



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Aluizio Galdino da Silva**

**Estudos de QSAR e *Docking* Molecular de Compostos Oxadiazólicos e  
Tiossemicarbazônicos como Agentes Larvicidas para o *Aedes Aegypti*.**

**Recife  
2015**

**Aluizio Galdino da Silva**

**Estudos de QSAR e *Docking* Molecular de Compostos Oxadiazólicos e Tiossemicarbazônicos como Agentes Larvicidas para o *Aedes Aegypti*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

**Área de concentração:** Físico-Química

**Orientador:** Prof. Dr. Mozart Neves Ramos.

**Co-Orientador:** Prof. Dr. João Bosco Paraíso da Silva.

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Elaine Freitas CRB4-1790

S586e Silva, Aluizio Galdino da  
Estudos de QSAR e Docking Molecular de Compostos Oxadiazólicos e Tiossemicarbazônicos como Agentes Larvicidas para o *Aedes Aegypti*. / Aluizio Galdino da Silva . – 2015.  
218 f.: fig., tab.

Orientador: Mozart Neves Ramos  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
CCEN. Química fundamental. Recife, 2015.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Aedes aegypti*. 2. QSAR. 3. Docking molecular. 4. Atividade larvicida. I. Ramos, Mozart Neves (orientador.). II. Título.

541

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2019-08

**ALUIZIO GALDINO DA SILVA**

**Estudos de QSAR e Docking Molecular de Compostos Oxadiazólicos e  
Tiossemicarbazônicos como Agentes Larvicidas para o *Aedes aegypti***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

**Aprovada em: 02/12/2015**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Alfredo Arnóbio de Souza Gama**

Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari**

Instituto de Química de São Carlos  
Universidade de São Paulo

---

**Profa. Dra. Kaline Rabelo Coutinho**

Instituto de Física  
Universidade de São Paulo

---

**Prof. Dr. Marcelo Zaldini Hernandes**

Departamento de Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof. Dr. João Bosco Paraíso da Silva**

Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a vida e me ajudado a superar todos os obstáculos, e aos meus pais pelos sacrifícios feitos em prol da minha educação, tanto escolar como doméstica.

Aos meus orientadores, professor Mozart Neves Ramos e João Bosco Paraíso da Silva, pelas discussões, paciência, amizade, sugestões e pela grande ajuda na realização deste trabalho.

Ao professor do DQF Benício de Barros Neto (*in memoriam*), pelas excelentes aulas de quimiometria.

Ao professor Marcelo Zaldini, pelas sugestões e pelas aulas da disciplina: Modelagem Molecular em Sistemas de Interesse Biológico, que sem dúvidas ajudaram muito na construção deste trabalho.

A professora Daniela Navarro, pela amizade, ensinamentos e conselhos.

Ao pessoal do LQTC, pelas sugestões e discussões.

Não podia deixar de agradecer também a Maurílio e a Patrícia, principalmente pela paciência e ajuda nos momentos mais difíceis.

E a todos do Departamento de Química Fundamental, que ajudaram de forma direta ou indireta, na elaboração desse trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

## RESUMO

Neste trabalho apresentamos os resultados de um estudo teórico envolvendo as relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR) e *docking* molecular para três classes de compostos possuindo atividades contra as larvas do *Aedes aegypti*, vetor transmissor da dengue e febre amarela, no estágio L4. Essas séries compreendem dezessete derivados aril- e fenóximetil tiossemicarbazônicos; nove derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos e quatorze derivados 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila. Os estudos de QSAR indicaram que a alta atividade larvicida desses compostos estava relacionada com descritores eletrônicos (momento de dipolo e cargas atômicas) e hidrofóbicos ( $\pi$  e  $\log P$ ). A partir desses estudos, foi possível desenvolver modelos matemático capazes de prever novos derivados mais ativos que àqueles empregados nos conjuntos de treinamento. Os compostos propostos foram sintetizados e suas atividades observadas confirmaram as nossas previsões. Estudos de *Docking* molecular foram realizados para um alvo em potencial, a proteína AeSCP-2. As atividades larvicidas *in vivo* para os nossos compostos ( $-\log(1/LC_{50})$ ), variaram como uma função energia de ligação obtida *in silico*. Nossos resultados indicaram que os compostos mais potentes são, geralmente, aqueles com as maiores energias de ligação, ou seja, maior afinidade, *in silico*, com o sítio ativo da proteína AeSCP-2. A partir desse estudo, um novo composto juntando as principais características de cada série foi previsto exibindo uma atividade larvicida maior que de todos os derivados previamente estudados nesse trabalho.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. QSAR. Docking molecular. Atividade larvicida. AeSCP-2.

