

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



MICALYNE SOARES DO EGITO

**SÍNTESE, AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, CITOTÓXICA E
ESQUISTOSSOMICIDA DE NOVAS 2-TIAZOLHIDRAZONAS**

Recife, PE

2014

MICALYNE SOARES DO EGITO

**SÍNTESE, AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, CITOTÓXICA E
ESQUISTOSSOMICIDA DE NOVAS 2-TIAZOLHIDRAZONAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

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

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^a. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque

Recife, PE

2014

Catálogo na Fonte

Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

E29s

Egito, Micalyne Soares do.

Síntese, avaliação microbiológica, citotóxica e esquistossomocida de novas 2-tiazolhidrazonas / Micalyne Soares do Egito. – 2014.

103 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2014.

Inclui referências.

1. Antimicrobiano. 2. Atividade citotóxica. 3. Esquistossomose. 4. Tiazolhidrazona. 5. Tiossemicarbazona. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2017-215)

MICALYNE SOARES DO EGITO

**SÍNTESE, AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, CITOTÓXICA E ESQUISTOSSOMICIDA
DE NOVAS 2-TIAZOLHIDRAZONAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 17/10/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Nelly Caetano Piscionatto (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Ivani Malvestiti (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

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. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

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

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite

*Dedico aos meus pais, Rosangela e
Joaquim, pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar comigo em todos os momentos, por plantar em mim um sonho que hoje se materializa, por me iluminar, me guiar e me dar forças para seguir em frente.

À Prof^ª. Dr^ª. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque, por toda ajuda, ensinamentos, conselhos e amizade. Muito obrigada por acreditar em mim e me possibilitar conhecer um exemplo de profissional tão dedicado

À Prof^ª. Dr^ª. Maria do Carmo Alves de Lima, por toda a colaboração para a concretização deste trabalho.

A todos que fazem parte do Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos (LPNS), por todas as contribuições, companheirismo e conhecimento adquirido durante os anos de convivência. Em especial a Priscila Brandão, que se tornou grande amiga dentro e fora da Universidade e quem deixará muita saudade!

Aos Professores do Departamento de Farmácia, por todos os ensinamentos transmitidos desde a graduação até o Mestrado. Aos Professores do Departamento de Antibióticos, pelo acolhimento, ensinamentos e colaborações. Em especial à Prof^ª. Kêsia Xisto, pela paciência e participação ativa nos testes microbiológicos realizados em seu laboratório. Às Professoras Doutoras Terezinha Gonçalves e Gardênia Militão pela realização dos testes citotóxicos. Ao Prof.^o Dr.^o Rafael Ximenes pelas sugestões e amizade durante o curso.

À Prof.^a Dr^a Mônica Albuquerque, ao Prof.^o Dr.^o André Aires e toda sua equipe pela realização dos testes esquistossomicidas.

Aos funcionários da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, em especial à Eliete Barros e Abene Ribeiro, pelas análises espectroscópicas.

Aos amigos e colegas do PPGCF-UFPE, pela amizade, horas de estudo e trocas de conhecimento durante o curso.

Aos colegas dos outros laboratórios, em especial à Anekécia, Antônio Sérgio, Jamerson de Oliveira, Luana Mariz, Risoleta Nogueira, Paulo Bruno e Tiago Bento, pela amizade e colaboração em algumas etapas do projeto.

A todos os meus amigos da graduação, em especial a Anselmo Segundo, Juliana Santos, Lecílio Soares, Mayara Karolyne e Monielle Costa, que sempre estiveram na caminhada comigo e por todo carinho de sempre.

Às minhas grandes amigas Keliny Cláudia, Natália Cunha, Nathallya Tayanny e Rafaela Carolina pela amizade, carinho e palavras de incentivo.

À família que Deus me permitiu escolher, os meus amigos de fé, Claudiane Renata, Robson Duarte, Rhayssa Anneccetto, Everton Melo, Márcio Melo, Leandro Barbosa e Ulisses Duarte, pela amizade, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus amigos de profissão João Pinilla e Mário Neto, pela amizade e conselhos.

Aos meus pais, Rosangela e Joaquim, por todos os esforços, ensinamentos, dedicação, amor, carinho e incentivo, essenciais durante toda minha formação. Sem eles, tudo seria mais difícil. Às minhas irmãs (Natali e Micaléide) e familiares pelo apoio e amor.

Ao meu amigo e namorado, Diogo Lopes, pelo amor, companheirismo, apoio, incentivo e por compartilhar das minhas expectativas.

Ao CNPq pelo projeto aprovado.

Agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste trabalho.

RESUMO

Esquistossomose é considerada pela Organização Mundial de Saúde um grave problema de saúde pública, uma vez que acomete milhões de pessoas em vários países do mundo. O fármaco atualmente utilizado para o tratamento desta parasitose é o Praziquantel. Porém, foi evidenciado que algumas cepas de *S. mansoni* vêm desenvolvendo uma possível resistência a esta droga. Diante deste fato e sabendo-se que as tiazolhidrazonas possuem diversas atividades biológicas comprovadas, este estudo teve como objetivos o planejamento estrutural, a síntese e avaliação das atividades esquistossomicida, microbiológica e citotóxica de novas 2-tiazolhidrazonas a fim de contribuir no tratamento da esquistossomose mansônica, doenças microbianas e alguns tipos de câncer. Dezesesseis moléculas foram sintetizadas, oito tiossemicarbazonas e oito tiazolhidrazonas. A síntese das novas tiazolhidrazonas foi realizada em duas etapas. As dezesseis moléculas foram avaliadas quanto ao seu potencial microbiológico, através do método qualitativo de difusão de disco de papel, e citotóxico, a partir do método do MTT. As novas tiazolhidrazonas também foram avaliadas quanto a sua atividade esquistossomicida *in vitro* frente aos parasitos adultos do *S. mansoni*. Para a avaliação microbiológica foram utilizados micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos, bactéria álcool-ácido resistente e levedura. A determinação da atividade citotóxica foi realizada frente às linhagens de células humanas: HL60 (leucemia promielocítica), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HEp-2 (carcinoma de laringe) e NCI H-292 (carcinoma epidermoide de pulmão). Os compostos foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas convencionais e apresentaram rendimentos satisfatórios. As moléculas não apresentaram boas atividades microbiológica, halos entre 8,33 e 25 mm, e esquistossomicida, na concentração de 100 µg/mL, com maior percentual de mortalidade de 36,36% (IIe). Porém, apresentaram boa atividade citotóxica com percentuais de inibição de até 97,1% (IIIf). Diante dos resultados obtidos na atividade citotóxica, foi possível concluir que a capacidade de inibição da proliferação celular das tiazolhidrazonas foi superior quando comparada àquela demonstrada por sua tiossemicarbazona correspondente. Outro aspecto a ser concluído é que estas moléculas devem passar por novas modificações a fim de melhorar as suas atividades microbiológica e esquistossomicida.

Palavras-chaves: Antimicrobiano. Atividade citotóxica. Esquistossomose. Tiazolhidrazona. Tiossemicarbazona.

ABSTRACT

Schistosomiasis is considered by the World Health Organization a serious public health problem as it affects millions of people in several countries around the world. The drug currently used for the treatment of this disease is the Praziquantel. However, it was shown that some strains of *S. mansoni* have been developing a possible resistance to this drug. Considering this fact and knowing that thiazolyldihydrazone have several proven biological activities, this study aimed at structural design, synthesis and evaluation of schistosomicidal, microbiological and cytotoxic activity of new 2- thiazolyldihydrazone to contribute to the treatment of schistosomiasis mansoni, bacterial diseases and some kinds of cancers. Sixteen molecules were obtained, eight thiazolyldihydrazone and eight thiosemicarbazones. The synthesis of new thiazolyldihydrazone was performed in two steps. The sixteen molecules were evaluated for their antibacterial potential by the paper disc diffusion qualitative method and cytotoxic, by the MTT method. The new thiazolyldihydrazone were also evaluated for their in vitro antischistosomal activity forward to adult parasites of *S. mansoni*. For microbiological evaluation were used microorganisms Gram-positive bacteria group, Gram-negative, Alcohol acid resistant and yeast. The cytotoxicity determination was performed against human cell lines: HL60 (promyelocytic leukemia), MCF-7 (breast carcinoma), HEp-2 (laryngeal carcinoma) and NCI H-292 (lung cancer). The compounds were characterized by standard spectroscopic techniques and had satisfactory yields. The molecules did not show good microbiological activities, halos between 8,33 and 25 mm, and schistosomicidal with concentration of 100 mg/mL, with highest percentage of mortality of 36.36% (IIe). However, showed good cytotoxic activity with percentage inhibition up to 97.1% (IIf). Given the results obtained in cytotoxic activity, it was concluded that the ability to inhibit cell proliferation thiazolyldihydrazone was superior compared to that demonstrated by its corresponding thiosemicarbazone. Another aspect to be concluded is that these molecules must undergo further modifications to improve its microbiological and antischistosomal activities.

Keywords: Antimicrobial. Cytotoxic activity. Schistosomiasis. Thiazolyldihydrazone. Thiosemicarbazone.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Esquema sintético para obtenção dos (2-arilidenohidrazino)-4-(2,4-dicloro-5-fluorofenil)tiazóis. I) Etapa de condensação de aldeídos aromáticos (14) com a tiossemicarbazida (15); II) Etapa de ciclização da ariltiossemicarbazona (16) com brometo de 2,4-dicloro-5-flúor-acetofenona (17).....	28
Esquema 2.	Esquema sintético para obtenção das novas tiazolhidrazonas contendo anéis de ciclobutano 3-substituídos (CUKUROVALI et al., 2006).....	29
Esquema 3.	Rota sintética para obtenção das 2-tiazolhidrazonas (CHIMENTI et al., 2007).....	30
Esquema 4.	Esquemas de síntese dos compostos 1-(1-ariletilideno) tiossemicarbazona (28) e N-(1-ariletilideno)-N'-[4-(indan-5-il)tiazol-2-il]hidrazonas (30) (TURAN-ZITOUNI et al., 2008).....	30
Esquema 5.	Rota sintética para obtenção dos derivados da 4-acil-2-tiazolhidrazona.....	31
Esquema 6.	Rota sintética para obtenção dos 2,4-disubstituídos-1,3-iazóis.....	32
Esquema 7.	Rota de síntese para obtenção das N-(4-ariltiazol-2-il)hidrazonas.....	32
Esquema 8.	Rota sintética para obtenção das 2-tiazolhidrazonas substituídas com acetilpiridina.....	33
Esquema 9.	Rota sintética para obtenção das novas tiazolhidrazonas: (A) Tiossemicarbazida; (B) Aldeído aromático; (C) Tiossemicarbazona; (D) 2-Bromo-4'-hidroxiacetofenona; (D) Tiazolhidrazona.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estruturas químicas: (1) Hidrazona; (2) Tiazol.....	22
Figura 2 -	Estrutura química das tiossemicarbazonas (BERALDO, 2004).....	23
Figura 3 -	Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas (TENÓRIO et al., 2005).....	23
Figura 4 -	Representação das conformações das tiossemicarbazonas (TENÓRIO et al., 2005).....	24
Figura 5 -	Representação dos estereoisômeros <i>E</i> e <i>Z</i> das tiossemicarbazonas.....	24
Figura 6 -	Estratégias de síntese das tiossemicarbazonas (TENÓRIO et al., 2005).....	26
Figura 7 -	Sistema de numeração do núcleo tiazólico (SIDDIQUI et al., 2009).....	26
Figura 8 -	Moléculas biologicamente ativas possuidoras do núcleo tiazolínico (SOUZA et al., 2005).....	27
Figura 9 -	Formas de ressonância do anel tiazólico.....	28
Figura 10 -	Estrutura química dos compostos sintetizados (LV et al., 2009).....	34
Figura 11 -	Estrutura básica dos N-(1-ariletillideno)-N'-[4-(indan-5-il) tiazol-2-il]hidrazonas (TURAN-ZITOUNI et al., 2008).....	35
Figura 12 -	Estrutura básica dos compostos desenvolvidos com atividade antimicobacteriana (OZADALI et al., 2014).....	35
Figura 13 -	Estrutura dos compostos desenvolvidos com atividade iMAO-B. Os círculos vermelhos indicam a posição 4 do anel onde foram introduzidos os átomos de flúor e cloro (DISTINTO et al., 2012).....	36
Figura 14 -	Estrutura do benzilideno-2-(4-substituído-feniltiazol-2-il)hidrazina (BHARTI & SINGH, 2014).....	37
Figura 15 -	Estrutura de TZHs candidatas a fármacos anti-chagásicos (CAPUTTO et al., 2012).....	37
Figura 16 -	Mapa representativo da distribuição global da esquistossomose, indicando a prevalência da doença (UTZINGER et al., 2010).....	39
Figura 17 -	Mapa representativo da distribuição da esquistossomose no território brasileiro, indicando as áreas endêmicas (BRASIL, 2009).....	40
Figura 18 -	Macho do <i>S. mansoni</i> . Acima (em menor escala) um casal, mostrando a	

	fêmea inserida no canal ginecofórico do macho (LAMBERTUCCI, 2010).....	41
Figura 19 -	Cercária penetrando à pele (à esquerda); esquistossômulo (à direita) (LAMBERTUCCI, 2010).....	42
Figura 20 -	Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> (SOUZA et al., 2011).....	42
Figura 21 -	Dermatite cercariana (GRYSEELS et al., 2012).....	43
Figura 22 -	Granuloma hepático em torno de ovo de <i>S. mansoni</i> no fígado de um rato experimentalmente infectado (à esquerda); criança com hepatoesplenomegalia (à direita) (GRYSEELS et al., 2012).....	44
Figura 23 -	Estruturas químicas da Oxaminiquina (à esquerda) e do Praziquantel (à direita) (CIOLI et al., 1995).....	46
Figura 24 -	Espectro de IV do composto Ia	63
Figura 25 -	Espectro de RMN ¹ H do composto Ia	64
Figura 26 -	Espectro de RMN ¹³ C do composto Ia	65
Figura 27 -	Espectro de IV do composto Iic	70
Figura 28 -	Espectro de RMN ¹ H do composto Iic	72
Figura 29 -	Espectro de RMN ¹³ C do composto Iic	74
Figura 30 -	Estruturas de tiazolhidrazonas: à direita - sintetizada para este trabalho; à esquerda - sintetizada por Alam et al., 2011.....	87
Figura 31 -	Estruturas dos compostos Ia (à esquerda) e Ig (à direita), mostrando que há diferença na atividade citotóxica quando a posição do substituinte é modificada.....	89
Figura 32 -	Estruturas dos compostos Iib (à esquerda) e Iig (à direita), mostrando que há diferença na atividade citotóxica quando a posição do substituinte é modificada.....	90
Figura 33 -	Exemplo de atividade citotóxica de tiazolhidrazona (à direita) obtida após ciclização de tiossemicarbazona (à esquerda).....	91

LISTA DE TABELAS

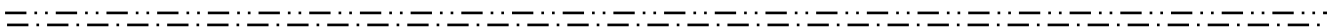
Tabela 1.	Compostos sintetizados e seus respectivos códigos.....	53
Tabela 2.	Condições de crescimento dos micro-organismos utilizados em testes de antagonismo realizados nos compostos obtidos por síntese.....	58
Tabela 3.	Constantes físico-químicas dos compostos sintetizados.....	61
Tabela 4.	Mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com os derivados tiazólicos sintetizados (%)......	80
Tabela 5.	Motilidade dos vermes (%) no grupo controle e depois de tratados com o Praziquantel e com as tiazolhidrazonas em diferentes tempos pós-incubação.....	81
Tabela 6.	Atividade antimicrobiana de compostos testados contra cepas bacterianas e levedura, utilizando o método de difusão em disco (diâmetro do halo de inibição em mm)......	84
Tabela 7.	Efeito da inibição do crescimento (% de inibição) em linhagens celulares de carcinoma humano (em 25 µg/mL)......	88
Tabela 8.	IC ₅₀ (em µg/mL) para os compostos II f e II g.....	91

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	TIOSSEMICARBAZONAS.....	22
2.1.1	Aspectos químicos e moleculares.....	23
2.1.2	Síntese das tiossemicarbazonas.....	25
2.2	THIAZÓIS.....	26
2.2.1	Aspectos químicos e moleculares.....	27
2.2.2	Síntese dos tiazóis.....	28
2.2.3	Aplicações farmacológicas dos tiazóis.....	33
2.2.3.1	Atividade Antibacteriana.....	33
2.2.3.2	Atividade Antituberculose.....	34
2.2.3.3	Atividade inibidora da MAO.....	36
2.2.3.4	Atividade anti-inflamatória.....	36
2.2.3.5	Atividade antichagásica.....	37
2.3	ESQUISTOSSOMOSE.....	38
2.3.1	Ciclo de vida.....	40
2.3.2	A doença.....	43
2.3.3	Tratamento.....	45
3	OBJETIVOS.....	47
3.1	GERAL.....	48
3.2	ESPECÍFICOS.....	48
4	MATERIAL E MÉTODO.....	49
4.1	ESTUDO QUÍMICO.....	50
4.1.1	Materiais.....	50
4.1.1.1	Equipamentos.....	50
4.1.1.2	Reagentes e Solventes.....	51
4.1.2	Procedimento experimental para obtenção das novas tiazolhidrazonas.....	51
4.1.3	Métodos.....	52
4.1.3.1	Síntese das benzaldeídos-tiossemicarbazonas (Ia-h).....	52
4.1.3.2	Síntese das novas tiazolhidrazonas (IIa-h).....	53
4.2	ESTUDO BIOLÓGICO.....	54

4.2.1	Avaliação da atividade esquistossomicida.....	55
4.2.1.1	Animais.....	55
4.2.1.2	Materiais e Equipamentos.....	55
4.2.1.3	Infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	55
4.2.1.4	Perfusão do sistema porta para recuperação de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	56
4.2.1.5	Avaliação da suscetibilidade in vitro de vermes adultos <i>Schistosoma mansoni</i> frente aos compostos sintetizados.....	56
4.2.2	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	56
4.2.2.1	Método de difusão em disco de papel.....	57
4.2.3	Avaliação da citotoxicidade dos compostos.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1	ESTUDO QUÍMICO.....	61
5.1.1	Análise espectrocópica.....	62
5.1.1.1	Tiossemicarbazonas.....	62
5.1.1.1.1	4-Clorotiossemicarbazona (Ia).....	66
5.1.1.1.2	4-Bromotiossemicarbazona (Ib).....	66
5.1.1.1.3	4-Nitrotiossemicarbazona (Ic).....	67
5.1.1.1.4	4-Fluortiossemicarbazona (Id).....	67
5.1.1.1.5	3-Clorotiossemicarbazona (Ie).....	68
5.1.1.1.6	3-Fluortiossemicarbazona (If).....	68
5.1.1.1.7	3-Bromotiossemicarbazona (Ig).....	69
5.1.1.1.8	3-Nitrotiossemicarbazona (Ih).....	69
5.1.1.2	Tiazolhidrazonas.....	70
5.1.1.2.1	4-{2-[N'-(4-Cloro-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (IIa).....	75
5.1.1.2.2	4-{2-[N'-(4-Bromo-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (IIb).....	75
5.1.1.2.3	4-{2-[N'-(4-Nitro-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (IIc).....	76
5.1.1.2.4	4-{2-[N'-(4-Fluor-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (IId).....	76
5.1.1.2.5	4-{2-[N'-(3-Cloro-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (IIe).....	77
5.1.1.2.6	4-{2-[N'-(3-Fluor-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (IIf).....	78
5.1.1.2.7	4-{2-[N'-(3-Bromo-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (IIg).....	78
5.1.1.2.8	4-{2-[N'-(3-Nitro-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (IIh).....	79
5.2	ESTUDO BIOLÓGICO.....	79

5.2.1	Avaliação da atividade esquistossomicida dos compostos sintetizados.....	79
5.2.2	Estudo da atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados.....	83
5.2.3	Estudo da atividade citotóxica dos compostos sintetizados.....	87
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	92
	REFERÊNCIAS.....	94



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são patologias causadas por diversos agentes infecciosos, como vírus, bactérias, protozoários e helmintos. Essas doenças são consideradas endêmicas nas classes menos favorecidas da população. A Organização Mundial de Saúde (OMS) as considera como responsáveis por grande sofrimento humano, podendo levar as pessoas acometidas a óbito. A esquistossomose é uma das dezessete doenças consideradas como negligenciadas pela OMS. Em 2012, mais de 40 milhões de pessoas foram tratadas para este mal (WHO, 2014).

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por vermes Trematódeos do gênero *Schistosoma*. Seis espécies deste parasito são capazes de infectar o ser humano. No Brasil, a espécie infectante mais comum é a *Schistosoma mansoni*. Através dos caramujos do gênero *Biomphalaria* este parasito penetra nos mamíferos e desencadeia diferentes sintomas, que variam de simples dermatites até graves complicações hepáticas (WHO, 2013).

O tratamento mais utilizado contra esta parasitose é o Praziquantel. Este fármaco apresenta boa tolerância, menor custo e baixa toxicidade quando comparado aos demais (BRASIL, 2005; TALLIMA & RIDI, 2007; KATZ & COELHO, 2008). Porém, o surgimento de resistência dos parasitos a este fármaco, impulsionou as pesquisas a fim de encontrar uma droga eficaz, segura e de boa tolerabilidade para o tratamento desta doença parasitária.

As tiazolhidrazonas possuem um anel tiazólico e uma hidrazona em sua estrutura química. Pelo método tradicional, para obtenção destes compostos são necessárias duas reações. Na primeira delas obtém-se um derivado tiossemicarbônico; na segunda ocorre a formação do núcleo tiazólico. Pesquisadores do mundo inteiro dedicam-se na síntese e estudo destas moléculas, visto que possuem inúmeras atividades biológicas e conseguem atuar em diversos alvos do organismo.

Das diversas atividades biológicas atribuídas às tiazolhidrazonas, merecem destaque: atividade antimicrobiana (LV et al., 2009; BHARTI et al., 2010), atividade antituberculose (TURAN-ZITOUNI et al., 2008; OZADALI et al., 2014), atividade inibidora da enzima monoamina oxidase (DISTINTO et al., 2012), atividade anti-inflamatória (BHARTI & SINGH, 2014) e atividade antichagásica (CAPUTTO et al., 2012).

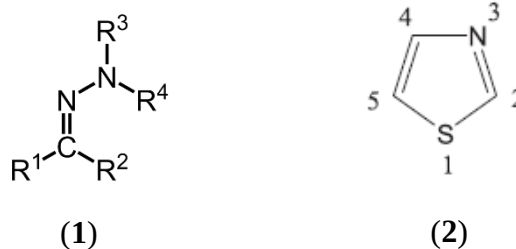
Diante do exposto, dezesseis compostos foram sintetizados, sendo oito tiossemicarbazonas e oito inéditas tiazolhidrazonas. As moléculas foram avaliadas *in vitro* frente a vermes adultos *S. mansoni*. Os potenciais antimicrobiano e citotóxico dos compostos também foram estudados.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

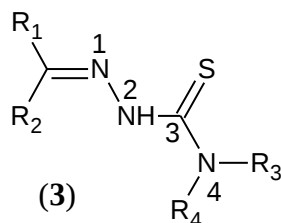
Vários compostos com potenciais propriedades biológicas são obtidos por meio de combinações na mesma molécula orgânica de espécies químicas que por si só possuem atividades biológicas. Por meio da junção das moléculas ativas, espera-se um efeito cooperativo das mesmas, o que potencializa a atividade biológica nos compostos sintetizados (TARASCONI et al., 2000). Partindo desse princípio, moléculas contendo dois grupos bioativos foram sintetizadas. Estes compostos possuem em suas estruturas partes hidrazonas (1) e tiazóis (2), sendo nomeados de tiazolhidrazonas. Assim, pode acontecer um sinergismo na ação das moléculas sintetizadas (**Figura 1**).

Figura 1 - Estruturas químicas: (1) Hidrazona; (2) Tiazol.



2.1 TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas (3) (**Figura 2**) consistem em uma das classes de compostos orgânicos mais estudados pela Química Medicinal. Estas moléculas despertam o interesse dos pesquisadores devido ao fato de possuírem um amplo perfil farmacológico. Dentre algumas atividades destacam-se a antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária e citotóxica (TENÓRIO et al., 2005). Porém, apesar desta versatilidade farmacológica, algumas especificidades em suas estruturas podem acarretar o desenvolvimento de atividades altamente específicas (BERALDO, 2004).

Figura 2 - Estrutura química das tiossemicarbazonas.

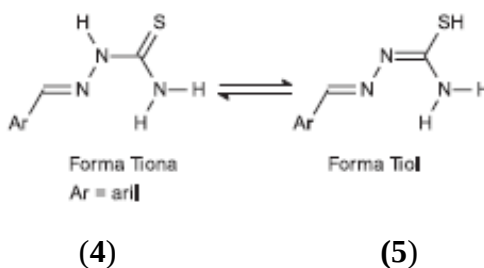
$R_1, R_2, R_3, R_4 = H, \text{ Alquil ou Aril}$

Fonte: BERALDO, 2004.

Estas moléculas são normalmente obtidas a partir de reações de condensações quimiosseletivas de tiossemicarbazidas com aldeídos ou cetonas. As reações para síntese das tiossemicarbazonas apresentam baixo custo e economia atômica, pois apenas água é liberada durante a síntese, enquanto todos os outros átomos dos reagentes encontram-se no produto final. Assim, a obtenção destes compostos é dita como versátil, fazendo com que estes sejam extensivamente utilizados como reações intermediárias para a aquisição de núcleos importantes (TENÓRIO et al., 2005).

2.1.1 Aspectos químicos e moleculares

As tiossemicarbazonas apresentam-se como sistemas com extrema deslocalização eletrônica, principalmente quando há grupos aromáticos ligados ao carbono da imina. Devido a isto, estes compostos podem coexistir na forma tiona (4) ou tiol (5) em equilíbrio tautomérico (**Figura 3**) (TENÓRIO et al., 2005).

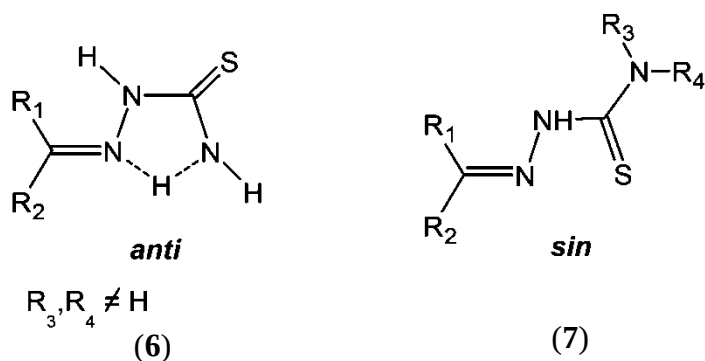
Figura 3 - Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas

Fonte: (TENÓRIO et al., 2005).

