agarose (ALMEIDA et al., 2016).

Como demonstrado na Figura 32, o DNA circular de plasmídeo pUC19 pode existir em três diferentes conformações topológicas: DNA circular superhelicoidal, DNA circular relaxado e DNA linear. Todos com a sequência idêntica, mas migram em taxas diferentes no gel de agarose. Em virtude da sua natureza compactada, o DNA superhelicoidal migra mais rápido através do gel agarose, em comparação ao DNA linear e o DNA relaxado (migração mais lenta).

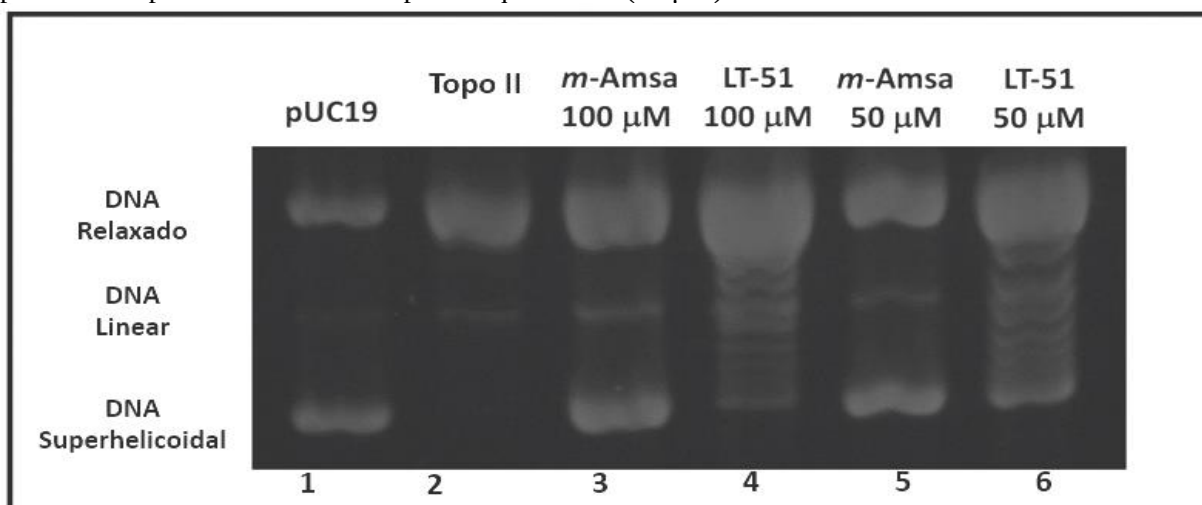
Desse modo, quando a enzima topoisomerase II α atua, o DNA de plasmídeo migra como uma única banda e mais lentamente na forma relaxada. Em contraste, a inibição da topoisomerase II α resulta no padrão de banda similar ao DNA de plasmídeo (Linha 1. Figura 32), por apresentar a banda de migração do DNA superhelicoidal.

A atividade do LqIT/LT-51 como inibidor Topo II α foi visualizada através da formação de topoisômeros (moléculas com tamanho e sequências idênticas, mas diferem na topologia) nas concentrações de 50 e 100 de μ M. Ambas as concentrações avaliadas não induziram a inibição total similar ao controle positivo *m*-AMSA. O padrão de migração da *m*-AMSA mostra a formação do DNA linear (quebra do DNA circular), resultado do efeito inibitório da religação das fitas do DNA clivadas pela enzima topoisomerase (complexo de clivagem). Os fármacos inibidores da Topo II podem ser divididos em dois grupos: “os

venenos de topoisomerase” que formam um complexo ternário fármaco-enzima-DNA, induzindo quebras sucessivas no DNA, inibindo a religação dessas clivagens e conduzindo a apoptose de células cancerígenas. E os inibidores Topo II os quais inibem diretamente a atividade catalítica ATPase da enzima (NITISS, 2009).

Figura 32 – Ensaio da Inibição da Topoisomerase II do composto LqIT/LT-51.

Linha 1. DNA pUC19; Linha 2. DNA pUC19 + Topoisomerase II; Linha 3. DNA pUC19 + Topoisomerase II + *m*-Amsa (100 μ M); Linha 4. DNA pUC19 + Topoisomerase II + composto LqIT/LT-51 (100 μ M); Linha 5. DNA pUC19 + Topoisomerase II + *m*-Amsa (50 μ M); Linha 6. DNA pUC19 + Topoisomerase II + composto LqIT/LT-51 (50 μ M).



O sítio ativo das enzimas topoisomerases é rico em arginina e lisina com carga positiva condensada permitindo interações eletrostáticas com os grupos fosfato do DNA carregados negativamente (ABDEL BAR, 2009). O derivado LqIT/LT-51 possui grupamentos possíveis de formar interações entre o DNA e a Topo II α . Além disso, Huang et al. (2010), mostraram através de estudos de modelagem molecular que as tiossemicarbazonas possuem o sistema hidrazina-carbotioamida se posicionando na entrada do sítio ativo da enzima e um átomo de nitrogênio realizando forte ligação de hidrogênio com a cadeia lateral NH da lisina. No entanto, o LqIT/LT-51 por apresentar substituintes volumosos na sua estrutura (indol e 1-naftil) pode ocasionar um impedimento estérico na sua conformação, interferindo a interação com o sítio ativo da enzima, o que resultou na inibição parcial da Topo II α (Figura 32). Contudo, isto poderá ser confirmado com estudos de modelagem molecular, onde de fato é analisado as possíveis interações entre o composto LqIT/LT-51 e a topoisomerase II α .

Além disso, as tiossemicarbazonas atuam frente a topoisomerase II α sendo capaz de causar inibição do efeito catalítico da enzima (YALOWICH et al., 2012). Huang et al. (2010),

propuseram o mecanismo de inibição através do estudo de modelagem molecular em que as tiossemicarbazonas interagiram com o domínio ATPase da enzima bloqueando a hidrólise do ATP. Os derivados indólicos também exibem atividade inibitória frente a topoisomerase II. A série indenoindolona-tiossemicarbazonas foi sintetizada e avaliada o seu potencial inibitório Topo II (KASHYAP et al., 2013).

Nesta perspectiva, o presente trabalho mostrou o derivado indólico-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 apresentando interação ao DNA nos ensaios de espectroscopia de absorvância no UV-vis e emissão de fluorescência, e sabe-se que os intercaladores de DNA podem interferir significativamente com a função da topoisomerase por uma inibição interfacial, onde o composto se liga entre o DNA e a enzima formando um complexo ternário e induzindo a morte celular (MARCHAND e POMMIER, 2012). Estes resultados envolvendo atividade anticâncer de tiossemicarbazonas e indóis possibilitam o planejamento de novos inibidores Topo II e o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o câncer associando alvos biológicos como, a topoisomerase e o DNA.

5.13 Análise da Apoptose

Com a finalidade de analisar a influência do derivado indólico tiossemicarbazona LqIT/LT-51 em linhagens tumorais humanas, a linhagem de adenocarcinoma colorretal (HT-29) foi selecionada para proceder o experimento de verificação da morte celular por ter demonstrado maior sensibilidade no ensaio antiproliferativo *in vitro* com SRB. O composto LqIT/LT-51 se destacou frente à linhagem de HT-29 com valor de $GI_{50} = 0.01 \mu M$ (ver Tabela 16).

Na primeira etapa do teste foi avaliada a capacidade de indução da exposição de fosfatidilserina (PS) (marcada com Anexina-V-PE), característico da morte celular apoptótica, juntamente com a análise da integridade da membrana celular (marcada com 7-AAD). Durante o estágio inicial de morte celular, a anexina-V liga-se a PS translocada para face externa da membrana, enquanto que a 7-AAD liga-se ao DNA após a perda da integridade da membrana, indicando o estágio tardio de morte celular, isto ocorre se as células estiverem duplamente coradas. As células marcadas apenas com 7-AAD são consideradas debris.

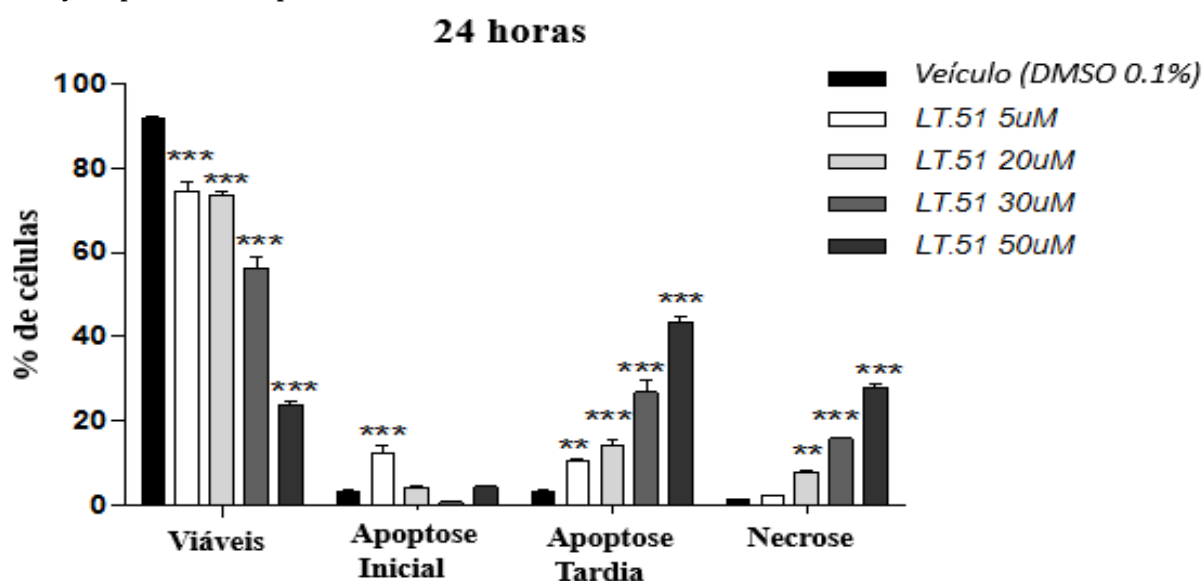
O tratamento com LqIT/LT-51 (5, 20, 30 e 50 μM) conduziu a morte celular concentração-dependente nas células de HT-29 durante 24 horas por ter diminuído a viabilidade celular em 25.5, 26.5, 43.6 e 76.2%, nas respectivas concentrações (Figura 33). Na menor concentração utilizada (5 μM), foi possível observar o estágio inicial da morte celular, com $12.6 \pm 1.6\%$ de células apresentando exposição de PS e sem a perda da integridade da

membrana. Para os outros tratamentos, as células foram analisadas no estágio tardio de morte celular, com 14.4 ± 1.1 , 26.9 ± 2.6 e $43.6 \pm 1.6\%$ de células nas concentrações de 20, 30 e 50 μM do composto LqIT/LT-51, respectivamente, e apresentando ambos a exposição de PS e o comprometimento da integridade da membrana (Figura 33).

O ensaio de externalização de PS detectou quatro categorias celulares: (a) Células viáveis, sem disfunção da membrana e não foram fluorescentes (Anexina(-)/7-AAD(-)); (b) Apoptóticas, mas viáveis (Anexina(+)/7-AAD(-)), foram coradas com anexina-V, mas não com 7-AAD; (c) Células marcadas ambos com anexina-V e 7-AAD (Anexina(+)/7-AAD(+)), possuem principalmente algum grau de integridade da membrana, embora apresentem a permeabilidade danificada ainda se coram com a anexina-V (d) Células não-viáveis (Anexina(-)/7-AAD(+)), apresentam a perda completa da integridade da membrana e são incapazes de se ligar a anexina-V.

Dessa forma, os resultados sugerem que o tratamento com LqIT/LT-51 induziu a morte celular concentração-dependente. Possivelmente, através da apoptose, por ter ocorrido a externalização da fosfatidilserina antes de perder a integridade da membrana.

Figura 33 – Indução da morte celular por LqIT/LT-51 em células da linhagem tumoral HT-29. As células foram tratadas durante 24 horas com o veículo (DMSO 0.1%) e LqIT/LT-51 (5, 20, 30 e 50 μM). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata, na porcentagem das células coradas apenas com anexina-V (estágio inicial de morte celular), duplamente coradas com anexina-V e 7-AAD (estágio tardio de morte celular), coradas apenas com 7-AAD (células mortas ou debris celulares) e não-coradas (células viáveis). Um total de 5000 eventos foram coletados por experimento. ANOVA seguido por teste de Turkey. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, estatisticamente diferente do veículo.



5.14 Análise do Ciclo celular

No presente estudo, a influência do LqIT/LT-51 sobre o ciclo celular da linhagem HT-29 foi avaliada e identificada as células em quatro fases diferentes do ciclo, baseado na quantidade de DNA: G1 – antes da síntese e duplicação de DNA, quando as células certificam-se que as condições são favoráveis para divisão celular, S - síntese do DNA, G2/M – quando as células apresentam a duplicação do DNA e estão preparadas para a mitose, e a fase Sub-G1 - onde as células possuem menor quantidade de DNA devido a fragmentações do DNA durante o processo de destruição celular ou interrupção da realização do experimento.

Nesse experimento, as células foram tratadas com as duas concentrações mais baixas (5 e 10 μM), com a finalidade de minimizar os efeitos citotóxicos e a acumulação de células na fase Sub-G1. A linhagem HT-29 também foi tratada com a concentração intermediária citotóxica (30 μM), no propósito de observar se a mesma afeta o ciclo celular antes de induzir a parada da fase Sub-G1. Colchicina (1.25 nM) foi utilizada como controle positivo, por promover a parada do ciclo celular na fase G2/M.

Interessantemente, todas as concentrações produziram a interrupção na fase G2/M e com o efeito mais pronunciado nas menores concentrações (Tabela 22). Este efeito foi acompanhado por diminuição da população na fase G1, seguindo o mesmo perfil apresentado pela Colchicina (Tabela 22). Colchicina é um composto natural conhecido por se ligar a tubulina, um componente do microtúbulo, conduzido a sua desestabilização e assim impedindo as células progredirem para a mitose (RAVELLI et al, 2004). De acordo com Jordan e Wilson (2004), os agentes que tem como alvo os microtúbulos induzem a parada do ciclo na fase G2/M seguida por apoptose. De fato, o tratamento com 30 μM do LqIT/LT-51, concentração citotóxica como mostrado na Figura 33, também promoveu a parada do ciclo celular na fase G2/M. Dessa forma, sugerindo que o derivado indólico-tiossemicarbazona induziu a interrupção em G2/M das células HT-29, impedindo-as de entrarem na mitose, e consequentemente conduzido a morte celular.

Além disso, existe uma relação entre a inibição da Topo II e a interrupção do ciclo celular. Estudos mostraram que a parada do ciclo celular na fase G2/M ocorreu em células cancerígenas tratadas com os “venenos da topoisomerase” (BUCHER, 2008). Esta correlação se deve ao fato da enzima topoisomerase II α se encontrar superexpressa na fase G2/M do ciclo (BISCEGLIE et al., 2014). Desse modo, é possível sugerir um mecanismo de ação para o derivado indólico-tiossemicarbazona LqIT/LT-51, já que o composto apresentou inibição

parcial da topoisomerase II α (ver Figura 32), e consequentemente a parada do ciclo celular na fase G2/M.

Os derivados tiossemicarbazonas são relatados por inibirem a Topo II (PRABHAKARAN et al., 2013; BISCEGLIE et al., 2014) e esta inibição também pode associar-se com a interação ao DNA, visto que os fármacos “venenos de topoisomerase” formam um complexo ternário entre a enzima-DNA-fármaco, impedindo a religação das fitas clivadas do DNA, formando fragmentos tóxicos ao genoma e conduzido a morte celular (LARA et al., 2017). Como o LqIT/LT-51 também apresentou interação ao DNA mostrando constantes de ligação e supressão da fluorescência (ver Tabelas 20 e 21) compatíveis com uma boa interação ao DNA, torna plausível que este novo composto atue em múltiplos alvos terapêuticos do câncer envolvidos com a indução da morte celular.

Tabela 22 – Porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular de HT-29, após 24 horas de tratamento com (DMSO 0.1%), Colchicina (1.25 nM) e LqTI/LT.51 (5, 10 e 30 μ M).

Tratamento	Sub-G1	G1	S	G2/M
Veículo (DMSO 0.1%)	3.5 $\pm$ 0.7	46.9 $\pm$ 2.1	17.2 $\pm$ 1.2	32.5 $\pm$ 2.3
Cochicina (1.25 nM)	3.5 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 1.8***	5.9 $\pm$ 1.3***	76.0 $\pm$ 1.7***
LqIT/LT-51 (5 μ M)	2.0 $\pm$ 0.5	10.7 $\pm$ 0.8***	6.8 $\pm$ 1.4***	^a 80.5 $\pm$ 2.4***
LqIT/LT-51 (10 μ M)	1.6 $\pm$ 0.3	26.7 $\pm$ 1.3***	5.5 $\pm$ 0.4***	^a 66.2 $\pm$ 1.2***
LqIT/LT-51 (30 μ M)	4.8 $\pm$ 0.8	34.9 $\pm$ 1.4***	7.3 $\pm$ 0.8***	53.1 $\pm$ 1.3***

^aLqIT/LT-51 promoveu a parada do ciclo celular de HT-29 na fase G2/M com menores concentrações.

*Os resultados são apresentados como media $\pm$ desvio padrão, na porcentagem de células de dois experimentos independentes em triplicata. Total de 5000 eventos foram coletados por experimento. ANOVA seguido por teste de Turkey. **p < 0.01, ***p < 0.001, estatisticamente diferente do veículo.

Uma das habilidades das células cancerígenas é apresentar o aumento da capacidade proliferativa, favorecendo a propagação de mutações e contribuindo para instabilidade genética (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Neste sentido, terapias que possam interferir e limitar esta capacidade são atrativas para o desenvolvimento de fármacos, e o LqIT/LT-51 apresentou-se um composto promissor para ser investigado como novo agente anticâncer.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- ✓ Foram sintetizadas três séries pertencentes à classe das tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas, todas apresentando como substituinte o anel indólico e variando, entre eles, os substituintes da posição 5 do heterociclo indol, o *N*-4 da tiossemicarbazona e a posição 5 do anel 4-tiazolidinona.
- ✓ Os compostos foram sintetizados através de eficientes metodologias de síntese e purificação, apresentando rendimentos reacionais satisfatórios. Todos foram caracterizados físico-quimicamente, bem como por métodos espectroscópicos unidimensionais e bidimensionais. Os espectros analisados apresentaram-se consistentes com as respectivas estruturas químicas.
- ✓ A configuração diastereoisomérica dos compostos indólicos-tiossemicarbazonas foi determinada como configuração *E*, confirmada a partir de métodos espectroscópicos 2D RMN NOESY.
- ✓ O LqIT-LT-51 foi o derivado mais promissor na atividade antiproliferativa *in vitro*. A formação do anel 4-tiazolidinona não ocasionou aumento da atividade dos compostos avaliados, sendo a modificação dos substituintes da posição *N*-4 mostrando-se mais efetiva para o incremento da atividade.
- ✓ O composto LqIT/LT-51 também foi avaliado quanto a sua capacidade de interação com o DNA, mostrando o *K_b* compatível com uma boa interação ao ctDNA ($4.30 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). No ensaio de fluorescência, apresentou o $K_{sv} = 1.19 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Este composto possui o núcleo indol, o sistema NNS e o 1-naftil, o que torna uma estrutura favorável para ligação ao DNA.
- ✓ O derivado indólico-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 exibiu inibição parcial frente à enzima topoisomerase II α , em comparação com a *m*-AMSA, inibidor total enzimático. Dessa forma, sugerindo a atuação em mais um alvo biológico do câncer para este composto correlacionado com a interação ao DNA.

- ✓ A linhagem de HT-29 foi tratada com o LqIT/LT-51 e apresentou a externalização da PS sem afetar a integridade da membrana, caracterizando o estágio inicial da apoptose. Na análise do ciclo celular apresentou a maior porcentagem de células na fase G2/M, sugerindo um mecanismo de ação associado com a inibição da Topo II e interação com DNA, ambos são alvos terapêuticos do câncer que conduzem a parada do ciclo e a morte celular.