## ABSTRACT

In this work we present the results of a theoretical study involving the quantitative structure-activity relationships (QSAR) and molecular *docking* for three series of compounds showing larvicidal activities against *Aedes aegypti* larvae, the vector of dengue and yellow fever in L4 stage. These series include seventeen ary- and phenoxy-methyl-(thio)semicarbazones; nine 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionic acids and fourteen methyl 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl) propanoates derivatives. The QSAR studies have indicated that the high larvicidal activity for these compounds was related to electronic (dipole moment and atomic charges) and hydrophobic ( $\pi$  and logP) descriptors. From these studies it was possible to develop mathematical models able to predict new more active derivatives than those employed in training set. The proposed compounds were synthesized and their observed activities have confirmed our predictions. Molecular *docking* studies were performed for a potential target, the protein AeSCP-2. The *in vivo* larvicidal activity of our compounds (-Log (1/LC<sub>50</sub>)) changed as a function of the binding energy obtained *in silico*. Our results indicated that the most potent compounds are in general those with the highest binding energies, i.e. those with the highest *in silico* affinity to the active site of AeSCP-2. From the studies, a new compound joining the principal features of each series was predicted to exhibit a larger larvicidal activity than all previous derivatives studied in this work.

Keywords: *Aedes aegypti*. QSAR. Molecular docking. Larvicidal activity. AeSCP-2.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do modelo chave fechadura e do processo de reconhecimento do ligante por seu receptor biológico (BARREIRO; FRAGA, 2001).....	18
Figura 2 - 15 derivados de 3,3-dimetil-1-feniltriazeno. ....	22
Figura 3 - Oito derivados de Ftalimidas.....	23
Figura 4 - Atividades hipolipidêmicas de N-fenilftalimida e seus derivados. ....	24
Figura 5 - Atividade anti-inflamatória de oito derivados de 4-Amino-2,6-diarilpirimidina-5-carbonitrila. ....	25
Figura 6 - Atividades hipolipidêmicas de dezesseis derivados de 2-fenilindan-1,3-dionas.....	26
Figura 7 - Regiões sujeitas à transmissão de dengue. (JANSEN; BEEBE, 2010) . ....	28
Figura 8 - <i>Aedes aegypti</i> . ....	30
Figura 9 - Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> . ....	30
Figura 10 - Alguns inseticidas utilizados para o combate do <i>Aedes aegypti</i> . ....	32
Figura 11 - Atividades larvicidas para o <i>A. aegypti</i> de estruturas isobutilamidas, isoladas do fruto da <i>Piper nigrum</i> (PARK et al., 2002). ....	34
Figura 12 - Derivados <i>para</i> -benzoquinônicos, com seus respectivos valores de LC <sub>50</sub> para larvas do <i>A.aegypti</i> no estágio L3 (DE SOUSA et al., 2010). ....	36
Figura 13 - Derivados de monoterpênos com suas respectivas atividades larvicidas, frente a larvas de <i>Aedes aegypti</i> no estágio L3 (SANTOS et al., 2011).....	37
Figura 14 - Estrutura geral da série triorganoestanho benzoatos <i>para</i> substituídos presentes na (DUONG et al., 2006).....	38
Figura 15 - Estrutura geral da série 2,2,3,3-tetrametilpropanocarboxilatos presentes na (SONG et al., 2007).....	38
Figura 16 - Alguns derivados tiossemicarbazônicos e suas atividades biológicas. ....	41
Figura 17 - (a) Estrutura geral das tiossemicarbazonas e semicarbazonas, (b) Arranjo conformacional das tiossemicarbazonas (na estrutura <i>syn</i> os substituintes em R <sub>3</sub> e R <sub>4</sub> são diferentes de hidrogênio).....	42
Figura 18 - Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas. ....	43
Figura 19 - Estruturas dos isômeros oxadiazólicos: (1) 1,2,3-Oxadiazol; (2) 1,2,4-Oxadiazol; (3) 1,2,5-Oxadiazol; (4) 1,3,4-Oxadiazol.....	44
Figura 20 - Alguns 1,2,4-oxadiazóis e suas atividades biológicas. ....	44
Figura 21 - Proteína AeSCP-2 co-cristalizada com ácido palmítico (adaptado de (DYER et al., 2003). (verde). Código PDB (1PZ4).....	47
Figura 22 - Principais interações entre o ácido palmítico com a proteína AeSCP-2. Figura extraída do PDB ( <i>Proten Data Bank</i> ). As linhas pontilhadas representam as ligações de hidrogênio, enquanto a linha verde as interações hidrofóbicas. Código PDB (1PZ4).....	48
Figura 23 - Valores de IC <sub>50</sub> para inibidores da proteína AeSCP-2 (SCPIs). Adaptado de (KIM; WESSELY; LAN, 2005).....	48
Figura 24 - Formas tautoméricas do derivado 12t. (a) Tiona, (b) Tiol. ....	62
Figura 25 - Representação geral das possíveis conformações e configurações para as classes de compostos (tio)semicarbazônicos investigados. ....	63
Figura 26 - Moléculas não substituídas. (a) ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il) propiônico, (b) 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila. ....	64
Figura 27 - Molécula não substituída do ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il) propiônico. (a) Conformação 1, (b) Conformação 2. ....	65
Figura 28 - Esquema da rotação do grupo fenil para análise da barreira de rotação. ....	65