As tiossemicarbazonas não substituídas na posição N-4 apresentam estrutura básica, $C=N-NHCS-NH_2$, aproximadamente planar, com o átomo de enxofre em posição *anti* em

relação ao átomo de nitrogênio da função imina. Este arranjo estrutural é favorecido por fatores eletrônicos e estéricos. A formação de ligação de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio da imina e os hidrogênios da tioamida é favorecida quando o átomo de enxofre encontra-se em posição *anti* (6). Este, provavelmente, seja o fator que mais contribua para a formação deste arranjo estrutural. Porém, quando ocorrem adições de grupos substituintes na posição N-4, a posição *anti* (6) é alterada significativamente. Este fato contribui para a conformação *sin* (7) entre o átomo de nitrogênio da imina e o átomo de enxofre (**Figura 4**) (TENÓRIO et al., 2005).

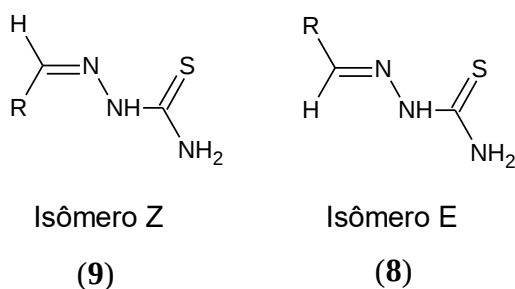
Figura 4 - Representação das conformações das tiossemicarbazonas.



Fonte: TENÓRIO et al., 2005.

De forma geral, as tiossemicarbazonas (3), obtidas a partir de reações de aldeídos, tendem a formar, preferencialmente, o isômero *E* (8), pois este é termodinamicamente mais estável em relação ao isômero *Z* (9). Por outro lado, as tiossemicarbazonas obtidas por meio de reações que utilizam cetonas assimétricas, a proporção entre *E* (8) e *Z* (9) depende da estrutura dos substituintes ligados à carbonila (**Figura 5**) (TENÓRIO et al., 2005).

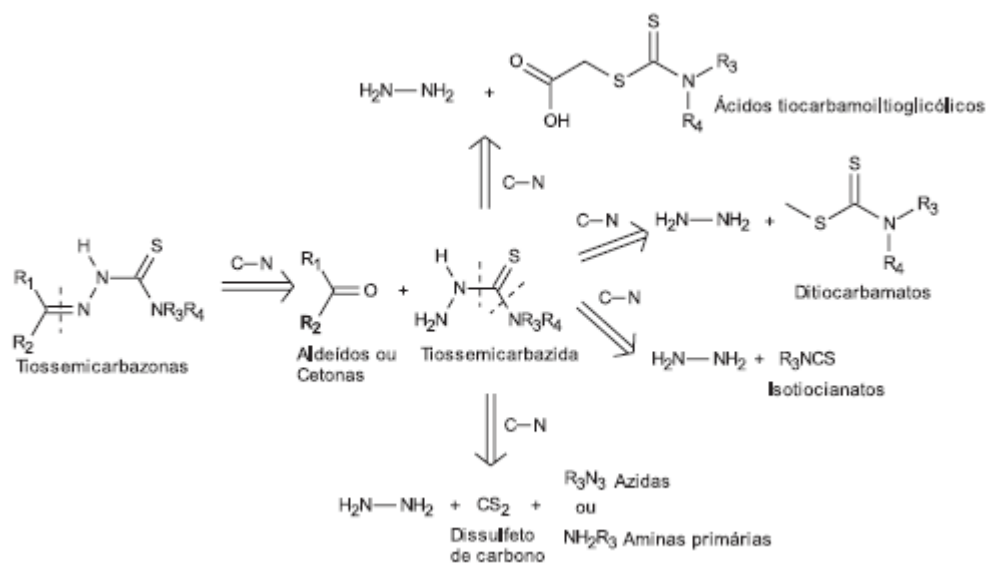
Figura 5 - Representação dos estereoisômeros *E* e *Z* das tiossemicarbazonas.



Do ponto de vista da química de coordenação, as tiossemicarbazonas (3) apresentam-se como ligantes versáteis, podendo se ligar aos metais tanto na forma neutra quanto na forma aniônica (LOBANA et al., 2009). As atividades farmacológicas desta classe de compostos estão frequentemente relacionadas à coordenação a um íon metálico. Esta propriedade destes compostos promove mudanças na lipofilia, parâmetro que determina a velocidade de entrada do composto na célula. Com isso, o complexo metálico pode ser mais ativo que a tiossemicarbazona livre, e alguns efeitos colaterais podem diminuir pela coordenação. O mecanismo de ação pode envolver a ligação do centro metálico em um sítio biológico ou o complexo metálico pode agir como um meio de ativação do ligante. Finalmente, a coordenação pode levar a uma mudança no mecanismo de ação da droga e consequente redução da resistência à droga (BERALDO, 2004).

2.1.2 Síntese das tiossemicarbazonas

Existem duas metodologias que podem ser utilizadas para a síntese das tiossemicarbazonas. A primeira delas é a obtenção direta, que se passa a partir da reação quimiosseletiva de aldeídos e/ou cetonas com as tiossemicarbazidas em meio alcoólico, sob refluxo, e com quantidades catalíticas de ácido. Esta reação é muito utilizada por possuir alta quimiosseletividade e rapidez, apresentando, geralmente, altos rendimentos (CASTIÑEIRAS et al., 1999). Na outra estratégia que pode ser empregada, é necessária a obtenção prévia das tiossemicarbazidas, a partir de hidrazina ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$) e diferentes reagentes, para posterior reação de condensação com o derivado carbonilado apropriado (**Figura 6**) (TENÓRIO et al., 2005).

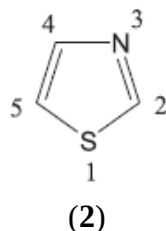
Figura 6 - Estratégias de síntese das tiossemicarbazonas

Fonte: TENÓRIO et al., 2005.

Quanto à nomenclatura, recebem o nome da classe tiossemicarbazona após o nome do respectivo aldeído ou cetona (HANG & BERTOZZI, 2001).

2.2 TIAZÓIS

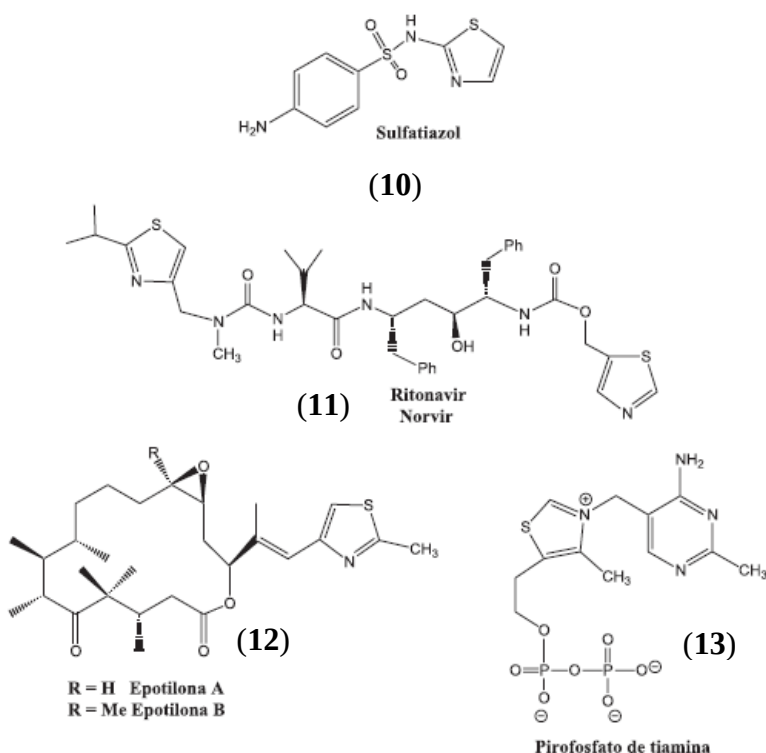
Os compostos tiazolínicos consistem em uma classe importante de compostos heterocíclicos que apresentam um leque diversificado de atividades biológicas (LV et al., 2009). Estas moléculas possuem além de carbono e hidrogênio, átomos de nitrogênio e enxofre como partes do anel aromático de cinco membros (**Figura 7**) (AZAM et al., 2009).

Figura 7 - Sistema de numeração do núcleo tiazólico

Fonte: SIDDIQUI et al., 2009.

Os núcleos tiazólicos estão presentes em várias moléculas biologicamente ativas, como o sulfatiazol (**10**), importante fármaco antimicrobiano, o ritonavir (Norvir®) (**11**) medicamento utilizado no combate ao vírus HIV, as epotilonas A e B, (**12**), produtos naturais que possuem potente atividade antitumoral e o pirofosfato de tiamina (**13**), presente em uma variedade de enzimas catalisadoras de reações de descarboxilação (descarboxilases) e de condensação do tipo aldólica (aldolases) (**Figura 8**) (SOUZA et al., 2005).

Figura 8 - Moléculas biologicamente ativas possuidoras do núcleo tiazolínico.



Fonte: SOUZA et al., 2005.

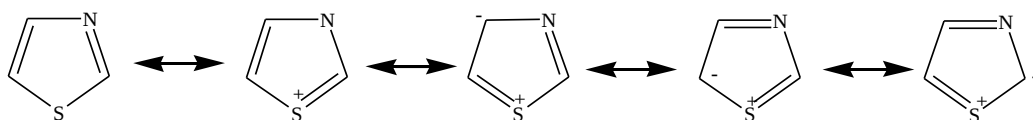
Estes compostos são bastante utilizados na síntese orgânica, podendo ser utilizados em reações de condensação, oxidação, transformação de grupos funcionais e formação de ligação carbono-carbono (SOUZA et al., 2005).

2.2.1 Aspectos químicos e moleculares

Os tiazóis (**2**) são compostos heterocíclicos, pois possuem heteroátomos, (átomos diferentes de carbono e hidrogênio), em seus anéis. Além disso, são aromáticos, uma vez que

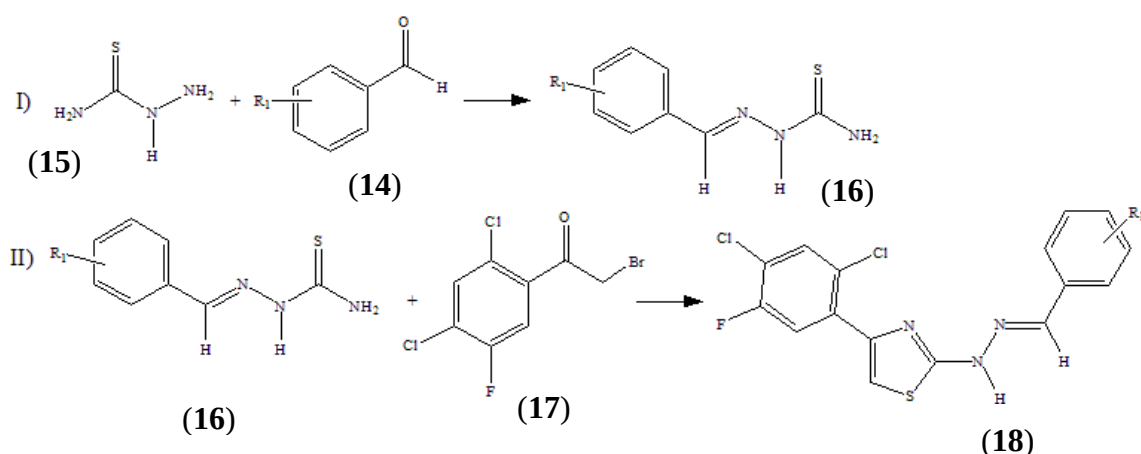
um par de elétrons do átomo de enxofre sofre deslocalização, completando seis elétrons π , o que é necessário para o cumprimento da regra de Hückel (**Figura 9**) (SIDDIQUI et al., 2009).

Figura 9 - Formas de ressonância do anel tiazólico.



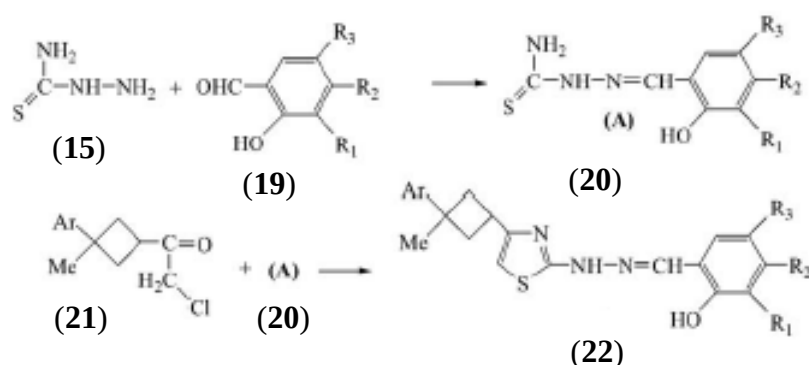
2.2.2 Síntese dos tiazóis

Em 2003, Holla e seu grupo de pesquisa sintetizaram seis novos derivados tiazólicos, com rendimentos variando entre 52 e 86%. Os compostos foram obtidos a partir da reação de condensação de aldeídos aromáticos apropriados (**14**) com tiossemicarbazida (**15**) na presença de ácido sulfúrico concentrado. O produto formado nessa primeira reação, ariltiossemicarbazonas, (**16**) reagiu com brometo de 2,4-dicloro-5-flúor-acetofenona (**17**) em etanol, sob refluxo, durante 3 horas. O sólido foi purificado e recristalizado em etanol, rendendo o derivado (2-arilidenohidrazina)-4-(2,4-dicloro-5-fluorofenil)-tiazóis (**18**) (**Esquema 1**) (HOLLA et al., 2003).



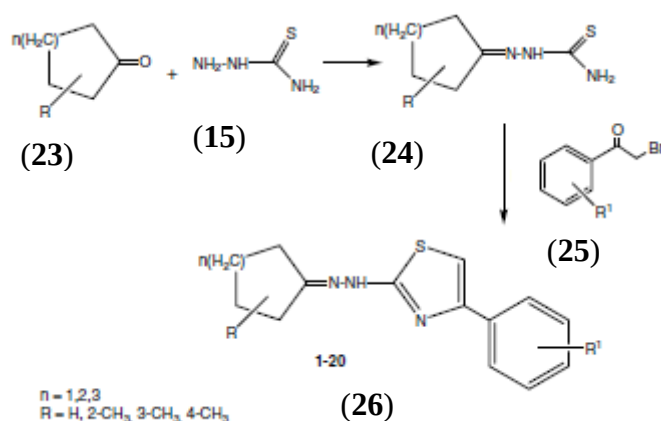
Esquema 1. Esquema sintético para obtenção dos (2-arilidenohidrazino)-4-(2,4-dicloro-5-fluorofenil)tiazóis. I) Etapa de condensação de aldeídos aromáticos (**14**) com a tiossemicarbazida (**15**); II) Etapa de ciclização da ariltiossemicarbazona (**16**) com brometo de 2,4-dicloro-5-flúor-acetofenona (**17**).

Cukurovali et al., em 2006, relataram a síntese de novas tiazolhidrazonas contendo anéis de ciclobutano 3-substituídos. O grupo sintetizou derivados tiossemicarbazônicos a partir da reação entre a tiossemicarbazida (15) e aldeídos selecionados (19) na presença de etanol e ácido para-toluenossulfônico, variando a temperatura entre 50 e 60 °C. Posteriormente, as tiossemicarbazonas (20) obtidas reagiram com α -clorocetona (21) para conversão em seus respectivos derivados de hidrazonas (22), contendo anéis tiazolínicos 2,4-dissubstituídos e ciclobutanos ligados a diferentes ciclos aromáticos, na presença de NaHCO_3 ou K_2CO_3 como um agente de neutralização a 60-70 °C durante cerca de 5 min (**Esquema 2**) (CUKUROVALI et al., 2006).



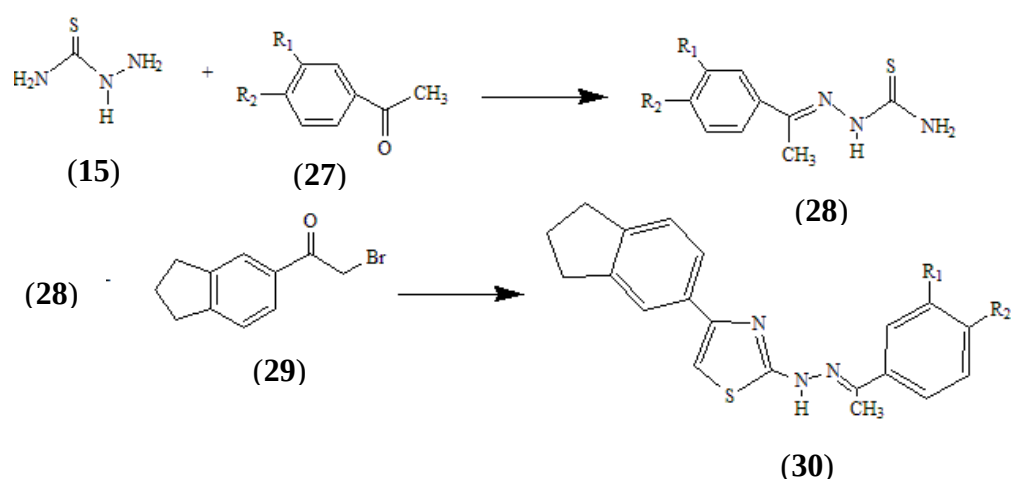
Esquema 2. Esquema sintético para obtenção das novas tiazolhidrazonas contendo anéis de ciclobutano 3-substituídos (CUKUROVALI et al., 2006).

Cetonas cíclicas ou aldeídos aromáticos (23) foram colocados para reagir diretamente com a tiossemicarbazida (15). Para esta reação foi utilizado ácido acético como catalisador e álcool isopropílico como solvente. Em seguida, as tiossemicarbazonas (24) obtidas reagiram com α -halogenocetonas (25), também utilizando álcool isopropílico, produzindo vinte derivados tiazólicos 4-substituídos. Os produtos das reações precipitaram no meio reacional, foram filtrados e purificados por cristalização a partir de etanol ou da mistura etanol/isopropanol para render as 2-tiazolhidrazonas (26) (**Esquema 3**) (CHIMENTI et al., 2007).



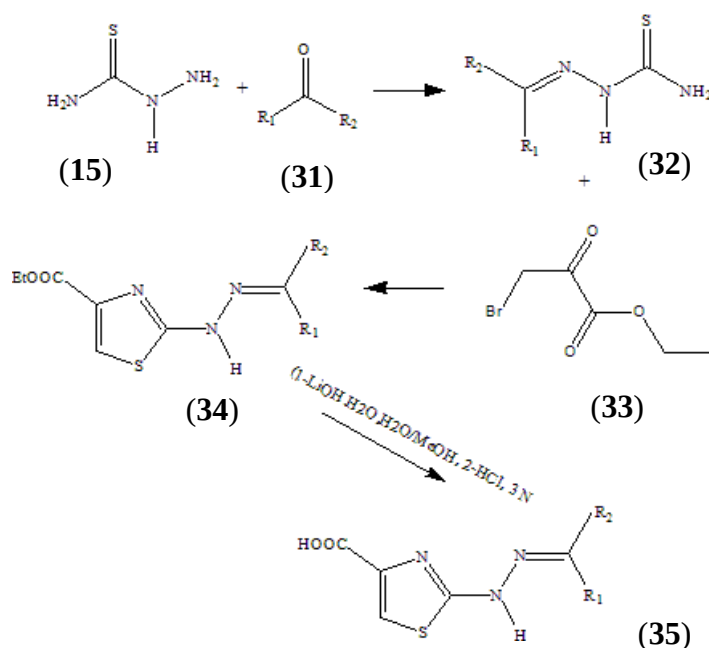
Esquema 3. Rota sintética para obtenção das 2-tiazolhidrazonas (CHIMENTI et al., 2007).

A síntese de novas tiazolhidrazonas também foi relatada Turan-Zitouni et al., em 2008. A tiossemicarbazida (15) e diferentes acetofenonas (27) reagiram em quantidades equimolares, produzindo 1-(1-ariletilideno) tiossemicarbazonas (28). A reação ocorreu sob refluxo durante 1 hora na presença de quantidade catalítica de ácido acético, utilizando álcool isopropílico como solvente. Em seguida, o produto da reação anterior (28) foi misturado a quantidades equimolares de 1-(5-indanil)-2-bromoetanona (29) sob refluxo em álcool isopropílico para obtenção das seis novas N-(1-ariletilideno)-N'-[4-(indan-5-il)tiazol-2-il]hidrazonas (30). Por fim, o sólido obtido foi filtrado e lavado com solução saturada NaHCO₃ e água, em seguida com água fria e depois cristalizado em etanol (**Esquema 4**) (TURAN-ZITOUNI et al., 2008).



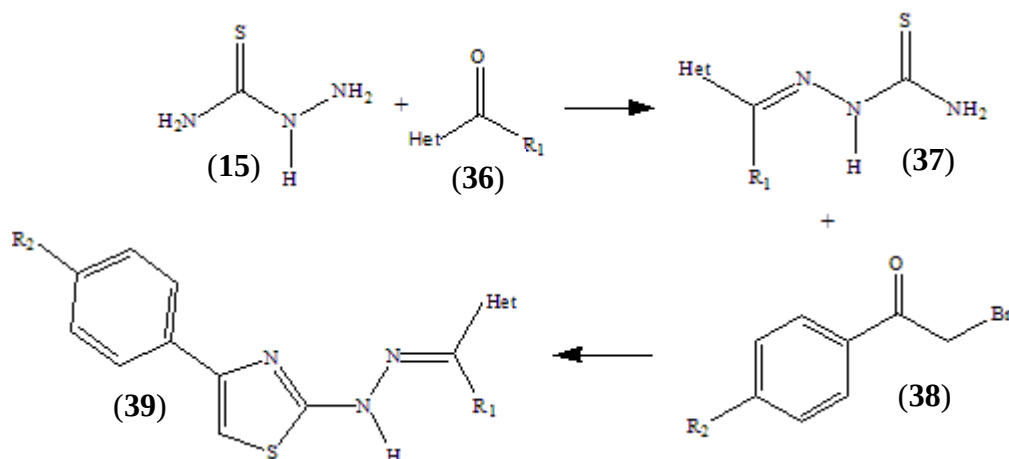
Esquema 4. Esquemas de síntese dos compostos 1-(1-ariletilideno) tiossemicarbazona (28) e N-(1-ariletilideno)-N'-[4-(indan-5-il)tiazol-2-il]hidrazonas (30) (TURAN-ZITOUNI et al., 2008).

Diferentes compostos carbonilados (31) foram submetidos à reação com a tiossemicarbazida (15) na presença de quantidades catalíticas de ácido acético em etanol. As tiossemicarbazonas obtidas (32) foram condensadas com o éster etílico do ácido bromopirúvico (33) em etanol para obtenção dos 1,3-tiazóis-2,4-dissubstituídos (34). Subsequentemente alguns dos derivados foram hidrolisados para o ácido carboxílico correspondente (35), através de hidrólise alcalina moderada (1-LiOH.H₂O, H₂O/MeOH, 2-HCl, 3 N), formando uma série de novos derivados 4-acil-2-tiazolhidrazonas (**Esquema 5**) (CHIMENTI et al., 2009).



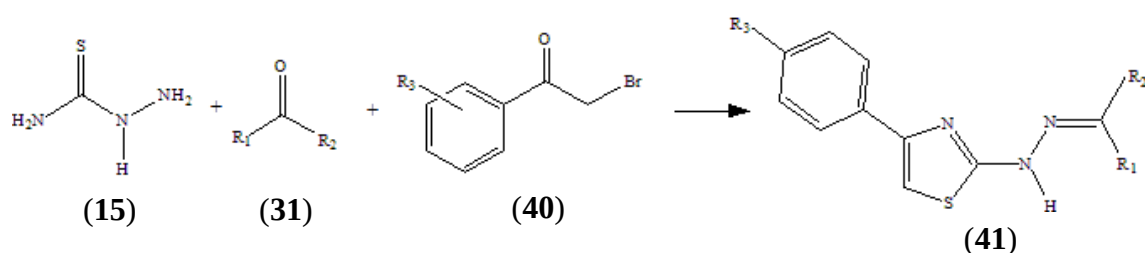
Esquema 5. Rota sintética para obtenção dos derivados da 4-acil-2-tiazolhidrazona.

Vários novos compostos foram obtidos em duas etapas. Na primeira, os pesquisadores reagiram vários compostos carbonilados (36) com tiossemicarbazida (15), utilizando ácido acético como catalisador e iso-propanol como solvente, à temperatura ambiente, obtendo tiossemicarbazonas (37). Posteriormente, os produtos destas reações foram condensados com α -bromo-4-metil/4-metoxiacetofenona (38), nas mesmas condições, culminando com a obtenção dos 2,4-dissubstituídos-1,3-tiazóis (39) (**Esquema 6**) (CHIMENTI et al., 2011).



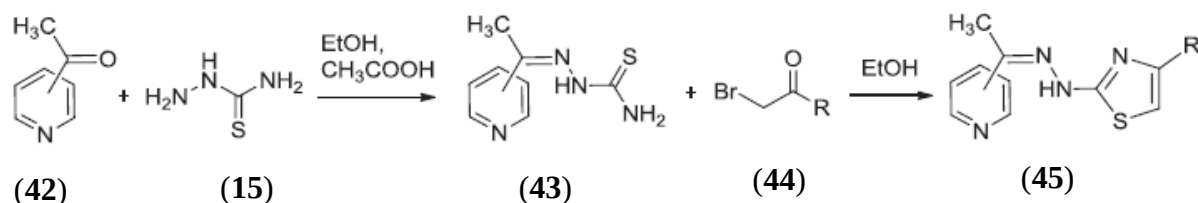
Esquema 6. Rota sintética para obtenção dos 2,4-dissubstituídos-1,3-tiazóis.

A síntese, em única etapa, de N-(4-ariltiazol-2-il)-hidrazonas foi realizada com sucesso reagindo aldeídos aromáticos ou cetonas (31), tiossemicarbazida (15), brometo de fenacil substituído (40) e água. A mistura reacional foi agitada e irradiada com ultrassom à temperatura ambiente. O produto N-(4-ariltiazol-2-il)-hidrazonas (41) foi lavado com etanol e purificado por cromatografia em coluna. Os rendimentos e o tempo reacional foram otimizados em relação à metodologia tradicional, que seria realizada em duas etapas e sem a utilização do ultrassom (**Esquema 7**) (ZHANG et al., 2012).