Diante dos resultados e conclusão apresentados neste trabalho, verifica-se a importância em prosseguir os estudos com os compostos indólicos. Desse modo, temos como perspectivas:

- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória dos derivados indólicos-tiossemicarbazonas e correlacionar com a atividade anticâncer, de modo que possam apresentar efeito em múltiplos alvos biológicos;
- ✓ Utilizar técnicas de espectroscopia de dicroísmo circular e viscosidade com os derivados indólicos-tiossemicarbazonas, para ampliar os estudos sobre a interação com o DNA;
- ✓ Verificar a interação ao DNA e a inibição da topoisomerase II α do composto LqIT/LTC-55 com a finalidade de analisar a influência da rigidificação molecular na atividade comparado ao LqIT/LT-51;
- ✓ Avaliar as alterações ultramorfológicas das células HT-29 tratadas com o derivado indólico-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 através de microscopias eletrônicas de transmissão e de varredura, e também microscopia de fluorescência confocal;
- ✓ Realizar a atividade antitumoral *in vivo* dos compostos sintetizados e a avaliação antiproliferativa *in vitro*, interação com DNA e topoisomerase II α dos demais compostos sintetizados deste trabalho.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBADY, M. A.; ABDEL-HAFEZ, S.H.; KANDEEL, M.M.; ABDEL-MONEM, M.I. Syntheses of New Unsymmetrical and Symmetrical Diaryl-sulphides and Diarylsulphones Containing Thiazoliny and Thiazolidinonyl Moieties Using 4,4'-Diacetyldiphenylsulphide. *Molecules*, v. 8, p. 622-641, 2003.
- ABDEL BAR, F.; KHANFAR, M.; ELNAGAR, A.; LIU, H.; ZAGHLOUL, A.; BADRIA, F.; SYLVESTER, P.; AHMED, K.; RAISCH, K.; EL SAYED, K.J. Rational design and semisynthesis of betulinic acid analogues as potent topoisomerase inhibitors. *Nat. Prod.* v. 72, n. 9, p. 1643-1650, 2009.
- ADHAULIYA, N.; ANUPAMA, N.; KALAPPANAVAR, I.M.; Ali, RAJESHWARI G. Annigeri. Autophagy: A boon or bane in oral câncer. *Oral Oncology*, v. 61, p. 120-126, 2016.
- AFRASIABI, Z.; SINN, E.; CHEN, J.; MA, Y.; RHEINGOLD, A.L.; ZAKHAROV, L.N.; RATH, N.; PADHYE, S. Appended 1,2-naphthoquinones as anticancer agents 1: synthesis, structural, spectral and antitumor activities of ortho-naphthaquinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes. *Inorg. Chim. Acta.*, v. 357, n. 1, p. 271–278, 2004.
- AIT-AISSA, K.; EBBEN, J. D.; KADLEC, O. A.; BEYER, A.M. Friend or foe? Telomerase as a pharmacological target in cancer and cardiovascular disease. *Pharmacological Research*. v. 111, p. 422-433, 2016.
- ALBERS, P.; SIENER, R.; KREGE, S.; SCHMELZ, H.U.; DIECKMANN, K.P.; HEIDENREICH et al. Randomized phase III trial comparind retroperitoneal lymph node dissection with onde ourse pf bleomycin and etoposide plus cisplatin chemotherapy in the adjuvant treatment of clinical stage I NONseminomatis testicular germ cells tumors: AUO trial AH 01/94 by the German Testicular Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.*, v. 26, n. 18, p. 2966-2972, 2008.
- ALEKSIC, M.M.; KAPETANOVIC, V. An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA – drug interactions, *Acta Chim. Slov.*, v. 61, p. 555-573, 2014.
- ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 4506-4521, 2014.
- ALI, A.A.; NIMIR, H.; AKTAS, C.; HUCH, V.; RAUCH, U.; SCHAFFER, K.H.; VEITH, M. Organoplatinum(II) Complexes with 2-Acetylthiophene Thiosemicarbazone: Synthesis, Characterization, Crystal Structures, and *in vitro* Antitumor Activity. *Organometallics*, v. 31, p. 2256-2262, 2012.
- ALI, A.Q.; TEOH, S.G.; ABDUSSALAM, S.; ELTAYEB, N.E.; AHAMED, M.B.K.; MAJID, A.M.S.A. Synthesis of isatin thiosemicarbazones derivatives: In vitro anti-cancer, DNA binding and cleavage activities. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 125, p. 440–448, 2014.
- ALIBOLANDI, M.; RAMEZANI, M.; SADEGHI, F.; ABNOUS, K.; HADIZADEH, F. Epithelial cell adhesion molecule aptamer conjugated PEG-PLGA nanopolymerosomes for targeted delivery of doxorubicin to human breast adenocarcinoma cell line *in vitro*. *Int. J. Pharm.*, v. 479, p. 241-251, 2015.

ALMEIDA, S.M.V.; LAFAYETTE, E.A.; GOMES DA SILVA, L.P.B.; AMORIM, C.A.C.; OLIVEIRA, T.B.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; MOURA, R.O.; BELTRÃO, E.I.C.; LIMA, M.C.A.; CARVALHO JÚNIOR, L.B. Synthesis, DNA binding, and Antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives. *International Journal of Molecules Sciences*, v. 16, p. 13023-13042, 2015.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, B. DEL C.L.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com DNA: uma introdução. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AL-OTAIBI, J.S.; SPITTLE, P.T.; EL-GOGARY, T.M. Interaction of anthraquinone anti-cancer drugs with DNA: Experimental and computational quantum chemical study. *Journal of Molecular Structure*, v.1127, p. 751-769, 2017.

ALVES, A. J.; LEITE, A. C. L.; SANTANA, D. P.; BELTRÃO, T. M.; COELHO, M. R. D. Synthesis of 2-Thiazolinone as Potential Antiprotozoal Activity. *Il Fármaco*, v. 48, p. 1167, 1993.

ANDREWS, N.C. Disorders of Iron Metabolism. *The New England Journal of Medicine*, v. 341, p. 1986-1995, 1999.

ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L.B.; ABRAHAM, D.J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.*, v.9, n.9, p.771-790, 2009.

ANTONINI, I.; CLAUDI, F.; FRANCHETTI, P.; GRIFANTINI, M.; MARTELLI, S. Elucidation of the structure of the antineoplastic agents, 2-formylpyridine and 1-formylisoquinoline thiosemicarbazones. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 3, p. 447-449, 1977.

APAYA, M.K.; CHANG, M.; SHYUR, L. Phytomedicine polypharmacology: Cancer therapy through modulating the tumor microenvironment and oxylipin dynamics. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 162, p. 58-68, 2016.

AQUINO, T.M. **Síntese e Avaliação das Atividades Anti-Toxoplasma gondii e Antimicrobiana de Benzaldeído 4-Fenil-3-tiossemicarbazonas e Derivados 2[(Fenilmetileno)hidrazono]-3-fenil-4-tiazolidinona-5-substituídos**. 2007. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

ARAVIND, A.; JEYAMOHAN, R.P.; NAIR, R.; VEERANARAYANAN, S.; NAGAOKA, Y.; YOSHIDA, Y., MAEKAWA, T.; KUMAR, D.S. AS1211 aptamer tagged PLGA-lecithin-PEG nanoparticles for tumor cell targeting and drug delivery. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 109, p. 2920-2931, 2012.

ASATI, V.; MAHAPATRA, D.K.; BHARTI, S.K. Thiazolidine-2,4-dions as multi-target scaffold in medicinal chemistry: potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 87, p. 814-833, 2014.

ASHTON, W. T.; CANTONE, C. L.; CHANG, L. L.; HUTCHINS, S. M.; STRELITZ,

R. A.; MACCOSS, M.; CHANG, R. S. L.; LOTTI, V. J.; FAUST, K. A.; CHEN, T.; BUNTING, P.; SCHORN, T. W.; KIVLIGHN, S. D.; SIEGL, P. K. S. 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*, v. 36, p. 591-609, 1993.

AVENDAÑO, C.; MENENDEZ, J. C. DNA intercalators and topoisomerase inhibitors. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. 1º Ed. Amsterdam: Elsevier, Chapter 7, p. 199-225, 2015.

AZAROVA, A.M.; LYU, Y.L.; LIN, C.P.; TSAI, Y.C.; LAU, J.Y.; WANG, J.C.; LIU, L.F. Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v. 104, p. 11014-11019, 2007.

BAGINSKI, M.; FOGOLARI, F.; BRIGGS, J. M. Electrostatic and nonelectrostatic contributions to the binding free energies of anthracycline antibiotics to DNA. *J. Mol. Biol.*, v. 274, p. 253-267, 1997.

BALASHANMUGAM, M.V.; NAGARETHINAM, S.; JAGANI, H.; JOSYULA, V.R.; ALROHAIMI, A.; UDUPA, N. Preparation and characterization of novel PBAE/PLGA polymer blend microparticles for DNA vaccine delivery. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1-9, 2014.

BARREIRO, E.J. Estratégia de Simplificação Molecular no Planejamento Racional de Fármacos: A Descoberta de Novo Agente Cardioativo. *Química Nova*, v. 25, p. 1142-1180, n. 6, 2002.

BARREIRO, E.J. **Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: An introduction in Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: Design, Synthesis, Evaluation**. 2015. p. 1-15. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/chapterhtml/2015/bk9781782620303-00001?isbn=978-1-78262-030-3>>. Acesso em: 12 nov. 2016.

BARREIRO, E.J. E BALZANI, C.A.M. Biodiversidade: fonte e inspiração para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BECK, D.E.; ABDELMALEK, M.; LV, W.; REDDY, P.V.N.; TENDER, G.S.; O'NEILL, E.; AGAMA, K.; MARCHAND, C.; POMMIER, Y.; CUSHMAN, M. Discovery of Potent Indenoisoquinoline Topoisomerase I Poisons Lacking the 3-Nitro Toxicophore. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, p. 3997-4015, 2015.

BECKFORD, F.; DOURTH, D.; SHALOSKI, M. JR.; DIDION, J.; THESSING, J.; WOODS, J.; CROWELL, V.; GERASIMCHUK, N.; GONZALEZ-SARRÍAS, A.; SEERAM, N.P. Half-sandwich ruthenium-arene complexes with thiosemicarbazones: synthesis and biological evaluation of [(η⁶-p-cymene)Ru(piperonal thiosemicarbazones)Cl]Cl complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 105, n.8, p. 1019-1029, 2011.

BENMOHAMMED, A.; KHOUMERI, O.; DJAFRI, A.; TERME, T.; VANELLE, P. Synthesis of Novel Highly Functionalized 4-Thiazolidinone Derivatives from 4-Phenyl-3-thiosemicarbazones. *Molecules*, v.19, p. 3068-3083, 2014.

BENNER, K.; IHMELS, H.; KOLSCH, S.; PITHAN, P.M. Targeting abasic site-containing DNA with annelated quinolizium derivatives: the influence of size, shape and substituents. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 12, p. 1725-1734, 2014.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Química Nova*, v. 27, n. 3, p. 461-471, 2004.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbozones and their metal complexes. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, v. 4, p. 31, 2004.

BERNHARDT, P.V.; SHARPE, P.C.; ISLAM, M.; LOVEJOY, D.S.; KALINOWSKI, D.S.; RICHARDSON, D.R. Iron chelators of the dipyritylketone thiosemicarbazone class: precomplexation and transmetalation effects on anticancer activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p. 407-415, 2009.

BHARTI, N.; SHAIENDRA, SHARMA, S.; NAQVI, F.; AZAM, A. New palladium(II) complexes of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones. synthesis, spectral studies and in vitro anti-amoebic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 13, 2923-2929, 2003.

BHAT, I.A.; RASOOL, R.; QASIN, I.; MASOODI, K.Z.; PAUL S.A.; BHAT, B.A.; GANAIE, F.A.; AZIZ, S.A.; SHAH, Z.A. COX-2 overexpression and -8473 T/C polymorphism in 3'UTR in non small cell lung cancer. *Tumour Biology*, v. 35, p. 11209-11218, 2014.

BI, S.; YAN, L.; WANG, Y.; PANG, B.; WANG, T. Spectroscopic study on the interaction of eugenol with salmon sperm DNA in vitro. *Journal of Luminescence*, v. 132, n. 9, p. 2355-2360, 2012.

BISCEGLIE, F.; PINELLI, S.; ALINOVI, R.; GOLDONI, M.; MUTTI, A.; CAMERINI, A.; PIOLA, L.; TARASCONI, P.; PELOSI, G. Cinnamaldehyde and cuminaldehyde thiosemicarbazones and their copper(II) and nickel(II) complexes: A study to understand their biological activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 140, p. 111-125, 2014.

BISCEGLIE, F.; MUSIARI, A.; PINELLI, S.; ALINOVI, R.; MENOZZI, I. POLVERINI, E.; TARASCONI, P.; TAVONE, M.; PELOSI, G. Quinoline-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their Cu(II) and Ni(II) complexes as topoisomerase IIa inhibitors. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 152, p. 10-19, 2015.

BISWAL, S.; SAHOO, U.; SETHY, S.; KUMAR, H.K.S.; BANERJEE, M. Indole: the molecule of diverse biological activities. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 5, p. 1-6, 2012.

BOTTEGONI, G.; FAVIA, A.D.; RECANATINI, M.; CAVALLI, A. The role of fragment-based and computational methods in polypharmacology. *Drug Discovery Today*, v. 17, p. 23-34, 2012.

BOYA, P.; GONZALEZ-POLO, R.A.; CASARES, N.; PERFETTINI, J.L.; DESSEN, P.; LAROCLETTE, N.; METIVIER, D.; MELEY, D.; SOUQUERE, S.; YOSHIMORI, T.;

PIERRON, G.; CODOGNO, P.; KROEMER, G. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular Cell Biology*, v. 25, p. 1025-1040, 2005.

BOYD, M.R.; PAULL, K.D. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute *in vitro* anticancer drug discovery screen, *Drug Dev. Res.*, v. 34, n. 2, p. 91-109, 1995.

BRANDÃO, HN; DAVID, JP; COUTO, RD; NASCIMENTO, JAP; DAVID, JM. Química e farmacologia de quimioterápicos anti-neoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRAÑA, M.F.; CACHO, M.; GRADILLAS, A.; DE PASCUAL-TERESA B.; RAMOS, A. Intercalators as anticancer drugs. *Current Pharmaceutical Designer*. v. 7, n. 17, p. 1745-1780, 2001.

BROCKMAN, R.W.; THOMSON, J.R.; BELL, M.J.; SKIPPER, H.E.; Observations on the antileukemic activity of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and thiocarbohydrazone. *Cancer Research*, v. 16, p. 167-170, 1956.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMAN, B.C. Quimioterapia das doenças antineoplásicas. In: _____. Oxford: Editora McGrawHill. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 12ª ed., p.1035-1036, 2012.

BRUNTZ, R.C.; TAYLOR, H.E.; LINDSLEY, C.W.; BROWN, H.A. Phospholipase D2 mediates survival signaling through direct regulation of AKT in glioblastoma cells. *J Biol Chem.*, v. 289, p. 600-616, 2014.

BUCHER, N. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *British Journal of cancer*, v. 98, p. 523–528, 2008.

BUSKENS, C.J.; RISTIMAKI, A.; OFFERHAUS, G.J.; RICHEL, D.J.; VAN LANSCHOT, J.J. Role of cyclooxygenase-2 in development and treatment of oesophageal adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol Suppl.*, v. 239, p. 87-93, 2003.

CANALS, A.; PURCIOLAS, M.; AYMAMI, J.; COLL, M. Structure of ellipticine in complex with a 6-bp DNA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, v. 61, p. 1009, 2005.

CAREW, J.S.; NAWROCKI, S.T.; CLEVELAND, J.L. Modulating autophagy for therapeutic benefit. *Autophagy*. v. 3, p. 464-467, 2007.

CARNEIRO, R.M.; CARNEIRO, B.A.; AGULNIK, M.; KOPP, P.A.; GILES, F.J. Targeted therapies in advanced differentiated thyroid cancer. *Cancer Treatment Reviews*, v. 41, n. 8, p. 690-698, 2015.

CASAS, J.S.; GARCÍA-TASENDE, M.S.; SORDO, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 209, p. 197–261, 2000.

CHAUVIN, L.; GOUPILLE, C.; BLANC, C.; PINAULT, M.; DOMINGO, I.; GUIMARAES, C.; BOUGNOUX, P.; CHEVALIER, S.; MAHEO K. Long chain n-3 polyunsaturated fatty

acids increase the efficacy of docetaxel in mammary cancer cells by downregulating Akt and PKCepsilon/delta-induced ERK pathways. *Biochim Biophys Acta*, v. 1861, p. 380-390, 2016.

CHELLAN, P. LAND, K.M.; SHOKAR, A.; AU, A.; AN, S.H.; CATHERINE M. CLAVEL, C.M.; DYSON, P.J.; DE KOCK, C.; SMITH, P.J.; CHIBALE, K. SMITH. G.S. Exploring the Versatility of Cycloplatinated Thiosemicarbazones as Antitumor and Antiparasitic. *Agents. Organometallics*, v. 31, p. 5791–5799, 2012.

CHEN, F.; ZHUANG, X.; LIN, L.; YU, P.; WANG, Y.; SHI, Y.; GUOHONG HU, G.; SUN, Y. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Medicine*, v. 13, p. 45, 2015.

CHEN, J.; HUANG, Y.W.; LIU, G.; AFRASIABI, Z.; SINN, E.; PADHYE, S.; MA, Y. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 197 n. 1, p. 40–48, 2004.

CHEN, S.; CHEN, L.; LE, N.T.; ZHAO, C.; SIDDURI, A.; LOU, J.P.; MICHOU, C.; PORTLAND, L.; JACKSON, N.; LIU, J.; KONZELMANN, F.; CHI, F.; TOVAR, C.; XIANG, Q.; CHEN, Y.; WEN, Y.; VASSILEV, L.T. Synthesis and activity of quinolinyl-methylene-thiazolinones as potent and selective cyclin-dependent kinase 1 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, p. 2134-2138, 2007.

CHEN, Y.Y.; WU, X.Q.; TANG, W.J.; SHI, J.B.; LI, J.; LIU, X.H. Novel dihydropyrazole-chromen: Design and modulates hTERT inhibition proliferation of MGC-803. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 110, p. 65-75, 2016.

CHEUNG-ONG, K.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. *Chemistry and Biology*, v. 20, n. 5, p. 648–659, 2013.

CHISAMORE, M.J.; WILKINSON, H.A.; FLORES, O.; CHEN, J.D. Estrogen-related receptor α -antagonist inhibits both estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast tumor growth in mouse xenografts. *Molecular Cancer Therapy*, v. 8, n.3, p. 672-681, 2009.

CHUMAK, V.V.; FIL, M.R.; PANCHUK, R.R.; ZIMENKOVSKY, B.S.; HAVRYLYUK, D.Y.; LESYK, R.B.; STOIKA, R.S. Study of antineoplastic action of novel isomeric derivatives of 4-thiazolidinone. *Ukr. Biochem. J.*, v. 86, n. 6, p. 96-105, 2014.

COSTA, P.M.; COSTA, M.P.; CARVALHO, A.A.; CAVALCANTI S.M.T.; CARDOSO, M.V.O.; FILHO, G.B.O.; VIANA, D.A.; JAMACARU, F.V.F.; LEITE, A.C.L.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; FERREIRA, P.M.P. Improvement of in vivo anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives. *Chemico-Biological Interactions*, v. 239, p. 174–183, 2015.

COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. *Substâncias carboniladas e seus derivados*. 1ª ed., Bookman: Porto Alegre/MG, 2003.

- COLGIN, L.M.; REDDEL, R.R. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Curr. Opin Genet Dev.*, v. 9, p. 97-103, 1999.
- CONGIU, C.; ONNIS, V. Synthesis and biological evaluation of novel acylhydrazone derivatives as potential antitumor agents, *Bioorganic of Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 6592-6599, 2013.
- CRUSZ, S.M.; BALKWILL, F.R. Inflammation and cancer: advances and new agentes. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 12, p. 584–596, 2015.
- CUNHA, S.; SANTOS, A.O.; SILVA, T.L. Tiossemicarbazonas: Aspectos Estruturais, Farmacológicos e Sintéticos. *Revista Processos Químicos*, p. 50-55, 2011.
- CUI, F.; HUO, R.; HUI, G.; LV, X.; JIN, J.; ZHANG, G.; ZING, W. Study on the interaction between aglycon of daunorubicin and calf thymus DNA by spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, v. 1001, p. 104-110, 2011.
- CUI, F.; LIU, Q.; LUO, H.; ZHANG, G. Spectroscopic, viscosity and molecular modeling studies on the interaction of 3'-azido-danorubicin thiosemicarbazone with DNA. *Journal of Fluorescence*, v. 24, p. 189-195, 2014.
- DAR, A.C.; DAS, T.K.; SHOKAT, K.M.; CAGAN, R.L. Chemical genetic discovery of targets and anti-targets for cancer polypharmacology. *Nature*, v. 486 n. 7401, p. 80–84, 2012.
- DAWOOD, D.H.; BATRAN, R.Z.; FARGHALY, T.A.; KHEDR, M.A.; ABDULLA, M.M. New Coumarin Derivatives as Potent Selective COX-2 Inhibitors: Synthesis, Anti-Inflammatory, QSAR, and Molecular Modeling Studies. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, v. 348, p. 1–14, 2015.
- DICKSON, M.; GAGNON, J.P. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.3, n. 5, p. 417–429, 2004.
- ĐILOVIĆ, M.; RUBČIĆ, V.; VRDOLJAK, S.K.; PAVELIĆ, M.; KRALJ, I.; PIANTANIDA, M. C. Novel thiosemicarbazone derivatives as potential antitumor agents: synthesis, physicochemical and structural properties, DNA interactions and antiproliferative activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 9, p. 5189–5198, 2008.
- DUFLOS, A.; KRUCZYNSKI, A.; BARRET, J.M. Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. v. 2, n. 1, p. 55-70, 2002.
- DUSKOVA. K.; SIERRA, S.; FERNANDEZ, M.J.; GUDE, L.; LORENTE, A. Synthesis and DNA interaction of ethylenediamine platinum (II) complexes linked to DNA intercalants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 7112-7118, 2012.
- EBRAHIMI, H.; HABI, J.S.; AL-ANSARI, H.S. A new series os Schiff bases derived from sulfa drugs and indole-3-carboxaldehyde: Synthesis, characterization, spectral and DFT computational studies. *Journal of Molecular Structure*, v. 1039, p. 37-45, 2013.