Figura 29 - Exemplo de um arquivo de saída do programa LigPlus. Representação 2D gerada automaticamente pelo programa, mostrando o tipo de interação realizada (ver a legenda) entre a proteína e o ligante. ....	69
Figura 30 - Energias livre de Gibbs padrão B3LYP/6-311++G(d,p) do derivado 12t nas formas: (a) tiona e (b) tiol. ....	71
Figura 31 - Magnitude e orientação do momento de dipolo para o conformero <i>E/anti</i> dos derivados tiossemicarbazônicos. Ângulo diédrico entre as os grupamentos aril/fenoxi e a porção tiossemicarbazida. Adaptado de (DA SILVA et al., 2015b). ....	75
Figura 32 - Valores previstos de Log (1/LC <sub>50</sub> ) usando a equação (23) <i>versus</i> seus correspondentes valores experimentais. ....	81
Figura 33 - Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo. ....	81
Figura 34 - Molécula não substituída do ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il) propiônico. (a) Conformação 1, (b) Conformação 2, com seus respectivos valores de energia livre padrão (G°) e menor frequência de vibração harmônica. ....	82
Figura 35 - Gráfico da barreira de rotação em torno da ligação C3–C6 para a molécula não substituída do ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônico usando o método B3LYP/6-311G(d,p). ....	83
Figura 36 - Estruturas otimizadas B3LYP/6-311G(d,p) para os nove derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos. ....	84
Figura 37 - Valores previstos de Log (1/LC <sub>50</sub> ) <i>versus</i> seus correspondentes valores experimentais: (a) Equação 24 e (b) Equação 25. ....	89
Figura 38 - Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo: a) Equação 24 e b) Equação 25. ....	90
Figura 39 - Gráfico da barreira de rotação em torno da ligação C3–C6 para a molécula não substituída de 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila usando o método B3LYP/6-311G(d,p). ....	91
Figura 40 - Estruturas otimizadas para os doze derivado 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) propanoato de metila, usando o método B3LYP/6-311G(d,p). ....	92
Figura 41 - Valores previstos do Log (1/LC <sub>50</sub> ) <i>versus</i> seus correspondentes valores experimentais usando a equação 26. ....	98
Figura 42 - Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo. ....	98
Figura 43 - Composto projetado 18t e derivados analisados 4t e 13t utilizando a equação 23. ....	99
Figura 44 - Substituintes utilizados na previsão dos 4 novos derivados bastante ativos. ....	101
Figura 45 - Compostos previstos, utilizando as equações 24 e 25 obtidas por estudos QSAR. ....	102
Figura 46 - Composto projetado (15e) e derivados analisados (2e e 8e) utilizando a equação 26. ....	103
Figura 47 - Sobreposição do ácido palmítico original (verde) e da melhor pose de <i>docking</i> (marrom), com RMSD=0,96 Å. ....	105
Figura 48 - Ilustração dos complexos da proteína AeSCP-2 com os derivados de aril-tiossemicarbazonas. Os derivados de aril-tiossemicarbazonas estão representados pela cadeia verde. ....	106
Figura 49 - Estruturas do ácido palmítico (linha verde) e derivados de aril-tiossemicarbazonas sobrepostas após <i>docking</i> molecular na proteína AeSCP-2. ....	106
Figura 50 - Interações hidrofóbicas e polares com os derivados de aril-tiossemicarbazonas e a proteína AeSCP-2. ....	107
Figura 51 - Estruturas do ácido palmítico (linha verde) e 8 derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas, sobrepostas após <i>docking</i> molecular no AeSCP-2. ....	108