Esquema 7. Rota de síntese para obtenção das N-(4-ariltiazol-2-il)-hidrazonas.

Em 2013, novos compostos 2-tiazolhidrazonas-4-substituídos foram obtidos a partir de 2-, 3- e 4-acetilpiridina (42). Os reagentes 2-, 3- ou 4-acetilpiridina (42) e tiossemicarbazida (15) foram dissolvidos em etanol e ácido acético e agitados magneticamente por 24 horas à temperatura ambiente. As tiossemicarbazonas (43) preparadas reagiram com quantidades equimolares de α -halocetona ou α -haloceto éster (44) dissolvidos em etanol. As 2-tiazolhidrazonas-4-substituídas (45) resultantes foram filtradas e lavadas com éter de petróleo e éter dietílico (**Esquema 8**) (CHIMENTI et al., 2013).



Esquema 8. Rota sintética para obtenção das 2-tiazolhidrazonas substituídas com acetilpiridina.

2.2.3 Aplicações farmacológicas dos tiazóis

Os tiazóis representam uma classe de compostos cujas propriedades têm despertado cada vez mais interesse em pesquisadores atuantes na área de Química Medicinal. Isto se deve principalmente ao amplo espectro de aplicação farmacológica demonstrado por seus derivados.

Vários relatos literários têm demonstrado a gama de atividades biológicas concernentes aos núcleos tiazólicos, tendo como destaque a atividade antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, dentre outras.

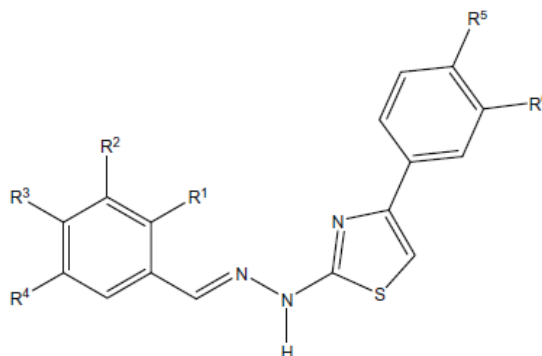
2.2.3.1 Atividade Antibacteriana

Em 2009, Lv et al. obtiveram 27 novas tiazolhidrazonas e as testaram contra três cepas de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Streptococcus faecalis* ATCC 9790) e três Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13525 e *Enterobacter cloacae* ATCC 13047). Os resultados revelaram que a maior parte dos compostos sintetizados mostrou significativa atividade antibacteriana. Três dos compostos sintetizados apresentaram as seguintes CMI's contra *E. coli* ATCC 35218: 1,56; 0,78; 1,56 µg/mL. Estes resultados mostraram ser promissores quando comparados aos demonstrados pelo controle positivo canamicina B (CMI = 3,125 µg/mL). Uma das moléculas mostrou atividade significativa para esta mesma bactéria, com CMI igual ao da canamicina B.

Um dos compostos sintetizados apresentou atividade potente com valor de CMI de 0,78 µg/mL contra *S. aureus* ATCC 6538, que foi superior ao do controle positivo penicilina G (CMI = 1,562 µg/mL). Outro derivado apresentou atividade significativa com valor de CMI de 1,562 µg/mL contra a mesma cepa bacteriana, a qual foi semelhante ao CMI da penicilina G. No geral, dois dos compostos mostraram não só atividade antibacteriana potente contra *E.*

coli ATCC 35218, mas também atividade favorável contra outras cinco cepas de bactérias, indicando amplo espectro de atividade antibacteriana (**Figura 10**) (LV et al., 2009).

Figura 10 - Estrutura química dos compostos sintetizados



Fonte: LV et al., 2009.

Bharti et al., em 2010, sintetizaram trinta bases de Schiff contendo hidrazona e anel tiazolínico 2,4-dissubstituído. As moléculas foram submetidas para avaliação de sua atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco e depois à determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Para realização deste estudo foram utilizadas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella typhi* (*S. typhi*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) e *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*).

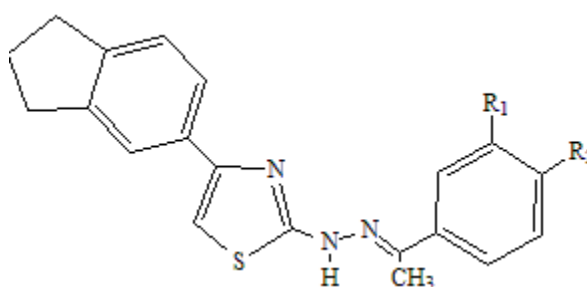
Alguns derivados mostraram moderada a boa atividade quando comparados com o padrão, ciprofloxacina. Os valores de CMI variaram entre 12,5-50 µg/mL em DMSO. Particularmente, o composto 2-(2-(4-(4-bromofenil)thiazol-2-il)hidrazona)-1,2-difeniletanol mostrou boa atividade (zona de inibição entre 17-20 mm na concentração de 12,5 µg/mL) contra *S. aureus* e *V. cholerae*. O composto 2-(2-(4-(4-metoxifenil)thiazol-2-il)hidrazona)-1,2-difeniletanol apresentou boa atividade contra *V. cholerae* (zona de inibição variando entre 16-19 mm na concentração de 25 µg/mL) (BHARTI et al., 2010).

2.2.3.2 Atividade Antituberculose

Em 2008, Turan-Zitouni et al. direcionaram seus estudos na busca por novas classes de agentes químicos com atividade antimicobacteriana. A partir de estudos de relação estrutura-atividade encontraram novos grupos farmacofóricos, entre elas as tiazolhidrazonas.

Assim, desenvolveram a síntese de N-(1-ariletillideno)-N'-[4-(indan-5-il)tiazol-2-il]hidrazonas e estudaram sua atividade anti-tuberculose e a toxicidade destas moléculas. Estes pesquisadores sintetizaram seis compostos. Dentre eles, quatro apresentaram excelentes percentuais de inibição contra o *Mycobacterium tuberculosis*, acima de 90%, e baixa citotoxicidade, ou seja, foram considerados agentes promissores para o tratamento da tuberculose (**Figura 11**) (TURAN-ZITOUNI et al., 2008).

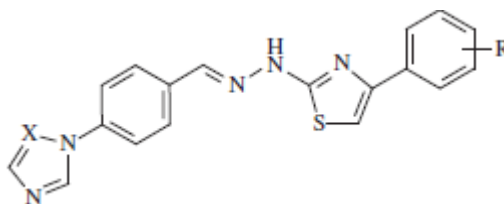
Figura 11 - Estrutura básica dos N-(1-ariletillideno)-N'-[4-(indan-5-il) tiazol-2-il]hidrazonas.



Fonte: TURAN-ZITOUNI et al., 2008.

Ozadali et al., em 2014, desenvolveram algumas tiazolhidrazonas e avaliaram a atividade *in vitro* destes compostos contra *Mycobacterium tuberculosis*. As atividades citotóxicas de todos os compostos também foram avaliadas. Os compostos apresentaram atividade antimicobacteriana promissora com CMIs entre 1,03-72,46 μM e fraca citotoxicidade (8,9-36,8% a 50 $\mu\text{g/mL}$). Entre as moléculas sintetizadas, o composto 1-(4-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-benzilideno)-2-(4-(4-nitrofenil)-tiazol-2-il)hidrazona, mostrou ser o mais ativo (CMI de 1,03 μM) com um bom perfil de segurança (16,4% a 50 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 12**) (OZADALI et al., 2014).

Figura 12 - Estrutura básica dos compostos desenvolvidos com atividade antimicobacteriana.

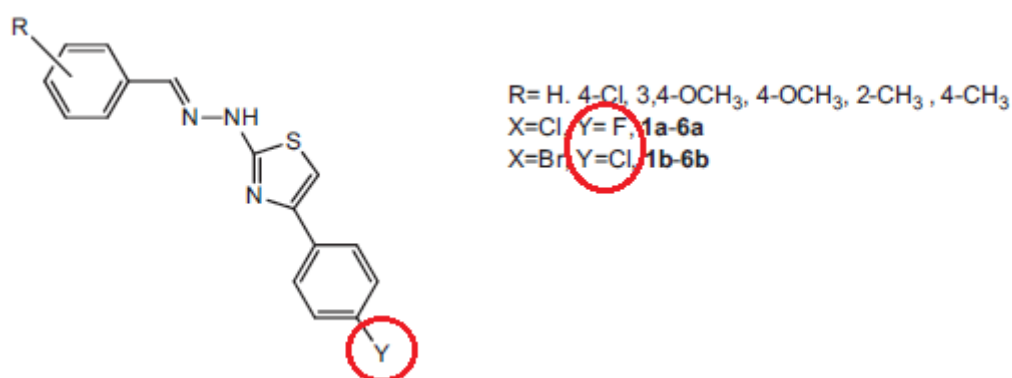


Fonte: OZADALI et al., 2014.

2.2.3.3 Atividade inibidora da MAO

Em 2012, Distinto e seus colaboradores sintetizaram derivados halogenados de 1-arilideno-2-(4-ariltiazol-2-il)hidrazona e avaliaram o efeito destes compostos frente a monoamina oxidase B (MAO-B), alvo promissor para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Os autores investigaram a influência da introdução de 4-cloro- ou 4-flúor-fenil na posição quatro do anel tiazólico. Os compostos substituídos com o átomo de cloro não inibiram a MAO-B. Entretanto, os derivados substituídos com 4-Flúor apresentaram efeito inibitório sob a isoforma B da monoamina oxidase com IC_{50} 's variando entre 0,19 e 44,74 μ M. As drogas-padrão utilizadas foram: clorgilina (IC_{50} : 61,35 μ M), deprenil (IC_{50} : 0,019 μ M) eiproniazida (IC_{50} : 7,54 μ M) (**Figura 13**) (DISTINTO et al., 2012).

Figura 13 - Estrutura dos compostos desenvolvidos com atividade iMAO-B. Os círculos vermelhos indicam a posição 4 do anel onde foram introduzidos os átomos de flúor e cloro.



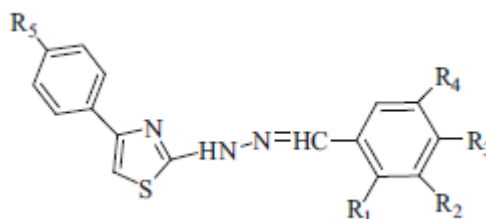
Fonte: DISTINTO et al., 2012.

2.2.3.4 Atividade anti-inflamatória

Uma série de benzilideno-2-(4-substituído-feniltiazol-2-il)hidrazina foi desenvolvida por Bharti & Singh, em 2014. A atividade anti-inflamatória destes compostos foi avaliada a partir de duas metodologias distintas. Avaliaram a inflamação aguda através do edema de pata induzido por carragenina e a inflamação crônica pelo modelo de granuloma induzido por *pellet* de algodão. A partir do primeiro método citado, observaram que sete compostos, em uma dose de 20 mg kg⁻¹ de peso corporal, por via oral, mostraram excelentes inibições (51,80-86,74%) entre uma e quatro horas. Através do modelo de granuloma induzido por *pellet* de algodão, esses mesmos compostos, nas mesmas dose e via de administração, inibiram a formação do granuloma (71,71-90,19% de inibição). Baseados nestes resultados, os autores

concluíram que das dezessete moléculas sintetizadas, sete apresentaram atividade anti-inflamatória comparável a de uma droga de referência, como ibuprofeno (90,36% de inibição do volume da pata em 3 horas e 94,02% de inibição na formação de granulomas) (**Figura 14**) (BHARTI & SINGH, 2014).

Figura 14 - Estrutura do benzilideno-2-(4-substituído-feniltiazol-2-il)hidrazina.

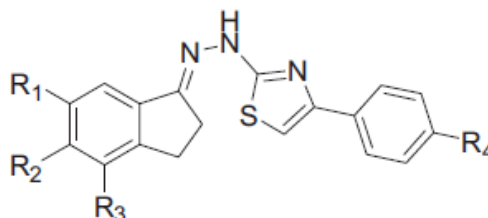


Fonte: BHARTI & SINGH, 2014.

2.2.3.5 Atividade antichagásica

Uma nova série de 4-ariltiazolhidrazonas (TZHs) derivada a partir de 1-indanonas foi sintetizada e submetida à avaliação *in vitro* quanto a sua atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. A atividade antichagásica foi determinada para as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota do parasita. A maioria das TZHs exibiu excelente atividade. Além disso, algumas foram mais potentes e seletivas do que o fármaco de referência, o Benznidazol, utilizado na quimioterapia atual. A partir da análise dos esteróis livres dos parasitas incubados, os autores determinaram que a inibição da biossíntese do ergosterol é o possível mecanismo de ação dessas novas moléculas (**Figura 15**) (CAPUTTO et al., 2012).

Figura 15 - Estrutura de TZHs candidatas a fármacos anti-chagásicos.



Fonte: CAPUTTO et al., 2012.

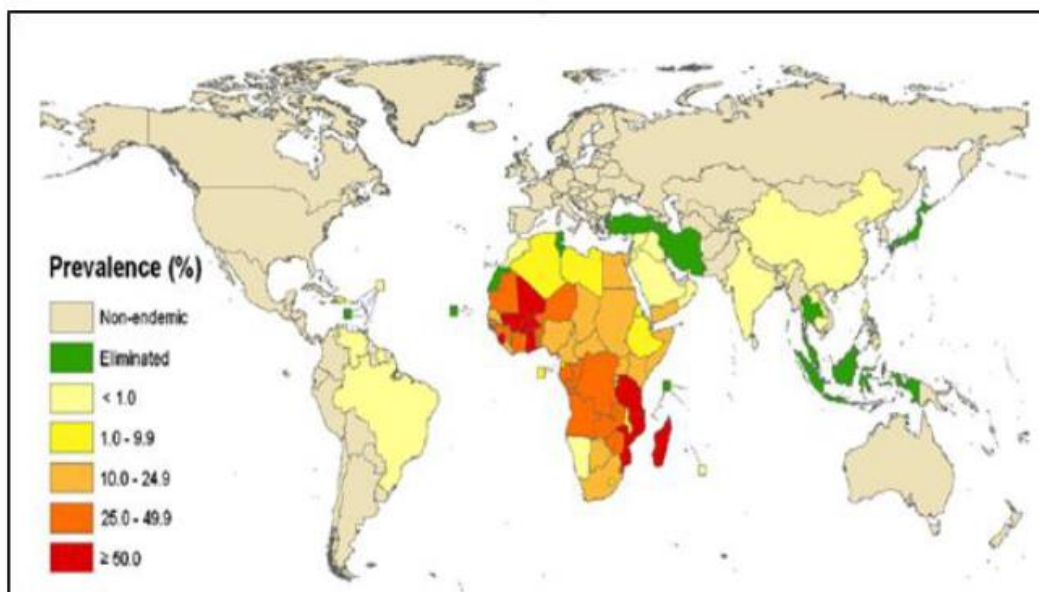
2.3 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose, doença causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*, é um grave problema mundial. Ocupa o segundo lugar das doenças de importância na Saúde Pública. A infecção por estes parasitos é mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, uma vez que nestas regiões é mais difícil o acesso à água potável e o saneamento básico é inadequado. Registros recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) relataram que, em 2012, 249 milhões de pessoas necessitaram de tratamento preventivo para esta parasitose e 42,1 milhões foram tratadas para a doença (WHO, 2014a).

A esquistossomose também é conhecida como “barriga d’água”, “xistossomose”, “xistosa” ou “doença do caramujo”, mas também pode ser chamada de bilharziose devido à sua descoberta por Theodore Bilharz (REY, 2008).

Seis espécies de *Schistosoma* são conhecidas no mundo. Destas seis, três merecem grande destaque, o *Schistosoma haematobium*, causadora da esquistossomose urinária, o *Schistosoma japonicum* e o *Schistosoma mansoni*, que causam a esquistossomose intestinal. As outras espécies, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma malayensis* e *Schistosoma mekongi*, causam infecções bem focais e, por isso, são de menor importância. No mundo, 77 países são afetados com as principais espécies de *Schistosoma*. O *S. mansoni* é encontrado na África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname; *S. haematobium* encontrado na África e Oriente Médio e o *S. japonicum* encontrado na China, Filipinas e Indonésia (**Figura 16**) (WHO, 2014a).

Figura 16 - Mapa representativo da distribuição global da esquistossomose, indicando a prevalência da doença.

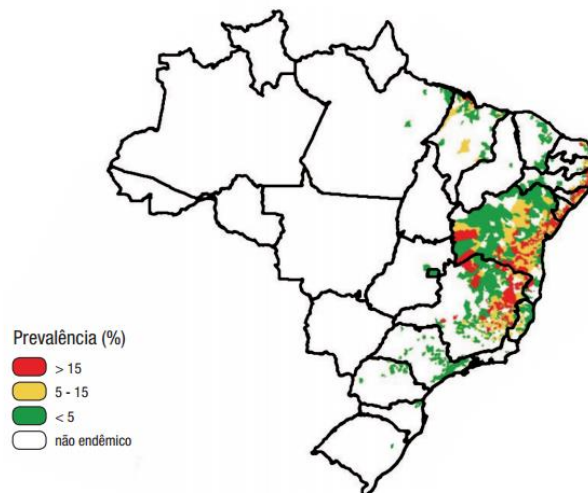


Fonte: UTZINGER et al., 2010.

No Brasil, as estimativas são de 6 a 8 milhões de pessoas infectadas pelo *S. mansoni* (VRANJAC, 2007). A região Nordeste apresenta mais da metade dos casos registrados em 2011 de esquistossomose mansônica, seguido da região Sudeste (BRASIL, 2013a). Os estados endêmicos são Alagoas, Maranhão, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. A transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (BRASIL, 2012) (**Figura 17**).

No período entre 2006 e 2007, 92 dos 186 municípios pernambucanos registraram endemia desta parasitose. As maiores prevalências encontravam-se em localidades dos municípios das bacias do Capibaribe, Una, Sirinhaém, Ipojuca, Jaboatão dos Guararapes e Goiana (BRASIL, 2007). Em 2011, o número de municípios afetados subiu de 92 para 102, o que fez com que o estado, no período entre 2005 a 2010, obtivesse a maior taxa de mortalidade no Brasil (BRASIL, 2011a). Em 2011, Pernambuco registrou aproximadamente nove mil casos positivos para a doença, ocupando o terceiro lugar em prevalência no Nordeste. Ainda em 2011, foram registrados 231 óbitos por esquistossomose na região nordestina. Destes, 114 ocorreram em Pernambuco (BRASIL, 2013b).

Figura 17 - Mapa representativo da distribuição da esquistossomose no território brasileiro, indicando as áreas endêmicas.



Fonte: BRASIL, 2009.

A esquistossomose no Brasil pode ter como hospedeiro intermediário umas das três espécies de caramujo do gênero *Biomphalaria*: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Ao menos uma das três espécies foi detectada em 25 das 27 unidades federadas do país. Estes moluscos encontram-se em regiões onde há coleções de água doce, como, por exemplo, barragens, áreas de irrigação, rios, lagos, lagoas, brejos, etc (PORDEUS et al., 2008).

2.3.1 Ciclo de vida

A esquistossomose mansônica é causada pelo verme trematódeo, da família *Schistosomatidae*, gênero *Schistosoma* e da espécie *Schistosoma mansoni* (**Figura 18**) (BRASIL, 2005). No organismo humano, o verme adulto tem seu *habitat* nas vênulas do plexo hemorroidário superior e nas ramificações mais finas das veias mesentéricas, particularmente da mesentérica inferior. São, às vezes, encontrados nos pulmões, baço, pâncreas e bexiga (SOUZA et al., 2011).

Figura 18 - Macho do *S. mansoni*. Acima (em menor escala) um casal, mostrando a fêmea inserida no canal ginecofórico do macho.



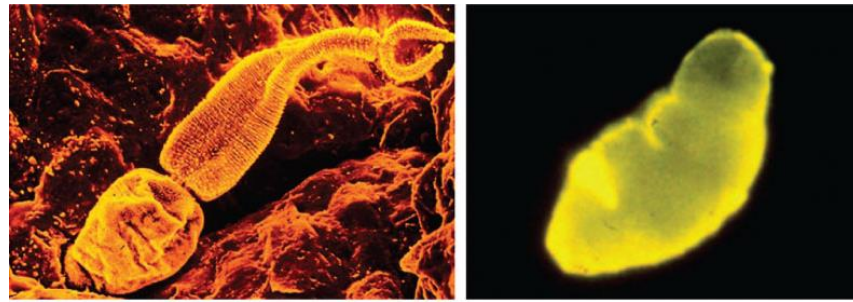
Fonte: LAMBERTUCCI, 2010.

No hospedeiro vertebrado, quando o *S. mansoni* evolui para sua forma adulta – no sistema vascular do plexo venoso mesentérico – macho e fêmea copulam, ocorrendo a fecundação da fêmea. As fêmeas fecundadas, isoladas ou acopladas ao macho, migram contra a corrente sanguínea e iniciam a postura dos ovos na submucosa dos vasos de menor calibre da parede intestinal. Alguns ovos são lançados na corrente sanguínea, outros chegam à luz intestinal (SOUZA et al., 2011).

Os ovos que caem no intestino são excretados juntamente com as fezes. Estes quando em contato com a água doce e em condições ideais, como hipotonicidade, eclodem liberando uma larva ciliada, o miracídio. Estas formas evolutivas permanecem na água doce até o instante do encontro com o hospedeiro intermediário, os caramujos do gênero *Biomphalaria*. Os miracídios, então, podem penetrar nos tecidos do caramujo onde darão origem aos esporocistos. Os mesmos, através de poliembrionia, dão origem às cercárias que com incidência de luminosidade e temperatura, o abandonam e retornam à água. Um único miracídio pode dar origem a 100-300 mil cercárias (LENZI et al., 2008).

A forma infectante para o hospedeiro definitivo, que pode ser o homem ou pequenos mamíferos, são as cercárias. Elas são formadas por corpo e cauda, e quando recém-eliminadas nadam ativamente com movimentos promovidos pela cauda até o encontro com o hospedeiro definitivo. Quando o homem entra em contato com águas infectadas pelas cercárias, elas penetram ativamente, pela pele e mucosa. As cercárias perdem a cauda e se transformam rapidamente em esquistossômulos (**Figura 19**) (LENZI et al., 2008).

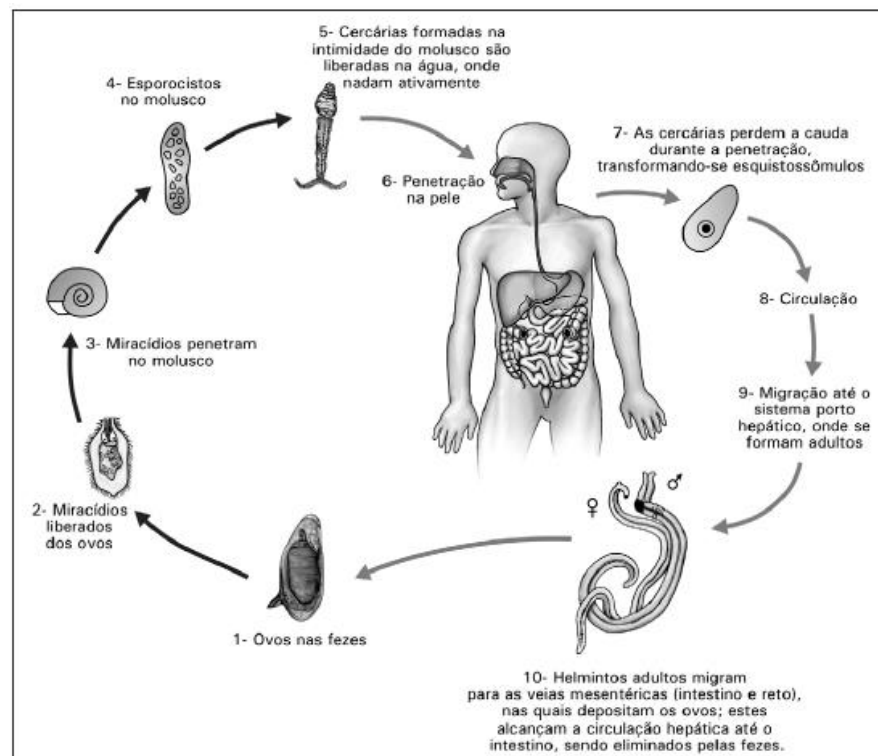
Figura 19 - Cercária penetrando à pele (à esquerda); esquistossômulo (à direita).



Fonte: LAMBERTUCCI, 2010.

Os esquistossômulos se dirigem para o sistema porta, por via sanguínea ou por via transtissular. Uma vez no sistema porta intra-hepático, alimentam-se e desenvolvem-se, transformando-se em formas unissexuadas, machos e fêmeas, 28 a 30 dias após a penetração. A partir deste ponto migram, acasalados, via sistema porta, até o território da artéria mesentérica inferior, onde farão a oviposição. Os primeiros ovos são vistos nas fezes após 40 dias da infecção do hospedeiro. Assim, completa-se o ciclo evolutivo do hospedeiro (**Figura 20**) (SOUZA et al., 2011).

Figura 20 - Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: SOUZA et al., 2011.

2.3.2 A doença

A patogênese da esquistossomose mansônica é dependente da interação humano/helminto. Em relação ao *S. mansoni* são importantes a cepa, a fase evolutiva, a intensidade e o número de infecções. Do lado do hospedeiro, participam a constituição genômica, órgão predominantemente lesado, padrão alimentar, etnia, reativação da doença, tratamento específico, infecções associadas (*Enterobacteriaceae*, vírus das hepatites B e C, dentre outras) e, sobretudo, o perfil imunitário antes, durante e após a infecção – talvez o fator mais importante na determinação e evolução das formas anatomoclínicas (SOUZA et al., 2011).

Os achados clínicos fazem com que a doença esquistossomose possa ser dividida nas fases aguda e crônica. A partir das primeiras doze horas após a penetração das cercárias observa-se importante reação inflamatória dérmica e subdérmica. Sua intensidade varia desde um quadro assintomático até o surgimento de dermatite urticariforme, com erupção papular, eritema, edema e prurido, persistindo até cinco dias após a infecção (**Figura 21**) (PORDEUS et al., 2008).

Figura 21 - Dermatite cercariana.



Fonte: GRYSEELS et al., 2012.