EL-GOGARY, T.M.; EL-GENDRY, E. Noncovalent attachment of xanthotoxine derivatives with DNA: hartree-fock and density functional studies on the pobres. ***Spectrochemistry Acta A***, v. 59, p. 2635-2644, 2003.

EL-GENDY, Z.; ABDEL-RAHMAN, R. M.; FAWZY, M. M.; MAHMOUD, M. B. Biologically active thiazolidinone. Part II. Synthesis and fungitoxicities of isolated and fused thiazolidinones derived from thiosemicarbazones. ***J. Ind. Chem. Soc.***, v. 67, p. 927-929, 1990.

ENG, C.H.; ABRAHAM, R.T. The autophagy conundrum in cancer: influence of tumorigenic metabolic reprogramming. ***Oncogene***, v. 30, p.4687-4696, 2011.

ERGENÇ, N.; CAPAN, G. Synthesis and anticonvulsant activity of new 4- thiazolidone and 4-thiazoline derivatives. ***Farmaco***, v. 49, n. 2, p.133-135, 1994.

FORTES, M.P.; SILVA, P.B.N.; SILVA, T.G.; KAUFMAN, T.S.; MILITAO, G.C.C.; SILVEIRA, C.C. Synthesis and preliminary evaluation of 3-thiocyanato-1*H*-indoles as potential anticancer agentes. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, v. 118, 21-26, 2016.

FRACZEK, M.; WOZNIAK, Z.; RAMSEY, D.; ZATONSKI, T.; KRECICKI, T. Clinicopathologic significance and prognostic role of cyclin E and cyclin A expression in laryngeal epithelial lesions. ***Acta Oto-Laryngologica***, v. 128, n.3, p. 329–334, 2008.

FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis. ***International Journal of Cancer***, v. 124, n. 3, p. 511-515, 2009.

GALSKY, M.D.; HAHN, N.H.; WONG, B.; LEE, K.M.; ARGIRIADI, P.; ALBANY, C.; GIMPEL-TETRA, K.; LOWE, N.; SHAHIN, M.; PATEL, V.; TSAI, C.K.; OH, W.K. Phase 2 trial of the topoisomerase II inhibitor, amrubicin, as second-line therapy in patients with metastatic urothelial carcinoma. ***Cancer Chemotherapy Pharmacology***, v. 76, p. 1259-1265, 2015.

GAO, C.; LIU, F.; LUAN, X.; TAN, C.; LIU, H.; XIE, Y.; JIN, Y.; JIANG, Y. Novel synthetic 2-amino-10-(3,5-dimethoxy)benzyl-9(10*H*)-acridinone derivatives as potent DNA-binding antiproliferative agents. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry***, v. 18, p. 7507–7514, 2010.

GENG, S.; CUI, Y.; LIU, Q.; CUI, F.; ZHANG, G.; CHI, Y.; PENG, H. Spectroscopic and molecular modeling study on the interaction of ctDNA qith 3'-deoxy-3'-azido doxorubicin. ***Journal of Luminescence***, v. 141, p. 144-149, 2013.

GENTRY, A.C.; JUUL, S.; VEIGAARD, C.; KNUDSEN, B.R.; OSHEROFF, N. The geometry of DNA supercoils modulates the DNA cleavage activity of human topoisomerase I. ***Nucleic Acids Research***, v. 39, p. 1014-1022, 2011.

GERONIKAKI, A.; ELEFThERIOU, P.; VICINI, P.; ALAM I.; DIXIT, A.; SAXENA, A.K. 2-Thiazolylimino/heteroarylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones as new agentes with SHP-2 inhibitory action. ***Journal of Medicinal Chemistry***, v. 51, p. 5221-5228, 2008.

GILAD, Y.; SENDEROWITZ, H. Docking Studies on DNA Intercalators. *Journal of chemical information and modeling*, v. 54, p. 96-107, 2014.

GOFTAR, M.K.; KOR, N.M; KOR, Z.M. DNA Intercalators and Using Them as Anticancer Drugs. *International Journal of Advanced Biological and Biochemical Research*, v. 2, n. 3, p. 811-822, 2014.

GOORIN, A.M.; HARRIS, M.B, BERNSTEIN, M.; FERGUSON, W.; DEVIDAS, M.; SIEGAL, G.P.; GEBHARDT, M.C.; SCHWARTZ, C.L; LINK, M.; GRIER, H.E. III trial of etoposide and high-dose ifosfamide in newly diagnosef metastatic osteosarcoma: a pediatric oncology group trial. *J. Clin. Oncol.*, v. 20, n. 2, p. 426-433, 2002.

GORE, S.; BASKARAN, S.; KONING, B. Fischer indole synthesis in low melting mixtures. *Organic Letters*, v. 14, p. 4568-4571, 2012.

GOU, Y.; WANG, J.; CHEN, S.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, W.; YANG, F. α -N-heterocyclic thiosemicarbazone Fe(III) complex: Characterization of its antitumor activity and identification of anticancer mechanism. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 123, p. 354-364, 2016.

GRAVES, D.E.; VELEA, L.M. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids. *Current Organic Chemistry*, v. 4, p. 915-929, 2000.

GRIBBLE, G.W. Indoles. *Tetrahedron organic Chemistry Series*, v. 26, n. 3, p. 81-188, 2007.

GROSSMAN, S.; PORTH, C. M. Neoplasias. In: _____. *Porth – Fisiopatologia*. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. p. 700-710.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos. *Rev. Proc. Quim.*, v. 2, n. 4, p. 24-26, 2008.

GÜRSOY, A.; TERZIOGLU, N.; ÖTUK, G. Synthesis of Some New Hydrazide-hydrazones, Thiosemicarbazides and Thiazolidinones as Possible Antimicrobials. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 32, p. 753-757, 1997.

HAHN, W.C.; COUNTER, C.M.; LUNDBERG, A.S.; BEIJERSBERGEN, R.L; BROOKS, M.W.; WEINBERG, R.A. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, v. 400, p. 464–468, 1999.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARIBABU, J.; SUBHASHREE, G.R.; SARANYA, S.; GOMATHI, K.; KARVEMBU, R.; GAYATHRI, D. Isatin based thiosemicarbazone derivatives as potential bioactive agents: Anti-oxidant and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, v. 1110, p. 185-195, 2016.

- HASSAN, M.F. AND RAUF, A. Synthesis and multi-spectroscopic DNA binding study of 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazol derivatives of fatty acid. ***Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, v. 153, p. 510-516, 2016.
- HASSONA, D.H.M.; CHAN, G. L.; GRAY, R. M.; LI, H.; LEBLANC, E.; BAN, F.; CHERKASOV, A.; RENNIE. P.S.; GUNS, E. DNA-binding domain as an alternative target site on androgen receptor for prostate cancer therapy: Pre-clinical *in vivo* study of a novel small molecule for drug development. ***Cancer Research***, v. 75, p. 1727-1727, 2015.
- HAVRYLYUK, D.; ZIMENKOVSKY, B.; VASYLENKO, O.; GZELLA, A.; LESYK, R. Synthesis of New 4-Thiazolidinone-, Pyrazoline-, and Isatin-Based Conjugates with Promising Antitumor Activity. ***Journal of Medicinal Chemistry***, v. 55, p. 8630–8641, 2012.
- HAYASHIDA, Y.; HONDA, K.; IDOGAWA, M.; INO, Y.; ONO, M.; TSUCHIDA, A.; AOKI, T.; HIROHASHI, S.; YAMADA, T. E-cadherin regulates the association between β -catenin and actinin-4. ***Cancer Research***, v. 65, p. 8836–8845, 2005.
- HOLLA, B. S.; MALINI, K. V.; RAO, B. S.; SAROJINI, B. K.; KUMARI, N. S. Synthesis of Some New 2,4-Disubstituted Thiazoles as Possible Antibacterial and Anti-inflammatory Agents. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, v. 38, p. 313-318, 2003.
- HOPKINS, A.L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. ***Nature Chemical Biology***, v. 4, n. 11, p. 682–690, 2008.
- HOSSAIN, M.; KUMAR, G.S. DNA binding of benzophenanthridine compounds sanguarine versus ethidium: Comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. ***Journal Chemistry Thermodynamics***, v. 41, p. 764-774, 2009.
- HOLDEN, J. A.; ROLFSON, D. H.; WITTEWER, C. T. Human DNA topoisomerase II: evaluation of enzyme activity in normal and neoplastic tissues. ***Biochemistry***, v. 29, p. 2127, 1990.
- HU, X.; ZHANG, Z. Understanding the Genetic Mechanisms of Cancer Drug Resistance Using Genomic Approaches. ***Trends Genet.***, v. 32, p. 127-137, 2016.
- HUANG, H.; CHEN, Q.; KU, X.; MENG, L.; LIN, L.; WANG, X.; ZHU, C.; WANG, Y.; CHEN, Z.; LI, M.; JIANG, H.; CHEN, K.; DING, J.; LIU, H. A Series of α -Heterocyclic Carboxaldehyde Thiosemicarbazones Inhibit Topoisomerase II α Catalytic Activity. ***Journal of Medicinal Chemistry***, v. 53, n. 8, p. 3048–3064, 2010.
- HUANG, J.; SHIAU, C.; YANG, J.; WANG, D.; CHIU, H.; CHEN, C.; CHEN, A. Development of Small-Molecule Cyclin D1-Ablative Agents. ***Journal of Medicinal Chemistry***, v. 49, n. 15, p. 4684–4689, 2006.
- HUGHES, D. L. ***Org. Prep. Proced. Int.***, v. 25, p. 607, 1993.
- HUMPHREY, R.; KUETHE, J. T. Practical Methodologies for the Synthesis of Indoles. ***Chem. Rev.***, v. 106, p. 2875-2911, 2006.

IHMELS, H.; OTTO, D. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA general principles and recent developments. *Topics in Current Chemistry*, v. 258, p. 161-204, 2005.

INCA. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015, p. 26.

JANARDAN, S.; SUMAN, P.; SWAPNA, G.; AMRITA, A.; PRIYA, R.; SIVA, R.; VIJAYAKRISHNA, K.; SIVARAMAKRISHNA, A. Evaluation of DNA Binding with Some Selected Hydrazide and Semicarbazide Derivatives. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 173, p. 596-608, 2014.

JANGIR, D.K.; DEY, S.K.; KUNDU, S.; MEHROTRA, K. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV-visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques, *J. Photochem. Photobiol. B.*, v.114, p. 38-43, 2012.

JANSSON, P.J.; KALINOWSKI, D.S.; LANE, D.J.R.; KOVACEVIC, Z.; SEEBACHER, N.A.; FOUANI, L.; SAHNI, S.; MERLOT, A.M.; RICHARDSON, D.S. The renaissance of polypharmacology in the development of anti-cancer therapeutics: Inhibition of the "Triad of Death" in cancer by Di-2-pyridylketone thiosemicarbazones. *Pharmacological Research*, v. 100, p. 255-260, 2015.

JL, Y.Y.; ZHU, Y.M.; WANG, J.W. GS-2, a pyrazolo[1,5-a] indole derivative with inhibitory activity of topoisomerase exerts its potent cytotoxic activity by ROS generation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 36, n. 3, p. 1186-1196, 2013.

JOHNSON, A.; ZENG, J.; BAILEY, A.M.; HOLLA, V.; LITZENBURGER, B.; LARA-GUERRA, H.; MILLS, G.B.; MENDELSON, J.; SHAW, K.R.; MARIE-BERSTAM, F. The right drugs at the right time for the right patient: the MD Anderson precision oncology decision support platform. *Drug Discovery Today*, v. 20, p. 1433-1428, 2015.

JOLLY, V. S.; SHARMA, K. P. Studies on Aryl Thiosemicarbazones and 2-Oxothiazolin-2-yl Hydrazones. *Journal of Indian Chemical Society*, v. 67, p. 412-413, 1990.

JONSSON, F.; YIN, L.; LUNDHOLM, C.; SMEDBY, K.E; CZENE, K.; PAWITAN, Y. Low-dose aspirin use and cancer characteristics: a population-based cohort study. *Br. J. Cancer.*, v. 109, p. 1921-1925, 2013.

JORDAN MA, WILSON L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, v. 4, n. 4, p.253-265, 2004.

JOSHI, H.; SENGUPTA, A.; GAVYALA, K.; HAZRA, P. Unraveling the mode of binding of the anticancer drug topotecan with dsDNA. *Royal Society of Chemistry Advances*, v. 4, p. 1015-1024, 2014.

JOULE J.; MILLS, K. Indole: Reactions e synthesis. In: *Heterocyclic Chemistry*, 5th edition, p. 373-400, 2010.

JUNTILA, M.R. DE SAUVAGE, FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, v. 501, p.346-54, 2013.

KABIR, A.; HOSSAIN, M.; KUMAR, G.S. Thermodynamics of the DNA binding of biogenic polyamines: Calorimetric and spectroscopic investigations. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v 57, p. 445-453, 2013.

KADOWAKI, S. MUNEKANE, M.; KITAMURA, Y.; HIROMURA, M.; KAMINO, S.; YOSHIKAWA, Y.; SAJI, H.; ENOMOTO, S. Development of New Zinc Dithiosemicarbazone Complex for Use as Oral Antidiabetic *Agent*. *Biological Trace Element Research*, v. 154, p.111-119, 2013.

KAISER, C.R. RMN 2D: Detecção inversa e Gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química nova*, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.

KALINOWSKI, D.S.; QUACH, P.; RICHARDSON, D.R. Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment. *Future Medicinal Chemistry*. v. 6, p. 1143-1151, 2009.

KAMINSKY, D.; ZIMENKOYSKY, B.; LESYK, R. Synthesis and in vitro anticancer activity of 2,4-azolidinedione-acetic acids derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 3627, 3662, 2009.

KARABATSOS, G. J.; VANE, F. M.; TALLER, R. A.; HSI, N. Structural studies by nuclear magnetic resonance. VIII. Ring-substituted phenylhydrazones, semicarbazones and thiosemicarbazones. *Journal of American Chemical Society*, v. 86, p. 3351-3358, 1964.

KARAH, N. Synthesis and Primary Cytotoxicity Evaluation of New 5-Nitroindole-2,3-dione Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 37, p. 909-918, 2002.

KASHANIAN, S.; DOLATABADI, E.N. DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chem.*, v. 116, p. 743-747, 2009.

KASHYAP, M; KANDEKAR, S; BAVISKAR, A.T; DAS, D.; PREET, R.; MOHAPATRA, P.; SATAPATHY, S.R.; SIDDHARTH, S.; GUCHHAIT, S.K.; KUNDU, C.N.; BANERJEE, U.C. Indenoindolone derivatives as topoisomerase II-inhibiting anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, p. 934-938, 2013.

KATRITZKY, A. R.; RAMSDEN, C. A.; SCRIVEN, E. F. V.; TAYLOR, R; J. K. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Elsevier. V.III, p. 288-315, 2008.

KAUSHIK, N.K.; KAUSHIK, N.; ATTRI, P.; KUMAR, N.; KIM, C.H.; VERMA, A.K.; CHOI, E.H. Biomedical Importance of Indoles. *Molecules*, v. 18 n. 6, p. 6620-6662, 2013

KENIFIC, C.; DEBNATH, J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. *Trends Cell Biol.*, v. 25, n. 1, p. 37-45, 2015.

KHAN, G. S.; SHAH, A.; REHMAN, Z.; BARKER, D. Chemistry of DNA minor groove binding agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 115, p. 105-118, 2012.

KHAN, S.Y.; GUTIÉRREZ-DE-TÉLAN, H.; BOUKHARTA, L.; AGYIST, J. Toward and optimal docking and free energy calculation scheme in ligand design with application to COX-1 inhibitors. *J. Chem Inf. Model.*, v. 54, p. 1488-1499, 2014.

KHANYE, S.D.; SMITH, G.S.; LATEGAN, C.; SMITH, P.J.; CUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; CHIBALE, K. Synthesis and in vitro evaluation of gold(I) thiosemicarbazone complexes for antimalarial activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 104, p. 1079-1083, 2010.

KOIRI, R.K.; TRIGUN, S.K.; DUBEY, S.K.; SINGH, S.; MISHRA, L. Metal Cu(II) and Zn (II) bipyridyls as inhibitors of lactate dehydrogenase. *Biometals*. v. 21, p. 112-126, 2008.

KONTUREK, P.C.; KANIA, J.; BURNAT, G.; HAHN, E.G.; KONTUREK, S.J. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol.*, v. 56, n. 5, p. 57-73, 2005.

KURBANOGU, S.; DOGAN-TOPAL, B.; RODRIGUEZ, E.V.; BOZAL-PALABIYIK, B.; OZKAN, S.A.; USLU, B. Advances in electrochemical DNA biosensors and their interaction mechanism with pharmaceuticals. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 775, p. 9-26, 2016.

KÜÇÜKGÜZEL, S.G.; ORUÇ, E.E.; ROLLAS, S.; SAHIN, F.; OZBEK, A. Synthesis, characterisation and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 37, n. 3, p. 197-206, 2002.

KÜÇÜGÜZEL, S.G.; KOCAYEPE, A.; DE CLERCQ, E.; SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M. Synthesis and biological activity of 4-thiazolidinones, thiosemicarbazides derived from diflunisal hydrazide. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, p. 353-359, 2006.

KUMAR, A.; SALUNKHE, R. V.; RANE, R. A.; DIKE, S. Y. Novel catalytic enantioselective protonation (proton transfer) in Michael addition of benzenethiol to α -acrylacrylates: synthesis of (S)-naproxen and α -arylpropionic acids or esters. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, p. 485-486, 1991.

KUMAR, C.A.; NAGARAJAPRAKASH, R.; VICTORIA, W.; VEENA, V.; SAKTHIVEL, N.; MANIMARAN, B. Synthesis, characterisation and cytotoxicity studies of manganese (I) and rhenium (I) based metallacrown ethers. *Inorganic chem. Communications*. v. 64, p. 39-44, 2016.

KUMAR, K.S.S.; HANUMAPPA, A.; VETRIVEL, N.; HEGDE, M.; GIRISH, Y.R.; BYREGOWDA, T.R.; RAO, S.; RAGHAYAN, S.C.; RANGAPPA, K.S. Antiproliferative and tumor inhibitory studies of 2,3-disubstituted 4-thiazolidinone derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 25, n. 17, p. 3616-3620, 2015.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutation. Research*, v. 659, p. 15-30, 2008.

LAFAYETTE, E.A.; ALMEIDA, S.M.V.; PITTA, M.G.R.; BELTRÃO, E.I.C.; SILVA, T.G.; MOURA, R.O.; PITTA, I.R.; CARVALHO JÚNIOR, L.B.; LIMA, M.C.A. Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. *Molecules*, v. 18, p. 15035-15050, 2013.

LAFAYETTE, E.A. **Síntese de derivados indólicos/acridínicos e avaliação da interação com dna através de técnicas de espectroscopia utilizando brometo de etídio como sonda fluorescente.** 2016. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** 3rd ed., Springer, p. 954, New York, NY, USA 2006.

LARA, L.I.; SLEDJE, A.; LARADJI, A.; OKORO, C.O.; OSHEROFF, N. Novel trifluoromethylated 9-amino-3,4-dihydroacridin-1(2H)-ones act as covalent poisons of human topoisomerase II α . **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 3, p. 586-589, 2017.

LARSEN, A.K.; SKLADANOWSKI, A. Cellular Resistance to Topoisomerase-Targeted Drugs: From Drug Uptake to Cell Death. **Biochemistry Biophysical Acta Gene Structure Expr.**, v. 1400, p. 257-274, 1998.

LAVECCHIA, A.; CARMEN CERCHIA, C. *In silico* methods to address polypharmacology: current status, applications and future perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 21, p. 288-298, 2016.

LE, N.T.V.; RICHARDSON, D.R. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer.** v. 1602, n. 1, p. 31-46, 2002.

LECOUTEY, C.; HEDOU, D.; FRERET, T.; GIANNONI, P.; GAVEN, F.; SINCE, M.; BOUET, V.; BALLANDONNE, C.; CORVAISIER, S.; MALZERT FRÉON, A.; MIGNANI, S.; CRESTEIL, T.; BOULOULARD, M.; CLAEYSEN, S.; ROCHAIS C.; DALLEMAGNE, P. Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 111, p. 3825-3830, 2014.

LEE H. O., MULLINS S. R., FRANCO-BARAZA J.; MATTHILDI VALIANOU, M.; CUKIERMAN, E.; CHENG, J.D. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. **BMC Cancer**, v. 11, p.245, 2011.

LI, G.; LEE, C-S.; WOO, M-H.; LEE, S-H.; CHANG, H-W.; SO, J-K. Lignans from the Bark of *Machilus thunbergii* and their DNA Topoisomerases I and II inhibition and Cytotoxicity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 1147-1150, 2004.

LI, P.; WU, M.; WANG, J.; SUI, Y.; LIU, S.; SHI, D. NAC selectively inhibit cancer telomerase activity: A higher redox homeostasis threshold exists in cancer cells. **Redox Biology**, v. 8, p. 91-97, 2016.

LI, T.K.; LIU, L.F. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 53-77, 2001.

LI, W.; WANG, Z.; GUDURU, V.; ZBYTEK, B.; SLOMINSKI, A.T.; DALTON, J.T.; MILLER, D.D. Structure-activity relationship studies of arylthiazolidine amides as selective cytotoxic agentes for melanoma. *Anticancer Research*, v. 27, n. 2, p. 883-888, 2007.