Figura 52 - Interações hidrofóbicas e polares para os derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas. ....	109
Figura 53 - Atividade larvicida experimental dos derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas <i>versus</i> a energia de ligação (em módulo) do complexo formado. ....	111
Figura 54 - Ilustração dos complexos da proteína AeSCP-2 com os derivados 1a e 10a de ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos. Os derivados estão representados pela cadeia verde. ....	112
Figura 55 - Estruturas do ácido palmítico e derivados oxadiazólicos, sobrepostas após <i>docking</i> molecular no AeSCP-2. ....	112
Figura 56 - Interações hidrofóbicas e polares dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos com o AeSCP-2. ....	113
Figura 57 - Atividade larvicida experimental dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos <i>versus</i> energia de ligação (em módulo) do complexo formado. .	116
Figura 58 - <i>Re-docking</i> do ácido palmítico: (a) Distribuição das energias de ligação, (b) sobreposição de 20 conformações do ácido palmítico no AeSCP-2. ....	117
Figura 59 - Frequência dos resíduos de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas com o ácido palmítico. ....	118
Figura 60 - (a) Resíduos hidrofóbicos (azul) interagindo com o ácido palmítico (DYER et al., 2003), (b) frequência de interação dos resíduos hidrofóbicos após <i>re-docking</i> . .	118
Figura 61 - <i>Docking</i> do derivado 1a no AeSCP-2: a) distribuição bimodal de energia, b,c) distribuições individuais relacionados a Figura (a), d,e) sobreposição de 20 estruturas relacionadas com sua respectiva distribuição de energia. ....	119
Figura 62 - <i>Docking</i> do derivado 10a no AeSCP-2: a) distribuição unimodal de energia, b) sobreposição de 20 estruturas aleatórias. ....	120
Figura 63 - Interação do derivado 1a com os domínios hidrofílicos e hidrofóbicos no AeSCP-2: a) estrutura linear, b) estrutura dobrada c,d) distribuições individuais relacionados as Figuras (a) e (b) para 100 conformações. ....	121
Figura 64 - Distribuição de frequências para os resíduos hidrofóbicos da proteína AeSCP-2 interagindo com: (a) derivado 1a e (b) derivado 10a. ....	122
Figura 65 - Atividade larvicida experimental dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos <i>versus</i> energia de ligação (em módulo) do complexo formado. .	123
Figura 66 - Ilustração dos complexos da proteína AeSCP-2 com os derivados 13e e 14e da série 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila. Os derivados estão representados pela cadeia verde. ....	124
Figura 67 - Estruturas do ácido palmítico e derivados 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il) propanoato de metila sobrepostas após o <i>docking</i> no AeSCP-2. ....	125
Figura 68 - Interações hidrofóbicas e polares dos derivados 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila com resíduos de aminoácidos presentes no AeSCP-2. ....	126
Figura 69 - Atividade larvicida experimental dos derivados 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila <i>versus</i> a energia de ligação (em módulo) do complexo formado. ....	128
Figura 70 - Comparação entre as energias de ligação (em módulo) dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos e 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila no AeSCP-2. ....	129
Figura 71 - Comparação entre as energias de ligação dos derivados : (a) ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos e (b) 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila com a proteína AeSCP-2 variando o tamanho do <i>grid</i> . ....	130
Figura 72 - Ilustração dos complexos da proteína AeSCP-2 com os SCPIs. Os inibidores estão representados pela cadeia verde. ....	131