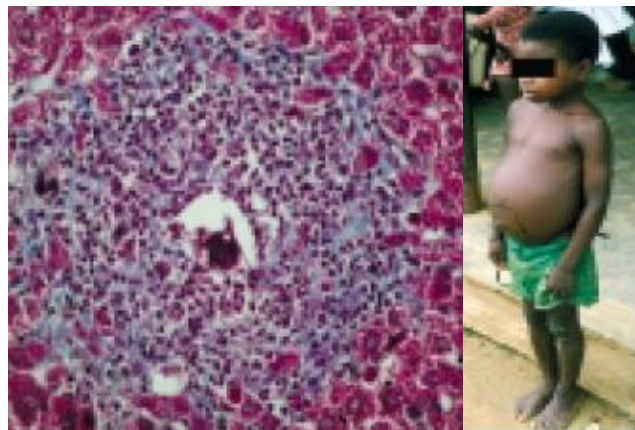
Durante a fase aguda o paciente pode apresentar febre, calafrios, fraqueza, cefaleia, anorexia, náuseas, vômitos e mal-estar geral. A maioria dos pacientes se recupera espontaneamente após 2-10 semanas, mas alguns persistem e desenvolvem perda de peso, dispneia, diarreia, dor abdominal, toxemia, hepatoesplenomegalia e erupção cutânea generalizada. A hepatoesplenomegalia pode ser encontrada no exame físico. Laboratorialmente, o achado da eosinofilia elevada é bastante sugestivo, quando associado a dados epidemiológicos (BRASIL, 2005; GRYSEELS et al., 2012).

A alta carga parasitária associada à reinfecção e/ou deposição contínua de ovos, na ausência de tratamento adequado, faz com que haja uma maior severidade da resposta inflamatória sobre os ovos do parasito o que pode conduzir a parasitose à fase crônica (LAMBERTUCCI et al., 2000; GRYSEELS et al., 2012).

A doença começa a se cronificar a partir dos seis meses após a infecção, podendo evoluir por muitos anos. Os sinais e sintomas de evolução da patologia aparecem em vários órgãos, com níveis extremos de gravidade. As manifestações clínicas variam, a depender da localização do parasito e da intensidade da carga parasitária, podendo apresentar as formas intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica e até neurológica (PORDEUS et al., 2008).

O evento patogênico mais importante na esquistossomose é a formação do granuloma hepático e a fibrose hepática peri-portal (SOUZA et al., 2011). Com a deposição dos ovos no fígado, é desencadeada uma resposta inflamatória com formação do granuloma e a persistência desse antígeno pode ocasionar a fibrose hepática, com aumento do fígado, hepatomegalia, e posterior hipertensão portal (**Figura 22**) (CONLON, 2005).

Figura 22 - Granuloma hepático em torno de ovo de *S. mansoni* no fígado de um rato experimentalmente infectado (à esquerda); criança com hepatoesplenomegalia (à direita).



Fonte: GRYSEELS et al., 2012.

O surgimento da hipertensão portal está associado a dois fatores: redução do fluxo sanguíneo na veia porta devido a formação do tecido fibroso cicatricial (REY, 2008), decorrente da formação do granuloma (PETROIANU, 2003), e oclusão dos vasos hepáticos provocada pelo próprio parasito vivo ou principalmente morto, nos casos de alta carga parasitária. A principal preocupação associada à hipertensão portal é a formação de varizes esofágicas e gástricas o que pode levar a um sangramento digestório (PETROIANU, 2003).

A formação dos granulomas em diferentes órgãos e tecidos explica as manifestações da doença, destacando-se: a hipertensão portal (granulomas hepáticos com a desorganização da arquitetura sinusoidal hepática), a formação de pseudotumores (granulomas no omento e na parede intestinal), as disfunções neurológicas (granulomas no sistema nervoso central, principalmente na medula) e as lesões vasculares pulmonares (granulomas nos vasos pulmonares) (SOUZA et al., 2011).

2.3.3 Tratamento

A importância do tratamento da esquistossomose reside não só no fato de curar a doença ou diminuir a carga parasitária dos pacientes, bem como impedir sua evolução para formas graves. Existem trabalhos demonstrando que a quimioterapia também reduz a hepatoesplenomegalia previamente instalada. Todo caso confirmado deve ser tratado, a não ser que haja contraindicação médica. Nas áreas de baixa prevalência com transmissão focal e nas áreas endêmicas está indicada a verificação de cura no 4º mês ao término do tratamento, com três amostras colhidas em dias sucessivos. Em caso de persistência da positividade do exame, o tratamento deve ser repetido (BRASIL, 2005).

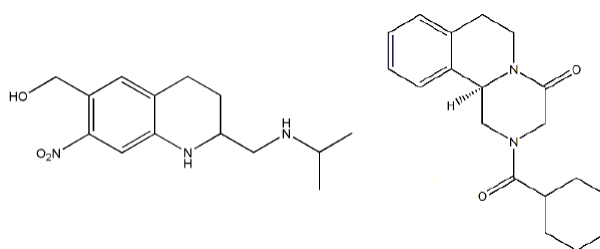
O arsenal terapêutico para tratar pacientes portadores de esquistossomose já conteve diversos fármacos, como os compostos antimoniais, emetina, niridazol, metrifonato, nitrofuranos, lucantone, hicantone. Porém, como todos apresentaram diversos efeitos colaterais, a utilização destes medicamentos ficou obsoleta (CIOLI et al., 1995).

Por muito tempo o praziquantel (PZQ) e a oxamniquina foram considerados os fármacos de escolha para o tratamento da esquistossomose em adultos e crianças (BRASIL, 2009). A oxamniquina, derivado 2-aminometiltetrahydroquinolina, foi desenvolvida por pesquisadores do laboratório Pfizer entre as décadas de 60 e 70. Apesar de apresentar alto percentual de cura da esquistossomose mansônica no Brasil e em outros países americanos, não alcançou o mesmo resultado nos países africanos, uma vez que nestes lugares esta parasitose é causada por helmintos de espécies diferentes, o *S. haematobium* e o *S. japonicum* (**Figura 23**) (KATZ & COELHO, 2008).

Na década de 70, foi lançado o praziquantel, (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino-(2,1- α)-isoquinolin-4-ona). Este fármaco mostrou ser eficaz contra as três principais espécies causadoras da esquistossomose, *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S.*

haematobium (KATZ & COELHO, 2008). Esta grande vantagem associada à boa tolerância, menor custo e toxicidade deste composto em comparação aos outros fármacos esquistossomicidas anteriormente utilizados, tornou o PZQ o medicamento de escolha para tratar esta doença (TALLIMA & RIDI, 2007). Os efeitos colaterais mais comumente observados com o uso do praziquantel são diarreia, dor abdominal, náuseas e tonturas (**Figura 23**) (BRASIL, 2009).

Figura 23 - Estruturas químicas da Oxaminiquina (à esquerda) e do Praziquantel (à direita).



Fonte: CIOLI et al., 1995.

A utilização do praziquantel como droga de escolha para a quimioterapia desta doença está ficando comprometida, pois relatos de resistência dos parasitos a este fármaco estão surgindo. Na clínica, a primeira observação de resistência ao PZQ foi feito por Stelma & Talla (1995). Os primeiros casos de diminuição da taxa de cura foram observados em um foco endêmico localizado no Senegal, onde uma amostra de pacientes aleatórios foram tratados com 40 mg/kg por via oral do PZQ por 12 semanas e apresentaram taxa de cura parasitológica entre 18-39% (STELMA et al., 1995). A taxa de cura esperada seria de 80-90% em áreas endêmicas (KATZ & COELHO, 2008).

No Egito, tratamentos sucessivos e em doses maiores foram administrados (duas doses de 40 mg/kg e uma dose de 60 mg/kg) e mesmo assim alguns pacientes, 1-2,4%, não responderam ao tratamento e ainda ovos viáveis foram detectados nas fezes destes doentes (FALLON, 1998; ISMAIL et al., 1996).

=====

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Nesta seção serão descritos todos os objetivos almejados com o desenvolvimento deste trabalho.

3.1 GERAL

O presente trabalho objetivou a síntese de novas tiazolhidrazonas, visando a obtenção de compostos ativos contra o *S. mansoni*. Além disso, teve a finalidade de determinar as atividades antimicrobiana e citotóxica destas moléculas.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Sintetizar novos derivados tiossemicarbazônicos;
- ✓ Realizar a síntese de novos compostos da nova série tiazolhidrazona;
- ✓ Determinar as principais propriedades físico-químicas dos derivados;
- ✓ Caracterizar estruturalmente os compostos através de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H), Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze (RMN¹³C), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e massas;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana frente a micro-organismos de diferentes classes;
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica das novas moléculas frente a diferentes linhagens celulares;
- ✓ Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de vermes adultos de *S. mansoni* (CEPA BH) frente às novas tiazolhidrazonas sintetizadas.

=====

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

A seguir serão descritos os materiais e as metodologias empregados na síntese dos novos derivados e na avaliação de suas atividades biológicas.

4.1 ESTUDO QUÍMICO

As novas tiazolhidrazonas foram obtidas a partir de uma rota sintética consolidada na literatura.

4.1.1 Materiais

Para a síntese e comprovação estrutural das novas tiazolhidrazonas sintetizadas, foram utilizadas placas cromatográficas Merck sílica gel 60 F254, de 0,25 mm de espessura, reveladas com lâmpada ultravioleta com duplo comprimento de onda (254 ou 366 nm). Os equipamentos, reagentes e solventes utilizados estão relacionados abaixo.

4.1.1.1 Equipamentos

- ✓ Espectrofotômetro de Absorção no Infravermelho - PerkinElmer - Spectrum 400 (Departamento de Química Fundamental – UFPE);
- ✓ Espectrômetro de RMN - espectrômetro Varian, modelo Unity Plus (400 MHz para ^1H ; 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX (300 MHz para ^1H e 75.5 MHz para ^{13}C), usando tetrametilsilano como padrão interno (Departamento de Química Fundamental – UFPE);
- ✓ Espectrômetro de Massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Laser Nd:YAG, 355 nm. Freq. laser: 100 Hz (Departamento de Química Fundamental – UFPE);
- ✓ Fusímetro - Quimis Modelo 340.23 (Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos – UFPE);
- ✓ Lâmpada de Ultravioleta – Philco (Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos – UFPE);
- ✓ Placas de agitação e aquecimento FISOTON 752A (Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos – UFPE);

- ✓ Balança analítica BEL, modelo Mark 210a (Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos – UFPE).

4.1.1.2 Reagentes e Solventes

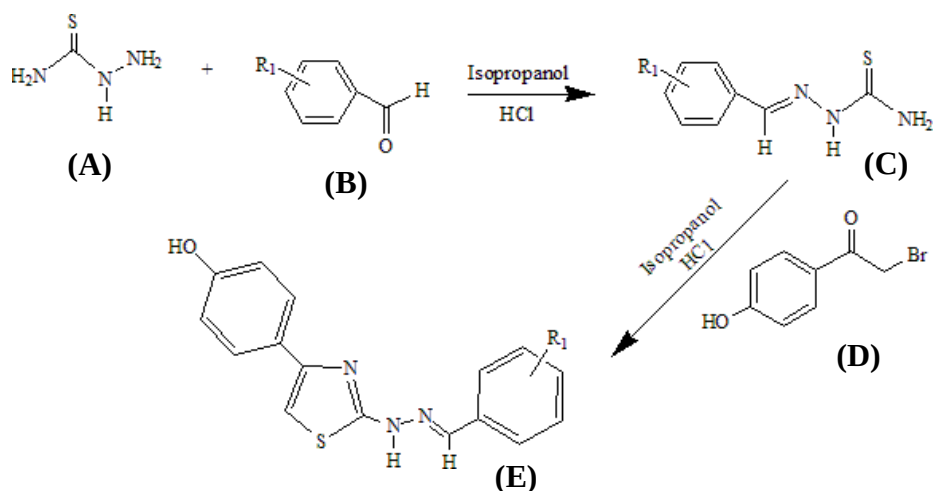
Para a obtenção das moléculas propostas, os seguintes reagentes e solventes foram utilizados:

- ✓ Tiossemicarbazida;
- ✓ Aldeídos aromáticos (3-Bromobenzaldeído, 3-Clorobenzaldeído, 3-Fluorbenzaldeído, 3-Nitrobenzaldeído, 4-Bromobenzaldeído, 4-Clorobenzaldeído, 4-Fluorbenzaldeído, 4-Nitrobenzaldeído);
- ✓ 2-Bromo-4-hidroxiacetofenona;
- ✓ Ácido Clorídrico (HCl) concentrado;
- ✓ Iso-propanol;
- ✓ Acetato de Etila;
- ✓ N-Hexano;
- ✓ Dimetil-sufóxido (DMSO);
- ✓ Acetona;
- ✓ Água Destilada.

Os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich e os solventes das marcas Vetec ou Dinâmica.

4.1.2 Procedimento experimental para obtenção das novas tiazolhidrazonas

As novas tiazolhidrazonas foram sintetizadas conforme o protocolo de Hantzsch (ALAM et al., 2011). O processo reacional é constituído de duas etapas. Na primeira ocorre a reação de condensação entre a tiossemicarbazida e diferentes benzaldeídos. A segunda etapa consiste na reação de ciclização entre o produto obtido na reação anterior e a acetofenona (α -halocetona) escolhida. É possível também reagir a tiossemicarbazida diretamente com a α -halocetona, mas esta via gera inúmeros subprodutos, o que diminui o rendimento da reação e dificulta a purificação do produto final (**Esquema 9**) (CUKUROVALI et al., 2006).



$R_1 = 4\text{-Cl}; 4\text{-Br}; 4\text{-NO}_2; 4\text{-F}; 3\text{-Cl}; 3\text{-Br}; 3\text{-F}; 3\text{-NO}_2.$

Esquema 9. Rota sintética para obtenção das novas tiazolhidrazonas: **(A)** Tiossemicarbazida; **(B)** Aldeído aromático; **(C)** Tiossemicarbazona; **(D)** 2-Bromo-4'-hidroxiacetofenona; **(E)** Tiazolhidrazona.

4.1.3 Métodos

Nesta seção serão descritos os métodos empregados para a síntese das novas tiazolhidrazonas.

4.1.3.1 Síntese das benzaldeídos-tiossemicarbazonas (**Ia-h**)

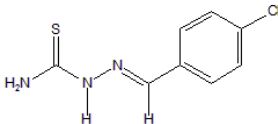
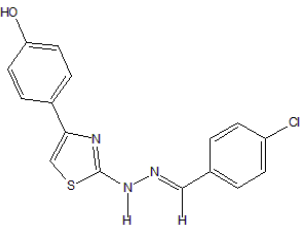
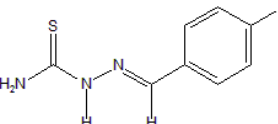
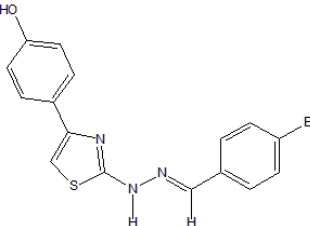
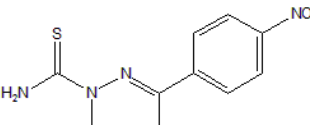
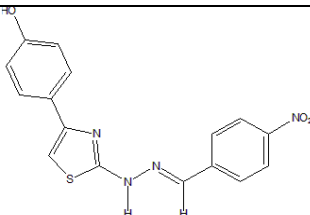
Em um balão de fundo redondo com capacidade para 25 mL, foram adicionados 1 mmol do benzaldeído substituído e 2 mL de iso-propanol. Após total solubilização do aldeído aromático, foram adicionadas 3 gotas de uma solução de ácido clorídrico concentrado diluído em iso-propanol. O ácido utilizado como catalizador da reação, objetiva a protonação do oxigênio da carbonila do aldeído, facilitando o ataque da amina que será adicionada posteriormente. A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado, gota a gota, 1 mmol da tiossemicarbazida parcialmente solubilizada em 2 mL de iso-propanol. Em seguida, a mistura reacional foi conduzida ao banho de óleo, onde permaneceu sob refluxo e agitação a 65 °C. Após comprovar que a reação havia chegado ao seu término, o produto foi resfriado em banho de gelo. O precipitado obtido foi filtrado, submetido a sucessivas lavagens com água destilada, a fim de remover resíduos do ácido, e seco em estufa a 37 °C.

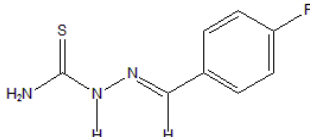
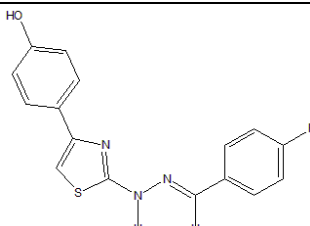
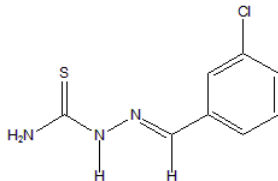
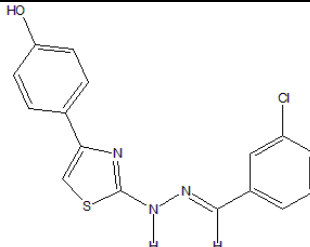
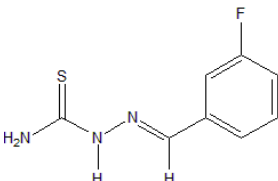
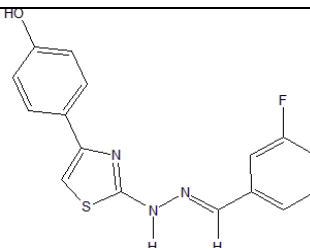
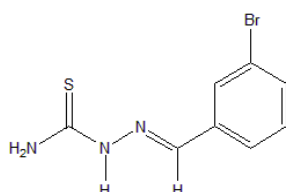
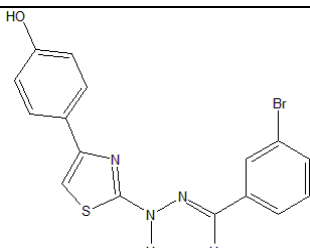
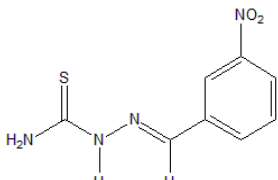
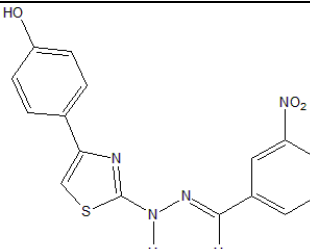
4.1.3.2 Síntese das novas tiazolhidrazonas (IIa-h)

Em um balão de fundo redondo com capacidade para 25 mL, foram adicionados 1 mmol do 2-Bromo-4-hidroacetofenona e 2 mL de iso-propanol. Após total solubilização da acetofenona, foram adicionadas 3 gotas de uma solução de ácido clorídrico concentrado diluído em iso-propanol. A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado, gota a gota, 1 mmol da benzaldeído-tiossemicarbazona, a qual foi obtida na etapa anterior, solubilizada em 2 mL de iso-propanol. Em seguida, a mistura reacional foi conduzida ao banho de óleo, onde permaneceu sob refluxo e agitação a 65 °C. Após comprovar que a reação havia chegado ao seu término, o produto foi resfriado em banho de gelo. O precipitado obtido foi filtrado, submetido a sucessivas lavagens com água destilada, a fim de remover resíduos do ácido, e seco em estufa a 37 °C.

A **Tabela 1** mostra as estruturas químicas e os respectivos códigos dos compostos sintetizados.

Tabela1. Compostos sintetizados e seus respectivos códigos.

I	Ar	Código do laboratório	II	Ar	Código do laboratório
a		Ju-702	a		Ju-726
b		Ju-703	b		Ju-727
c		Ju-707	c		Ju-730

d		Ju-731	d		Ju-733
e		Ju-732	e		Ju-735
f		Ju-736	f		Ju-737
g		Ju-738	g		Ju-740
h		Ju-739	h		Ju-741

Compostos I: Derivados tiossemicarbazônicos; Compostos II: Tiazolhidrazonas.

4.2 ESTUDO BIOLÓGICO

Nos tópicos abaixo serão descritos os métodos para avaliação das atividades esquistossomicida, antimicrobiana e citotóxica.

4.2.1 Avaliação da atividade esquistossomicida

Nesta seção serão descritos os métodos para avaliação da atividade esquistossomicida.

4.2.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos com 30 dias de idade, albinos suíços (*Mus musculus*) mantidos no Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami – UFPE (LIKA), em gaiolas individuais, sob condições padronizadas de temperatura, luminosidade e alimentação.

As cercárias (Cepas BH) de *S. mansoni* foram obtidas no Departamento de Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Os vermes adultos de *S. mansoni* foram obtidos no LIKA após realização da perfusão dos camundongos infectados.

4.2.1.2 Materiais e Equipamentos

- ✓ Câmara de fluxo;
- ✓ Microscópio óptico invertido;
- ✓ Placas de Petri e placas de cultura com 24 poços;
- ✓ Anestésicos: cloridrato de xilasina (Bayer) e cloridrato de ketamina (Agener União);
- ✓ Solução salina obtida a partir de cloreto de sódio, citrato de sódio e água destilada;
- ✓ Pipeta graduada, tubos de falcon, seringa, ponteiros, álcool 70% e matérias cirúrgicos todos esterilizados;
- ✓ Praziquantel (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4*H*-pirazino{2,1-a}isoquinolina-4-ona) (PZQ) (Sigma-Aldrich) como fármaco controle nos experimentos;
- ✓ Meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) completo suplementado com penicilina, estreptomicina e soro bovino fetal;
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich);
- ✓ Compostos sintetizados.

4.2.1.3 Infecção por *Schistosoma mansoni*

Após 15 dias do recebimento dos camundongos, os animais foram infectados por via percutânea, utilizando cerca de 120 cercárias (Cepa BH), oriundas de *Biomphalaria glabrata*,

para cada animal. Após 45 dias de infecção, foi realizado exame parasitológico das fezes dos camundongos para avaliar a positividade da infecção (HOFFMAN & STRAND, 1996).

4.2.1.4 Perfusão do sistema porta para recuperação de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Os camundongos foram submetidos a eutanásia após 55 dias de infecção. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de ketamina (100-200 mg/Kg) associada a cloridrato de xilasina (5-16 mg/Kg). Após anestesia, os animais foram submetidos à perfusão do sistema porta hepático para a recuperação dos vermes, os quais foram separados em placas de petri contendo meio RPMI-1640 e em seguida os parasitos foram contados e classificados, de acordo com o sexo e vitalidade (DUVAL & DEWITT, 1967).

4.2.1.5 Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de vermes adultos *Schistosoma mansoni* frente aos compostos sintetizados

Os parasitos foram removidos dos camundongos infectados e posteriormente lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20 mM pH 7,5 e suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e soro bovino fetal a 10% em uma placa de petri. Após a lavagem os vermes adultos foram transferidos para placas de cultura de tecidos contendo 2 mL de meio RPMI-1640 completo.

Para cada composto foram utilizados 4 poços da placa de cultura e foram acrescidos a cada poço 2 casais, em seguida foram incubados a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após o período de 2 horas de adaptação ao meio, os derivados tiazólicos foram adicionados na concentração de 100 µg/mL. Utilizou-se o praziquantel como controle positivo dos experimentos, na concentração de 10 µg/mL. Os parasitos foram mantidos em cultura por 5 dias sendo monitorados a cada 24 horas e observados no microscópio óptico invertido (BestScope BS-2090) para avaliação da atividade motora e da taxa de mortalidade. Para confirmação dos resultados, todos os testes foram realizados em duplicata.

4.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os testes para avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Fármacos do Departamento de Antibióticos –

UFPE. Foram utilizados os micro-organismos da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos - UFPE, representantes dos grupos de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* DAUFPE 01, *Micrococcus luteus* DAUFPE 06, *Bacillus subtilis* DAUFPE 16, *Enterococcus faecalis* DAUFPE 138; Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE 39, *Escherichia coli* DAUFPE 224, *Serratia marcescens* DAUFPE 398; Álcool-ácido resistente: *Mycobacterium smegmatis* DAUFPE 71 e levedura: *Candida albicans* DAUFPE 1007.

Os inóculos foram obtidos a partir de culturas recentes dos micro-organismos teste, com 18-24 horas de incubação à 35 °C nos seguintes meios de cultura:

- ✓ Müeller-Hinton ágar – bactérias Gram-positivas e Gram negativas.
- ✓ Sabouraud dextrose ágar – *Candida albicans*.
- ✓ Glicose extrato de levedura ágar (GL) – *Enterococcus faecalis* e *Mycobacterium smegmatis*.

Suspensões desses inóculos foram padronizadas à densidade óptica de 0,2 de absorbância a 600 nm, equivalentes à turvação 0,5 da escala de McFarland, em solução fisiológica, correspondente a, aproximadamente, 10^8 UFC para bactérias e 10^6 UFC leveduras, obedecendo aos métodos descritos por Barry et al., 2002 e Koneman et al., 2001.

4.2.2.1. Método de difusão em disco de papel

A avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados foi inicialmente realizada pela técnica de difusão em disco de papel, de acordo com Bauer et al., 1966.

Os testes foram realizados com uma solução de 30.000 µg/mL das substâncias em estudo, utilizando DMSO (Dimetilsulfóxido) como solvente.

As suspensões dos micro-organismos teste foram semeadas em placas de Petri contendo 10 mL do meio de cultura apropriado para o micro-organismo. Foram utilizados discos de 6 mm de diâmetro impregnados com 10 µL da solução, obtendo-se uma concentração de 300 µg por disco.

Os discos foram colocados na superfície do meio semeado com o micro-organismo teste, sendo as placas incubadas de acordo com a exigência do micro-organismo em estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Condições de crescimento dos micro-organismos utilizados para determinação da atividade antimicrobiana dos compostos obtidos por síntese.

Micro-organismos	Meios de cultura	Temperatura (°C)	Tempo (h)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Müeller-Hinton	35	24
<i>Micrococcus luteus</i>	Müeller-Hinton	35	24
<i>Bacillus subtilis</i>	Müeller-Hinton	35	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Müeller-Hinton	35	24
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Glicose-extrato de levedura ágar	35	48
<i>Enterococcus faecalis</i>	Glicose-extrato de levedura ágar	35	24
<i>Escherichia coli</i>	Müeller-Hinton	35	24
<i>Serratia marcescens</i>	Müeller-Hinton	27	24
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud-ágar	30	48

A placa com o micro-organismo *Serratia marcescens* foi deixada à temperatura ambiente para que houvesse produção de pigmentação. Após esse período de incubação foi realizada a leitura dos resultados, medindo o diâmetro dos halos de inibição formados em torno dos discos. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos halos de inibição em mm e calculado os desvios padrão. Os controles positivos utilizados como padrões foram a ampicilina (10 µg/disco), cefotaxime (30 µg/disco) e kanamicina (30 µg/disco).