LI, X.; WANG, Q.; QING, Y.; LIN, Y.; ZHANG, Y.; QIAN, X.; CUI, J. NOvel DNA intercalators without basic side chains as efficient antitumor agentes: Design, synthesis and evaluation of benzo-[c,d]-indol-malononitrile derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chesmitry*, v. 18, p. 3279-3284, 2010.

LIMA, T.S. **Síntese e Avaliação da Atividade Antitumoral de Novos Derivados Indólicos-Carbotioamidas**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

LING, R.; YOSHIDA, M.; MARIANO, P.S. Exploratory Investigations Probing a Preparatively Versatile, Pyridinium Salt Photoelectrocyclization-Solvolitic Aziridine Ring Opening Sequence. *Journal of Organic Chemistry*. v.61, n.13, p. 4439-4449, 1996.

LIU, J.C.; ZHENG, C.J.; WANG, M.X.; LI, Y.R.; MA, L.; HOU, S.; PIAO, H. Synthesis and evaluation of the antimicrobial activities of 3-((5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl)-2-thioxothiazolidin-4-one derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 74, p. 405-410, 2014

LIU, S.; WICHA, M. S. Targeting breast cancer stem cells. *Journal of Clinical Oncology*. v. 28, n.25, p. 4006–4012, 2010.

LIU, X.; XIE, H.; LUO, C.; ToNG, L.; WANG, Y.; PRNG, T.; DING, T.; JIANG, H.; Li, H. Discovery and SAR of thiazolidine-2,4-dione analogues as insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) inhibitors via hierarchical virtual screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, p. 2661-2665, 2010.

LIU, Z.; WU, S.; WANG, Y.; LI, R.; WANG, J.; WANG, L.; ZHAO, Y.; GONG P. Design, synthesis and biological evaluation of novel thieno[3,2-d] pyrimidine derivatives possessing diaryl semicarbazone scaffolds as potent antitumor agentes. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 87, p.782-793, 2014.

LOBANA, T.S.; SHARMA, R.; BAWA, G.; KHANNA, S. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals—An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 253, p. 977–1055, 2009.

LOOK, G.C.; SHUILCK, J.R.; HOLMES, Ch.P.; CHINN J.P.; GORDON, E.M.; GALLOP, M.A. The identification of cyclooxygenase-1- inhibitors from 4-thiazolidinone combinatorial library. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, v. 6, p. 707-712, 1996.

LU, Y.; LV, J.; ZHANG, G.; WANG, G.; LIU, Q. Interaction of an anthracycline disaccharide with ctDNA: Investigation by spectroscopic technique and modeling studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. v. 75 n. 5, p. 1511-1515, 2010.

LUGOVSKOY, A.A.; DEGTEREV, A.I.; FAHMY, A.F.; ZHOU, P.; GROSS, J.D.; YUAN. J.; WAGNER, G. A novel approach for characterizing protein ligand complexes: molecular

basis for specificity of small-molecule Bcl-2 inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 124, n. 7, p. 1234-1240, 2002.

MA, D.L.; CHAN, D.S.H.; LEE, P.; KWAN, M.H.T.; LEUNG, C.H. Molecular modeling of drug-DNA interactions: virtual screening to structure-based design. *Biochimie*, v. 93, p. 1252-1266, 2011.

MACK, D.J.; WEINRICH, M.L.; VITAKU, E.; NJARDARSON, J.T. *Top 200 Brand Name Drugs by US Retail Sales in 2010*, 2010. Disponível em: <<http://cbc.arizona.edu/njardarson/group/top-pharmaceuticalsposter>>. Acesso em 10 de nov. 2016.

MALUMBRES, M. e BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, p. 153 - 166, 2009.

MARCHAND, C.; POMMIER, Y. Topoisomerases Inhibitors: A Paradigm for Interfacial Inhibition. In: _____. *DNA Topoisomerases and Cancer*. Springer, New York, 2012, p. 175-184.

MARSICO, G.; GORMALLY, M.V. Small molecule inhibition of FOXM1: How to bring a novel compound into genomic context. *Genomics Data*, v. 3, p.19–23, 2015.

MASUTOMI, K.; POSSEMATO, R.; WONG, J.M.; CURRIER, J.L.; TOTHOVA, Z.; MANOLA, J.B.; HAHN, W.C. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.*, v. 102, p. 8222-8227, 2005.

MATESANZ, A.I.; LEITAO, I.; SOUZA, P. Palladium (II) and platinum (II) bis (thiosemicarbazone) complexes of the 2,6-diacetylpyridine series with high cytotoxic activity in cisplatin resistant A2780cisR tumor cells and reduced toxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 125, p. 23-31, 2013.

MATI, S.S.; ROY, S.S.; CHALL, S.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA CHANDRA, S. Unveiling the Groove Binding Mechanism of a Biocompatible Naphthalimide-Based Organoselenocyanate with Calf Thymus DNA: An “Ex Vivo” Fluorescence Imaging Application Appended by Biophysical Experiments and Molecular Docking Simulations. *Journal Physical Chemistry B*, v. 117, p. 14655-14665, 2013.

MCGHEE, J.D.; VON HIPPEL, P.H. Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *Journal Molecular Biology*, v. 86, p. 469–489, 1974.

MERIC-BERNSTAM, F.; MILLS, G.B. Overcoming implementation challenges of personalized cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.*, v. 9, p.542–548, 2012.

MIZUSHIMA, N.; LEVINE, B.; CUERVO, A.M.; KLIONSKY, D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, v.451, p.1069-1075, 2008.

MOHD RASHID, ASIF HUSAIN, MOHAMMAD SHAHARYAR, RAVINESH MISHRA, AFZAL HUSSAIN, OBAID AFZAL. Design and synthesis of pyrimidine molecules endowed with thiazolidin-4-one as new anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 83, p. 630-645, 2014.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 83, p. 757-766, 1991.

MONROIG, P.C.; CHEN, L.; ZHANG, S.; CALIN, G.A. Small molecule compounds targeting miRNAs for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 81, p. 104–116, 2015.

NGUYEN-NIELSEN, M.; LIEDE, A.; MAEGBAEK, M.L.; BORRE, M.; HARVING, N.; HERNANDEZ, R.K.; SORENSEN, H.T.; EHRENSTEIN, V. Survival and PSA-markers for mortality and metastasis in nonmetastatic prostate cancer treated with androgen deprivation therapy. *Cancer Epidemiology*, v. 39, n. 4, p. 623-632, 2015.

NICOLAU, K.C.; SNYDER, S.A. **Classical in Total Synthesis II**. Wiley-VCH, Weinheim, p. 658, 2003.

NITISS, J.L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, v. 9, p. 338-350, 2009.

NURSE, P.; MASUI, Y.; HARTWELL, L. Understanding the cell cycle. *Nat. Med.*, v. 4, p. 1103–1106, 1998.

OLIVEIRA, J.F.; SILVA, A.L.; VENDRAMINI-COSTA, D.B.; AMORIM, C.A.C.; CAMPOS, J.F.; RIBEIRO, A.G.; MOURA, R.O.; NEVES, J.L.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; LIMA, M.C.A. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 104, p. 148-156, 2015.

OLIVEIRA, J.F.; NONATO, F.R.; ZAFRED, R.R.; LEITE, N.M.; RUIZ, A.L.; CARVALHO, J.E.; SILVA, A.L.; MOURA, R.O.; ALVES DE LIMA M. C. Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (E)-N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 80, p. 388-392, 2016.

OLSON, O.C.; JOYCE, J.A. Microenvironment-mediated resistance to anticancer therapies. *Cell Research*, v. 23, p. 179–181, 2013.

OMOTE, Y.; FUKADA, N.; SUGIYAMA, N., ZASSHI, N. K., v. 90, p. 1283, 1969.

ONEM-BAYRAM, F.E.; DURMAZ, I.; SCHERMAN, D.; HERSCOVICI, J.; ETIN-ATALAY, R. A novel thiazolidine compound d induces caspase-9 dependent apoptoss in câncer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 17, p. 5094-5102, 2012.

OPREA, T.I.; MESTRES, J. Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs. *AAPS Journal*, v. 14, n. 4, p.759-763, 2012.

OTTANÀ, R.; CAROTTI, S.; MACCARI, R.; LANDINI, I.; CHIRICOSTA G.; CACIAGLI, B.; VIGORITA, M.G.; MINI, E. In vitro antiproliferative activity against human colon cancer

cell lines of representative 4-thiazolidinones. Part I. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 17, p. 3930-3933, 2005.

OUYANG, R.; YANG YANG, Y.;XIAO TONG, X.;YAOQIN YANG, Y.; HUIHONG TAO, H.; TIANYU ZONG, T.; KAI FENG, K.; PENG PENG JIA, P.; PENGHUI CAO, P.; NING GUO, N.; HAIZHOU CHANG, H.; SHUANG ZHOU, S.; YUQING MIAO, Y. Potential anti-cancer activity of a novel Bi(III) containing thiosemicarbazone derivative. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 73, p. 138-141, 2016.

PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P.J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 497-503, 2007.

PAKRAVAN, P.; MASOUDIAN, S. Study on the Interaction between Isatin- β -Thiosemicarbazone and Calf Thymus DNA by Spectroscopic Techniques. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 111-123, 2015.

PAPASTAIKOUDI, T. S.; TSOTINIS, A.; RAPTOPOULOU, C.; SAMBANI, C.; THOMOU, H. Synthesis of New Alkylaminoalkyl Thiosemicarbazones of 3- Acetyldole and their Effect on DNA Synthesis and Cell Proliferation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 30, p. 107-114, 1995.

PAPE, V.F.S.; TOTH, S.; FÜREDI, A.; SZEKENYI, K.; LOVRICS, A.; SZABO, P.; WIESE, M.; SZAKACS, G. Design, synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazones, hydrazinobenzothiazoles and arylhydrazones as anticancer agents with a potential to overcome multidrug resistance. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 117, p. 335-354, 2016.

PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**, In:_____. 5^a ed. Oxford: University Press, 2013. p. 200-208.

PAUL, B.K. AND GUCHHAIT, N. Exploring the Strength, Mode, Dynamics, and Kinetics of Binding Interaction of a Cationic Biological Photosensitizer with DNA: Implication on Dissociation of the Drug–DNA Complex via Detergent Sequestration. **Journal Physical Chemistry B**, v. 115, p. 11938-11949, 2011.

PAULÍKOVÁ, H.; VANTOVÁ, Z.; HUNÁKOVÁ, L.; ČIŽEKOVÁ, L.; ČARNÁ, M.; KOŽURKOVÁ, M.; SABOLOVÁ, D.; KRISTIAN, P.; HAMULÁKOVÁ, S.; IMRICH, J. DNA binding acridine–thiazolidinone agents affecting intracellular glutathione. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 7139-7148, 2012.

PENG, Q.; YANG, S.; LAO, X.; TANG, W.; CHEN, Z.; LAI, H. WANG, J.; SUI, J.; QIN, X.; LI, S. Meta-analysis of the association between COX-2 polymorphisms and risk of colorectal cancer based on case-control studies. **PLoS One**, v. 9, e94790, 2014.

PINDUR, U.; JANSEN, M.; LEMSTER, T. Advances in DNA-ligands with groove binding, intercalating and/or alkylating activity: chemistry, DNA binding and biology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2805-2847, 2005.

- PINGAEW, R.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Synthesis and cytotoxicity of novel N-sulfonyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline thiosemicarbazone derivatives. *Med. Chem. Res.*, v. 22, n. 1, p. 267–277, 2013.
- PIZZOLATO, J.F.; SALTZ, L.B. The camptothecins. *Lancet*, v. 361, p. 2235-2242, 2003.
- POMMIER, Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology and interfacial inhibition. *Chemical Reviews*, v. 109, p. 2894-2902, 2009.
- POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs, *Chemical Biology*, v. 17, p. 421-433, 2010.
- POMMIER, Y.; MARCHAND, C. Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 11, p. 25-36, 2012.
- POMMIER, Y. DNA Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges. *ACS chemical biology*, v. 8, n. 1, p. 82-95, 2013.
- POPOVIC-BIJELIC, A.; KOWOL, C.R.; LIND, M.E.; LUO, J.; HIMO, F.; ENYEDY, E.A.; ARION, V.B.; GRASLUND, A. Ribonucleotide reductase inhibition by metal complexes of Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): a combined experimental and theoretical study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 105, p. 1422-1431, 2011.
- POVIRK, L.F.; SHUKER, D.E. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutation Research*, v. 318, p.205–26, 1994.
- PRABHAKARAN, P.; KALAIVANI, P.; POORNIMA, P.; DALLEMER, F.; HUANG, R.; PADMA, V.V.; NATARAJAN, K.; Synthesis, DNA/protein binding and in vitro cytotoxic studies of new palladium metallothiosemicarbazones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 6742-6752, 2013.
- PRATI, F.; ULIASSI, E.; BOLOGNESI, M.L. Two diseases, one approach: multitarget drug discovery in Alzheimer's and neglected tropical diseases. *Med. Chem. Commun.*, v. 5, p. 853-861, 2014.
- RAVELLI RB, GIGANT B, CURMI PA, JOURDAIN I, LACHKAR S, SOBEL A, KNOSSOW M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*, v. 428(6979), p. 198-202, 2004.
- RAWAL, R. K.; TRIPATHI, R.; KATTI, S. B.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERCQ E. Design, synthesis, and evaluation of 2-aryl-3-heteroaryl-1,3-thiazolidin-4-ones as anti-HIV agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. v. 15, n. 4, p. 1725–1731, 2007.
- REDDEL, RR. Telomere maintenance mechanisms in human cancer: clinical implications. *Curr. Pharm Des.*, v. 20, p. 6361-6374, 2014.
- REED, J.C. Apoptosis-based therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, n. 2, p. 111-121, 2002.

RESCIFINA, A.; ZAGNI, C.; VARRICA, M.G.; PISTARÀ, V.; CORSARO, A. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 74, p. 95-115, 2014.

REVELANT, G.; HUBER-VILLAUME, S.; DUNAND, S.; KIRSCH, G.; SCHOHN, H.; HESSE, S. Synthesis and biological evaluation of novel 2-heteroarylimino-1,3-thiazolidin-4-ones as potential antitumor agentes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 94, p. 102-112, 2015.

ROCA, J. Topoisomerase II: a fitted mechanism for chromatin landscape. *Nucleic Acids Res.*, v. 37, n. 3, p. 721-730, 2009.

ROSKOSKI JR., R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, v. 94, p. 9–25, 2015.

SALA, M.; CHIMENTO, A.; SATURNINO, C.; GOMEZ-MONTERREY, I.M.; MUSELLA, S.; BERTAMINO, A.; MILITE, C.; SINICROPI, M.S.; CARUSO, A.; SIRIANNI, R.; TORTORELLA, P.; NOVELLINO, E.; CAMPIGLIA, P.; PEZZI, V. Synthesis and cytotoxic activity evaluation of 2,3-thiazolidin-4-one derivatives on human breast cancer cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, p. 4990-4995, 2013.

SALEH, A.M.; AL-ASAD, R.M.; EL-ABADELAH, M.M.; SABRI, S.S.; ZAHRA, J.A.; ALASKAR, A.S.; ALJADA, A. Synthesis and Biological Evaluation of New Pyridone-Annelated Isoindigos as Anti-Proliferative Agents. *Molecules*, v. 19, p. 13076-13092, 2014.

SAMADI, A.K.; BILSLAND, A.; GEORGAKILAS, A.G.; AMEDEI, A.; BISHAYEE, A.A.; AZMI, A.S.; LOKESHWAR, B.L.; GRUE, B.; PANIS, C.; BOOSANI C.S.; POUDYAL, D.; STAFFORINI, D.M.; BHAKTA, D.; NICCOLAI, E.; GUHA G.; VASANTHA RUPASINGHE, H.P.; FUJII, H.; HONOKI, K.; MEHTA K.; AQUILANO, K.,; LOWE, L.; HOFSETH, L.J.; RICCIARDIELLO, L.; CIRIOLO M.R.; SINGH, N.; WHELAN, R.L.; CHATURVEDI, R.; ASHRAF, S.S.; SHANTHA KUMARA, H.M.; NOWSHEEN, S.; MOHAMMED, S.I.; KEITH, W.N.; HELFERICH, W.G.; YANG, X. A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. *Seminars in Cancer Biology*. v. 35, p. 151-154, 2015.

SAMALA, G.; DEVI, P.B.; NALLANGI, R.; SRIDEVI, P. J.; SAXENA, S.; YOGESHWARI, P.; SRIRAM, D. Development of novel tetrahydrothieno[2,3-c]pyridine-3-carboxamide based Mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase inhibitors: Molecular hybridization from known antimycobacterial leds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 1938-1947, 2014.

SÁNCHEZ-PERIS, M.; FALOMIR, E.; MURGA, J.; CARDA, M.; MARCO, J.A. Synthesis and evaluation of biphenyl derivatives as potential downregulators of VEGF protein secretion and telomerase-related gene expressions. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. v. 24, n. 14, p. 3108-3115, 2016.

SARETZKI, G. Extra-telomeric functions of human telomerase cancer, mitochondria and oxidative stress. *Curr. Pharm Des.*, v. 20, p. 6386-6403, 2014.

SARKER, S.D.; NAHAR, L. **Química para estudantes de farmácia: Química Geral, Orgânica e Produtos Naturais**, 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 143-144.

SARODNICK, G.; HEYDENREICH, M.; LINKER, T.; KLEINPETER, E. Quinoxalines. Part 12: Synthesis and Structural Study of 1-(Thiazol-2-yl)-1Hpyrazolo[3,4-]quinoxalines – The Dehydrogenative Cyclization with Hydroxylamine Hydrochloride. **Tetrahedron**, v. 59, p. 6311- 6321, 2003.

SEEBACHER, W.; BRUN, R.; WEIS, R. New 4-aminobicyclo[2.2.2]octane derivatives and their activities against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma b. rhodesiense*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 21, p. 225-233, 2004.

SERDA, M.; MALECKI, J.G.; MROZEK-WILCZKIEWICZ, A.; MUSIOL, R.; POLANSKI, J. Microwave assisted synthesis, X-ray crystallography and DFT calculations of selected aromatic thiosemicarbazones. **Journal of Mol. Struct.**, v. 1037, p. 63–72, 2013.

SHAHABADI, N.; HEIDARI, L. Binding studies of the antidiabetic drug, metformin to calf thymus DNA using multispectroscopic methods. **Spectrochim. Acta A**. v. 97, p. 406–410, 2012.

SHAPIRO, G. I. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24(11), p.1770–1783, 2006.

SHANG, E.; YUAN, Y.; CHEN, X.; LIU, Y.; PEI, J.; LAI, L. *De novo* design of multitarget ligands with interative fragment-growing strategy. **J. Chem Inf Mode.**, v. 54, p. 1235-1241, 2014.

SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAK, D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review. **Journal Heterocyclic Chemistry**, v. 47, p. 491-502, 2010.

SHAY, J.R.; WRIGHT, W.E. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 577-584, 2006.

SHENG, C.; MIAO, Z.; ZHANG, W. Chapter 1 – Topoisomerase I Inhibitors Derived from Natural Products: Structure–Activity Relationships and Antitumor Potency. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 47, p. 1-28, 2016.

SHERER, C.; SNAPE, T.J. Heterocyclic scaffolds as promising anticancer agentes against tumours of the central nervous system: exploring the scope of indole and carbazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, n. x, p. 552-560, 2015.

SHIMAZAKI, Y.; YAJIMA, T.; TALANI, M.; YAMAUCHI, O. Metal complexes involving indole rings: Structures and effects of metal-indole interactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 479-492, 2009.

SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 813-823, 2006.

SHREE, T.; OLSON O.C.; ELIE B.T.; ELIE, B.T.; KESTER, J.C.; GARFALL, A.L.; SIMPSON, K.; BELL-MCGUINN, K. M.; ZABOR, E.C.; BROGI, E.; JOYCE, J.A. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast câncer. *Genes Development*, v. 25, p. 2465–2479, 2011.

SILVA, C.S. **Determinação da estrutura cristalina/molecular de um derivado da tiossemicarbazona com atividade farmacológica, tetralona-tiossemicarbazona**. 2013, 77 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2013.

SANTIAGO, P.B.G.S. **Síntese, Avaliação Microbiológica e Citotóxica de Novas Tiazolidina-2,4-Dionas e 4-Tioxo-Tiazolidina-2-Onas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). 2014. 87 f. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. In: _____. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013. p. 305-312.

SINGHAPOL, C., PAL, D.; CZAPIEWSKI, R., PORIKA, M.; NELSON, G.; SARETZKI, G.C. Mitochondrial telomerase protects câncer cells from nuclear DNA damage and apoptosis. *PLos One*, v. 8, e52989, 2013.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 124, p. 1-19, 2013.

SMITH, T.T.; ROTH, J.C.; FRIEDMAN, G.K.; GILLESPIE, G.Y.; Oncolytic viral therapy: targeting cancer stem cells. *Dove Medical Press*. v. 3, p. 21-33, 2013.

STARIAT, J. SUPRUNOVÁ, V.; ROH, J.; ŠESTÁK, V.; EISNER, T.; FILIPSKÝ, T.; MLADĚNKA, P.; NOBILIS, M.; ŠIMŮNEK, T.; KLIMEŠ, J.; KALINOWSKI, D.S.; RICHARDSON, D.R.; KOVARÍKOVÁ, P. Simultaneous determination of the novel thiosemicarbazone anti-cancer agent, Bp4eT, and its main phase I metabolites in plasma: Application to a pilot pharmacokinetic study in rats. *Biomedical Chromatography*, v. 28, p. 621–629, 2013.