Figura 73 - Estruturas do ácido palmítico (linha verde) e SCPIs após o <i>docking</i> molecular no <i>AeSCP-2</i> .....	131
Figura 74 - Interações hidrofóbicas e polares entre os SCPIs e os resíduos de aminoácidos da proteína <i>AeSCP-2</i> .....	132
Figura 75 - Estruturas do ácido palmítico (linha verde) e todos os derivados das três séries estudadas após o <i>docking</i> no <i>AeSCP-2</i> . ....	134
Figura 76 - Comparação entre as energias de ligação (em módulo) das séries esrtudadas via <i>docking</i> molecular com a proteína <i>AeSCP-2</i> .....	135
Figura 77 - Novo derivado proposto a partir das “melhores” características das séries estudadas. ....	137
Figura 78 - Estruturas do ácido palmítico (verde) e do novo derivado proposto sobrepostas após o <i>docking</i> molecular no <i>AeSCP-2</i> .....	138
Figura 79 - Valores previstos de Log (1/LC <sub>50</sub> ) usando a equação 27 <i>versus</i> seus correspondentes valores experimentais.....	139
Figura 80 - Interações hidrofóbicas e polares entre o novo derivado e os resíduos de aminoácidos da proteína <i>AeSCP-2</i> .....	140

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dezesete derivados de aril- e fenoximetil- tiossemicarbazonas. ....	43
Tabela 2 - Nove derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propionicos. ....	45
Tabela 3 - Quatorze derivados de 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.....	45
Tabela 4 - Cálculos B3LYP/6-311++G(d,p) da energia livre de Gibbs padrão <sup>a</sup> , do momento de dipolo elétrico, da menor frequência vibracional harmônica e da diferença de energia livre de Gibbs padrão entre as conformações <i>syn</i> e <i>anti</i> do isômero <i>E</i> . Adaptado de (DA SILVA et al., 2015b).....	73
Tabela 5 - Dezesete derivados de (tio)semicarbazonas com os respectivos valores da atividade larvicida. ....	76
Tabela 6 - Atividade larvicida experimental, descritores eletrônicos B3LYP/6-311++G(d,p) e lipofílicos para os derivados aril e fenoximetil-tiossemicarbazônicos. ....	79
Tabela 7 - Matriz dos coeficientes de correlação dos parâmetros presentes na Tabela 6 para os derivados aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos. ....	79
Tabela 8 - Atividades larvicidas obtidas dos dados experimentais e previstos para os derivados aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos usando a equação 23. ....	80
Tabela 9 - Nove derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propionicos com os respectivos valores da atividade larvicida. ....	85
Tabela 10 - Atividades larvicidas, descritores eletrônicos B3LYP/6-311G(d,p) e lipofílicos da série ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propionicos.....	86
Tabela 11 - Matriz de correlação das atividades e das variáveis calculadas com o método B3LYP/6-311G(d,p) da série ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propionicos. ....	87
Tabela 12 - Atividades larvicidas experimentais e previstas para a série dos ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propionicos usando a equação 24. Os valores entre parênteses foram previstos com a equação 25.....	88
Tabela 13 - Quatorze derivados 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila com os respectivos valores da atividade larvicida. ....	93
Tabela 14 - Comparação entre os valores de LC <sub>50</sub> e logP dos ésteres com seus respectivos ácidos 1,2,4-oxadiazólicos. ....	94
Tabela 15 - Comparação entre os valores de logP experimentais entre alguns ácidos com seus respectivos ésteres. Adaptado de (SANGSTER, 1989). ....	95
Tabela 16 - Atividades larvicidas, descritores eletrônicos B3LYP/6-311G (d,p), e lipofílicos da série 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.....	96
Tabela 17 - Matriz de correlação das atividades e das variáveis calculadas com o método B3LYP/6-311G (d,p) da série 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.....	96
Tabela 18 - Atividades larvicidas obtidas dos dados experimentais e previstos da série 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila usando a equação 26. ....	97
Tabela 19 - Descritores físico-químicos, com as atividades larvicidas previstas (equação 23) e experimentais.....	99
Tabela 20 - Descritores físico-químicos, atividades larvicidas previstas (equação 25) e experimentais para os três derivados ácidos propostos. Os valores entre parênteses indicam a previsão com a equação 24.....	102
Tabela 21 - Descritores físico-químicos, com as atividades larvicidas previstas (equação 26) e experimentais.....	104
Tabela 22 - Energias de ligação, tipo de interação para cada complexo (proteína-derivado), após o estudo de <i>docking</i> dos derivados de aril-tiossemicarbazonas. ....	107