4.2.3 Avaliação da citotoxicidade dos compostos

A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* foi realizada para verificar a citotoxicidade das substâncias puras em 4 linhagens de células tumorais. Esta análise faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral destas amostras.

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

As linhagens tumorais utilizadas, HL60 (leucemia promielocítica - humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama - humano), HEp-2 (carcinoma de laringe – humano) e NCI H-292 (carcinoma epidermoide de pulmão - humano) foram obtidas do Banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), tendo sido cultivadas em meio DMEN e RPMI, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL para as linhagens MCF-7, HEp-2 e NCI H-292. Para a linhagem HL60, a concentração foi de 3×10^5 células/mL. As substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas, em série, no meio de cultura para obtenção das concentrações finais (25 µg/mL) e distribuídas em placa de 96 poços (100 µL/poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. No final deste período, o meio de cultura com o excesso de MTT foi aspirado e depois, 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço para dissolver os cristais de formazan. A doxorubicina foi utilizada como padrão. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado e comparada com o controle (células apenas com o meio) em espectrofotômetro a 595 nm. O valor de IC₅₀ foi definido como a concentração pela qual inibiu 50% do crescimento celular. Os testes foram realizados em concentrações de 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,5; 0,7 e 0,3 µg/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão descritos os resultados obtidos na síntese dos compostos e nos estudos biológicos pelos quais estas moléculas foram submetidas.

5.1 ESTUDO QUÍMICO

As propriedades físico-químicas de todos os compostos sintetizados estão expressas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Constantes físico-químicas dos compostos sintetizados.

Composto	Fórmula molecular	Peso molecular	Tempo Reacional (minutos)	Rend. (%)	Rf	Sistema (Hexano/AcOEt)	PF (°C)
Ia	C ₈ H ₈ ClN ₃ S	213,6872	5	89	0,51	(0,7: 0,3)	208-209
Ib	C ₈ H ₈ BrN ₃ S	256,1382	10	72	0,43	(0,7: 0,3)	209-210
Ic	C ₈ H ₈ N ₄ O ₂ S	224,2397	3	60	0,45	(0,6: 0,4)	233-234
Id	C ₈ H ₈ FN ₃ S	197,2326	13	54	0,48	(0,65: 0,35)	184-185
Ie	C ₈ H ₈ ClN ₃ S	213,6872	33	61,3	0,48	(0,7: 0,3)	184-185
If	C ₈ H ₈ FN ₃ S	197,2326	13	59,2	0,43	(0,65: 0,35)	184-185
Ig	C ₈ H ₈ BrN ₃ S	258,1382	30	89,4	0,46	(0,7: 0,3)	201-202
Ih	C ₈ H ₈ N ₄ O ₂ S	224,2397	0	52,5	0,46	(0,55: 0,35)	214-215
IIa	C ₁₆ H ₁₂ ClN ₃ OS	329,8040	15	91	0,39	(0,6: 0,4)	267-269
IIb	C ₁₆ H ₁₂ BrN ₃ OS	374,2550	10	78,7	0,46	(0,55: 0,45)	213-214
IIc	C ₁₆ H ₁₀ N ₄ O ₃ S	340,3565	215	65,6	0,48	(0,55: 0,45)	262-263
IId	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ OS	313,3494	60	69,5	0,5	(0,55: 0,45)	194-195
IIe	C ₁₆ H ₁₂ ClN ₃ OS	329,8040	32	60,3	0,43	(0,55: 0,45)	172-173
IIf	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ OS	313,3494	15	50,7	0,43	(0,55: 0,45)	190-191
IIg	C ₁₆ H ₁₂ BrN ₃ OS	374,2550	53	50,1	0,48	(0,55: 0,45)	147-148
IIh	C ₁₆ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	340,3565	61	65,5	0,51	(0,5: 0,5)	215-216

Os rendimentos obtidos foram considerados satisfatórios, uma vez que para todos os compostos foi superior a 50%. As tiossemicarbazonas **Ia** e **Ig** apresentaram os maiores rendimentos, 80 e 59,4%, respectivamente. Em relação às tiazolhidrazonas, as reações para obtenção dos derivados **IIa** e **IIb** foram as que renderam maior quantidade de produto puro (91 e 78,7%, respectivamente).

5.1.1 Análise espectrocópica

Para a caracterização das moléculas foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , Infravermelho (IV) e Massas.

5.1.1.1 Tiossemicarbazonas

A análise inicial dos espectros de IV teve como objetivo identificar a presença das bandas de absorção referentes aos principais grupamentos químicos característicos dos compostos sintetizados.

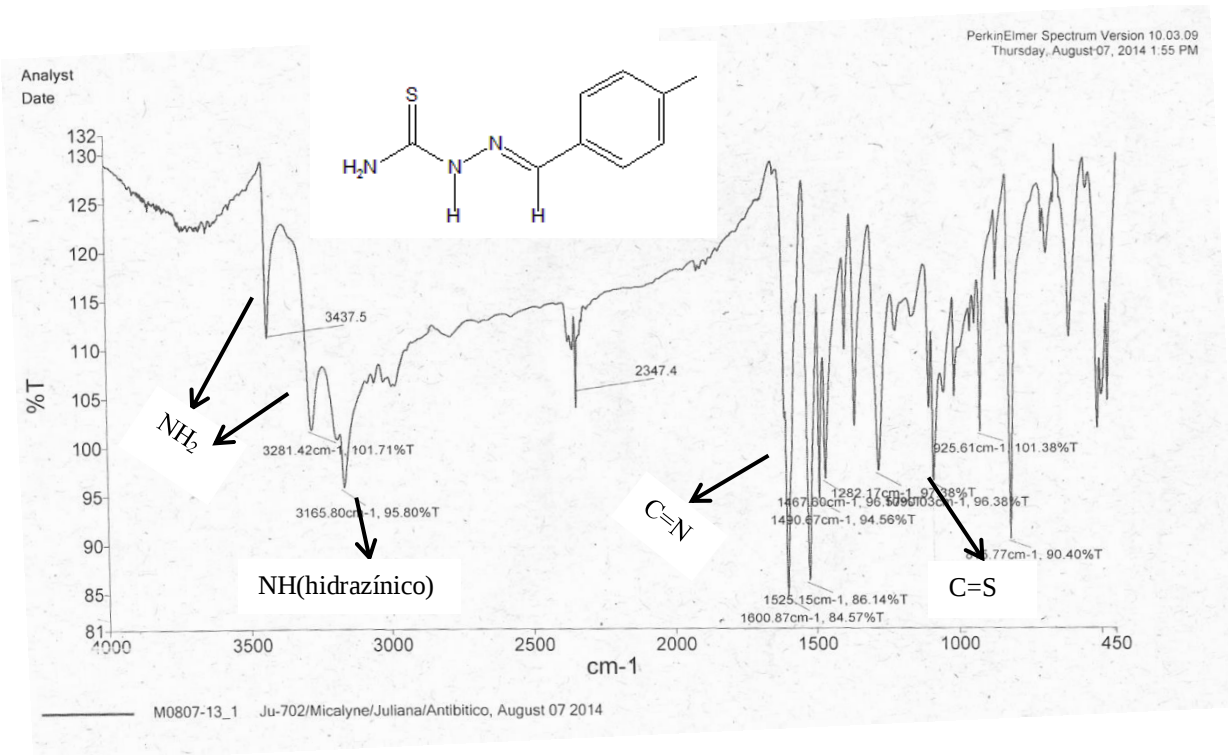
De acordo com dados encontrados na literatura, a banda de absorção referente ao estiramento da ligação N-H hidrazínico é verificada na região entre 3141 e 3178 cm^{-1} . Para as moléculas sintetizadas neste trabalho esta banda foi encontrada em frequências entre 3145 e 3165,84 cm^{-1} (PALENIK et al., 1974; TARASCONI et al., 2000).

A presença de uma banda de absorção entre 1589,11 e 1604,88 cm^{-1} indica o sucesso da metodologia empregada na condensação entre os aril-aldeídos e a tiossemicarbazida, uma vez que esta banda foi atribuída à frequência de estiramento da ligação C=N para os compostos desta série (DUFFY et al., 2002; PANDEYA et al., 1999).

Como discutido anteriormente, as tiossemicarbazonas podem coexistir na forma tiona ou tiol. A inexistência da banda característica do C-SH (forma tiol) nos espectros de IV, a qual é observada em geral na região de 2500 – 2600 cm^{-1} , bem como a presença da banda de C=S entre 1062,5 e 1106,84 cm^{-1} confirma a forma tiona das aril-tiossemicarbazonas sintetizadas (TARASCONI et al., 2000; BHARTI et al., 2003).

A **figura 24** representa o espectro de IV do composto **Ia**. A partir dela é possível verificar as bandas características desta molécula, as quais foram discutidas anteriormente: ν 3437,5 cm^{-1} (assimétrica NH_2); 3281,42 cm^{-1} (simétrica NH_2); 3165,80 cm^{-1} (NH); 1600,87 cm^{-1} (C=N) e 1062,5 cm^{-1} (C=S).

Figura 24 - Espectro de IV do composto **Ia**.



Na elucidação estrutural das tiossemicarbazonas, através da análise do RMN¹H, pontos característicos foram observados. Singletos referentes ao próton do grupamento NH foram detectados. Este pico apresentou deslocamento químico variando entre 11,7 e 10,55 ppm (DILOVIC et al., 2008).

Outro ponto importante presente no RMN¹H dos derivados tiossemicarbazônicos é a presença de dois singletos em diferentes deslocamentos referentes aos hidrogênios do NH₂. Nestes compostos, estes prótons apresentaram deslocamentos químicos variando de 8,76 a 7,55 e 8,75 a 7,56 ppm. Estes prótons apresentam-se como singletos distintos devido ao bloqueio da rotação livre da ligação C-N que ocorre nas tiossemicarbazonas, em virtude de seu caráter parcialmente duplo (TARASCONI et al., 2000; JOUAD et al., 2001). Consequentemente, os hidrogênios se encontram em ambientes químicos diferentes, de modo que o mais próximo espacialmente ao enxofre da tiocarbonila apresenta um deslocamento químico maior, ou seja, está mais desblindado, devido a sua interação com a nuvem eletrônica deste átomo, que possui um raio atômico relativamente grande.

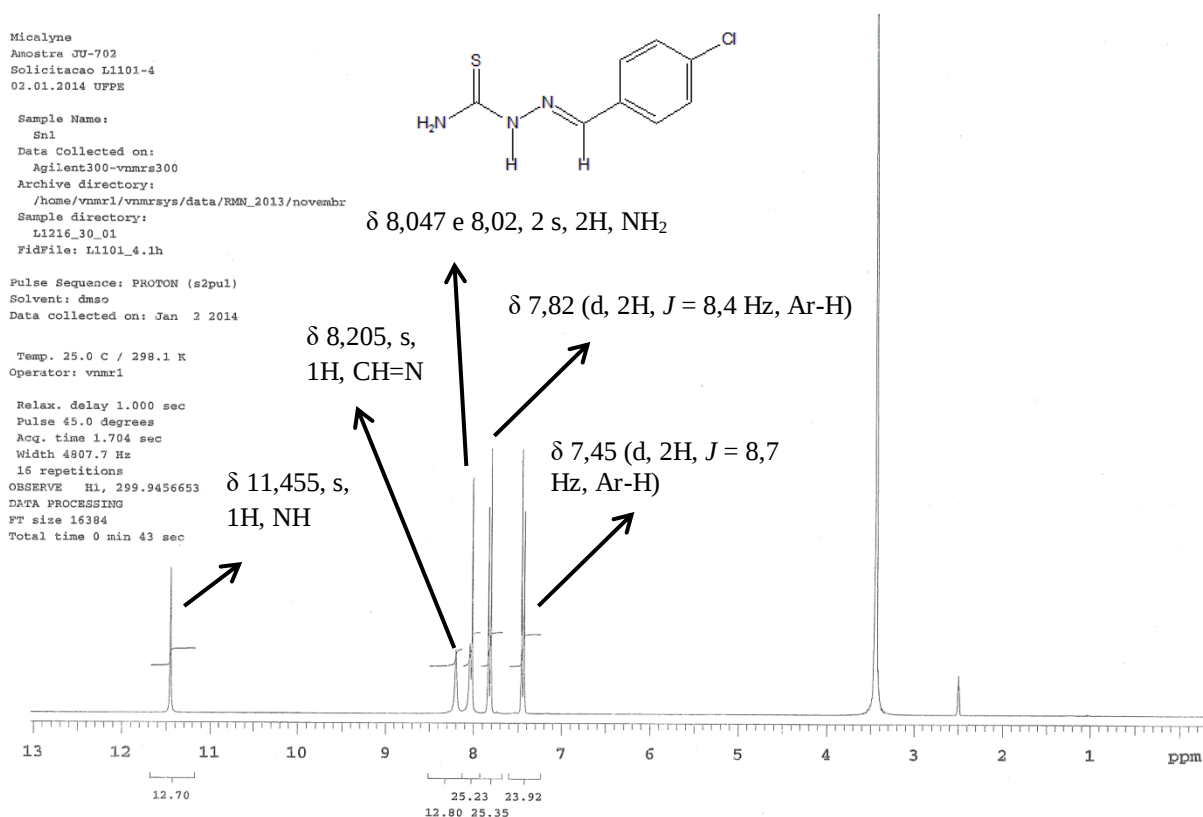
O sinal relativo ao hidrogênio da função azometina (CH=N) corrobora com dados do IV e revela, portanto, o sucesso da realização da etapa de condensação entre os aldeídos aromáticos e a tiossemicarbazida. Os picos observados para esses hidrogênios

corresponderam a singletos com deslocamentos químicos variando entre 9,05 e 8,04 ppm (BAUTISTA et al., 2013).

Em todos os espectros analisados foi possível observar sinais de singlete (s), dubleto (d), e/ou multipeto (m) na região característica de grupamentos aromáticos (8,73 a 7,14 ppm).

Na **Figura 25**, é possível identificar, através do RMN¹H, os sinais referentes aos prótons do derivado tiossemicarbazônico **Ia**. Os singletos do hidrogênio do NH (11,455 ppm), do próton azometínico (8,205 ppm) e dos hidrogênios do grupamento NH₂ (8,047 e 8,02 ppm) comprovam a eficácia da rota sintética na obtenção do composto planejado. Também foram identificados os quatro hidrogênios aromáticos, os quais se apresentaram como dois dubletos em 7,82 (*J* = 8,4 Hz) e 7,45 ppm (*J* = 8,7 Hz).

Figura 25 - Espectro de RMN¹H do composto **Ia**

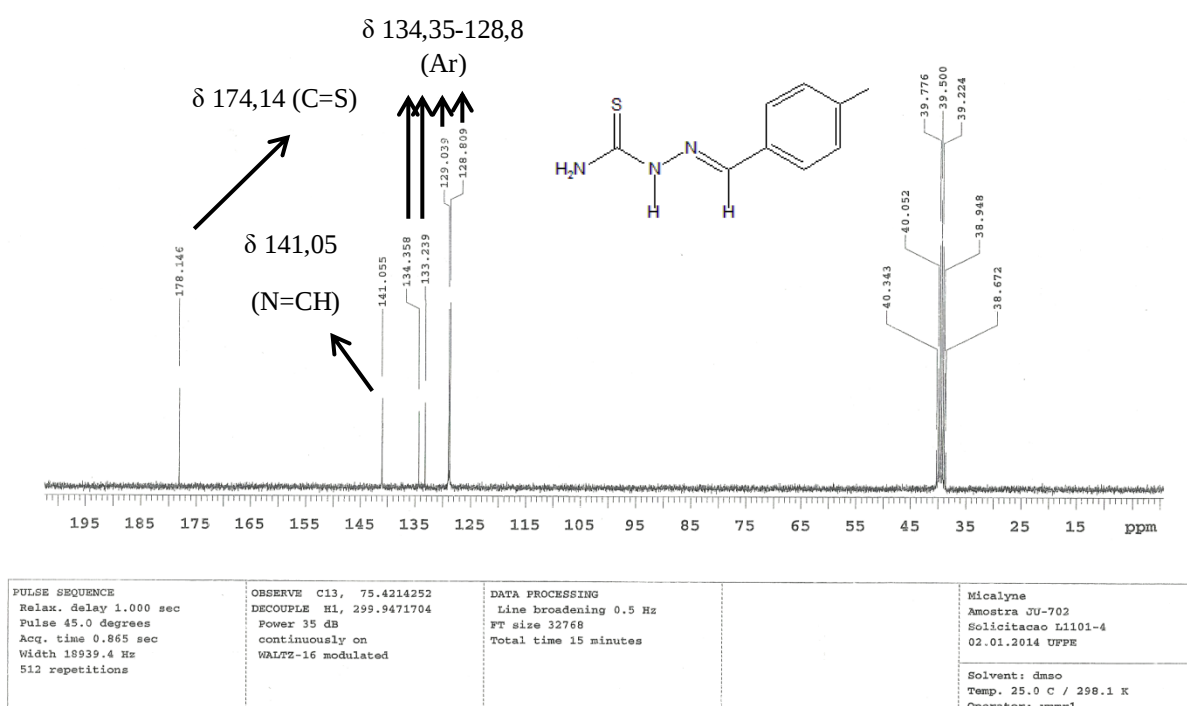


Nos espectros de RMN¹³C, por sua vez, foi possível identificar os oito carbonos constituintes dos derivados tiossemicarbazônicos. Os sinais encontrados nos espectros entre 139,55 e 141,88 ppm foram atribuídos ao carbono da função CH=N, como pode ser observado no espectro do composto **Ia** (TENÓRIO et al., 2005).

As tiossemicarbazonas foram obtidas na forma tiona. Essa confirmação se deu tanto por meio do infravermelho, uma vez que não foi observada a banda característica do grupamento C-SH, apenas a banda que indica a presença de C=S ($1062,5$ e $1106,84\text{ cm}^{-1}$), como por meio do RMN ^{13}C . Nesta última técnica, os maiores deslocamentos químicos foram atribuídos ao carbono da tiocarbonila (C=S), bastante desblindado (TENÓRIO et al., 2005).

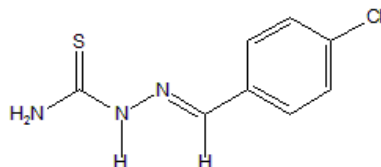
Os sinais referentes aos carbonos benzílicos foram detectados em deslocamentos químicos variando entre $113,5$ e $162,67\text{ ppm}$. A partir da análise dos DEPTs dos compostos foi permitido diferenciar os carbonos quanto a sua quantidade de substituintes (C ou CH).

Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **Ia**.



A **Figura 26** revela os sinais característicos de RMN ^{13}C do derivado **Ia**. Em $178,14\text{ ppm}$ foi observado o sinal correspondente ao carbono da tiocarbonila (-C=S); em $141,05\text{ ppm}$ foi identificado o carbono do grupamento N=C-H. Os carbonos aromáticos benzílicos foram detectados a partir de sinais com deslocamentos químicos entre $128,8$ e $134,35\text{ ppm}$.

5.1.1.1.1 4-Cloroariltiossemicarbazona (**Ia**)



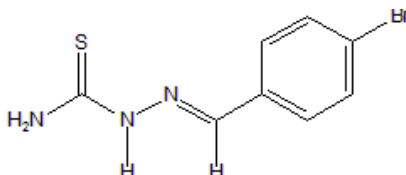
IV, principais bandas (ν cm⁻¹, KBr): 3437,5 (assim. NH₂); 3281,42 (sim. NH₂); 3165,80 (NH); 1600,87 (C=N); 1062,5 (C=S).

RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 11,45 (s, 1H, NH); 8,2 (s, 1H, N=CH); 8,04 (s, 1H, NH₂); 8,02 (s, 1H, NH₂); 7,82 (d, 2H, J = 8,4 Hz, benzilideno); 7,45 (d, 2H, J = 8,7 Hz, benzilideno).

RMN¹³C (75 MHz, DMSO-d₆, ppm) e DEPT: δ 178,14 (-C=S); 141,05 (C-H); 134,35 (Cq benzilideno); 133,23 (Cq benzilideno); 129,03 (CH benzilideno); 128,8 (CH benzilideno).

EMAR (ESI): Calculado: 214,028; Encontrado: 213,0127.

5.1.1.1.2 4-Bromoariltiossemicarbazona (**Ib**)

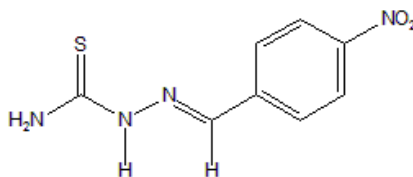


IV, principais bandas (ν cm⁻¹, KBr): 3434,3 (assim. NH₂); 3288 (sim. NH₂); 3165,84 (NH); 1600,28 (C=N); 1075 (C=S).

RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 11,46 (s, 1H, NH); 8,2 (s, 1H, N=CH); 8,04 (s, 1H, NH₂); 8,0 (s, 1H, NH₂); 7,75 (d, 2H, J = 8,1 Hz, benzilideno); 7,57 (d, 2H, J = 8,7 Hz, benzilideno).

RMN¹³C (75 MHz, DMSO-d₆, ppm) e DEPT: δ 178,14 (-C=S); 141,14 (N=C-H); 133,57 (Cq benzilideno); 131,70 (CH benzilideno); 129,26 (CH benzilideno); 123,15 (Cq benzilideno).

EMAR (ESI): Calculado: 257,993; Encontrado: 256,9622.

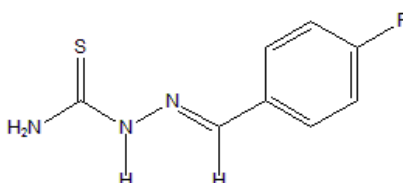
5.1.1.1.3 4-Nitroariltiossemicarbazona (**Ic**)

IV, principais bandas (ν cm⁻¹, KBr): 3492,67 (assim. NH₂); 3365,94 (sim. NH₂); 3145 (NH); 1589,11 (C=N); 1099,28 (C=S).

RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 11,7 (s, 1H, NH); 8,39 (s, 1H, N=CH); 8,22-8,06 (m, 6H, benzilideno e NH₂).

RMN¹³C (75 MHz, DMSO-d₆, ppm) e DEPT: δ 178,48 (-C=S); 147,56 (Cq benzilideno); 140,71 (Cq benzilideno); 139,55 (N=C-H); 128,15 (CH benzilideno); 123,76 (CH benzilideno).

EMAR (ESI): Calculado: 225,065; Encontrado: 224,0368.

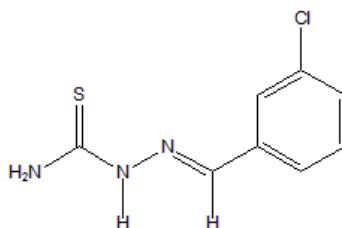
5.1.1.1.4 4-Fluorariltiossemicarbazona (**Id**)

IV, principais bandas (ν cm⁻¹, KBr): 3393,5 (assim. NH₂); 3238 (sim. NH₂); 3158,14 (NH); 1601,57 (C=N); 1090,99 (C=S).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 11,41 (s, 1H, NH); 8,18 (s, 1H, N=CH); 8,03 (s, 1H, NH₂); 8,02 (s, 1H, NH₂); 7,85 (d, 2H, J = 8,8 Hz, benzilideno); 7,21 (d, 2H, J = 8,8 Hz, benzilideno).

RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, ppm) e DEPT: δ 178,0 (-C=S); 164,21 (Cq benzilideno); 161,75 (Cq benzilideno); 141,05 (N=C-H); 129,50 (CH benzilideno); 129,43 (CH benzilideno); 115,76 (CH benzilideno); 115,55 (CH benzilideno).

EMAR (ESI): Calculado: 198,070; Encontrado: 197,0423.

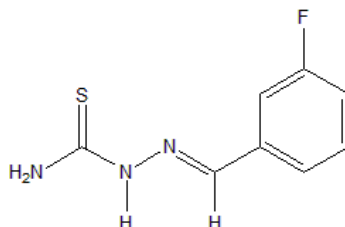
5.1.1.1.5 3-Cloroariltiossemicarbazona (**Ie**)

IV, principais bandas (ν cm⁻¹, KBr): 3391,56 (assim. NH₂); 3233,27 (sim. NH₂); 3154,03 (NH); 1603,33 (C=N); 1105,34 (C=S).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 11,49 (s, 1H, NH); 8,24 (s, 1H, NH₂); 8,17 (s, 1H, NH₂); 8,04 (s, 1H, N=CH); 8,01 (s, 1H, benzilideno); 7,64 (m, 1H, benzilideno); 7,41 (d, 2H, J = 3,6 Hz, benzilideno).

RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, ppm) e DEPT: δ 178,17 (-C=S); 140,49 (N=C-H); 136,46 (Cq benzilideno); 133,74 (Cq benzilideno); 130,42 (CH benzilideno); 129,37 (CH benzilideno); 126,57 (CH benzilideno); 125,99 (CH benzilideno).

EMAR (ESI): Calculado: 214,048; Encontrado: 213,0127.

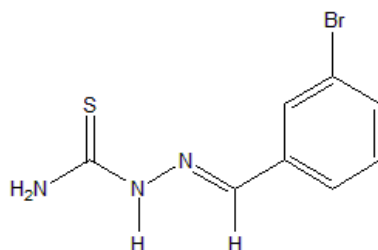
5.1.1.1.6 3-Fluorariltiossemicarbazona (**If**)

IV, principais bandas (ν cm⁻¹, KBr): 3394,68 (assim. NH₂); 3238 (sim. NH₂); 3160,05 (NH); 1602,98 (C=N); 1073,98 (C=S).

RMN¹H (400 MHz, acetona, ppm): δ 10,55 (s, 1H, NH); 8,17 (s, 1H, N=CH); 7,77-7,67 (m, 2H, benzilideno); 7,55 (s, 1H, NH₂); 7,53 (s, 1H, NH₂); 7,48-7,42 (m, 1H, benzilideno); 7,19-7,14 (m, 1H, benzilideno).

RMN¹³C (100 MHz, acetona, ppm) e DEPT: δ 180,66 (-C=S); 162,67 (Cq benzilideno); 141,88 (N=C-H); 137,83 (Cq benzilideno); 131,44 (CH benzilideno); 124,87 (CH benzilideno); 117,4 (CH benzilideno); 113,5 (CH benzilideno).