SWARTZ, M.A.; LUND, A.W. Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: Linking mechanobiology with immunity. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, p. 210-219, 2012.

SWAT, A.; DOLADO I.; ROJAS, J.M.; NEBREDÁ, A.R. Cell density-dependent inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by p38a mitogen-activated protein kinase via sprouty2 downregulation. *Molecular and Cellular Biology*, v. 29, n. 12, p. 3332–3343, 2009.

TENÓRIO, R.P.; CARVALHO, C.S.; PESSANHA, C.S.; LIMA, G.J.; FARIA, R.A.; ALVES, A.J.; MELO, E.J.T.; GÓES, A.J.S. Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 10, p. 2575–2578, 2005.

TENÓRIO, R.P.; GÓES, A.J.S.; LIMA, G.J.; FARIA, R.A.; ALVES, A.J.; AQUINO, T.M. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Química Nova*, v. 28 n. 6, p. 1030-1037, 2005.

TIWARI, V.K.; BURGER, L.; NIKOLETOPOULOU, V.; DEOGRACIAS, R.; THAKURELA, S.; WIRBELAUER, C.; KAUT, J.; TERRANOVA, R.; HOERNER, L.; MIELKE C.; BOEGE, F.; MURR, R.; PETERS, A.H.; BARDE, Y.A.; SCHUBELER, D. Target genes of Topoisomerase II β regulate neuronal survival and are defined by their chromatin state, *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.*, v. 109, n. 16, p. 934-943, 2012.

TOLBA, R.H.; FET, N.; YONEZAWA, K.; TAURA, K.; NAKAJIMA, A.; HATA, K.; OKAMURA, Y.; UCHINAMI, H.; KLINGE, U.; MINOR, T. Role of preferential cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam in ischemia/reperfusion injury of the rat liver. *Eur. Sur. Res.*, v. 53, p. 11-24, 2014.

TORRE, L.A.; BRAY, R.L.; SIEGEL, J.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JERNAL, A. Global cancer statistics, 2012. *Cancer J. Clin.*, v. 65, p.87-108, 2015.

TOSCHI, A.; LEE, E.; XU, L.; GARCIA, A.; GADIR, N.; FOSTER, D.A. Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Molecular Cell Biology*. v. 29, p. 1411-1420. 2009.

TRIPATHI, A.C.; GUPTA, S.J.; FATIMA, G.N.; SONAR, P.K.; VERMA, A.; SARAF, S.K. 4-Thiazolidinones: the advances continue. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 72, p. 52-77, 2014.

TROST, B. M.; KEELEY, D. E. New synthetic methods secoalkylative approach to grandisol. *J. Org. Chem.* v. 40, p. 2013, 1975.

URADE, M. Cyclooxygenase (COX)-2 as a potent molecular target for prevention and therapy of oral cancer. *Japanese Dental Science Review*, v. 44, n. 1, p. 57–65, 2008.

VERÇOZA, G.L; FEITOZA, D.D.; ALVES, A.J.; AQUINO, T.M.; LIMA, J.G.; ARAÚJO, J.M.; CUNHA, I.G.B.; GÓES, A.J.S. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novas 4-tiazolidinonas obtidas a partir de formilpiridina tiossemicarbazonas. *Química Nova*, v. 32, n.6, 2009.

VICHA, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, v. 1, p. 1112-1116, 2006.

VIDEIRA, M.; REIS, R.L.; BRITO, M.A. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, v. 1846, p. 312-325, 2014.

VO, B.T.; MORTON, D. JR, KOMARAGIRI, S.; MILLENA, A.C.; LEATH, C.; KHAN, S.A. TGF- β effects on prostate cancer cell migration and invasion are mediated by PGE2 through activation of PI3K/AKT/mTOR pathway. *Endocrinology*. v. 154 n. 5, p.1768-79 2013.

ZEGLIS, B.M., DIVILOV, V., LEWIS, J.S. Role of Metalation in the Topoisomerase II α inhibition and antiproliferation activity of a series of α -heterocyclic-N 4-substituted thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, n. 7, p. 2391-2398, 2011.

ZEIDNER, J.F.; KARP, J.E.; BLACKFORD, A.L.; SMITH, B.D.; GOJO, I.; GORE, S.D.; LEVIS, M.J.; CARRAWAY, H.E.; GREER, J.M.; IVY, S.P.; PRATZ, K.W.; MCDEVITT, M.A.; A phase II trial of sequential ribonucleotide reductase inhibition in aggressive myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, v. 99, n. 4, p. 672-678, 2014.

ZELENAY, S.; VAN DER VEEN, AG.; BÖTTCHER, J.P.; SNELGROVE, K.J.; ROGERS, N.; ACTON, S.E.; CHAKRAVARTY, P.; GIROTTI, M.R.; MARAIS, R.; QUEZADA, S.A.; SAHAI, E.; REIS E SOUSA, C. Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell*. v. 162, n. 6, p. 1257-1270, 2015.

ZHANG, C.; QU, Y.; NIU, B. Synthesis and biological evaluation of lapachol derivatives possessing indole scaffolds as topoisomerase I inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 22, p. 5781-5786, 2016.

ZHANG, G.; HU, X.; FU, P. Spectroscopic studies on the interaction between carbaryl and calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a fluorescence probe. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 108, p. 53-61, 2012.

ZHANG, L.Z.; TANG, G.-Q. The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v. 74, p. 119-125, 2004.

ZHANG, S.; LIU, X.; BAWA-KHALFE, T.; LU, L-S.; LYU, L. et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat. Med.*, v. 18, n. 11, p. 1639-1242, 2012.

ZHANG, X.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; YANG, Z. The interaction of taurine-salicylaldehyde Schiff base copper(II) complex with DNA and the determination of DNA using the complex as a fluorescence probe. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 77, p. 1-5, 2010.

ZHOU, C.Y.; XI, X.L.; YANG, P. Studies on DNA binding to metal complexes of sal(2)trien. *Biochemistry*, v. 72, p. 37-43, 2007.

ZHU, J.; CHEN, L.; DONG, Y.; LI, J.; LIU, X. Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-Hydroxymethyl-2-furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and biomolecular Spectroscopy*. v. 124, p. 78-83, 2014.

YALOWICH, J.C.; WU, X.; ZHANG, R.; KANAGASABAI, R.; HORNBAKER, M.; HASINOFF, B.B. The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II α . *Biochemical Pharmacology*, v. 84, p. 52-58, 2012.

YAMAUCHI, O.; TAKANI, M.; TOYODA, K.; MASUDA, H. *Inorg. Chem.*, v. 29, p. 1856, 1990.

YAO, B.L.; MAI, Y.M.; CHEN, S.B.; XIE, H.T.; YAO, P.F.; OU, T.M.; TAN, J.H.; WANG, H.G.; LI, D.; HUANG, S.L.; GU, L.Q.; HUANG Z.S. Design, synthesis and biological evaluation of novel 7-alkylamino substituted benzo[a]phenanzin derivatives as dual

topoisomerase I/II inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 92, p. 540-553, 2015.

YUTKIN, V.; CHIN, J. Apaziquone as an intravesical therapeutic agent for urothelial non-muscle-invasive bladder cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs*, v. 21, p. 251–260, 2012.

WALL, M.E.; WANI, M.C.; COOK, C.E.; PALMER, K.H.; MCPHAIL, A.I.; SIM, G.A. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 88, p. 3880-3890, 1966.

WANG, D.; DUBOIS, R.N. Eicosanoids and cancer. *Nat. Ver. Cancer*, v.10, p. 181-193, 2010.

WANG, J.C. DNA topoisomerases. *Ann. Ver. Biochem*, v. 65, p. 635-692, 1998.

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, v. 3, p. 430–440, 2002.

WANG, Q.; LI, W.; LIU, A.; ZHANG, B.; GAO, F.; LI, S.; LIAO, X. Binding and photocleavage of a neutral nickel (II) bis(hydrogen pyridine-2,6-dicarboxylato) complex DNA. *Journal of Molecular Structure*, v. 985, p. 129-133, 2011.

WENG, J. R.; TSAI, C. H.; KULP, S. K.; CHEN, C. S. *Cancer Letters*, v. 262, p. 153-63, 2008.

WEST, D.X.; MOKIJEWSKI, B.L.; GEHREMEDHIN, H.; ROMACK, T.J. *Transition Met. Chem*. v. 17, p. 384, 1992.

WHO. World Health Organization. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

WOLFE, A.; SHIMER JR., G.H.; MEEHAN, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. *Biochemistry*, v. 26, p. 6392-6396, 1987.

WU, J.; YU, L.; YANG, F.; LI, J.; WANG, P.; ZHOU, W.; QIN, L.; LI, Y.; LUO, J.; YI, Z.; LIU, M.; CHEN, Y. Optimization of 2-(3-(arylalkyl amino carbonyl) phenyl)-3-(2-methoxyphenyl)-4-thiazolidinone derivatives as potent antitumor growth and metastasis agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 80, p. 340-351, 2014.

APÊNDICE A – Artigo publicado no periódico *European Journal of Medicinal Chemistry*



Qualis: A2 - Farmácia

Fator de Impacto: 3.902

Jamerson Ferreira de Oliveira; Talitha Santos Lima; Débora Barbosa Vendramini-Costa; Sybelle Christianne Batista de Lacerda Pedrosa; Elizabeth Almeida Lafayette; Rosali Maria Ferreira da Silva; Sinara Monica Vitalino de Almeida; Ricardo Olímpio de Moura; Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz; João Ernesto de Carvalho; Maria do Carmo Alves de Lima. Thiosemicarbazones and 4-Thiazolidinones Indole-based derivatives: synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 136, p. 305-314, 2017.

Thiosemicarbazones and 4-Thiazolidinones Indole-based derivatives: synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay

Jamerson Ferreira de Oliveira^a; Talitha Santos Lima^a; Débora Barbosa Vendramini-Costa^{b,c}; Sybelle Christianne Batista de Lacerda Pedrosa^d; Elizabeth Almeida Lafayette^e; Rosali Maria Ferreira da Silva^f; Sinara Monica Vitalino de Almeida^g; Ricardo Olímpio de Moura^h; Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz^b; João Ernesto de Carvalho^{b,i}; Maria do Carmo Alves de Lima^{a,*}

^a*Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Antibióticos (DANTI), 50670-901, Recife, PE (Brazil)*

^b*Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) 13083-970, Campinas, SP (Brazil)*

^c*Cancer Biology, Fox Chase Cancer Center, 19111, Philadelphia, PA (USA)*

^d*Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Colegiado de Ciências Farmacêuticas (CFARM), 56304-205, Petrolina, PE (Brazil)*

^e*Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Departamento de Química e Física (DQF), 58397-000, Areia, PB (Brazil)*

^f*Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCFAR), 50670-901, Recife-PE, Brazil*

^g*Universidade de Pernambuco (UPE), Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), 55290-000, Garanhuns-PE, Brazil*

^h*Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Departamento de Farmácia, 58429-500, Campina Grande, PB (Brazil)*

ⁱ*Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), 13083-970, Campinas, SP (Brazil)*

*To whom correspondence should be addressed: Maria do Carmo Alves de Lima; Phone number: +55 8121268347; Fax: +55 8121268346.

Received Date: 30 January 2017 / Revised Date: 4 May 2017 / Accepted Date: 6 May 2017

Abstract

In this study, we report the synthesis and structural characterization of a series of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinones derivatives, as well as their *in vitro* antiproliferative activity against eight human tumor cell lines. For the most potent compound further studies were performed evaluating cell death induction, cell cycle profile, ctDNA interaction and topoisomerase II α inhibition. A synthetic three-step route was established for compounds (**2a-e** and **3a-d**) with yields ranging from 32-95%. Regarding antiproliferative activity, compounds **2a-e** and **3a-d** showed mean GI₅₀ values ranging between 1.1 μ M (**2b**) - 84.65 μ M (**3d**). Compound **2b** was the most promising especially against colorectal adenocarcinoma (HT-29) and leukemia (K562) cells (GI₅₀ = 0.01 μ M for both cell lines). Mechanism studies demonstrated that 24h-treatment with compound **2b** (5 μ M) induced phosphatidylserine residues exposure and G2/M arrest on HT-29 cells. Moreover, **2b** (50 μ M) was able to interact with ctDNA and inhibited topoisomerase II α activity. These results demonstrate the importance of thiosemicarbazone, especially the derivative **2b**, as a promising candidate for anticancer therapy.

Keywords: Medicinal chemistry; anticancer therapy; cellular death; DNA interaction; topoisomerase inhibition.

1 Introduction

Cancer remains a major health problem with 14.1 million new cases and 8.2 million deaths by cancer in 2012 worldwide [1]. Although chemotherapy is one of the main therapeutic options for cancer, this form of treatment has limitations such as the possibility of severe adverse effects and the development of resistance. Moreover, as cancer is a group of diseases, there is no specific treatment for some kinds of tumors. In this context, the continuous research and development of new chemical entities is of great relevance for cancer therapy [2].

Among the available cancer therapeutic targets, DNA remains as an attractive target for the development of new drugs that can bind to its structure and artificially alter and/or inhibit its function [3]. Extensive chemical and biochemical studies have characterized a variety of molecules that can react with DNA, conferring various pharmacological effects, such as antibiotic, antitumor, antiviral or antiprotozoal [4]. Once drugs bind to DNA and protein interfaces, the activity of enzymes that metabolize the DNA, such as topoisomerase can be inhibited by the induction of cell death [5].

Topoisomerases are ubiquitous enzymes that alter DNA topology by relieving supercoiling-associated tension in double stranded DNA. These enzymes can perform their function by transiently cutting one strand (type I topoisomerases, Top1) or both DNA strands (type II topoisomerases, Top2) [6]. The ubiquitous presence and crucial biological roles of topoisomerases explain their prevalence as therapeutic target [5]. Moreover, it is widely known that cancer cells possess high levels of topoisomerase activity and show remarkable sensitivity to DNA-targeted drugs [7].

Most clinical drugs that target Top1 or Top2 convert the topoisomerase-associated DNA breaks (known as topoisomerase cleavage complexes) into irreversible DNA damage that initiates the apoptotic program [8]. These topoisomerase-targeted drugs, referred to as topoisomerase poisons, stabilize the topoisomerase cleavage complexes by preventing DNA religation [6]. In addition to their role in the initiation of apoptosis, a growing number of studies show that Top1 and Top2 also participate directly in the execution of the apoptotic program [9]. Since topoisomerase inhibitors can trigger cell death by apoptosis, the elucidation of the relationship between these mechanisms provide opportunities to develop novel therapeutic strategies.

In this context, thiosemicarbazones arise as a promising class of molecules, due to their reported antiproliferative activity in human tumor cell lines [10-12] and associated

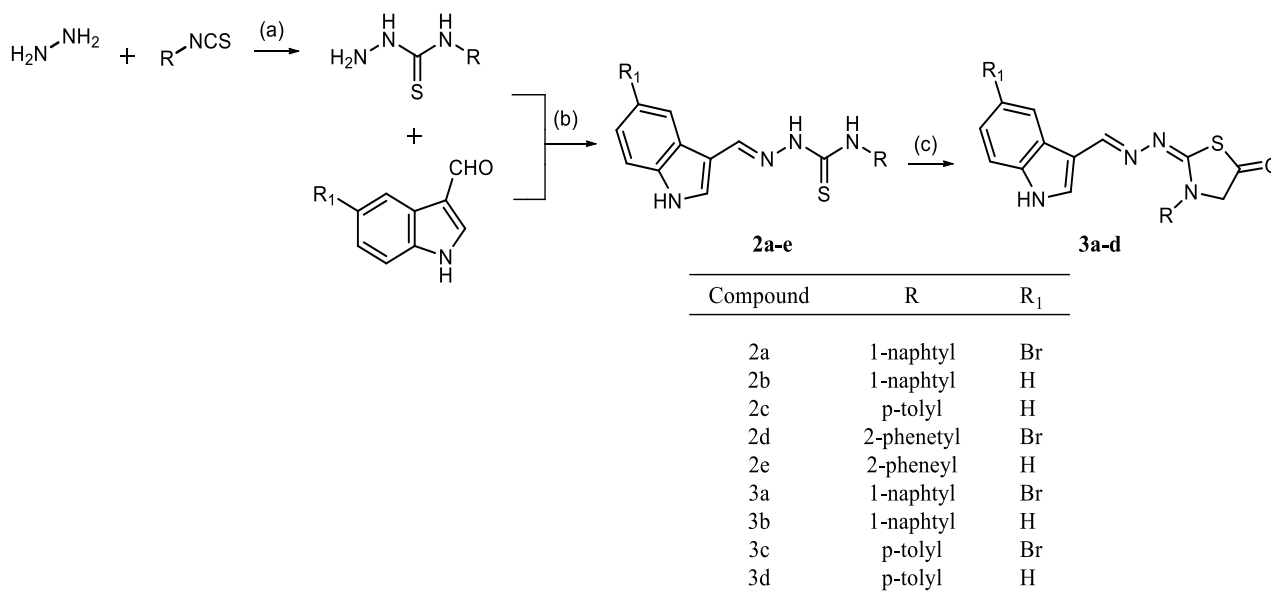
mechanisms of action, including the ability of interacting with DNA and topoisomerase inhibition [13-16]. Recent studies in our research group have shown that thiophene-thiosemicarbazone and acridine-thiosemicarbazone derivatives are promising for antitumor activity, presenting the ability to interfere in the cell cycle and to interact with DNA [12,14]. Additionally, the indole nucleus has also been disclosed as a privileged structure in the design of new molecules [17-19].

Continuing our studies with thiosemicarbazone derivatives, this study aimed to synthesize a new series of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinones exploring the indole heterocycle. The antiproliferative activity of the new series was evaluated in a panel of eight human tumor cell lines and the most active derivative (compound **2b**) was selected for evaluation of cell death induction, cell cycle profile, DNA interaction and topoisomerase inhibition.

2 Results and Discussion

2.1 Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinones derivatives

The synthesis of thiosemicarbazone (**2a-e**) and 4-thiazolidinones (**3a-d**) derivatives was performed in three steps (Scheme 1). First, a nucleophilic addition reaction between hydrazine and substituted isothiocyanates afforded a thiosemicarbazide. Then, the synthesized thiosemicarbazides reacted with indole-3-carboxaldehyde, in the presence of a catalytic amount of AcOH, via condensation reaction, leading the thiosemicarbazones [12]. Afterwards, the obtained thiosemicarbazone derivatives were treated with ethyl-2-chloroacetate and sodium acetate affording the respective *N*-3-substituted-4-thiazolidinones [20, 21]. The yields ranged from 32 to 95%



Scheme 1. Synthesis of thiosemicarbazones (**2a-e**) and 4-thiazolidinone (**3a-d**) derivatives. Reagents and conditions: (a) CHCl_3 , room temperature; (b) AcOH (few drops), EtOH , room temperature; (c) $\text{ClCH}_2\text{COOEt}$, sodium acetate, EtOH , reflux.

After crystallization, the thiosemicarbazone (**2a-e**) and 4-thiazolidinones (**3a-d**) structures were determined by ^1H and ^{13}C NMR, IR and high-resolution mass.

In general, the IR spectrum of thiosemicarbazones **2a-e** displayed stretching of $\text{C}=\text{N}$ and $\text{C}=\text{S}$ bonds around $1537\text{--}1547$ and $1203\text{--}1243\text{cm}^{-1}$, respectively. Thus, the predominance of the thione form of the synthesized thiosemicarbazones was confirmed through the absence of absorption in the $2500\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ region [22, 23]. For the 4-thiazolidinones **3a-d**, the IR spectra showed bands at $1398\text{--}1362\text{ cm}^{-1}$ characteristic of NCS bending vibration, providing evidence of ring closure [24, 25]. Finally, the IR spectra of **3a-d** displayed $\text{C}=\text{O}$ absorbance in the $1701\text{--}1722\text{ cm}^{-1}$ region [26].

All the compounds synthesized showed in ^1H NMR signals at δ 7.88–7.17 ppm corresponding to protons related to a phenyl group besides a singlet between δ 7.32 and 8.47 ppm attributed to azomethine group ($\text{H}-\text{C}=\text{N}$), which is in accordance with the reports involving thiosemicarbazones [27, 28]. Moreover, the protons of 4-thiazolidinone ring ($\text{S}-\text{CH}_2$) occurred between δ 4.07 and 4.41 ppm [29]. The $\text{N}-\text{H}$ aromatic (N^4) proton signals appeared at δ 9.50–9.99 ppm region, except for **2d** and **2e**. The presence of a spacer group in N^4 of thiosemicarbazone **2d** and **2e** promoted an electron-releasing inductive effect shifting to downfield region (δ 7.79 and 7.87 ppm, respectively) the $\text{N}-\text{H}$ aromatic (N^4) proton signals. Finally, the other signals related to thiosemicarbazone, such as $\text{N}-\text{H}$ hydrazine proton pre

sented chemical shifts at δ 11.49-11.60 ppm region and N–H indole ring showed a singlet peak in the range of δ 11.22 and 11.83 ppm.

Similarly, in the ^{13}C NMR spectra, the chemical shift of azomethine group ($\text{H}-\text{C}=\text{N}$) appeared at region δ 138.0-153.8 ppm while $\text{C}=\text{S}$ group occurred in the range δ 174.6-179.8 ppm, both comparable to the literature [30, 31]. The carbon of carbonyl group of 4-thiazolidinone ring occurred between 171.9 and 172.3 δ ppm beside signals in δ 20.64 - 44.9 ppm region attributed to methylene, methyl and spacer groups. In addition, HRMS analysis confirmed the identity of all the synthesized compounds.

The relative configuration (*E* or *Z*) of thiosemicarbazone depends on the aldehyde substituent [32]. For the **2a-e** and **3a-d** series, indole-carboxaldehyde was used. In the ^1H NMR spectrum analysis, it was possible to detect a single peak, referring to a chemical shift of 7.32 to 8.47 δ ppm for the singlet azomethine hydrogen. Furthermore, it was also observed in our experiments the appearance of a single spot in thin layer chromatography (TLC), indicating the presence of a single isomeric form.

In this study, compound **2b**, the most promising compound in the series, was chosen for elucidation of isomerism of the derivatives synthesized. Thus, in 2D NMR NOESY spectrum, it was observed the spatial correlation between the hydrogen of $=\text{N}-\text{NH}-$ at δ 11.68 ppm and azomethine ($-\text{CH}=\text{N}-$) at δ 8.49 ppm, as well as no spatial interaction between the hydrogen in position 2 of the indole ($-\text{CH}=\text{C}-$) at δ 7.92 ppm and the hydrogen azomethine ($-\text{CH}=\text{N}-$) at δ 8.47 ppm (See supplementary material). These results suggested the *E* configuration, which corroborates the crystallographic studies of X-ray and NOESY spectrum of *E*-thiosemicarbazone presented in the literature [12, 33].

2.1 Evaluation of the antiproliferative activity in human tumor cell lines

Considering that different cell lines display different sensitivities toward the same cytotoxic compound, the antiproliferative activity of thiosemicarbazone (**2a-e**) and 4-thiazolidinones (**3a-d**) were evaluated *in vitro* against eight different human cancer cell lines [U251 (glioma), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (multidrug resistant ovary carcinoma), 786-0 (renal), NCI-H460 (non-small cell lung cancer), OVCAR-3 (ovary), HT-29 (colon), and K-562 (leukemia)] according to the National Cancer Institute of United States protocols (NCI-US) [34]. The antiproliferative activity of each compound was also evaluated *in vitro* against spontaneously transformed keratinocytes from histologically normal skin (HaCat cells). Doxorubicin was employed as the positive control [35].

The antiproliferative activity was represented as the GI_{50} (concentration of compound that inhibits 50% of cell growth, Table 1) and the mean values ranged between 1.1 μ M (compound **2b**) and 84.65 μ M (compound **3d**). Based on this mean values expressed as logarithm, Fouche et al. (2008) [36] described four levels of activity named inactive (mean $\log GI_{50} > 1.50$), weak activity ($1.50 \geq \text{mean } \log GI_{50} > 1.10$), moderate activity ($1.10 > \text{mean } \log GI_{50} > 0$) and potent activity (mean $\log GI_{50} < 0$). Considering these criteria, compounds **2e** and **3a-d** were considered inactive while **2a**, **2c** and **2d** showed a moderate activity besides **2b** that presented a potent antiproliferative activity (Table 1).

These results suggest that transforming thiosemicarbazone **2a-d** into *N*-3-substituted-4-thiazolidinones **3a-d** by a non-classical bioisosteric modification resulted in lack of antiproliferative effects (Table 1). Between thiosemicarbazone derivatives, the absence of bromine in the indole ring associated to the 1-naphthyl group connected to *N*⁴ (**2b**) resulted in better antiproliferative activity (mean $\log GI_{50} = -0.69$, potent activity) with selectivity against colorectal adenocarcinoma (HT-29) and leukemia (K562) cell lines ($GI_{50} = 0.01 \mu$ M, for both cell lines). The substitution of the naphthyl group (**2b**) for the p-toluyyl (**2c**) or 2-phenethyl (**2e**) resulted in moderate (mean $\log GI_{50} = 0.39$) to inactive (mean $\log GI_{50} > 1.47$) results, respectively (Table 1).

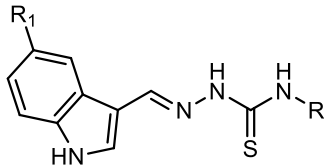
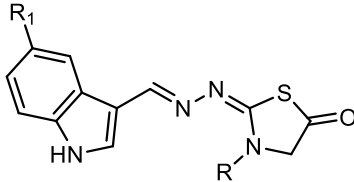
The strategy for the design of derivatives in this study was based on previous studies by our research group [12,14]. The best compounds evaluated by Oliveira et al. (2015) and Almeida et al. (2015) presented mean $\log GI_{50}$ of 0.75 and 0.88, respectively, characterizing these compounds as being of moderate activity. Our proposal for molecular modification of thiophene and acridine heterocycles by the heteroaromatic nucleus of indole increased substantially antiproliferative activity (mean $\log GI_{50} = -0.69$).

The introduction of an aliphatic spacer group between *N*⁴-thiosemicarbazone and the phenyl ring, as found in **2d** and **2e**, did not exert a positive effect on the cytostatic activity. Oliveira et al. (2015) [12] described that this kind of substitution did not improve the cytostatic activity of 2-thiophene-thiosemicarbazone derivatives. Moreover, the presence of a bromine in the indole ring (**2d**) improved the antiproliferative activity of the 2-phenethyl thiosemicarbazone derivatives. Thus, while **2e** was inactive, **2d** showed a moderate antiproliferative activity (Table 1).

Therefore, the presence of an aromatic group at *N*⁴ seemed to be the main factor for the biological activity displayed by this series of compounds (**2a-e**) while the substitution in the indole nucleus of thiosemicarbazones afforded a secondary contribution.

In order to simulate the behavior of compounds against normal cells, the HaCat cell line (immortalized human keratinocyte) was inserted into the evaluation panel. Inactive compounds (**2e**, **3b**, **3c** and **3d**) were shown to be non-cytotoxic. On the other hand, the most potent compound of the series (**2b**), also presented cytostatic effect in this lineage ($GI_{50} = 0.50 \mu M$). However, the results presented *in vitro* cytotoxicity do not necessarily have repercussions on *in vivo* toxicity assays. Oliveira et al. (2015) [12] chose, in their antiproliferative *in vitro* study, a potent compound against tumor cells that was also cytotoxic in the HaCat lineage. Subsequently, the acute toxicity of this compound was evaluated, in which no severe clinical side effects were observed.

Table 1. In vitro antiproliferative activity (GI₅₀^a in μ M) of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone based indole-derivative

	 2a-e					 3a-d				
Cell Lines	2a R = 1-naphtyl R ₁ = Br	2b R = 1-naphtyl R ₁ = H	2c R = p-toluyyl R ₁ = H	2d R = 2-phenethyl R ₁ = Br	2e R = 2-phenethyl R ₁ = H	3a R = 1-naphtyl R ₁ = Br	3b R = 1-naphtyl R ₁ = H	3c R = p-toluyyl R ₁ = Br	3d R = p-toluyyl R ₁ = H	Dox
U251	7.32	0.92	8.11	7.49	77.90	48.81	72.52	54.71	90.16	0.14
MCF 7	0.95	0.25	2.52	6.81	15.54	6.06	34.88	59.52	>100	0.07
NCI-ADR/RES	6.18	6.48	1.46	7.14	38.74	12.41	38.57	64.58	>100	0.77
786-0	6.56	0.25	3.99	7.58	76.29	29.09	62.08	39.85	79.14	0.11
NCI-H460	6.99	0.38	11.72	8.48	>100	>100	>100	96.60	>100	0.09
OVCAR-3	1.60	0.21	3.88	8.22	>100	5.12	25.74	98.50	>100	0.22
HT29	6.56	0.01	1.45	7.87	>100	27.34	96.86	>100	>100	0.23
K562	5.29	0.01	0.16	2.12	0.17	>100	>100	0.01	>100	0.93
mean log GI ₅₀	0.63 M	-0.69 P	0.39 M	0.81 M	>1.47 I	>1.40 I	>1.77 I	>1.36 I	>1.98 I	-0.68 P
HaCat	6.15	0.59	0.99	7.85	>100	6.23	62.98	54.00	>100	0.20

GI₅₀ (μ M) concentration that inhibits cell growth by 50% after 48 h exposition; GI₅₀ was determined from nonlinear regression analysis by using ORIGIN 8.0 software (OriginLab Corporation). Experiments were conducted in triplicate. Dox: doxorubicine, positive control.

2.2 Cell Cycle and Cell Death Analyses of Compound 2b

Based on antiproliferative activity (Table 1), compound **2b** was chosen for analyses of cell cycle and cell death on colorectal adenocarcinoma cell line (HT-29, $GI_{50} = 0.01 \mu\text{M}$, Table 1). In the first set of experiments, the induction of phosphatidylserine (PS) exposure was evaluated by the ability of annexin-V to bind OS residues translocated to the outer face of the cell membrane during the early stage of cell death, while 7-AAD binds to the DNA only after loss of cell membrane integrity.

After 24h, compound **2b** reduced HT29 cells viability (unstained cells) in a concentration-dependent manner and increased double stained cell subpopulations (PS residues exposition along with lack of cell membrane integrity) and 7-AAD stained (only lack of cell membrane integrity) in a similar profile. Only at the lowest concentration ($5 \mu\text{M}$), **2b** increased ($12.6 \pm 1.6 \%$) the cell subpopulation with PS residues exposition without lack of membrane integrity (Figure 1). These data suggested that compound **2b** induces cell death in a concentration-dependent way, possibly through externalizing phosphatidylserine residues prior to membrane integrity lack.

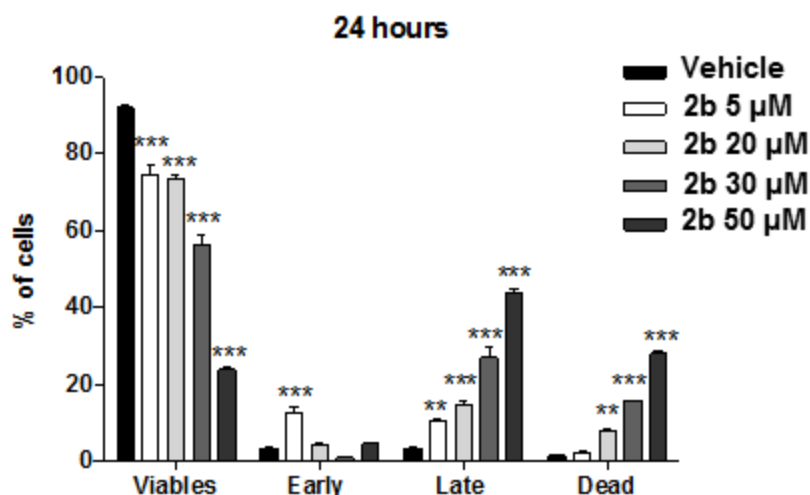


Figure 1. Compound 2b induces cell death in HT-29 cells. Cells were treated for 24 h with vehicle (DMSO 0.1%) and compound 2b (5, 20, 30 and 50 μM). Results are expressed as mean $\pm$ standard error from two independent experiments in triplicate, in percentage of cells stained with annexin-V only (early cell death), double stained with annexin-V and 7-AAD (late cell death), stained with 7-AAD only (dead cells or cellular debris) and unstained (viable cells). A total of 5000 events were collected per experiment. ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, statistically different from vehicle.

Furthermore, **2b** (5, 10 and 30 μ M) induced G2/M arrest, more pronouncedly in smaller concentrations, followed by a decrease in G1- and S-phase populations (Table 2).

These results were similar to those obtained for colchicine (1.25 nM, positive control), a natural product that binds to tubulin leading microtubule destabilization and prevents mitosis progress [37]. Moreover, the induction of G2/M arrest by microtubule-targeting agents can be followed by induction of programmed cell death process [38]. Consequently, the promotion of cell cycle arrest in G2/M phase by **2b** (Table 2) can induce programmed cell death process initialized by PS residues externalization (Figure 1).

Table 2. Influence of **2b** on HT29 cells cycle after 24h-exposition

Treatments		Sub-G1	G1	S	G2/M
Vehicle		3.5 $\pm$ 0.7	46.1 $\pm$ 2.1	17.2 $\pm$ 1.2	32.5 $\pm$ 2.3
Colchicine	1.25 nM	3.5 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 1.8****	5.9 $\pm$ 1.3****	76.0 $\pm$ 1.7****
	5 μ M	2.0 $\pm$ 0.5	10.7 $\pm$ 0.8****	6.8 $\pm$ 1.4****	80.5 $\pm$ 2.4****
2b	10 μ M	1.6 $\pm$ 0.3	26.7 $\pm$ 1.3****	5.5 $\pm$ 0.4**	66.2 $\pm$ 1.2****
	30 μ M	4.8 $\pm$ 0.8	34.9 $\pm$ 1.4****	7.3 $\pm$ 0.8****	53.1 $\pm$ 1.3****

Distribution of cells in the different phases of cell cycle, after 24 h of treatment with (DMSO 0.1%), Colchicine (1.25 nM) and derivative **2b** (5, 10 and 30 μ M). Mean (%) $\pm$ standard error of two independent experiments in triplicate. A total of 5000 events were collected per experiment. ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test. **p < 0.01, ****p < 0.001, statistically different from vehicle.

One of the features of cancer cells is presenting sustained proliferative capacity, which favors the propagation of mutations and contributes to genetic instability, one of the characteristics of tumorigenesis [39]. Thus, therapies that interfere and limit this capacity are desirable, to which compound **2b** has proved to be a promising alternative.

2.3 DNA binding properties of compound **2b**

Indole derivative biological activities have been associated to DNA binding power and correlated to apoptosis of cancer cells since this type of death can be attributed to the alteration of nucleic acid structure, function or stability [40]. Moreover, interaction between indole compounds and specific regions of nucleic acid can modulate several key cell processes as DNA replication [41].

Aiming to understand the means by which **2b** exerts G2/M arrest on HT-29 cells, the mode of interaction of **2b** with DNA was evaluated. Generally, small organic compounds can interact to DNA by intercalation, DNA-groove binding or by attractive electrostatic interactions [42]. Monitoring UV-Visible absorption in Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.6), **2b** showed maximum absorption peak at 334 nm and calf thymus DNA (ctDNA) did not demonstrate absorption at the same λ , when they were analyzed separately. Titration of increasing amounts of ctDNA into **2b** solution led to increased absorption (hyperchromic effect), presenting hyperchromicity of 13 % at 100 μ M of ctDNA. Both hyperchromic and hypochromic effects are characteristic of conformational alterations of the DNA double helix after compound binding [43]. Generally, hypochromism combined with a redshift is considered an indicative of intercalation of small molecules to the DNA due to the stacking of the chromophore pairs [3, 14, 44]. Besides, the hyperchromic effect suggests changes on DNA conformation and structure (denaturation) [4, 45]. Therefore, the UV-Visible absorption result suggested that **2b** promoted changes on DNA conformation.

Using the model proposed by McGhee and Von Hippel (1974) [46] the binding constant value (K_b) of **2b** was estimated in $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Table 3). Binding constant values in the range of 10^4 are typical of complexes formed between DNA and organic dyes [42], indicating moderate binding to DNA [47].

Table 3. UV-Vis absorption and fluorescence emission data of derivative **2b** in the absence and presence of ctDNA.

Compound	λ_{max}		Extinction Coefficient (ϵ) M^{-1}	Hyperchr. ^a	Hyperchr. ^a	λ excitation	λ emission	$K_{\text{sv}} \text{M}^{-1}$
	Free	Bound						
2b	334 nm	334 nm	18.440	13%	4.3×10^4	335 nm	435 nm	1.19×10^3

^aHyperchromicity for complexes formed by compound 2b and 100 μ M of ctDNA in comparison to free ligands.

The positive influence of hydrogen donor groups on ctDNA binding affinity is observed in several studies [48-50]. Here, the presence of NH groups in the hydrazine-carbothioamide portion of **2b** could contribute to ctDNA binding ability. Janardan et al. (2014) [51] have synthesized hydrazine and semicarbazide derivatives with DNA binding properties confirmed by UV-Vis and IR techniques. For both intercalation and groove bind, DNA and organic compound interactions occur by hydrogens and Van der Waals bonds [52].

Compounds bearing typical aromatic rings such as pyrrole, furan or benzene as lateral chain with torsional freedom, can bind to the DNA groove producing little or no structural rearrangement of the DNA helix, unlike intercalators [4, 53].

Almeida et al (2015) [14] showed that derivative 2-(acridin-9-ylmethylene)-*N*-(naphthalen-1-yl)-hydrazinecarbothioamide intercalates DNA with a binding constant value of $8.47 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. The presence of the naphthalen ring and hydrazine-carbothioamide group strengthens their interaction with DNA. In addition, acridine ring is the structural difference compared to derivative **2b** and confirms the importance of planarity of the aromatic ring in the increased affinity to DNA [54].

Moreover, fluorescence spectroscopy was used to confirm the interaction between **2b** and ctDNA, since fluorescence quenching studies can give some information on the binding of small molecules to biomacromolecules on the molecular level [55, 56]. Fluorescence spectra of **2b** (15 μM ; $\lambda_{\text{excitation}}$ 335 nm; $\lambda_{\text{emission}}$ 435 nm) were monitored in the absence and presence of increasing amounts of ctDNA (0-100 μM) demonstrating that increases in ctDNA concentration promoted decrease on **2b** fluorescence emission (Figure 2). Suppression in fluorescence intensity in the presence of DNA can be observed when groove binding agents [57, 58], electrostatic [59], hydrogen bonding [60] or hydrophobic interactions are involved [61].

Quantitative analysis of fluorescence quenching was determined from the plot of the relative intensity of fluorescence versus the concentration of ctDNA, and the fluorescence suppression constant (K_{sv}) was obtained using the Stern-Volmer equation [62]. Derivative **2b** presented a K_{sv} value of $1.19 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, indicating the interaction with ctDNA [3]. Emission-quenching phenomena reflect the interaction between the derivative and ctDNA, consistent with the electronic absorption spectroscopy results [63]. Both K_{sv} and K_{b} constants of the derivative **2b** indicate static quenching due to complex formation between the new derivative and ctDNA. Moreover, the reduction of fluorescence emission by derivative **2b** was accompanied by an apparent change in the maximum wavelength of fluorescence emission, with a shift of 8 nm that is indicative of a physical interaction with ctDNA [64]. These DNA-binding results could explain the cell cycle arrest and the topoisomerase-DNA interface interaction that were evaluated by topo II α inhibition assay and that can be related to apoptosis pathway.

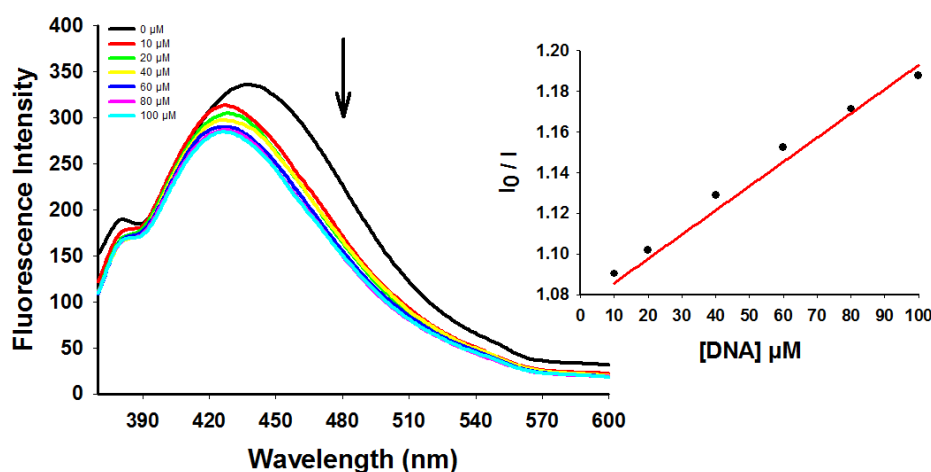


Figure 2. Fluorescence spectra of derivative **2b** (15 μM) with increasing concentration of ctDNA. Insert: corresponding the fluorescence intensity of bound derivative to ctDNA.

2.4 Topoisomerase II α assay

Topoisomerase (Topo) inhibitors are molecules that impair the enzymatic activity by forming of a ternary complex (DNA-Topo-compound) or by catalytic inhibition, resulting in cell death by apoptosis [9, 65, 66]. Some antitumor drugs already used in clinical practice have topoisomerase as biological target, such as doxorubicin and daunorubicin (anthracycline group), etoposide and teniposide (epipodophyllotoxins group), amsacrine (acridines group) and some thiosemicarbazones [67, 68]. However, these drugs present many side effects, which prompts the development of new topoisomerase inhibitors [69].

Among the mammalian topoisomerases, Topo II α is preferentially expressed in proliferating cells consisting in an important target for the discovery of new antitumor drugs [8]. Compound **2b** was evaluated in the DNA plasmid relaxation assay. This assay consisted in the evaluation of topo II α enzymatic activity in the absence and presence of the compound followed by electrophoresis analysis [70]. As demonstrated in Figure 3, the circular plasmid pUC19 can exist in three different topological conformations: supercoiled circular DNA, nicked circular DNA and linear DNA, all of which have identical sequences, but migrate at different rates through agarose gel. Owing to their compact nature, supercoiled DNA topoisomers migrate faster through agarose in comparison to linear DNA, nicked circular DNA, or relaxed DNA. When topo II α is active, the plasmid migrates as a single band and much more slowly. On the other hand, inhibition of topo II α results in a similar band pattern compared to plasmid DNA (first lane). The activity of **2b** as topo II inhibitor was visualized

by the formation of topoisomers for both tested concentration, but the inhibition was partial when compared to the positive control used (*m*-AMSA).