5.1.1.1.7 3-Bromoariltiossemicarbazona (**Ig**)

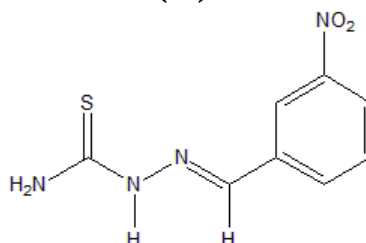


IV, principais bandas (ν cm⁻¹, KBr): 3390,3 (assim. NH₂); 3234,7 (sim. NH₂); 3155,13 (NH); 1602,55 (C=N); 1105,33 (C=S).

RMN¹H (300 MHz, acetona, ppm): δ 10,55 (s, 1H, NH); 8,14 (s, 1H, N=CH); 8,07 (s, 1H, NH₂); 8,06 (s, 1H, NH₂); 7,75-7,71 (m, 1H, benzilideno); 7,58-7,54 (m, 2H, benzilideno); 7,39-7,34 (t, 1H, $J = 7,8$ e $8,1$ Hz, benzilideno).

RMN¹³C (75 MHz, acetona, ppm) e DEPT: δ 179,82 (-C=S); 140,5 (N=C-H); 136,9 (Cq benzilideno); 132,6 (CH benzilideno); 130,8 (CH benzilideno); 129,1 (CH benzilideno); 126,4 (CH benzilideno); 122,2 (Cq benzilideno).

5.1.1.1.8 3-Nitroariltiossemicarbazona (**Ih**)



IV, principais bandas (ν cm⁻¹, KBr): 3393,5 (assim. NH₂); 3241,1 (sim. NH₂); 3158,06 (NH); 1604,88 (C=N); 1106,84 (C=S).

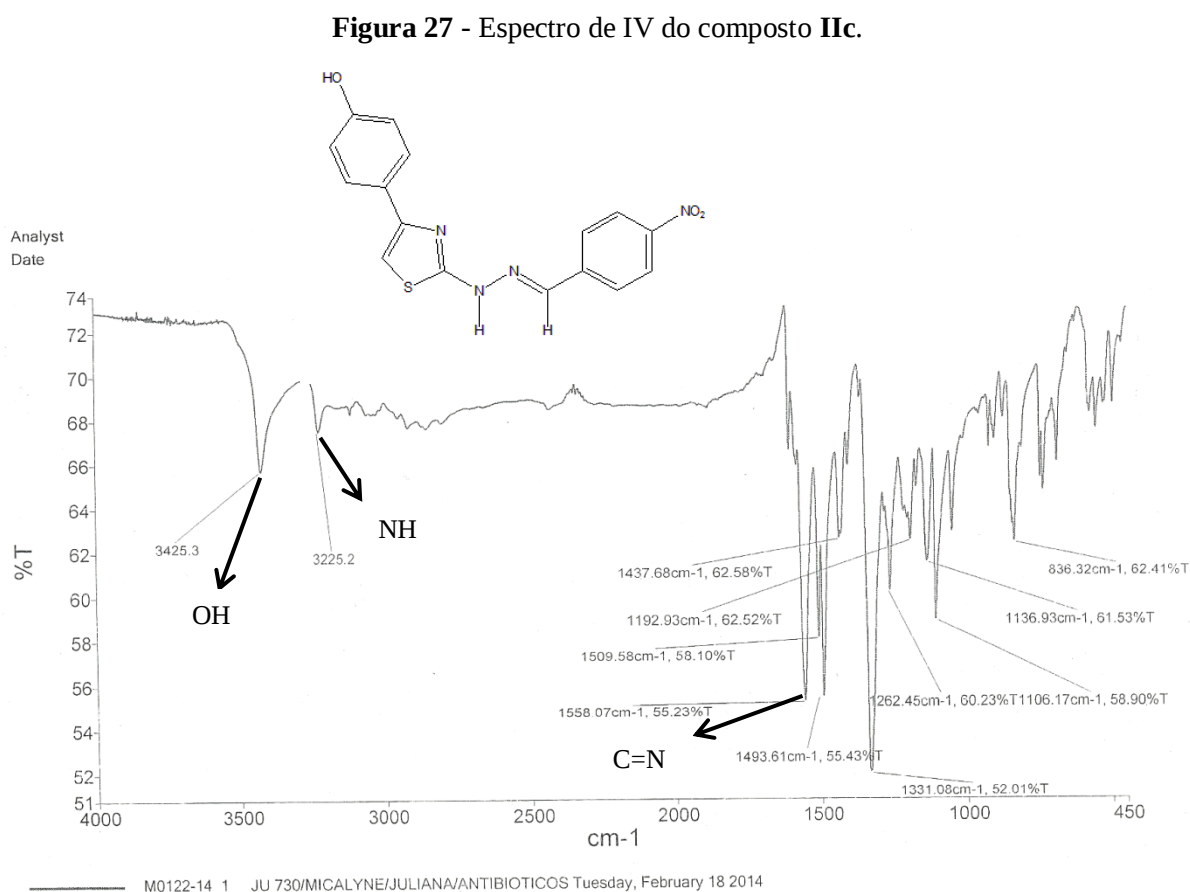
RMN¹H (300 MHz, acetona, ppm): δ 11,07 (s, 1H, NH); 9,05 (s, 1H, N=CH); 8,76 (s, 1H, NH₂); 8,75 (s, 1H, NH₂); 8,73-8,63 (m, 2H, benzilideno); 8,18-8,12 (m, 2H, $J = 8,1$ Hz, benzilideno).

RMN¹³C (75 MHz, acetona, ppm) e DEPT: δ 179,71 (-C=S); 140,4 (N=C-H); 136,9 (Cq benzilideno); 133,57 (CH benzilideno); 132,1 (Cq benzilideno); 130,5 (CH benzilideno); 124,43 (CH benzilideno); 121,74 (CH benzilideno).

5.1.1.2 Tiazolhidrazonas

A partir da técnica do infravermelho foi possível identificar algumas funções orgânicas essenciais para a comprovação estrutural da molécula. Na frequência entre 3267,71 e 3450,75 cm^{-1} foi observada a banda referente à deformação axial da ligação O-H. A ligação N-H foi verificada entre 3117,3 e 3286,87 cm^{-1} . No comprimento de onda que variou entre 1558,07 e 1624,99 cm^{-1} foi possível observar a banda referente à ligação C=N. (CHIMENTI et al., 2013).

Na **figura 27** é possível observar as bandas do composto **IIc**. As principais bandas observadas foram: 3425,3 cm^{-1} (O-H); 3225,2 cm^{-1} (N-H); 1558,07 cm^{-1} (C=N).



A partir da análise dos espectros de RMN^1H das novas tiazolhidrazonas foi possível evidenciar os picos característicos destas moléculas.

O sinal mais importante para caracterização desta classe de compostos é o do próton do grupamento $=\text{CH-S}$ presente no anel tiazólico. O pico que representa este hidrogênio aparece como singlete e foi detectado em todos os espectros das tiazolhidrazonas sintetizadas.

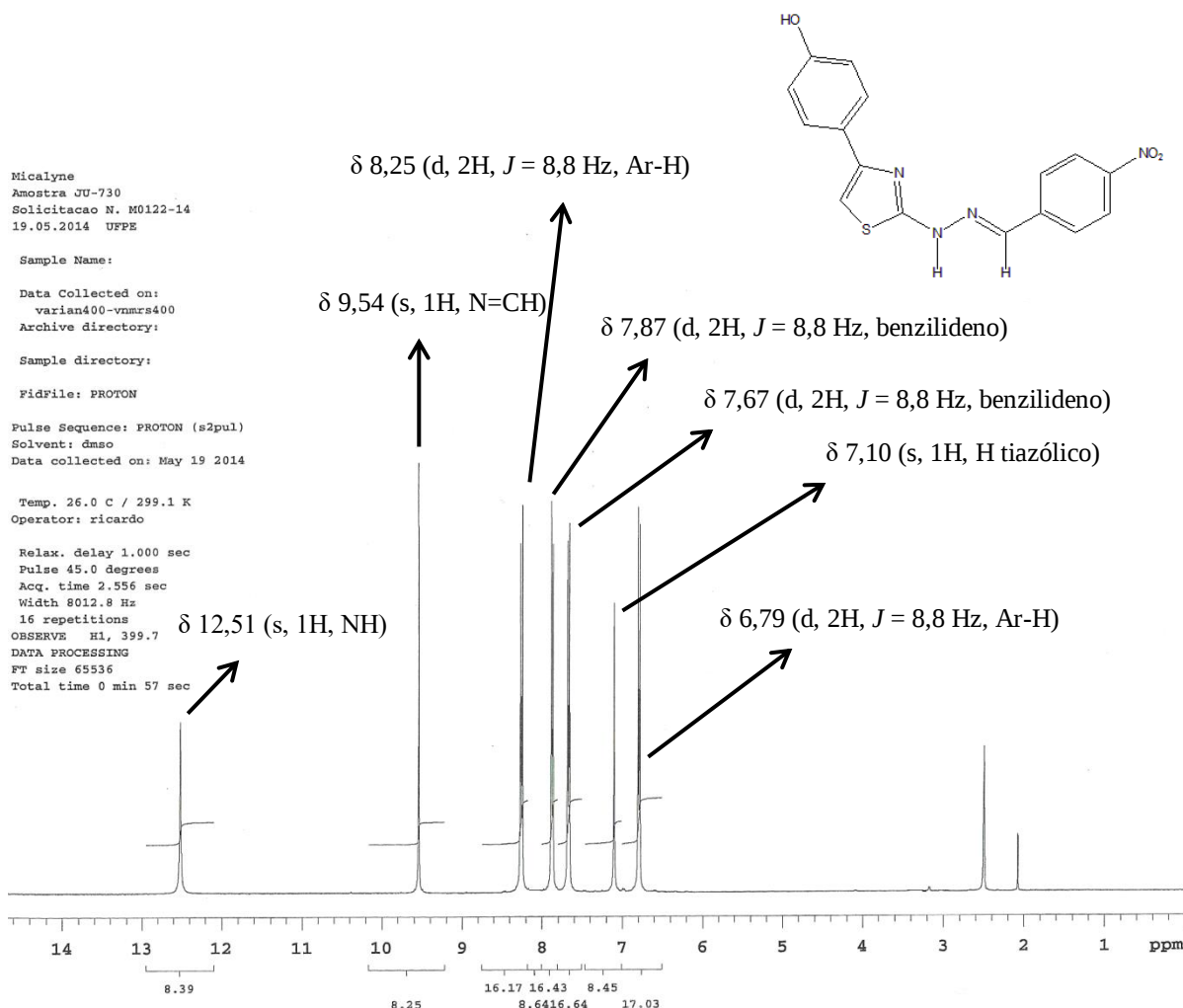
O deslocamento químico deste próton variou entre 6,95 e 7,1 ppm. Nas moléculas intermediárias para a formação dos derivados tiazólicos, as tiossemicarbazonas, este sinal não é observado. Com isso, a presença deste pico é determinante para comprovar o sucesso da reação e, conseqüentemente, a obtenção do produto final (CHIMENTI et al., 2013).

Outro pico detectado nos espectros de RMN¹H destas moléculas é o relativo ao próton do grupamento NH. Este hidrogênio foi observado como um singlete largo com deslocamento químico variando entre 8,46 e 12,51 ppm.

Assim como as tiossemicarbazonas, as tiazolhidrazonas apresentam um singlete referente ao próton da função azometina (CH=N). Este fato deve ser considerado, uma vez que deixa claro que a segunda etapa da reação não tem influência sob a ligação estabelecida entre o aldeído e a tiossemicarbazida na etapa anterior. Os singletos observados para esse hidrogênio apresentaram deslocamentos químicos entre 8,07 e 9,54 ppm (DISTINTO et al., 2012).

As novas tiazolhidrazonas sintetizadas possuem um anel aromático substituído com uma hidroxila na posição *para* do anel. Por se tratar de hidrogênio lábil, o sinal referente a este próton não apareceu em todos os espectros. Quando foi possível a sua detecção, apresentou-se como um singlete largo com deslocamento entre 3,56 e 5,6 ppm.

Nos espectros analisados foi possível observar sinais de singlete (s), dubleto (d), duplo dubleto (dd), tripleto (t) e/ou multipeto (m) na região característica de grupamentos aromáticos (6,81-8,25 ppm).

Figura 28 - Espectro de RMN¹H do composto **IIc**.

A **Figura 28** trata-se do RMN¹H da tiazolhidrazona **IIc**. Através deste é possível detectar os sinais referentes aos prótons desta molécula. Em 12,51 ppm foi observado o singlete referente ao próton do NH e em 9,54 ppm o hidrogênio azometínico. O hidrogênio do grupamento =CH–S, característico do anel tiazolínico e essencial para a comprovação estrutural deste núcleo, foi detectado em 7,1 ppm. Os hidrogênios benzílicos apareceram como dois dubletos em 7,87 e 7,67 ppm ($J = 8,8$ Hz). Os prótons pertencentes ao fenol também foram observados como dois dubletos, com os seguintes deslocamentos: 8,25 e 6,79 ppm ($J = 8,8$ Hz).

A partir dos espectros de RMN¹³C, por sua vez, foi possível identificar os dezesseis carbonos constituintes das novas tiazolhidrazonas. Entre 167,43 e 168,94 ppm foi detectado o pico referente ao carbono do grupamento S–C=N. Trata-se do carbono quaternário pertencente ao anel tiazólico ligado a dois nitrogênios e um enxofre. O ambiente químico ao redor deste

átomo torna este carbono o mais desblindado da molécula. Este fato justifica o seu deslocamento químico (CUKUROVALI et al., 2006).

Entre 152,12 e 162,89 ppm foi detectado o sinal referente ao carbono quaternário do anel aromático substituído na posição *para* com uma hidroxila. O oxigênio é o segundo átomo mais eletronegativo da tabela periódica. Por isso, ele exerce efeito retirador de elétrons e, com isso, deixa o carbono pelo qual está diretamente ligado com nuvem eletrônica menor, ou seja, mais desblindado.

Das oito moléculas sintetizadas, seis possuem um de seus anéis aromáticos monossubstituídos com um halogênio. Devido ao grande caráter eletronegativo destes átomos, o carbono quaternário do aromático encontra-se mais à esquerda do espectro de RMN¹³C. Como discutido anteriormente, quanto maior a eletronegatividade do substituinte mais desblindado está o carbono diretamente ligado a ele. Os deslocamentos observados para os compostos que contêm halogenetos foram: **IIa** (4-Cl) 133,03 ppm; **IIb** (4-Br) 122,75 ppm; **IIc** (4-F) 165,34 ppm; **IId** (3-Cl) 137,65 ppm; **IIe** (3-F) 165,5 ppm; **IIg** (3-Br) 122,87 ppm. Os sinais referentes aos carbonos ligados ao bromo foram detectados mais para a direita do espectro. Este fato é chamado de efeito de átomo pesado (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

Nos espectros dos compostos **IIc** e **IIh** foram observados picos em 147 e 157,31 ppm. Estes são referentes ao carbono quaternário do aromático ligado ao grupamento nitro. Este substituinte é retirador de elétrons, o que torna o carbono menos blindado.

O primeiro CH detectado no RMN¹³C é referente àquele ligado ao carbono quaternário do anel aromático e ao nitrogênio, por meio de ligação dupla. Por estar ligado a um átomo de alta eletronegatividade e a um carbono sp², seu deslocamento é observado 138,28 e 148,3 ppm.

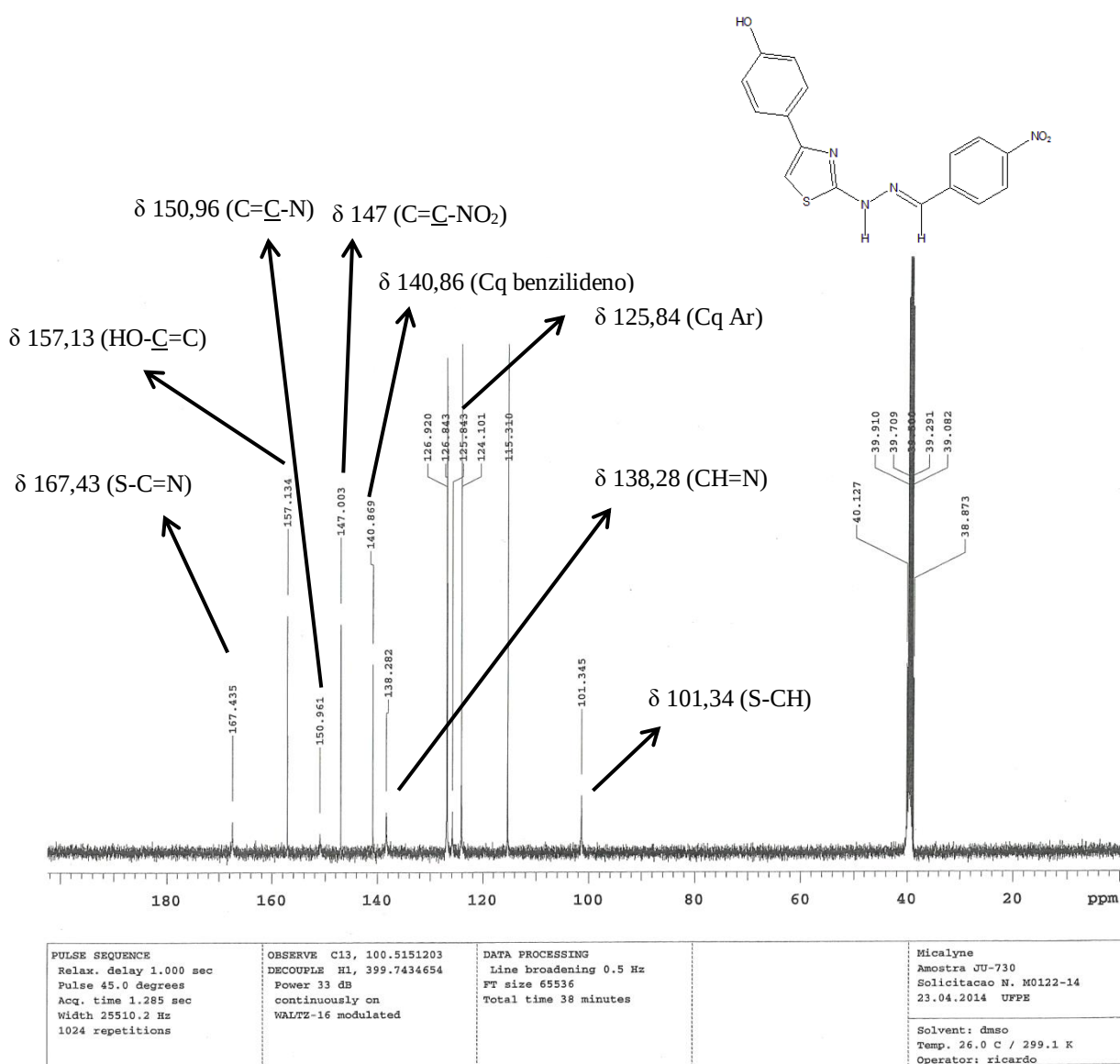
O anel tiazólico possui dois carbonos quaternários. Um deles foi detectado no campo mais alto do espectro devido à natureza da sua vizinhança, o carbono está ligado a dois nitrogênios, um por meio de ligação dupla e outro por ligação simples. O segundo carbono quaternário é mais blindado, pois se encontra ligado à apenas um átomo de nitrogênio, por meio de ligação simples. O sinal referente a este carbono foi observado entre 134,03 e 152,15 ppm.

Dos grupamentos CH, o pertencente ao anel tiazólico é o mais blindado da molécula.

Este carbono está ligado a um átomo de enxofre, que disponibiliza facilmente elétrons para participar da ressonância no anel tiazólico, uma vez que é volumoso, mole e de baixa eletronegatividade. O deslocamento químico deste CH pode ser verificado entre 101,07 e 101,76 ppm (CHIMENTI et al., 2013).

Os sinais referentes aos carbonos aromáticos e benzílicos foram detectados em deslocamentos químicos variando entre 112,81 e 141,87 ppm. A partir da análise dos DEPTs dos compostos foi permitido diferenciar os carbonos quanto a sua quantidade de substituintes (C ou CH).

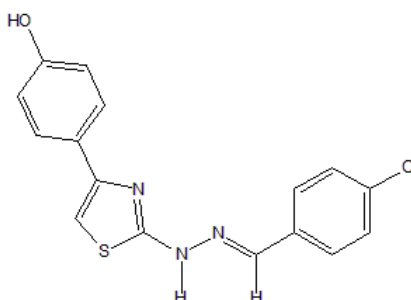
Figura 29 - Espectro de RMN¹³C do composto **IIc**.



A **Figura 29** revela os sinais característicos de RMN¹³C do derivado **IIc**. Em 167,43

ppm foi observado o sinal correspondente ao carbono quaternário do tiazol ($S-C=N$); em 157,13 ppm o carbono quaternário ligado ao oxigênio da hidroxila ($HO-C=C$). Em 150,96 ppm foi identificado o carbono do grupamento $C=C-N$. O sinal referente ao carbono do grupamento $CH=N$ foi observado em 138,28 ppm. O carbono mais blindado, $C=CH-S$, foi identificado em 101,34 ppm. O sinal correspondente ao carbono ligado ao grupamento nitro foi detectado em 147 ppm. Os carbonos aromáticos e benzílicos foram detectados a partir de sinais com deslocamentos químicos entre 140,86 e 115,31 ppm.

5.1.1.2.1 4-{2-[N'-(4-Cloro-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (**IIa**)



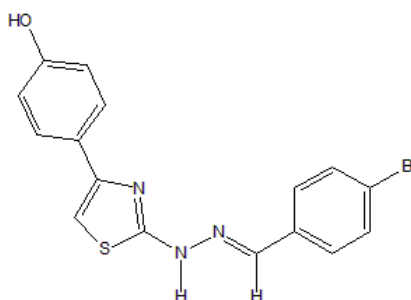
IV, principais bandas: (ν cm^{-1} , KBr): 3267,71 (O-H); 3117,3 (N-H); 1622 (C=N).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 9,41 (s, 1H, NH); 8,13 (s, 1H, CH=N), 7,69 (d, 2H, J = 8 Hz, Ar-H); 7,63 (d, 2H, J = 8,2 Hz, benzilideno); 7,48 (d, 2H, J = 8,2 Hz, benzilideno); 7,08 (s, 1H, H tiazólico); 6,82 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H).

RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, ppm) e DEPT: δ 168,05 ($S-C=N$); 157,56 ($HO-C=C$); 148,3 (CH=N); 141,87 (CH benzilideno); 134,03 ($C=C-N$); 133,03 ($C=C-Cl$); 129,29 (CH benzilideno); 128,96 (CH benzilideno); 128,16 (CH benzilideno); 128,01 (Cq Ar); 127,27 (CH Ar); 124,41 (Cq benzilideno); 115,44 (CH Ar); 115,05 (CH Ar); 101,26 (S-CH).

EMAR (ESI): Calculado: 330,068; Encontrado: 329,0390.

5.1.1.2.2 4-{2-[N'-(4-Bromo-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (**IIb**)



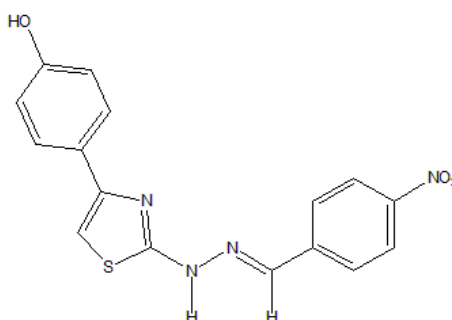
IV, principais bandas (ν cm^{-1} , KBr): 3292 (O-H); 3250 (N-H); 1619 (C=N).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 8,08 (s, 1H, CH=N); 7,65 (d, 2H, J = 9,2 Hz, Ar-H); 7,61-7,56 (m, 4H, benzilideno); 7,05 (s, 1H, H tiazólico); 6,81 (d, 2H, J = 8 Hz, Ar-H).

RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, ppm) e DEPT: δ 168,07 (S-C=N); 157,51 (HO-C=C); 149,53 (C=C-N); 141,65 (CH=N); 133,47 (Cq benzilideno); 131,89 (CH benzilideno); 129,5 (CH benzilideno); 128,36 (CH Ar); 127,26 (CH Ar); 124,71 (Cq Ar); 122,75 (C=C-Br); 115,47 (CH Ar); 115,27 (CH Ar); 101,25 (S-CH).

EMAR (ESI): Calculado: 374,042; Encontrado: 372,9884.

5.1.1.2.3 4-{2-[N'-(4-Nitro-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (**IIc**)



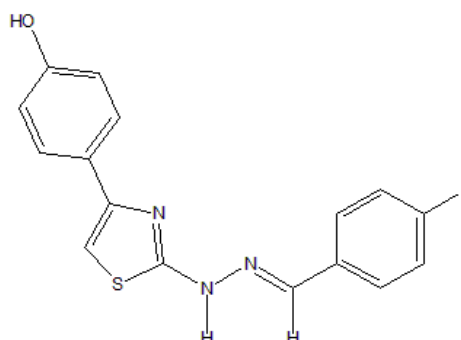
IV, principais bandas (ν cm⁻¹, KBr): 3425,3 (O-H); 3225,2 (N-H); 1558,07 (C=N).

RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 12,51 (s, 1H, NH); 9,54 (s, 1H, CH=N), 8,25 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H); 7,87 (d, 2H, J = 8,8 Hz, benzilideno); 7,67 (d, 2H, J = 8,8 Hz, benzilideno); 7,10 (s, 1H, H tiazólico); 6,79 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H).

RMN¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, ppm) e DEPT: δ 167,43 (S-C=N); 157,13 (HO-C=C); 150,96 (C=C-N); 147 (C=C-NO₂); 140,86 (Cq benzilideno); 138,28 (CH=N); 126,92 (CH benzilideno); 126,84 (CH Ar); 125,84 (Cq Ar); 124,10 (CH benzilideno); 115,31 (CH Ar); 101,34 (S-CH).

EMAR (ESI): Calculado: 341,077; Encontrado: 340,0630.

5.1.1.2.4 4-{2-[N'-(4-Fluor-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (**IIId**)



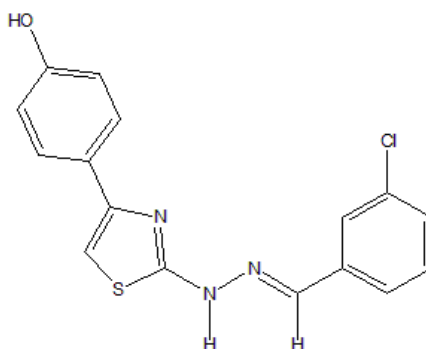
IV, principais sinais (ν cm⁻¹, KBr): 3420,2 (O–H); 3248,16 (N–H); 1624,99 (C=N).