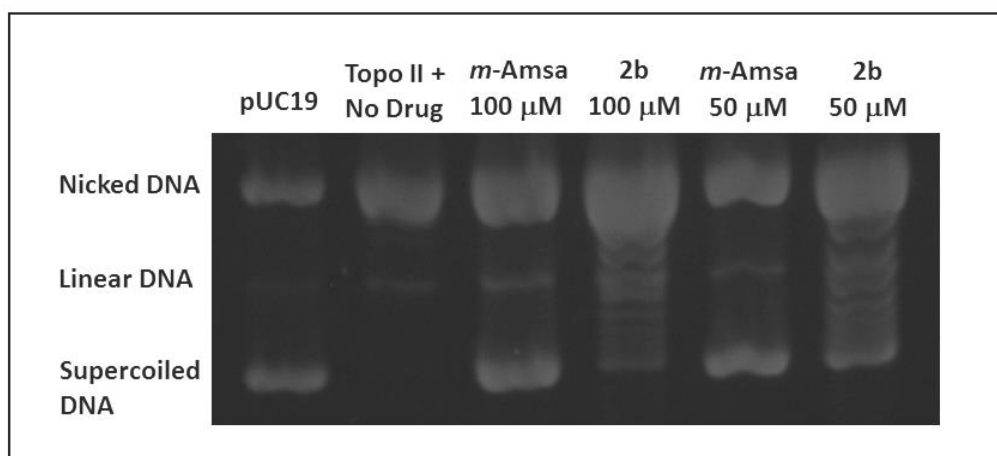


Figure 3. Effect of derivative **2b** on inhibition of Topo II α . Inhibition of TopoII α -induced DNA relaxation by derivative **2b** and *m*-AMSA as positive control. Native supercoiled pUC19 was incubated for 30 min at 37°C with 4 units of human Topo II α in the absence or presence of ligands at concentrations of 50 and 100 μM.

The topo II inhibition probably corroborates other mechanisms of action identified in this work, such as cell cycle arrest and phosphatidylserine residues exposition to the external plasma membrane surface. The formation of DNA topoisomers indicates that the cleavage complex was stabilized which could be due to alkylation of the thiol residues in the DNA-topo II complex by the thiosemicarbazone moiety [71].

Indole derivatives are also known for their inhibitory activity against topo II. Some indenoindolone-thiosemicarbazones were synthesized and evaluated for their potential in inhibiting topo II. Kashyap et al. (2013) in their study evaluated the capacity of inhibition of topoisomerase of indeneindolones. It was found that two derivatives of the series could inhibit the enzyme activity, without DNA intercalation [72]. In this way, this pharmacophore may also have contributed to the biological action of derivative **2b**.

It is worthwhile to highlight that there is a relationship between inhibition of topo II and cell cycle arrest. Recent studies show that the cell cycle arrest observed in cancer cells treated with topo II poisons is primarily in the G2/M phase [73]. These data corroborate our results, where the compound **2b** could cause arrest at the G2/M phase of the cell cycle. This suggests indole-thiosemicarbazone derivative, in particular compound **2b**, as candidate for anticancer therapy.

3 Conclusions

This study showed the antiproliferative activity of thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives, with emphasis on derivative **2b** that presents important chemical characteristics such as the presence of the indole, thiosemicarbazone and naphthalene moieties. As far as our results have suggest, **2b** can interact with DNA and inhibit topo II α that probably could explain PS residues externalization and G2/M arrest in HT-29 cells highlighting as a promising candidate for use in anticancer therapy.

4 Experimental Section

4.1 Chemistry

All reagents used in this study are commercially available (Sigma-Aldrich, Acros Organics, Vetec). The melting points were determined on Quimis 340 (Quimis, Brazil) apparatus and are uncorrected. IR spectra were measured on Bruker IFS-66 IR spectrophotometer (Bruker, Germany) using KBr pellets. NMR spectra were recorded on Varian UnityPlus spectrometer 400 MHz (400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C) or a Bruker AMX-300 MHz (300 MHz for ^1H and 75.5 MHz for ^{13}C) instruments by using tetramethylsilane as an internal standard. DMSO- d_6 was purchased from Sigma-Aldrich. HRMS were performed on a MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). The chemical shifts were reported in δ units, and coupling constants (J) were reported in Hertz (Hz). The multiplicities were given as s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (double doublet). TLC development was conducted on 0.25 mm silica gel plates (Merck, silica gel 60 F₂₅₄ in aluminium foil).

4.1.2 General procedure for compounds 2a-e

Substituted thiosemicarbazide (1 mmol) and 3-5 drops of acetic acid were added to a solution of indole-3-carboxaldehyde (1 mmol) in ethanol (10 mL). The reaction was processed under magnetic stirring for 2h at room temperature. The precipitate was filtered off, washed with ethanol then dried in desiccator under vacuum. Additional amount of desired compound could be recovered from the filtrate after cooling. After drying, the product was recrystallized from ethanol [12].

4.1.2.1 (E)-2-(5-bromo-1H-indol-3-ylmethylene)-N-(naphthalen-1-yl)hydrazinecarbothioamide (2a)

White powder; MP: 205-207°C; Yield: 77%; Rf: 0.54 (CHCl₃/MeOH 9.5:0.5) NMR ¹H (300 MHz, DMSO) δ: 7.33 (m, 1H, indole), 7.41 (s, 1H, indole), 8.46 (s, 2H, indole), 8.00 (s, 1H, =CH-), 8.00-7.43 (m, 7H, naphthyl), 9.99 (s, 1H, NH), 11.69 (s, 1H, NH), 11.88 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO) δ: 110.73, 113.38, 113.86, 122.69, 132.53, 133.65, 135.42, 135.80, 140.98, 176.21. IR (KBr, cm⁻¹): 3320.50 (NH), 3200.00 (NH), 3164.90 (NH), 750.00 (CS). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₂₀H₁₅BrN₄S: 422.0201; found: 423.3289.

4.1.2.2 (E)-2-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-*N*-(naphthalen-1-yl)hydrazinecarbothioamide (2*b*)

White powder; MP: 185-187°C; Yield: 95%; Rf: 0.44 (CHCl₃/MeOH 9:1). NMR ¹H (300 MHz, DMSO) δ: 7.09 (t, 1H, *J* = 7.5Hz, indole), 7.20 (t, 1H, *J* = 7.5Hz, indole), 7.46 (d, 1H, *J* = 8.1Hz, naphthyl), 7.63-7.51 (m, 3H, naphthyl), 7.69 (d, 1H, *J* = 7.2Hz, indole), 7.89 (d, 1H, *J* = 8.2Hz, naphthyl), 7.93 (d, 1H, *J* = 2.7Hz, indole), 8.03-7.95 (m, 2H, naphthyl), 8.37 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, indole), 8.51 (s, 1H, =CH-), 9.87 (s, 1H, NH), 11.69 (s, 2H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO) δ: 111.07, 111.75, 120.55, 122.17, 122.64, 122.92, 124.01, 125.40, 125.88, 125.97, 126.08, 126.51, 128.06, 130.38, 131.38, 133.68, 135.70, 137.06, 141.34, 176.22. IR (KBr, cm⁻¹): 3319.51 (NH), 3158.5 (NH), 773.75 (CS) HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₂₀H₁₆N₄S: 344.1096; found: 344.4328.

4.1.2.3 (E)-2-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-*N*-(*p*-toluyl)hydrazinecarbothioamide (2*c*)

White powder; MP: 195-197°C; Yield: 32%; Rf: 0.55 (CHCl₃/MeOH 9:1). NMR ¹H (300 MHz, DMSO) δ: 3.43 (s, 3H, CH₃), 7.17 (d, 2H, *J* = 8.1Hz, fenil), 7.48 (d, 2H, *J* = 8.4Hz, phenyl), 7.23-7.11 (m, 2H, indole), 7.44 (d, 1H, *J* = 7.5Hz, indole), 7.88 (d, 1H, *J* = 2.7Hz, indole), 8.20 (d, 1H, *J* = 7.5Hz, indole), 8.39 (s, 1H, =CH-), 9.50 (s, 1H, NH), 11.49 (s, 1H, NH), 11.66 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (DMSO, 75MHz) δ: 20.64, 111.03, 111.98, 120.79, 121.83, 122.77, 124.13, 125.19, 125.19, 128.70, 128.70, 131.29, 134.26, 136.74, 137.11, 141.23, 174.62. IR (KBr, cm⁻¹): 3409.4 (NH), 3314.1 (NH), 3164.9 (NH), 744.1 (CS). HRMS *m/z* [*M* + *H*] calcd for C₁₇H₁₆N₄S: 308.1096; found: 308.4007.

4.1.2.4 (E)-2-((5-bromo-1*H*-indol-3-yl)methylene)-*N*-phenethylhydrazinecarbothio-amide (2*d*)

White powder; MP: 220-222°C; Yield: 86%; Rf: 0.46 (CHCl₃/MeOH 9:1). NMR ¹H (300 MHz, DMSO) δ: 2.38 (t, 2H, J= 6.9Hz, CH₂), 3.82 (m, 2H, J= 5.7Hz, CH₂), 7.21-7.17 (m, 1H, indole), 7.43-7.40 (m, 1H, indole), 7.98 (d, 1H, J= 2.4Hz, indole), 8.27 (d, 1H, J= 3.9Hz, indole), 7.35-7.21(m, 5H, phenyl), 7.87 (d, 1H, J= 5.4Hz, NH), 8.25 (s, 1H, =CH-), 11.25 (d, 1H, J= 3Hz, NH), 11.81 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO) δ: 34.82, 44.98, 110.75, 113.34, 113.89, 123.67, 125.31, 125.57, 126.18, 128.44, 128.44, 128.56, 128.56, 132.07, 135.76, 139.26, 140.13, 176.09 (CS). IR (KBr, cm⁻¹): 3420.25 (NH), 3365.13 (NH), 3200.00 (NH), 1737.84 (CS). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₁₈H₁₇BrN₄S: 400.0357; found: 401.3234.

4.1.2.5 (*E*)-2-((1*H*-indol-3-yl)methylene)-*N*-phenethylhydrazinecarbothioamide (2*e*)

White powder; MP: 197-199°C; Yield: 73%; Rf: 0.51 (CHCl₃/MeOH 9:1). NMR ¹H (300 MHz, DMSO) δ: 2.95 (t, 2H, J= 7.8Hz, CH₂), 3.85 (quart., 2H, J= 7.2Hz, CH₂), 7.15-7.10 (m, 1H, indole), 7.42 (d, 1H, J= 8.1Hz, indole), 7.39-7.18 (m, 5H, phenyl), 7.79 (d, 1H, J= 2.7Hz, NH), 7.84 (d, 1H, indole, J=7.8Hz), 7.98 (d, 1H, indole, J=5.4Hz), 8.28 (s, 1H, =CH), 11.22 (s, 1H, NH), 11.60 (s, 1H, NH). NMR ¹³C (75 MHz, DMSO) δ: 34.88, 44.71, 111.03, 111.76, 120.57, 121.83, 122.60, 123.82, 126.20, 128.47, 128.47, 128.57, 128.57, 131.06, 137.04, 139.27, 140.68, 175.84 (CS). IR (KBr, cm⁻¹): 3365.00 (NH), 3256.37 (NH), 3200.00 (NH), 746.08 (CS). HRMS *m/z* [*M* + *H*]⁺ calcd for C₁₈H₁₈N₄S: 322.1252; found: 322.4273.

4.1.3 General procedure for compounds 3*a-d*

A solution of 1 mmol of thiosemicarbazones, 1.1 mmol of ethyl-2-chloroacetate, and 4 mmol of sodium acetate anhydrous in 20 mL of ethanol was stirred until reflux to the completion of the reaction (16-24 h). After, the solution was cooled to 0° C, the precipitate was collected with filter under vacuum and washed with hot methanol and water [20,21].

4.1.3.1 (*E*)-2-(*E*)-(5-bromo-1*H*-indol-3ylmethylene)hydrazono)-3-(naphthalen-1-yl)thiazolidin-4-one (3*a*)

White powder; MP: 280-282°C; Yield: 35%; Rf: 0.58 (CHCl₃/MeOH 9:1). NMR ¹H (300 MHz, DMSO) δ: 4.41-4.33 (m, 2H, CH₂), 7.32 (m, 1H, indole), 7.35 (m, 1H, indole), 8.24

(m, 1H, indole), 8.40 (m, 1H, indole), 7.42 (m, 1H, naphthyl), 7.76-7.57 (m, 5H, naphthyl), 8.07 (m, 1H, naphthyl), 8.07 (s, 1H, =CH-), 11.79 (s, 1H, NH). IR (KBr, cm^{-1}): 3345.7 (NH), 3053.8 (NH), 2977.5 (NH), 1707.48 (CO). HRMS m/z $[M + H]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{BrN}_4\text{OS}$: 462.0150; found: 463.3497.

4.1.3.2 *(E)-2-(E)-(1H-indol-3-ylmethylene)hydrazono)-3-(naphthalen-1-yl)thiazolidin-4-one (3b)*

White powder; MP: 265-267°C; Yield: 45%; Rf: 0.59 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9.5:0.5). NMR ^1H (300 MHz, DMSO) δ : 4.35 (d, 1H, $J = 17.1\text{Hz}$, CH_2), 4.19 (d, 1H, $J = 16.2\text{Hz}$, CH_2), 7.20 (m, 2H, indole), 8.08 (d, 1H, $J = 8.1\text{Hz}$, indole), 8.23 (d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$, indole), 7.44 (m, 1H, naphthyl), 7.69-7.58 (m, 5H, naphthyl), 7.79-7.76 (m, 1H, naphthyl), 8.27 (s, 1H, =CH), 11.62 (s, 1H, NH). NMR ^{13}C (75 MHz, DMSO) δ : 32.40, 111.75, 111.98, 120.79, 121.95, 122.46, 122.69, 124.42, 125.83, 126.52, 127.13, 127.13, 128.34, 129.37, 129.37, 132.01, 132.01, 133.91, 137.10, 153.89, 161.51, 172.32 (CO). IR (KBr, cm^{-1}): 3394.93 (NH), 1613.64 (CO). HRMS m/z $[M + H]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}$: 384.1045; found: 384.4536.

4.1.3.3 *(E)-2-(E)-(5-bromo-1H-indol-3-ylmethylene)hydrazono)-3-(p-toluy)thiazolidin-4-one (3c)*

White powder; MP: 295°C; Yield: 32%; Rf: 0.56 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9.5:0.5). NMR ^1H (300 MHz, DMSO) δ : 2.37 (s, 3H, CH_3), 4.11 (s, 2H, CH_2), 7.28 (d, 2H, $J = 8.7\text{Hz}$, phenyl), 7.43 (d, 2H, $J = 8.7\text{Hz}$, phenyl), 7.35-7.24 (d, 2H, indole), 8.40 (m, 2H, indole), 7.82 (s, 1H, =CH), 11.83 (s, 1H, NH). NMR ^{13}C (75 MHz, DMSO) δ : 111.42, 113.45, 114.01, 125.17, 127.93, 127.93, 127.93, 127.93, 129.49, 129.49, 129.49, 129.49, 132.58, 133.10, 135.78, 135.78, 138.05, 153.22, 171.98 (CO). IR (KBr, cm^{-1}): 3255.75 (NH), 1608.29 (CO). HRMS m/z $[M + H]$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{BrN}_4\text{OS}$: 426.0150; found: 427.3176.

4.1.3.4 *(E)-2-(E)-(1H-indol-3-ylmethylene)hydrazono)-3-(p-toluy)thiazolidin-4-one (3d)*

White powder; MP: 274-276°C; Yield: 72%; Rf: 0.57 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9.5:0.5). NMR ^1H (300 MHz, DMSO) δ : 2.38 (s, 3H, CH_3), 4.07 (s, 2H, CH_2), 7.25 (d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, phenyl), 7.32 (d, 2H, $J = 8.4\text{Hz}$, phenyl), 7.21-7.14 (m, 1H, indole), 7.45 (d, 1H, $J = 6.6\text{Hz}$, indole), 7.77 (d, 1H, $J = 2.4\text{Hz}$, indole), 8.22 (d, 1H, $J = 6.6\text{Hz}$, indole), 8.42 (s, 1H, =CH-), 11.64 (s, 1H, NH). NMR ^{13}C (DMSO, 75MHz) δ : 32.14, 120.77, 122.69, 124.47, 127.96, 127.96, 127.96, 127.96,

129.49, 129.49, 129.49, 129.49, 132.01, 132.64, 137.11, 138.02, 153.70, 154.49, 172.00 (CO). IR (KBr, cm^{-1}): 3405.71 (NH), 1722.24 (CO). HRMS m/z $[M + H]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}$: 348.1045; found: 348.4215.

4.2 Biological Assay

4.2.1 Cell culture conditions

Eight different human cancer cell lines [U251 (glioma), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (multidrug resistant ovary carcinoma), 786-0 (renal), NCI-H460 (non-small cell lung cancer), OVCAR-3 (ovary), HT-29 (colon), and K-562 (leukemia)] were kindly provided by National Cancer Institute at Frederick (NCI-USA). The immortalized human keratinocyte (HaCaT) cell line was kindly provided by prof. Dr. Ricardo Della Coletta (University of Campinas). All cell lines were maintained in RPMI 1640 (Gibco, USA) supplemented with 5% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% (v/v) penicillin:streptomycin (Nutricell, 1000 U/mL:1000 g/mL) in a humidified atmosphere with 5% CO_2 , at 37°C. For the experiments, HaCaT and CHO-K1 were used between passages 5 to 12.

4.2.2 Samples preparations

Compounds **2a-e** and **3a-d** (5 mg) were initially diluted in DMSO (50 μL) followed by the addition of 950 μL of RPMI 1640/FBS 5% (working solution). Final concentrations (0.25, 2.5, 25 and 250 $\mu\text{g/mL}$, for an antiproliferative assay; 5, 10, 20, 30 and 50 μM , for flow cytometry experiments of **2b**) were obtained by serial dilution in RPMI 1640/FBS 5%. Doxorubicine (0.025, 0.25, 2.5 and 25 $\mu\text{g/mL}$, final concentration) and Colchicine (1.25nM, final concentration) were used as positive controls on antiproliferative and cell cycle assays, respectively.

4.2.3 Antiproliferative assay

The *in vitro* antiproliferative activity assay was performed as described by Monks et al. (1991) [74]. Each cell line was plated in 96-well plates (100 μL cells/well) for 24h and then exposed to the derivatives **2a-e** and **3a-d** in different concentrations at 37°C, 5% of CO_2 in air for 48 hours. Final DMSO concentration (< 0.25%) did not affect cell viability. Before (T_0 plate) and after (T_1 plates) sample addition, cells were fixed with 50% trichloroacetic acid and cell proliferation determined by spectrophotometric quantification (540 nm) of cellular

protein content using sulforhodamine B assay. The GI_{50} (concentration expressed in μM inhibiting 50% of cell growth or cytostatic effect) were determined through non-linear regression analysis using the concentration-response curve for each cell line in software ORIGIN 8.0[®] (OriginLab Corporation) [74, 75].

4.2.4 Cell treatments for Cytometry assays:

For the flow cytometry experiments, HT-29 (human colorectal adenocarcinoma, epithelial, adherent) cells were seeded in 6 well plates (2×10^5 cells/well) and incubated for 24 h prior to treatments.

4.2.5 Measurement of phosphatidylserine externalization

Phosphatidylserine externalization was analysed with Guava Nexin Assay Kit (Guava Technologies, Hayward, CA) in accordance with manufacturer's instructions. After 24 h, HT-29 cells were treated with **2b** (5, 20, 30 and 50 μM) for 24 h, harvested (Trypsin-EDTA 0.25%) and resuspended at a density of 1×10^5 cells in 100 μL of phosphate buffered saline (PBS). The binding buffer containing annexin-V-PE and 7-AAD was added to the cells (100 μL /sample) and the suspension was incubated in the dark for 20 min at room temperature. After that, cells were analyzed (5000 events/replicate) by flow cytometry (Guava Easycyte Mini – Guava Technologies, Hayward, CA).

4.2.6 Cell Cycle analyses

Cell cycle analyses were performed with the Guava Cell Cycle reagent (Guava Technologies, Hayward, CA) in accordance with manufacturer's instructions. After the first 24h, HT-29 cells were deprived of FBS for 24 h (cell cycle synchronization). After that, cells were treated with **2b** (5, 10 and 30 μM) and Colchicine (1.25 nM) for 24 h, harvested (Trypsin-EDTA 0.25%) and resuspended at a density of 1×10^5 cells in 100 μL of PBS. The binding buffer containing propidium iodide (PI) was added to the cells (100 μL) and suspension was incubated in the dark for 20 min at room temperature. Finally, cells were analyzed (5000 events/replicate) by flow cytometry (Guava Easycyte Mini).