RMN¹H (400 MHz, acetona, ppm): δ 8,46 (s largo, 1H, NH); 8,08 (s, 1H, CH=N), 7,76-7,71 (m, 4H, Ar-H e benzilideno); 7,22-7,17 (m, 2H, benzilideno); 6,95 (s, 1H, H tiazólico); 6,82 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H).

RMN¹³C (100 MHz, acetona, ppm) e DEPT: δ 168,93 (S–C=N); 165,34 (HC=C–F); 162,89 (O–C=C); 152,15 (C=C–N); 141,09 (CH=N); 132,27 (Cq Ar); 129,28 (CH benzilideno); 129,2 (CH benzilideno); 128,04 (CH Ar); 127,8 (Cq benzilideno); 116,6 (CH Ar); 116,37 (CH Ar); 116,08 (CH benzilideno); 101,45 (S–CH).

EMAR (ESI): Calculado: 314,105; Encontrado: 313,0685.

5.1.1.2.5 4-{2-[N'-(3-Cloro-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (**IIe**)

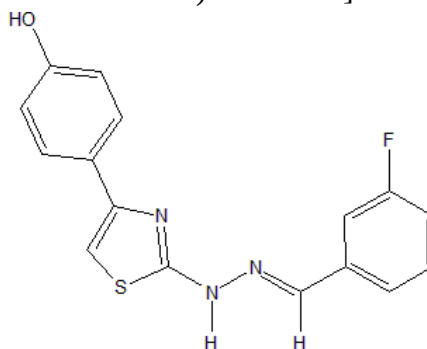


IV, principais bandas (ν cm⁻¹, KBr): 3375 (O–H); 3285,15 (N–H); 1569,28 (C=N).

RMN¹H (400 MHz, acetona, ppm): δ 8,07 (s, 1H, CH=N), 7,73 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H); 7,7 (s, 1H, benzilideno); 7,6 (d, 1H, J = 7,6 Hz, benzilideno); 7,45-7,37 (m, 2H, benzilideno); 6,99 (s, 1H, H tiazólico); 6,87 (d, 2H, J = 8,8 Hz, Ar-H); 5,83 (s largo, 1H, OH).

RMN¹³C (100 MHz, acetona, ppm) e DEPT: δ 168,94 (S–C=N); 158,28 (HO–C=C); 151,12 (C=C–N); 141,41 (CH=N); 137,65 (C=C–Cl); 135,11 (Cq benzilideno); 131,24 (CH benzilideno); 129,86 (CH benzilideno); 128,12 (CH Ar); 126,96 (Cq Ar); 126,63 (CH benzilideno); 125,94 (CH benzilideno); 116,18 (CH Ar); 101,76 (S–CH).

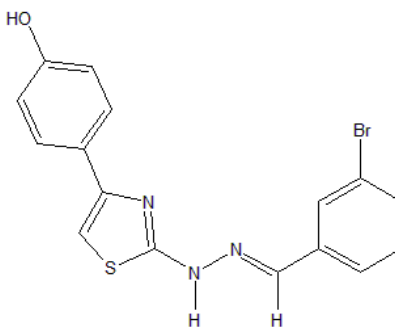
EMAR (ESI): Calculado: 330,059; Encontrado: 329,0390.

5.1.1.2.6 4-{2-[N'-(3-Fluor-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (**IIIf**)

IV, principais sinais (ν cm⁻¹, KBr): 3450,75 (O–H); 3190 (N–H); 1574,64 (C=N).

RMN¹H (300 MHz, acetona, ppm): δ 8,66 (s largo, 1H, NH); 8,07 (s, 1H, CH=N); 7,74-7,71 (dd, 2H, $J = 2,4$ e $J = 1,8$ Hz, Ar-H); 7,49-7,41 (m, 3H, benzilideno); 7,16-7,09 (m, 1H, benzilideno); 6,97 (s, 1H, H tiazólico); 6,87-6,84 (dd, 2H, $J = 2,4$ e $J = 2,1$ Hz, Ar-H); 3,57 (s largo, 1H, OH).

RMN¹³C (75 MHz, acetona, ppm) e DEPT: δ 168,84 (S–C=N); 165,5 (C=C–F); 158,13 (HO–C=C); 152,15 (C=C–N); 140,78 (CH=N); 138,22 (Cq benzilideno); 131,43 (CH benzilideno); 128,06 (CH benzilideno); 127,61 (Cq Ar); 123,55 (CH Ar); 123,52 (CH Ar); 116,76 (CH benzilideno); 116,09 (CH benzilideno); 113,11 (CH Ar); 112,81 (CH Ar); 101,69 (S–CH).

5.1.1.2.7 4-{2-[N'-(3-Bromo-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (**IIg**)

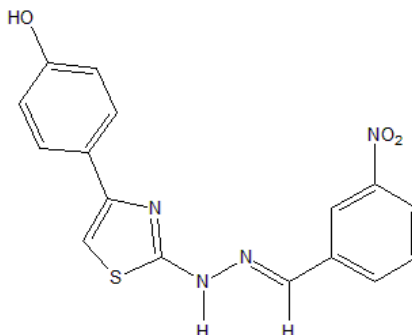
IV, principais sinais (ν cm⁻¹, KBr): 3406,25 (O–H); 3286,87 (N–H); 1611,22 (C=N).

RMN¹H (300 MHz, acetona, ppm): δ 8,77 (s, 1H, NH); 8,23 (s, 1H, CH=N); 7,90-7,89 (m, 1H, benzilideno); 7,73-7,70 (dd, 2H, $J = 1,8$ e $J = 2,4$ Hz, Ar-H); 7,68 (s, 1H, benzilideno); 7,58-7,55 (m, 1H, benzilideno); 7,41-7,36 (t, 1H, benzilideno); 7,04 (s, 1H, H tiazólico); 6,91-6,88 (dd, 2H, $J = 1,8$ e $J = 1,8$ Hz, Ar); 5,4 (s largo, 1H, OH).

RMN¹³C (75 MHz, acetona, ppm) e DEPT: δ 168,85 (S–C=N); 158,38 (HO–C=C); 147,96 (CH=N); 143,25 (C=C–N); 137 (Cq benzilideno); 132,92 (CH benzilideno); 131,16 (CH benzilideno); 129,51 (CH benzilideno); 127,79 (CH Ar); 126,32 (Cq Ar); 124, 65 (CH

benzilideno); 122,87 (Br-C=C); 115,97 (CH Ar); 101,37 (S-CH).

5.1.1.2.8 4-{2-[N'-(3-Nitro-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol (**IIIh**)



IV, principais bandas (ν cm⁻¹, KBr): 3396,46 (O-H); 3120,8 (N-H); 1611,22 (C=N).

RMN¹H (300 MHz, acetona, ppm): δ 8,51 (s, 1H, CH=N); 8,22-8,19 (m, 2H, benzilideno); 8,11 (d, 1H, J = 8,4 Hz, Ar-H); 7,75-7,72 (dd, 2H, J = 1,8 e J = 1,8 Hz, Ar-H); 7,70 (s, 1H, benzilideno); 7,01 (s, 1H, H tiazólico); 6,87-6,84 (dd, 2H, J = 1,5 e J = 2,4 Hz, Ar-H); 4,1 (s largo, 1H, OH).

RMN¹³C (75 MHz, acetona, ppm) e DEPT: δ 167,72 (S-C=N); 157,31 (C=C-NO₂); 151,12 (HO-C=C); 148,82 (C=C-N); 139,01 (CH=N); 136,77 (Cq benzilideno); 132,07 (CH benzilideno); 130,12 (CH benzilideno); 127,22 (CH Ar); 126,61 (Cq Ar); 123,28 (CH Ar); 120,52 (CH benzilideno); 115,27 (CH Ar); 101,07 (S-CH).

5.2 ESTUDO BIOLÓGICO

A seguir serão descritos os resultados obtidos nas avaliações biológicas dos compostos.

5.2.1 Avaliação da atividade esquistossomicida dos compostos sintetizados

A atividade esquistossomicida dos derivados tiazólicos foi avaliada frente a vermes adultos de *S. mansoni* na concentração única de 100 µg/mL. As leituras foram realizadas a cada 24 horas por um período de cinco dias, ou seja, 120 horas.

Durante todo o período de observação (120 horas), todos os vermes adultos de *S. mansoni* incubados na ausência de qualquer fármaco (grupo controle negativo) exibiram movimento ondulatório e peristáltico característico ao longo do eixo do corpo, com aderência ocasional no fundo da placa de cultura, através da ventosa ventral (pontuação 5). Em

contraste, os vermes expostos à droga esquistossomicida de escolha, praziquantel (grupo controle positivo), apresentaram contração muscular imediatamente após a administração do fármaco. Depois de 24 horas de tratamento com praziquantel, 100% dos vermes morreram (pontuação 0).

As oito tiazolhidrazonas foram testadas, observando-se a capacidade destas moléculas de inibir a motilidade e/ou levar os parasitos à morte. Das oito moléculas avaliadas apenas três mataram os parasitos (**IIc**, **Ile** e **IIf**), mas com percentuais de mortalidade muito baixos, variando entre 6,66 e 36,36%. Os derivados **Ila**, **Ilb**, **IId**, **Ilg** e **Ilh** não apresentaram atividade esquistossomicida neste experimento.

A **Tabela 4** reúne as taxas de mortalidade dos vermes adultos frente aos compostos sintetizados e também retrata algumas observações feitas ao longo das leituras.

Tabela 4. Mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* tratados com os derivados tiazólicos sintetizados (%).

Tempo (horas)							Observações
Compostos	0	24	48	72	96	120	
Ila	0	0	0	0	0	0	Vermes escuros e aderidos à placa; presença de ovos.
Ilb	0	0	0	0	0	0	Presença de ovos.
Ilc	0	0	0	0	7,69	30,76	Vermes curtos, escuros e descamados; ausência de ovos.
IId	0	0	0	0	0	0	Casais desacalando e não aderidos; presença de ovos.
Ile	0	0	0	0	0	36,36	Vermes escuros e descamados; presença de bolhas; ausência de ovos.
IIf	0	6,66	6,66	6,66	6,66	6,66	Vermes aderidos; presença de ovos.
Ilg	0	0	0	0	0	0	Presença de ovos.
Ilh	0	0	0	0	0	0	Ausência de ovos.

A motilidade dos parasitos pode ser analisada na **Tabela 5**. Cada verme foi analisado de acordo com os scores a seguir:

- 0** – Ausência total de movimento corporal e cefálico do parasito;
- 1** – Verme com pouco movimento ao longo do corpo;
- 2** – Parasito com movimento apenas nas extremidades;
- 3** – Presença apenas de movimentos internos;

4 – Movimentos não coordenados e vermes não aderidos à placa;

5 – Movimento padrão do parasito e adesão à placa.

Tabela 5. Motilidade dos vermes (%) no grupo controle e depois de tratados com o Praziquantel e com as tiazolhidrazonas em diferentes tempos pós-incubação.

Tempo (horas)					
Compostos	24	48	72	96	120
Controle	100% – 5	100% – 5	100% – 5	100% – 5	100% – 5
Praziquantel	100% – 0	100% – 0	100% – 0	100% – 0	100% – 0
IIa	100% – 4	100% – 5	100% – 5	100% – 5	100% – 4
IIb	100% – 4	100% – 4	100% – 4	70% – 4 10% – 1 20% – 5	60% – 1 30% – 4 10% – 2
IIc	100% – 4	100% – 4	100% – 4	8,33% – 0 8,33% – 1 16,66% – 2 16,66% – 3 50% – 4	30,76% – 0 46,15% – 1 23,07% – 3
IId	100% – 4	100% – 4	55,55% – 5 44,44% – 4	55,55% – 5 44,44% – 4	100% – 4
IIe	9,09% – 1 90,9% – 4	100% – 4	9,09% – 1 90,9% – 4	36,36% – 1 9,09% – 2 27,27% – 4 27,27% – 5	36,36% – 0 27,27% – 1 9,09% – 2 27,27% – 4
IIf	6,66% – 0 93,33% – 4	6,66% – 0 33,33% – 1 60% – 4	6,66% – 0 66,66% – 4 26,66% – 5	6,66% – 0 13,33% – 1 80% – 4	6,66% – 0 13,33% – 1 66,66% – 4 13,33% – 5
IIg	100% – 4	9,09% – 1 90,9% – 4	9,09% – 4 90,9% – 5	9,09% – 1 90,9% – 4	100% – 4
IIh	40% – 1 60% – 4	100% – 4	100% – 4	20% – 1 6,66% – 1 13,33% – 3 60% – 4	60% – 1 33,33% – 2 6,66% – 4

Como se pode observar, a maioria dos compostos sintetizados não se mostraram eficazes frente aos vermes adultos do *S. mansoni*. Os compostos **IIa**, **IId** e **IIg** não apresentaram taxa de mortalidade, mas, após 120 horas, foi observado que os vermes tratados com estes compostos apresentaram movimentos não coordenados e não encontravam-se aderidos à placa.

Os compostos **IIb** e **IIh** não mataram nenhum parasito. Após 120 horas de observação, foi possível verificar que a maior parte dos vermes tratados com estes compostos apresentava pouco movimento ao longo do corpo.

As tiazolhidrazonas **IIc**, **IIe** e **IIf** apresentaram taxa de mortalidade para vermes adultos de *S. mansoni*. O composto **IIc**, substituído com um grupamento nitro na posição quatro do benzilideno, matou, após 120 horas, 30,76% dos parasitos. Apesar da taxa de mortalidade ser baixa, é importante verificar que 46,15% dos vermes que receberam esta molécula apresentaram pouco movimento ao longo do corpo no último dia do experimento. Além disso, esta molécula promoveu descamações e escurecimento dos vermes.

O radical nitro é considerado parasitofórico por apresentar um grupo de nitroderivados auxiliando na atividade antiparasitária, tais como os furanos, tiofenos, tiazóis e imidazóis. Muitos nitrocompostos vêm se destacando na terapêutica como antiparasitários, tais como o metronidazol, o benzonidazol e o nifurtimox (PAULA et al., 2009).

O composto **IIf** matou apenas 6,66% dos parasitos. Mas quase 80% dos vermes apresentaram alteração na sua motilidade.

Dos vermes tratados com o composto **IIe**, 36,36% morreram. O 4-{2-[N'-(3-Cloro-benzilideno)-hidrazona]-tiazol-4-il}-fenol mostrou ser o mais ativo dos compostos testados, uma vez que todos os outros parasitos que receberam tratamento com esta molécula (63,64%) tiveram sua motilidade comprometida ou apresentaram movimentos descoordenados. Além disso, esta molécula promoveu descamações e escurecimento dos vermes.

O átomo de cloro se caracteriza por ser um retirador de elétrons por efeito indutivo negativo e por apresentar efeito mesomérico positivo (BRUICE, 2006). A introdução de um átomo de halogênio como substituinte torna o derivado mais lipofílico, ou seja, menos solúvel em água. Estudos indicam que os halogênios podem melhorar a absorção dos compostos em meio biológico, mais precisamente nas membranas celulares (THOMAS, 2003).

Como dito anteriormente, os halogênios conferem às moléculas certo grau de lipofilicidade, mas a presença da hidroxila diminui esse fator. Com isso, aumenta a dificuldade de penetração dos compostos nos organismos a ser tratados, o que provavelmente justifica os fracos resultados obtidos neste experimento.

O escurecimento dos parasitos ocorre quando eles se contraem. Esta característica também é observada quando os vermes são tratados com Praziquantel. A descamação observada nos vermes após o tratamento com as tiazolhidrazonas pode ser causada pela destruição do tegumento.

Apenas nos poços que receberam os compostos **IIc**, **IIe** e **IIh** não foi detectada a presença de ovos, ou seja, os compostos inibiram o acasalamento entre os parasitos. Nos demais poços, inclusive no que recebeu o composto **IIf** (molécula que apresentou taxa de mortalidade), houve oviposição.

5.2.2 Estudo da atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados

Os resultados da avaliação do teste de difusão em disco de papel estão descritos na **Tabela 6**.

Tabela 6. Atividade antimicrobiana de compostos testados contra cepas bacterianas e levedura, utilizando o método de difusão em disco (diâmetro do halo de inibição em mm).

Compostos	Micro-organismos								Levedura
	Bactéria Gram-positiva				Bactéria Gram-negativa			Bactéria Álcool- ácido resistente	
	<i>Sa</i>	<i>Ml</i>	<i>Bs</i>	<i>Ef</i>	<i>Pa</i>	<i>Ec</i>	<i>Sm</i>	<i>Ms</i>	<i>Ca</i>
Ia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ib	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ic	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Id	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ie	0	0	0	0	0	0	0	0	0
If	0	0	0	0	0	0	0	13,33 ± 0,57	0
Ig	0	0	0	0	0	0	0	9,66 ± 0,57	0
Ih	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IIa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IIb	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IIc	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IId	0	8,33 ± 0,57	0	0	0	0	0	0	0
IIe	8,66 ± 0,57	25 ± 1	8,33 ± 0,57	0	0	0	0	9,33 ± 0,57	0
IIf	9	10,66 ± 0,57	8,66 ± 0,57	8,33 ± 0,57	0	0	0	9 ± 1	0
IIg	0	0	0	0	0	0	0	9 ± 1	0
IIh	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kanamicina (30 µg/disco)	22,33 ± 0,58	27 ± 1,0	13,33 ± 0,58	13 ± 1,0	14,6 ± 0,58	14,66 ± 0,58	14,66 ± 0,58	40 ± 1,0	NT
Cefotaxime (30 µg/disco)	34	45	25	12	22	38	36	15	24 ± 1,0
Ampicilina (10 µg/disco)	38	45	28	24	NT	20	NT	NT	NT

Os resultados representam a média ± desvio padrão.

Sa: *S. aureus*; *Ml*: *M. luteus*; *Bs*: *B. subtilis*; *Ef*: *E. faecalis*; *Pa*: *P. aeruginosa*; *Ec*: *E. coli*; *Sm*: *S. marcescens*; *Ms*: *M. smegmatis*; *Ca*: *C. albicans*.

Das oito tiossemicarbazonas sintetizadas, apenas duas demonstraram possuir atividade antimicrobiana. Os compostos **If** e **Ig** apresentaram halos de inibição contra o *Mycobacterium smegmatis* de 13,33 e 9,66 mm, respectivamente.

Quatro das oito tiazolhidrazonas sintetizadas mostraram inibir o crescimento dos micro-organismos. O composto **IId** exibiu halo inibitório de 8,33 mm contra o *Micrococcus luteus*, halo este considerado muito pequeno. A sua tiossemicarbazona correspondente, **Id**, não se mostrou ativa frente a nenhum micro-organismo utilizado neste experimento.

A molécula **IIe** inibiu o crescimento de quatro micro-organismos diferentes, sendo um deles com halo considerável. Os halos exibidos por este composto foram: 8,66 mm (*Staphylococcus aureus*), 25 mm (*Micrococcus luteus*), 8,33 mm (*Bacillus subtilis*) e 9,33 mm (*Mycobacterium smegmatis*). O maior halo formado por este derivado foi contra o *M. luteus* (25 mm). O seu intermediário, 3-Cloroariltiossemicarbazona (**Ie**), não mostrou eficácia contra nenhuma cepa testada.

O derivado **IIIf** apresentou maior espectro de ação, uma vez que inibiu o crescimento de cinco micro-organismos. Os halos formados foram: 9 mm (*S. aureus*), 10,66 mm (*M. luteus*), 8,66 mm (*B. subtilis*), 8,33 mm (*Enterococcus faecalis*) e 9 mm (*M. smegmatis*). Estes halos não foram considerados significativos. Porém, vale ressaltar que o seu intermediário, 3-Fluorariltiossemicarbazona (**If**), mostrou efetividade frente à apenas uma cepa, *M. smegmatis*.

O composto **IIg** exibiu halo de inibição apenas para a bactéria álcool-ácido resistente (*M. smegmatis*). O halo formado foi de 9 mm.

De uma forma geral, as moléculas ciclizadas, as tiazolhidrazonas, demonstraram maior atividade antimicrobiana dos que as suas respectivas tiossemicarbazonas. Estes resultados demonstram que a presença de dois grupos bioativos na molécula tende a aumentar a atividade destes compostos.

Em 2008, Karegoudar et al. sintetizaram sete derivados tiazólicos contendo o radical 2,3,5-triclorofenil. Estes compostos foram testados contra os micro-organismos: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*. Estas moléculas exibiram halos de inibição de até 20 mm, inclusive para as bactérias Gram-negativas. O padrão utilizado por esses pesquisadores foi a ciprofloxacina, que apresentou halo variando entre 16 e 20 mm, exceto para o *B. subtilis*, cujo halo exibido foi de 21 mm (KAREGOUDAR et al., 2008).

Estes resultados contrastam-se aos obtidos neste trabalho, uma vez que as tiazolhidrazonas sintetizadas não inibiram nenhuma cepa Gram-negativa. E os halos apresentados por estas moléculas para o *S. aureus* e o *B. subtilis*, foram menores quando comparados aos trabalhos do grupo de pesquisa de Karegoudar.

No trabalho de Alam e seu grupo de pesquisa, desenvolvido em 2011, os autores determinaram a atividade microbiológica de arilidenotiossemicarbazonas e 2-

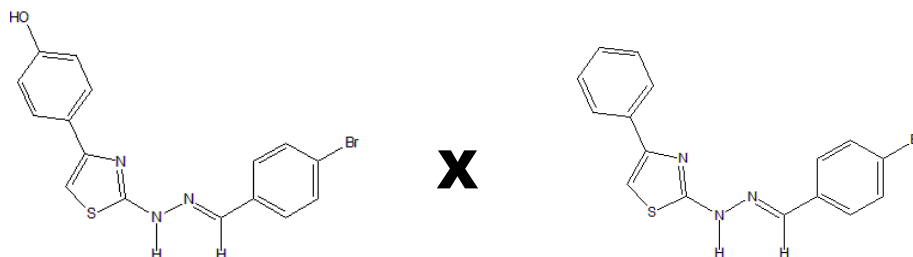
arilidenohidrazina-4-ariltiazóis nas concentrações de 25 e 50 µg por disco. Para tal, estes pesquisadores utilizaram os seguintes micro-organismos: *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Bacillus megaterium*, *P. aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *E. coli*, *Aspergillus oryzae*, *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*.

As tiosemicarbazonas não mostraram nenhuma eficácia contra estas cepas. Entretanto, dos onze 2-arilidenohidrazinil-4-ariltiazóis apenas três não exibiram nenhuma atividade antimicrobiana. Os compostos 2-(2-(4-Bromobenzilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol e 2-(2-(4-metoxibenzilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol apresentaram forte atividade contra *B. cereus*, *S. aureus*, *B. megaterium*, *S. typhi*, e *E. coli*. Os halos formados por esses compostos variaram entre 10 e 19 mm. O padrão utilizado para este experimento foi a kanamicina, que apresentou halos entre 10 e 17 mm. Porém, nas concentrações de 25 e 50 µg por disco, os derivados sintetizados não foram eficazes para as cepas Gram-negativas *P. aeruginosa* e *S. dysenteriae* e para os fungos *A. oryzae*, *C. albicans* e *S. cerevisiae* (ALAM et al., 2011).

Os resultados obtidos por Alam e seu grupo de pesquisa demonstraram que as moléculas sintetizadas por eles são mais eficazes do que as sintetizadas neste trabalho, uma vez que exibiram halos de inibição consideráveis e alguns derivados conseguiram inibir o crescimento das bactérias Gram-negativas *S. typhi*, e *E. coli*.

O caráter lipofílico de uma molécula é o fator mais determinante para a sua atividade antimicrobiana, uma vez que quanto mais lipofílica é uma substância mais facilmente ela conseguirá penetrar nas células dos micro-organismos ou causar danos irreversíveis à membrana desses seres. Alam e sua equipe realizaram estudos de relação estrutura-atividade e concluíram que a introdução na molécula de grupos polares acarretava a redução ou a não presença de atividade antimicrobiana. Este fato fica muito nítido quando se analisa a **Figura 30**. Nela são retratadas duas tiazolhidrazonas, uma substituída na posição *para* por uma hidroxila e outra sem substituição neste anel aromático.

Figura 30 - Estruturas de tiazolhidrazonas: à direita - sintetizada para este trabalho; à esquerda - sintetizada por Alam et al., 2011.



Esses pesquisadores testaram suas drogas frente a onze micro-organismos diferentes, sendo quatro iguais aos utilizados nesta dissertação, e em menores concentrações. A molécula que possui uma hidroxila na posição quatro do anel aromático não inibiu o crescimento de nenhum micro-organismo. Entretanto, a molécula sintetizada por esses estudiosos inibiu o crescimento de cinco germes, sendo três deles os mesmos que foram utilizados na avaliação microbiológica das moléculas sintetizadas para este trabalho. Com isso, concluiu-se que a introdução da hidroxila na molécula tornou-a inativa, uma vez que a deixa mais hidrofílica e, consequentemente, com maior dificuldade de penetrar nos micro-organismos. Este fato corrobora com os estudos de relação estrutura-atividade que também foram realizados por esse grupo de pesquisa (ALAM et al., 2011).

Nenhum dos compostos sintetizados neste trabalho apresentou inibição frente aos micro-organismos Gram-negativos, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Serratia marcescens*, e frente à levedura, *C. albicans*.

5.2.3 Estudo da atividade citotóxica dos compostos sintetizados

A atividade citotóxica *in vitro* dos compostos (**Ia-h**) e (**IIa-h**) foi realizada pelo método do MTT frente às células NCI H-292 (carcinoma epidermoide de pulmão - humano), HL60 (leucemia promielocítica - humana), MCF-7 (adenocarcinoma de mama - humano) e HEP-2 (carcinoma de laringe – humano). A **Tabela 7** mostra os valores do efeito da inibição do crescimento (% de inibição) nas linhagens celulares testadas (em 25 µg/mL).

Ao analisar superficialmente os resultados presentes na **Tabela 7**, é possível observar que os compostos apresentaram citotoxicidade, variando de pouca atividade até muita atividade. A inibição da proliferação celular variou de 5,57%, para o composto **IIa** frente à linhagem MCF-7, a 97,1%, apresentado pelo composto **IIf** frente às células da linhagem HL60.

Tabela 7. Efeito da inibição do crescimento (% de inibição) em linhagens celulares de carcinoma humano (em 25 $\mu\text{g/mL}$).