4.2.7 DNA interaction

4.2.7.1 Preparation of the ct-DNA solution

Calf thymus DNA (ctDNA) was purchased from Sigma and was used without further purification. The solution of ctDNA in Tris-HCl (0,01 M, pH 7.6) buffer was sonicated for 5 min and the DNA concentration was determined using the molar extinction coefficients $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 260 nm [76]. The purity of DNA was determined by monitoring the rate value of A260/A280. DNA concentration was expressed as micromolar equivalents of the base pairs.

4.2.7.2 UV-vis absorption measurements

The derivative 2b was dissolved in DMSO at a concentration of 1 mM (stock solution) from which the working solutions were prepared by dilution using Tris-HCl (0.01 M, pH 7.6) buffer at concentrations ranging from 10 to 80 μM . Under optimized concentration, the compounds were titrated with increasing concentrations of ctDNA. Before the measurements, the system was stirred and incubated at room temperature for 10 minutes. The measurements were performed in a rectangular quartz cuvette with a path length of 1cm. The intrinsic binding constant (K_b) was obtained by fitting the data to equation 1 [46]:

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f) \quad (1)$$

where, ϵ_a ; ϵ_b and ϵ_f are the apparent, bound, and free extinction coefficients, respectively. Plot fitting of $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs. $[\text{DNA}]$ used K_b obtained from the ratio of the slope to the Y intercept. The binding data were fitted using a SigmaPlot 10.0 software.

4.2.7.3 Fluorescence Measurements

Fluorescence measurements of non-bound derivative were performed with 15 μM of compound 2b in 0.01 M Tris buffer, pH 7.6. Emission spectra were recorded in the region 370-700 nm using an excitation wavelength of 220-400 nm. All measurements were performed at 25 °C in a rectangular quartz cuvette with a 1 cm path length. Fluorescence intensities were expressed in arbitrary units. Fluorescence titrations were conducted by the addition of increasing amounts of ctDNA directly into the cell containing the derivatives. The behavior suppression emission was analyzed by the Stern-Volmer equation was obtained through the equation (2) [62]:

$$F_0 / F = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2)$$

where, F_0 and F are the fluorescence intensities in the absence and presence of indoles derivatives. K_{SV} is the constant linear suppression. $[Q]$ is the concentration of derivatives. The

plot of relative emission intensity (F_0/F) versus $[Q]$ was used to obtain the constant from the linear regression. The binding data were fitted using a SigmaPlot 10.0 software.

4.2.8 *In vitro* topoisomerase II inhibition assay

Human topoisomerase II α inhibition activity was determined as previously described by Almeida et al. (2016) [70]. Briefly, 100 ng pUC19 DNA plasmid (from Sigma) and 4.0 unit of recombinant human (p170) topoisomerase II (Sigma-Aldrich) in relaxation buffer without or with 2b or amsacrine (*m*-AMSA) were incubated for 30 min at 37° C. The tested concentrations were 50 and 100 μ M. Reactions were terminated with 1% SDS and digested with proteinase K. Then, the reaction products were analyzed by electrophoresis gel stained with Ethidium Bromide and photographed under UV light.

4.2.9 Statistical analyses

The results were expressed as the mean $\pm$ standard error and by analysis of variance (ANOVA), one-way followed by Tukey tests. P values lower than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as indicative of significance and represented by: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. The calculations were performed using the statistical software GraphPad Prism version 7.0, San Diego California, USA.

Acknowledgements

This study was supported by Brazilian agencies Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of Interest

The authors declare that there was no competing interests.

References

- [1] Globocan. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013: <http://globocan.iarc.fr>. (accessed: November 2016).
- [2] N. Bailón-Moscoso, J.C. Romero-Benavides, P. Os trosky-Wegman, Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells, Tumor Biol. 35 (2014) 3981-3995.

- [3] M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry, *J Photochem Photobiol B*. 124 (2013) 1-19.
- [4] M.M. Aleksic, V. Kapetanovic, An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA-drug interactions, *Acta Chim Slov*. 61 (2014) 555-573.
- [5] Y. Pommier, E. Kiselev, C. Marchand, Interfacial inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25 (2015) 3961-3965.
- [6] Y. Pommier, E. Leo, H. Zhang, C. Marchand, DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs, *ACS Chem Biol*. 17 (2010) 421-433.
- [7] M.K. Kathiravan, M.M. Khilare, K. Nikoomanesh, A.S. Chothe, K.S. Jain, Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery, *J Enzyme Inhib Med Chem*. 28 (2013) 419-435.
- [8] J.L. Nitiss, Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy, *Nat Rev Cancer*. 9 (2009) 338-350.
- [9] O. Sordet, S. Solier, Topoisomerases and Apoptosis, in: Y. Pommier (Ed.), *DNA Topoisomerases and Cancer*, Springer, New York, 2012.
- [10] S. Arora, S. Agarwal, S. Singhal, Anticancer activities of thiosemicarbazides/thiosemicarbazones: A review, *J Pharm Pharm Sci*. 9 (2014) 34-41.
- [11] N. Sharma, D.P. Pathak, Combatting challenging aspects of cancer with thiosemicarbazones, *J Pharm Pharm Sci*. 8 (2016) 27-34.
- [12] J.F. Oliveira, A.L. Silva, D.B. Vendramini-Costa, C.A.C. Amorim, J.F. Campos, A. G. Ribeiro, R.O. Moura, J.L. Neves, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, M.C.A. Lima, Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities, *Eur J Med Chem*. 104 (2015) 148-156.
- [13] S. Krishan, D.R. Richardson, S. Sahni, The Anticancer Agent, Di-2-Pyridylketone 4,4-Dimethyl-3-Thiosemicarbazone (Dp44mT), Up-Regulates the AMPK-Dependent Energy Homeostasis Pathway in Cancer Cells, *Biochim Biophys Acta*. 1863 (2016) 2916-2933.
- [14] S.M.V. Almeida, E.A. Lafayette, L.B.P.G. Silva, C.A.C. Amorim, T.B. Oliveira, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, R.O. Moura, E.I.C. Beltrão, M.C.A. Lima, L.B. Carvalho-Júnior, Synthesis, DNA binding, and Antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives, *Int J Mol Sci*. 16 (2015) 13023-13042.
- [15] A.M. Merlot, N.H. Shafie, Y. Yu, V. Richardson, P.J. Jansson, S. Sahni, D.J. Lane, Z. Kovacevic, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, Mechanism of the induction of endoplasmic reticulum stress by the anti-cancer agent, di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT): Activation of PERK/eIF2 α , IRE1 α , ATF6 and calmodulin kinase, *Biochem Pharmacol*. 109 (2016) 27-47.

- [16] H. Huang, Q.Chen, X. Ku, L. Meng, L. Lin, X. Wang, C. Zhu, Y. Wang, Z. Chen, M. Li, H. Jiang, K. Chen, J. Ding, H. Liu, A series of alpha-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones inhibit topoisomerase IIalpha catalytic activity, *J Med Chem.*, 53 (2010) 3048-3064.
- [17] C. Zhang, Y. Qu, B. Niu, Design, synthesis and biological evaluation of lapachol derivatives possessing indole scaffolds as topoisomerase I inhibitors, *Bioorg Med Chem.* 24 (2016) 5781-5786.
- [18] J. Yan, J. Hu, B. An, L. Huang, X. Li, Design, synthesis, and biological evaluation of cyclic-indole derivatives as anti-tumor agents via the inhibition of tubulin polymerization, *Eur J Med Chem.* 125 (2016) 663-675.
- [19] P.M. Kelly, S.A. Bright, D. Fayne, J.K. Pollock, D.M. Zisterer, D.C. Williams, M.J. Meegan, Synthesis, antiproliferative and pro-apoptotic activity of 2-phenylindoles, *Bioorg Med Chem.* 24 (2016) 4075-4099.
- [20] R. Ottana, R. Maccari, M.L. Barreca, G. Bruno, A. Rotondo, A. Rossi, G. Chiricosta, R. Di Paola, L. Sautebin, S. Cuzzocread, M.G. Vigorita, 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: Design and Synthesis of Novel Anti-inflammatory Agents, *Bioorg Med Chem.* 13 (2005) 4243-4252.
- [21] T.M. Aquino, A.P. Liesen, I. Spacov, C.S. Carvalho, V.T. Lima, A. Alves, A.R. Faria, J.M. Araujo, J.G. Lima, E.J.T. Melo, A.J.S. Góes, Synthesis, Anti-Toxoplasma gondii and Antimicrobial Activities of 2-Hydrazolyl-3-phenyl-5-(4-nitrobenzylidene)-4-thiazolidinone Substituted Derivatives, *Lat Am J Pharm.* 30 (2011) 1567-1573.
- [22] N. Bharti, Shailendra, S. Sharma, F. Naqvi, A. Azam, New palladium (II) complexes of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones: Synthesis, spectral studies and *in vitro* anti-amoebic activity, *Bioorg Med Chem.* 11 (2003) 2923-2929.
- [23] I. Antonini, F. Claudi, P. Franchetti, M. Grifantini, S. Marteli, Elucidation of the structure of the antineoplastic agents, 2-formylpyridine and 1-formylisoquinoline thiosemicarbazones, *J Med Chem.* 20 (1977) 447-449.
- [24] Z. El-Gendy, R.M. Abel-Rahman, M.M. Fawzy, M.B. Mahmoud, Biologically active thiazolidinone. Part II. Synthesis and fungitoxicities of isolated and fused thiazolidinones derived from thiosemicarbazones. *J Indian Chem Soc.* 67 (1990) 927-929.
- [25] N. Ulusoy, M. Kiraz, O. Kuçukbasmaci, New 6-(4 -Bromophenyl)-imidazo[2,1-*b*]thiazole Derivatives: Synthesis and Antimicrobial Activity, *Monatsh Chem.* 133 (2002) 1305-1315.
- [26] N. Ergenç, G. Capan, N.S. Gunay, S. Ozkirimli, M. Gungor, S. Ozbey, E. Kendi, Synthesis and hypnotic activity of new 4-thiazolidinone and 2-thioxo-4,5-imidazolidinedione derivatives, *Arch Pharm (Weinheim)*. 332 (1999) 343-347.
- [27] R. Pingaew, S. Prachayasittikul, S. Ruchirawat, V. Prachayasittikul, Synthesis and cytotoxicity of novel N-sulfonyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline thiosemicarbazone derivatives, *Med Chem Res.* 22 (2013) 267-277.

- [28] I. Dilovic, M. Rubcic, V. Vrdoljak, S.K. Pavelic, M. Kralj, I. Piantanida, M. Cindric, Novel thiosemicarbazone derivatives as potential antitumor agents: synthesis, physicochemical and structural properties, DNA interactions and antiproliferative activity, *Bioorg Med Chem.* 16 (2008) 5189-5198.
- [29] N. Ergenç, G. Capan, Synthesis and anticonvulsant activity of new 4- thiazolidone and 4-thiazoline derivatives, *Farmaco.* 49 (1994) 133-135.
- [30] Z. Afrasiabi, E. Sinn, J. Chen, Y. Ma, A.L. Rheingold, L.N. Zakharov, N. Rath, S. Padhye, Appended 1,2-naphthoquinones as anticancer agents 1: synthesis, structural, spectral and antitumor activities of ortho-naphthaquinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes, *Inorg Chim Acta.* 357 (2004) 271-278.
- [31] J. Chen, Y.W. Huang, G. Liu, Z. Afrasiabi, E. Sinn, S. Padhye, Y. Ma, The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells, *Toxicol Appl Pharmacol.* 197 (2004) 40-48.
- [32] G.J. Karabatsos, F.M. Vane, R.A. Taller, N. Hsi, Structural studies by nuclear magnetic resonance. VIII. Ring-substituted phenylhydrazones, semicarbazones and thiosemicarbazones, *J Am Chem Soc.* 86 (1964) 3351-3358.
- [33] Z. Liu, S. Wu, Y. Wang, R. Li, J. Wang, L. Wang, Y. Zhao, P. Gong, Design, synthesis and biological evaluation of novel thieno[3,2-d] pyrimidine derivatives possessing diaryl semicarbazone scaffolds as potent antitumor agents, *Eur J Med Chem.* 87 (2014) 782-793.
- [34] M.R. Boyd, K.D. Paull, Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen, *Drug Dev Res.* 34 (1995) 91-109.
- [35] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, M.R. Boyd, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J Natl Cancer Inst.* 82 (1990) 1107-1112.
- [36] G. Fouche, G.M. Cragg, P. Pillay, N. Kolesnikova, V.J. Maharaj, J. Senabe, In vitro anticancer screening of South African plants, *J Ethnopharmacol.* 119 (2008) 455-461.
- [37] R.B. Ravelli, B. Gigant, P.A. Curmi, I. Jourdain, S. Lachkar, A. Sobel, M. Knossow, Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain, *Nature.* 428 (2004) 198-202.
- [38] M.A. Jordan, L. Wilson, Microtubules as a target for anticancer drugs, *Nat Rev Cancer.* 4 (2004) 253-65.
- [39] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell.* 144 (2011) 646-74.
- [40] S. Sarkar, P. Bhattacharjee, K. Bhadra, DNA binding and apoptotic induction ability of harmalol in HepG2: Biophysical and biochemical approaches, *Chem Biol Interact.* 258 (2016) 142-152.
- [41] J. Carvalho, P. Nottelet, J.L. Mergny, J.A. Queiroz, G.F. Salgado, C. Cruz, Study of the interaction between indole-based compounds and biologically relevant G-quadruplexes, 135 (2017) 186-195.

- [42] H. Ihmels, D. Otto, Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA: general principles and recent developments, *Top Curr Chem* (J). 258 (2005) 161-204.
- [43] E.A. Lafayette, S.M.V. Almeida, M.G.R. Pitta, E.I.C. Beltrão, T.G. Silva, R.O. Moura, I.R. Pitta, L.B. Carvalho-Júnior, M.C.A. Lima, Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives, *Molecules*. 18 (2013) 15035-15050.
- [44] Q. Wang, W. Li, A. Liu, B. Zhang, F. Gao, S. Li, X. Liao, Binding and photocleavage of a neutral nickel (II) bis(hydrogen pyridine-2,6-dicarboxylate) complex DNA, *J Mol Struct*. 985 (2011) 129-133.
- [45] S. Kashanian, E.N. Dolatabadi, DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive, *Food Chem*. 116 (2009) 743-747.
- [46] J.D. McGhee, P.H. Von Hippel, Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: Cooperative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice, *J Mol Biol*. 86 (1974) 469-489.
- [47] D.K. Jangir, S.K. Dey, S. Kundu, K. Mehrotra, Assessment of amsacrine binding with DNA using UV-visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques, *J Photochem Photobiol B*. 114 (2012) 38-43.
- [48] M.F. Hassan, A. Rauf, Synthesis and multi-spectroscopic DNA binding study of 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives of fatty acid, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 153 (2016) 510-516.
- [49] P. Pakravan, S. Masoudian, Study on the Interaction between Isatin- β -Thiosemicarbazone and Calf Thymus DNA by Spectroscopic Techniques, *Iran J Pharm Res*. 14 (2015) 111-123.
- [50] K. Benner, H. Ihmels, S. Kolsch, P.M. Pithan, Targeting abasic site-containing DNA with annelated quinolinium derivatives: the influence of size, shape and substituents, *Org Biomol Chem*. 12 (2014) 1725-1734.
- [51] S. Janardan, P. Suman, G. Swapna, A. Amrita, R. Priya, R. Siva, K. Vijayakrishna, A. Sivaramakrishna, Evaluation of DNA Binding with Some Selected Hydrazide and Semicarbazide Derivatives, *Appl Biochem Biotechnol*. 173 (2014) 596-608.
- [52] S. Kurbanoglu, B. Dogan-Topal, E.V. Rodriguez, B. Bozal-Palabiyik, S.A. Ozkan, B. Uslu, Advances in electrochemical DNA biosensors and their interaction mechanism with pharmaceuticals, *J Electroanal Chem (Lausanne)*. 775 (2016) 9-26.
- [53] A. Ali, S. Bhattacharya, DNA binders in clinical trials and chemotherapy, *Bioorg Med Chem*. 22 (2014) 4506-4521.
- [54] A. Rescifina, C. Zagni, M.G. Varrica, V. Pistara, A. Corsaro, Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: synthesis, activity and modeling, *Eur J Med Chem*. 74 (2014) 95-115.

- [55] S. Geng, Y. Cui, Q. Liu, F. Cui, G. Zhang, Y. Chi, H. Peng, Spectroscopic and molecular modeling study on the interaction of ctDNA with 3'-deoxy-3'-azido doxorubicin, *J Lumin.* 141 (2013) 144-149.
- [56] S. Bi, L. Yan, Y. Wang, B. Pang, T. Wang, Spectroscopic study on the interaction of eugenol with salmon sperm DNA in vitro, *J Lumin.* 132 (2012) 2355-2360.
- [57] H. Joshi, A. Sengupta, K. Gavyala, P. Hazra, Unraveling the mode of binding of the anticancer drug topotecan with dsDNA, *RSC Adv.* 4 (2014) 1015-1024.
- [58] S.S. Mati, S.S. Roy, S. Chall, S. Bhattacharya, S.B. Chandra, Unveiling the Groove Binding Mechanism of a Biocompatible Naphthalimide-Based Organoselenocyanate with Calf Thymus DNA: An "Ex Vivo" Fluorescence Imaging Application Appended by Biophysical Experiments and Molecular Docking Simulations, *J Phys Chem B.* 117 (2013) 14655-14665.
- [59] B.K. Paul, N. Guchhait, Exploring the Strength, Mode, Dynamics, and Kinetics of Binding Interaction of a Cationic Biological Photosensitizer with DNA: Implication on Dissociation of the Drug-DNA Complex via Detergent Sequestration, *J Phys Chem B.* 115 (2011) 11938-11949.
- [60] Y. Lu, J. Lv, G. Zhang, G. Wang, Q. Liu, Interaction of an anthracycline disaccharide with ctDNA: Investigation by spectroscopic technique and modeling studies, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 75 (2010) 1511-1515.
- [61] F. Cui, R. Huo, G. Hui, X. Lv, J. Jin, G. Zhang, W. Zing, Study on the interaction between aglycon of daunorubicin and calf thymus DNA by spectroscopy, *J Mol Struct.* 1001 (2011) 104-110.
- [62] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third ed., Springer, 2006.
- [63] C. Gao, F. Liu, X. Luan, C. Tan, H. Liu, Y. Xie, Y. Jin, Y. Jiang, Novel synthetic 2-amino-10-(3,5-dimethoxy)benzyl-9(10H)-acridinone derivatives as potent DNA-binding antiproliferative agents, *Bioorg Med Chem.* 18 (2010) 7507-7514.
- [64] F. Cui, Q. Liu, H. Luo, G. Zhang, Spectroscopic, viscosity and molecular modeling studies on the interaction of 3'-azido-danorubicin thiosemicarbazone with DNA, *J Fluoresc.* 24 (2014) 189-195.
- [65] J. Nateewattana, S. Dutta, S. Reabroi, R. Saeeng, S. Kasemsook, A. Chairoungdua, J. Weerachayaphorn, S. Wongkham, P. Piyachaturawat, Induction of apoptosis in cholangiocarcinoma by an andrographolide analogue is mediated through topoisomerase II α inhibition, *European Journal of Pharmacology* 723 (2014) 148-155.
- [66] J.C. Yalowich, X. Wuc, R. Zhang, R. Kanagasabai, M. Hornbaker, B.B. Hasinoff, The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II α , *Biochem Pharmacol.* 84 (2012) 52-58.
- [67] A.M. Azarova, Y.L. Lyu, C.P. Lin, Y.C. Tsai, J.Y. Lau, J.C. Wang, L.F. Liu, Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 104 (2007) 11014-11019.

- [68] H. Huang, Q. Chen, X. Ku, L. Meng, L. Lin, X. Wang, C. Zhu, Y. Wang, Z. Chen, M. Li, H. Jiang, K. Chen, J. Ding, H. Liu, A Series of α -Heterocyclic Carboxaldehyde Thiosemicarbazones Inhibit Topoisomerase II α Catalytic Activity, *J Med Chem.* 53 (2010) 3048-3064.
- [69] M.K. Kathiravan, A.N. Kale, S. Nilewar, Discovery and Development of Topoisomerase Inhibitors as Anticancer Agents, *Mini Rev. Med. Chem.* 16 (2016) 1219-1229.
- [70] S.M. Almeida, E.A. Lafayette, W.L. Silva, V.L. Serafim, T.M. Menezes, J.L. Neves, A.L. Ruiz, J.E. Carvalho, R.O. Moura, E.I. Beltrão, L.B. Carvalho-Júnior, M.D. Lima, New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases, *Int J Biol Macromol.* 92 (2016) 467-475.
- [71] J. Chen, J. Huang, G. Liu, Z. Afrasiabi, E. Sinn, S. Padhye, Y. Ma, The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells, *Toxicol Appl Pharmacol.* 197 (2004) 40-48.
- [72] M. Kashyap, S. Kandekar, A.T. Baviskar, D. Das, R. Preet, P. Mohapatra, S.R. Satapathy, S. Siddharth, S.K. Guchhait, C.N. Kundu, U.C. Banerjee, Indenoindolone derivatives as topoisomerase II-inhibiting anticancer agents, *Bioorg Med Chem Lett.* 23 (2013) 934-938.
- [73] N. Bucher, G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer, *Br J Cancer.* 98 (2008) 523-528.
- [74] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd, Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *J Natl Cancer Inst.* 83 (1991) 757.