Compostos	Linhagens			
	NCI H-292	HL60	MCF-7	HEp-2
Ia	25,88	83,55	ND	47,21
Ib	5,59	72,24	ND	46,43
Ic	26,43	7,943	ND	26,79
Id	21,08	28,33	ND	61,18
Ie	25,35	10,24	ND	49,76
If	10,82	14,75	ND	39,8
Ig	29,07	48,97	ND	68,26
Ih	46,82	1,71	ND	27,66
IIa	59,18	84,18	5,57	70,83
IIb	68,21	81	13,65	79,9
IIc	48,7	88,06	ND	12,26
IId	66,77	92,57	21,82	77,54
IIe	69,93	76,19	ND	77,54
IIf	75,56	97,1	52,51	80,54
IIg	83,26	75,49	55,59	83,06
IIh	46,21	11,02	ND	21,85
Doxorrubicina	89,64	ND	64,5	78,75

ND: Não determinado.

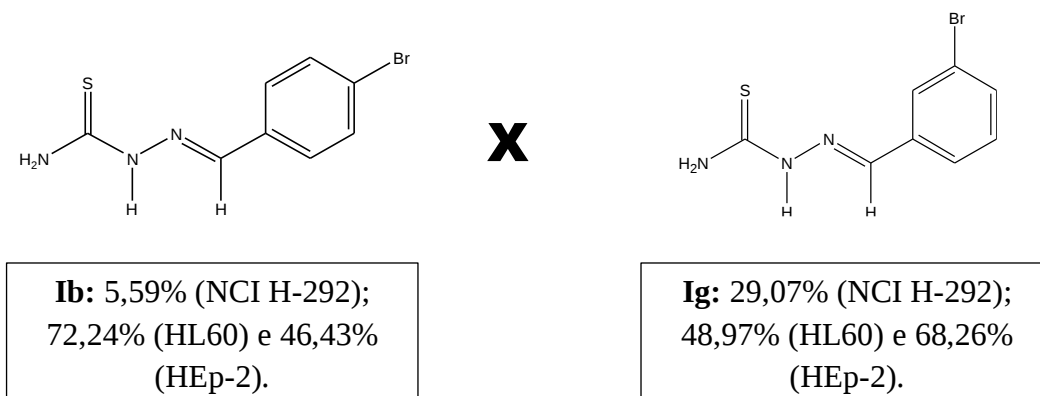
Os compostos testados podem ser divididos em dois grupos distintos, as tiosemicarbazonas, intermediários para obtenção dos compostos finais, e as tiazolhidrazonas. Oito derivados tiosemicarbazônicos e oito tiazolhidrazonas foram sintetizados e testados. As tiosemicarbazonas foram testadas para três linhagens celulares. A maioria dessas moléculas apresentou inibição abaixo de 50%. Cinco das oito tiazolhidrazonas foram testadas para quatro linhagens de células. Esses compostos inibiram o crescimento da maioria das linhagens celulares (**Tabela 7**).

Em relação aos compostos intermediários, as tiosemicarbazonas, podemos observar que os melhores resultados foram obtidos para as células HL60, a mais sensível das linhagens celulares utilizadas. Os compostos **Ia** e **Ib** apresentaram, respectivamente, 83,55 e 72,24% de inibição para as células dessa linhagem. Para a linhagem NCI H-292 nenhum composto tiosemicarbazônico inibiu mais que 50% da proliferação celular. O melhor resultado para esse tipo celular foi obtido pelo **IIh**, com um percentual de 46,82%. Os compostos **Id** e **Ig** apresentaram os maiores percentuais de inibição frente às células HEp-2, 61,18 e 68,26%, respectivamente.

As tiosemicarbazonas que possuem substituição na posição *para* do anel demonstraram ser mais efetivas frente às células de leucemia promielocítica humana quando

comparadas às tiossemicarbazonas que possuem os mesmos substituintes, mas na posição *meta*. A diferença na efetividade de inibição do crescimento celular desta linhagem pode ser verificada ao comparar os derivados **Ib** (72, 24%) e **Ig** (48,97%), por exemplo (**Figura 31**).

Figura 31 - Estruturas dos compostos **Ia** (à esquerda) e **Ig** (à direita), mostrando que há diferença na atividade citotóxica quando a posição do substituinte é modificada.



Três destes intermediários substituídos na posição *meta* do benzilideno mostraram ser mais efetivos na inibição da proliferação celular das células HEp-2, exceto o **Id** (4-Fluorariltiossemicarbazona), que demonstrou maior percentual de inibição quando comparado ao **If** (3-Fluorariltiossemicarbazona).

As tiazolhidrazonas sintetizadas apresentaram excelentes percentuais de inibição. Frente às células da linhagem NCI H-292, seis dos oito compostos obtidos apresentaram inibição da proliferação celular acima de 50%. Os resultados obtidos para essa linhagem variaram de 46,21 (**IIh**) a 83,26% (**IIg**).

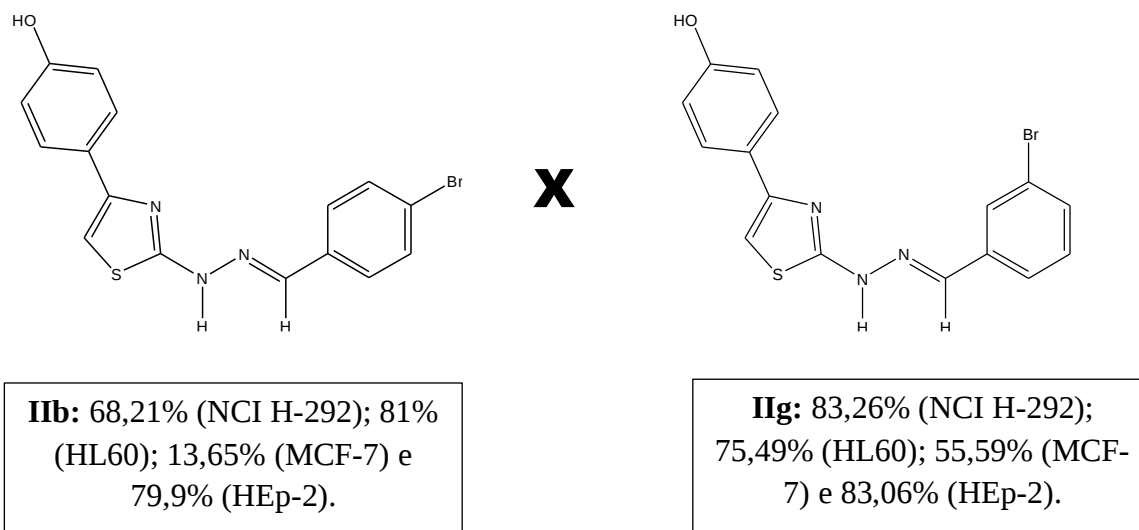
Todas as moléculas apresentaram inibição superior a 50% frente às células de leucemia promielocítica (HL60). O menor resultado obtido foi 75,49% (**IIg**) e o maior foi 97,1% (**IIf**).

A linhagem MCF-7 é a mais resistente das células utilizadas neste experimento. Cinco compostos foram avaliados contra esta linhagem. Dos cinco, apenas dois, o **IIf** e o **IIg**, mostraram inibição superior a 50%, 52,51 e 55,59%, respectivamente.

Das oito tiazolhidrazonas sintetizadas, seis apresentaram mais que 50% de citotoxicidade frente às células HEp-2. Os resultados variaram entre 12,26 (**IIc**) e 83,06% (**IIg**).

De forma geral, as tiazolhidrazonas com o substituinte na posição *para* do benzilideno mostraram ser mais eficazes frente à leucemia promielocítica humana. Dos derivados sintetizados e testados, todas as tiazolhidrazonas substituídas na posição *para* do benzilideno demonstraram maior atividade citotóxica contra as células HL60 do que as moléculas com os mesmos substituintes, mas na posição *meta*. No geral, para o carcinoma epidermoide de pulmão as tiazolhidrazonas com o substituinte em *meta*, também apresentaram maior atividade citotóxica do que os compostos substituídos na posição *para* do benzilideno. A comparação dos percentuais de inibição de compostos com os mesmos substituintes, mas em posições diferentes, podem ser vistos na **Figura 32**.

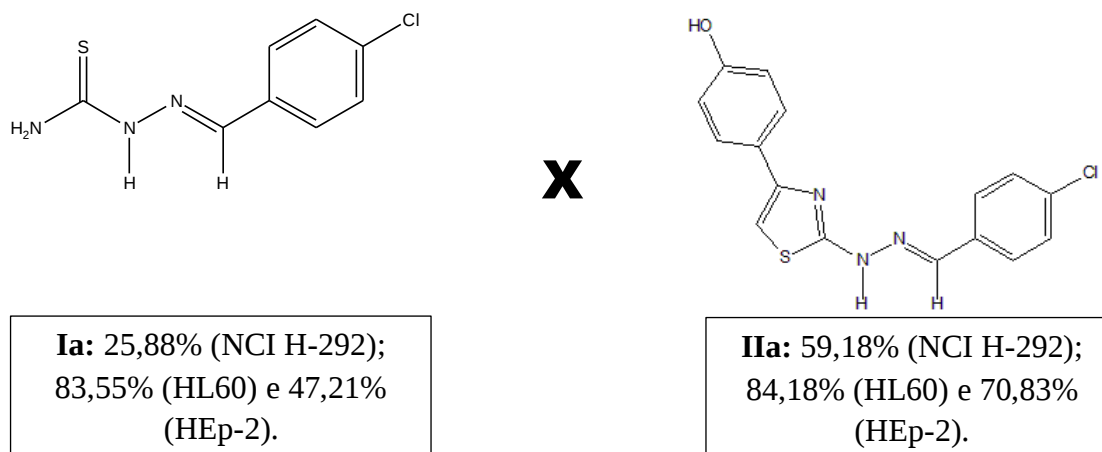
Figura 32 - Estruturas dos compostos **IIb** (à esquerda) e **IIg** (à direita), mostrando que há diferença na atividade citotóxica quando a posição do substituinte é modificada.



O interessante é observar que, na maioria dos casos, as tiazolhidrazonas apresentaram citotoxicidade maior do que as demonstradas pelas tiossemicarbazonas correspondentes. Por exemplo, o derivado **Ia**, 4-cloroariltiossemicarbazona, apresentou inibição de: 25,88% frente às células NCI H-292, 83,55% contra a linhagem HL60 e 47,21% de inibição da proliferação das células HEp-2. Enquanto a sua tiazolhidrazona correspondente, 4-{2-[N'-(4-Cloro-benzilideno)-hidrazina]-tiazol-4-il}-fenol (**IIa**), mostrou os seguintes resultados: 59,18% (NCI H-292), 84,18% (HL60) e 70,83% (HEp-2). Assim, podemos perceber que ao introduzirmos um anel tiazólico, a partir de uma reação de ciclização, no derivado

tiossemicarbazônico, potencializamos a atividade citotóxica deste, com aumentos expressivos na sua capacidade inibitória (**Figura 33**).

Figura 33 - Exemplo de atividade citotóxica de tiazolhidrazona (à direita) obtida após ciclização de tiossemicarbazona (à esquerda).



Neste estudo, as moléculas **II**f e **II**g apresentaram maior citotoxicidade. Inibiram todas as células com percentuais acima de 50% para todas as linhagens em concentração única. Então, esses compostos foram submetidos a diluições para avaliar a IC₅₀. Assim, foi definido a concentração com a qual se observou 50% de inibição do crescimento. Os valores obtidos nesse teste estão descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8. IC₅₀ (em µg/mL) para os compostos **II**f e **II**g.

Compostos	LINHAGENS		
	NCI H-292	HL60	MCF-7
II	11,8	5,34	12,0
II	16,1	12,58	20,0

Os compostos evidenciaram moderada capacidade de inibir a proliferação das células testadas. Os melhores resultados foram obtidos pelo composto **II**f, uma vez que apresentou as menores IC₅₀ para as três linhagens celulares testadas: 11,8 µg/mL (NCI H-292), 5,34 µg/mL (HL60) e 12 µg/mL (MCF-7). Estes resultados não foram considerados excelentes, pois, de acordo com o protocolo estabelecido no experimento, o composto é ativo, quando a IC₅₀ apresenta valor igual ou inferior a 4 µg/mL (GERAN et al, 1972; FERRARI et al, 1992).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- ✓ Oito tiossemicarbazonas e oito inéditas tiazolhidrazonas foram sintetizadas, purificadas e suas constantes físico-químicas determinadas;
- ✓ Todos os compostos tiveram rendimento acima de 50%;
- ✓ Três tiazolhidrazonas apresentaram atividade esquistossomicidas, **IIc**, **Ile** e **IIf**, embora que com baixa taxa de mortalidade;
- ✓ Apenas duas tiossemicarbazonas (**If** e **Ig**) apresentaram atividade antimicrobiana. Ambas inibiram o crescimento do *M. smegmatis*, com halos de 13,33 e 9,66 mm, respectivamente;
- ✓ Quatro tiazolhidrazonas inibiram o crescimento de micro-organismos. O composto **Ile** apresentou os maiores halos e o composto **IIf** o maior espectro de ação;
- ✓ Todavia, nenhum inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativas e levedura;
- ✓ Os resultados não mostraram efeitos inibitórios significativos contra as cepas testadas;
- ✓ Quatro tiossemicarbazonas e sete tiazolhidrazonas apresentaram atividade citotóxica superior a 50%, frente a, no mínimo, uma linhagem celular. Os compostos **IIf** e **Ilg** mostraram ser os mais citotóxicos, apresentaram inibição frente às quatro linhagens testadas.
- ✓ O composto **IIf** e **Ilg** apresentaram IC₅₀ superior a 4 µg/mL para as três linhagens celulares testadas. A molécula **IIf** apresentou os menores valores de IC₅₀.
- ✓ Determinação da citotoxicidade dos compostos em macrófagos;
- ✓ Avaliar a atividade esquistossomicida das tiossemicarbazonas;
- ✓ Avaliar outras atividades biológicas dos derivados sintetizados;
- ✓ Sintetizar os mesmos derivados utilizando o ultrassom, a fim de realizar estudo comparativo entre as duas metodologias;
- ✓ Realizar modificações nas moléculas, a fim de melhorar as suas atividades biológicas;
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral frente a outras linhagens celulares de carcinoma humano.

=====

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALAM, M.S., LIJUN, L., LEE, Y., LEE, D. Synthesis, Antibacterial Activity and Quantum-Chemical Studies of Novel 2-Arylidenehydrazinyl-4-arylthiazole Analogues. **Chem. Pharm. Bull.**, 59 (5): 568-573, 2011.
- AZAM, F., ALKSKAS, I.A., KHOKRA, S.L., PRAKASH, O. Synthesis of some novel N4-(naphtha[1,2-d]thiazol-2-yl)semicarbazides as potential anticonvulsants. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44: 203-211, 2009.
- BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology**, 45 (4): 493-496, 1966.
- BARRY, A. L., PFALLER, M. A., RENNIE, R. P., FUCHS, P. C., BROWN, S. D. Precision and Accuracy of Fluconazole Susceptibility Testing by Broth Microdilution, Etest and Disk Diffusion Methods. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**. 46 (6): 1780-1784, 2002.
- BAUTISTA, J.L, FLORES-ALAMO, M., TIBURCIO, J., VIETO, R., TORRENS, H. Synthesis and Structural Characterization of Fluorinated Thiosemicarbazones. **Molecules**, 18: 13111-13123, 2013.
- BECERRA, M. C. *et al.*, In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on Trypanosoma cruzi epimastigote and trypomastigote forms. **Experimental Parasitology**, 131: 57-62, 2012.
- BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, 27 (3): 461-471, 2004.
- BHARTI, S.K., NATH, G., TILAK, R., SINGH, S.K. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2, 4-disubstituted thiazole ring. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 45: 651-660, 2010.

BHARTI, S.K., SINGH, S.K. Design, synthesis and biological evaluation of some novel benzylidene-2-(4-phenylthiazol-2-yl) hydrazines as potential anti-inflammatory agents. **Medicinal Chemistry Research**, 23: 1004–1015, 2014.

BRASIL. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6º edição. Ministério da Saúde, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde: Relatório de Situação – Pernambuco. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 3ª edição, Brasília – DF. Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde: **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7ª edição. – Brasília – DF. Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde: Guia de vigilância epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. 7. Brasília: Ministério da Saúde press, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=35752> Acessado em: 01 março 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde: Relatório de Situação – Pernambuco. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 5ª edição, Brasília – DF. Ministério da Saúde, 2011a.

BRASIL. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: Plano de ação 2011-2015**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. – Brasília, 2012.

BRASIL. **Casos positivos de Esquistossomose por mês. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas**. 2011.

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_esquistossomose_mes_2011_06_08_2012.pdf. Acesso no dia 15/11/2013a.

BRASIL. Óbitos por Esquistossomose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990-2011.

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/obitos_esquistossomose_25_03_2013.pdf. Acesso no dia 15/11/2013b.

BRUICE, P.Y. **Química Orgânica**. 4ª Edição. São Paulo: Editora Pearson Prentice Hall, 2006.

CAPUTTO, M.E., CICCARELLI, A., FRANK, F., MOGLIONI, A.G, MOLTRASIO, G.Y., VEJA, D., Lombardo, E., Finkielstein, L.M. Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolyldhydrazone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 55: 155-163, 2012.

CASTIÑEIRAS, A., BERMEJO, E., ACKERMAN, L.J., BERALDO, H., West, D.X. Structural and spectral characterization of two bis{N(4)-alkylthiosemicarbazones} of 1-phenylglyoxal. **Journal of Molecular Structure**, 477: 1–6, 1999.

CHIMENTI, F., BIZZARRI, B., MACCIONI, E., SECCI, D., BOLASCO, A., FIORAVANTI, R., CHIMENTI, P., GRANESE, A., CARRADORI, S., RIVANERA, D., LILLI, D., ZICARI, A., DISTINTO, S. Synthesis and in vitro activity of 2-thiazolyldhydrazone derivatives compared with the activity of clotrimazole against clinical isolates of *Candida* spp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 17: 4635-4640, 2007.

CHIMENTI, F., BIZZARRI, B., BOLASCO, A., SECCI, D., CHIMENTI, P., CARRADORI, S., GRANESE, A., RIVANERA, D., FRISHBERG, N., BORD, C., JONES-BRANDO, L. Synthesis and Evaluation of 4-Acyl-2-thiazolyldhydrazone Derivatives for Anti-Toxoplasma Efficacy *in vitro*. **Journal of Medicinal Chemistry**, 52: 4574-4577, 2009.

CHIMENTI, F., BIZZARRI, B., BOLASCO, A., SECCI, D., CHIMENTI, P., GRANESE, A., CARRADORI, S., D'ASCENZIO, M., LILLI, D., RIVANERA, D. Synthesis and

biological evaluation of novel 2,4-disubstituted-1,3-thiazoles as anti-*Candida* spp. agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 46 (1): 378-382, 2011.

CHIMENTI, P., PETZER, A., CARRADORI, S., D'ASCENZIO, M., SILVESTRI, R., ALCARO, S., ORTUSO, F., PETZER, J.P., SECCI, D. Exploring 4-substituted-2-thiazolylhydrazones from 2-, 3-, and 4-acetylpyridine as selective and reversible hMAO-B inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 66: 221-227, 2013.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present... and future?. **Pharmacology & Therapeutics**, 68 (1): 35-85, 1995.

CONLON, C.P. Schistosoma. **Medicine**, 33: 8, 2005.

CUKUROVALI, A., YILMAZ, I., GUR, S., KAZAZ, C. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of some new thiazolylhydrazone derivatives containing 3-substituted cyclobutane ring. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 41: 201-207, 2006.

DISTINTO, S., YÁÑEZ, M., ALCARO, S., CARDIA, M.C., GASPARI, M., SANNA, M.L., MELEDDU, R., ORTUSO, F., KIRCHMAIR, J., MARKT, P., BOLASCO, A., WOLBER, G., SECCI, D., MACCIONI, E. Synthesis and biological assessment of novel 2-thiazolylhydrazones and computational analysis of their recognition by monoamine oxidase B. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 48: 284-295, 2012.

DILOVIC, I., RUBICIC, M., VRDOLJAK, V., PALEVIC, S.P., KRALJ, M., PIANTANIDAB, I., CINDRIC, M. Novel thiosemicarbazone derivatives as potential antitumor agents: Synthesis, physicochemical and structural properties, DNA interactions and antiproliferative activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16: 5189–5198, 2008.

DUVALL, R.H.; DEWITT, W.B. **An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 16: 483-486, 1967.

FALLON, P.G. Schistosome resistance to praziquantel. **Drug Resistance Updates**, 1: 236-24, 1998.

FERRARI, M., FORNASIERO, M. C., ISETTA, A. M., MTT colorimetric assay for testing macrophase cytotoxic activity in vitro. **J. Immunology Methods**, 153 (1-2): 265-267, 1992.

GERAN, R.I., GREENBERG, N.H., McDONALD, M.M., SCHUMACHER, A.N., ABBOT B.J. Protocols for screening clinical agents and natural products against animal tumors and other biological systems, 1972.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, 26: 383-97, 2012.

HANG, H.C.; BERTOZZI, C.R. Chemoselective Approaches to Glycoprotein Assembly. **Accounts of Chemical Research**, 34 (9): 727-736, 2001.

HOFFMANN, K.F., STRAND, M. Molecular identification of a *Schistosoma mansoni* tegumental protein with similarity to cytoplasmic dynein light chains. **The journal of biological chemistry**, 271: 26117 – 26123, 1996.

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**, 38: 313-318, 2003.

ISMAIL, M., METWALLY, A., FARGHALLY, A., BRUCE, J., TAO, L.F., BENNETT, J.L. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate highly doses of praziquantel. **Am J Trop Med Hyg**, 55: 214-218, 1996.

KAREGOUDAR, P., KARTHIKEYAN, M.S., PRASAD, D.J., MAHALINGA, M., HOLLA, B.S., KUMARI, N.S. Synthesis of some novel 2,4-disubstituted thiazoles as possible antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 43 (2): 261-267, 2008.

KATZ, A. & COELHO, P.M.Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. **Acta Tropica**, 108: 72-78, 2008.

KEENAN, M *et al.* Analogues of fenarimol are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and are efficacious in a murine model of Chagas disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, 55: 4189-4204, 2012.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN, W.C. **Diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

LAMBERTUCCI, J.R., SERUFO J.C., GERSPACHER-LARA, R., RAYES, A.A., TEIXEIRA, R., NOBRE, V., ANTUNES, C.M. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, 77: 101–109, 2000.

LAMBERTUCCI, J.R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 105 (4): 422-435, 2010.

LENZI, H.L., CARVALHO, O.S, COELHO, P.M.Z., **Migração e Desenvolvimento do Schistosoma mansoni no Hospedeiro Definitivo**. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*, Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 2008, Parte I, cap. 3, p. 86-146.

LV, P.C., WANG, K.R., YANG, Y., MAO, W.J., CHEN, J., XIONG, J., ZHU, H.L. Design, synthesis and biological evaluation of novel thiazole derivatives as potent FabH inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 19: 6750-6754, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65 (1–2): 55-63, 1983.

OZADALI, K., TAN, O.U., YOGESWARI, P., DHARMARAJAN, S., BALKAN, A. Synthesis and antimycobacterial activities of some new thiazolylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 24: 1695–1697, 2014.

PAULA, F.R., SERRANO, S.H.P., TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, 32 (4): 1013-1020, 2009.

PETROIANU, A. Tratamento cirúrgico da hipertensão porta na esquistossomose mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36 (2): 253-265, 2003.

PORDEUS, L.C., AGUIAR, L.R., QUININO, L.R.M., BARBOSA, C.S. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Brasília: Epidemiol. Serv. Saúde**, 17 (3): 163-175, 2008.

REY, L. **Parasitologia**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2008.

ROMANHA, A.J. *et al.* In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 105 (2): 233-238, 2010.

ROSTOM, S.A.F., FAIDALLAH, H.M., RADWAN, M.F., BADR, M.H. Bifunctional ethyl 2-amino-4-methylthiazole-5-carboxylate derivatives: Synthesis and in vitro biological evaluation as antimicrobial and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 76: 170-181, 2014.

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

SIDDIQUI, N., ARSHAD, M.F., ALAM, M.S. Thiazoles: A Valuable Insight into the Recent Advances and Biological Activities. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, 1 (3): 136-143, 2009.

SILVA, P.C.V. & DOMINGUES, A.L.C. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. **Brasília: Epidemiol. Serv. Saúde**, 20 (3): 327-336, 2011.

SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6ª edição. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2000.

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

SOUZA, M.V.N., FERREIRA, S. B., MENDONÇA, J.S., COSTA, M., REBELLO, F. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química Nova**, 28 (1): 77-84, 2005.

SOUZA, F.P.C., VITORINO, R.R., COSTA, A.P., FARIA-JÚNIOR, F.C., SANTANA, L.A., GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev Bras Clin Med**, 9 (4): 300-7, 2011.

STELMA F.F., TALLA, I.S., SOW, S., KONGS, A., NIANG, M., POLMAN, K., DEELDER, A.M., GRYSEELS, B. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, 53: 167-170, 1995.

TALLIMA, H. & RIDI, R.E. Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult worm actin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 29, 570–575, 2007.

TARASCONI, P.; CAPACCHI, S.; PELOSI, G.; CORNIA, M., ALBERTINI, R., BONATI, A., DALL’AGLIO, P.P., LUNGHI, P., PINELLI, S. Synthesis, Spectroscopic Characterization and Biological Properties of New Natural Aldehydes Thiosemicarbazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**; 8 (1): 157-162, 2000.

TENÓRIO, R.P., GÓES, A.J.S., LIMA, J.G., FARIA, A.R., ALVES, A.J., AQUINO, T.M. Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas e Importância Biológica. **Química Nova**, 28 (6): 1030-1037, 2005.

THOMAS, G. **Química Medicinal: uma introdução**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003.

TURAN-ZITOUNI, G., OZDEMIR, A., KAPLANCIKLI, Z.A., BENKLI, K., CHEVALLET, P., AKALIN, G. Synthesis and antituberculosis activity of new thiazolylhydrazone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 43: 981-985, 2008.

UTZINGER, J., N'GORAN, E.K., CAFFREY, C.R., KEISER, J. From innovation to application: Social–ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Tropica**, 1-17, 2010.

VRANJAC, A. **Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose**. 2007.

ZHANG, D.N., LI, J.T., SONG, Y.L., LIU, H.M., LI, H.Y. Efficient one-pot three-component synthesis of N-(4-arylthiazol-2-yl) hydrazones in water under ultrasound irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, 19: 475-478, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Schistosomiasis : rapport de situation 2001-2012 : plan stratégique 2012-2020**. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases**. www.who.int/neglected_diseases/about/en/. Acessado no dia 27/08/2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Media centre – Schistosomiasis. Factsheet N°115 - Fevereiro 2014**. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html. Acessado no dia 15/04/2014a.