Tabela 23 - Energias de ligação, tipo de interação para cada complexo após o estudo de <i>docking</i> molecular dos derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas. ....	110
Tabela 24 - Energias de ligação e tipo de interações para cada complexo (proteína-derivado), após o estudo de <i>docking</i> da série ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos. ....	115
Tabela 25 - Energias de ligação e tipo de interações para cada complexo, após o estudo de <i>docking</i> molecular da série 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila. ....	127
Tabela 26 - Energias de ligação e tipo de interações para cada complexo (proteína- SCPIs), após o estudo de <i>docking</i> molecular. ....	133

## LISTA DE ABREVIATURAS

AeSCP-2	<i>Aedes aegypti Sterol Carrier Protein-2</i>
AM1	<i>Austin Model 1.</i>
BOA	<i>Born-Oppenheimer Approximation.</i>
COSMOS	<i>Conductor-like Screening Model.</i>
DFT	<i>Density Functional Theory.</i>
DQF	Departamento de Química Fundamental
G09	Gaussian 2009
HF	<i>Hartree-Fock.</i>
HOMO	<i>highest unoccupied molecular orbital.</i>
LC <sub>50</sub>	<i>Lethal Concentration.</i>
LUMO	<i>lowest occupied molecular orbital.</i>
MLR	<i>Multiple Linear Regression.</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis.</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PCM	<i>Polarizable Continuum Model.</i>
PLS	<i>Partial Least Square.</i>
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship.</i>
SAR	<i>Structure-Activity Relationship.</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1	QUÍMICA MEDICINAL.....	17
1.2	DENGUE.....	27
1.3	O VETOR DA DENGUE: <i>Aedes Aegypti</i> .....	30
1.4	FORMAS DE CONTROLE DO <i>Aedes Aegypti</i> .....	31
1.5	OS SISTEMAS ESTUDADOS.....	39
<b>1.5.1</b>	<b>Uma breve introdução à história dos larvicidas sintéticos na UFPE.....</b>	<b>39</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Derivados de Tiossemicarbazonas.....</b>	<b>41</b>
<b>1.5.3</b>	<b>Derivados 1,2,4-Oxadiazólicos.....</b>	<b>44</b>
1.5.3.1	Derivados Ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionicos.....	45
1.5.3.2	Derivados 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoato de metila.....	45
1.6	ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR DOS DERIVADOS ÁCIDOS E ÉSTERES 1,2,4-OXADIAZÓLICOS E TIOSSEMICARBAZÔNICOS.....	46
<b>2</b>	<b>TESE.....</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>50</b>
3.1	TÉCNICAS COMPUTACIONAIS.....	50
3.2	O MÉTODO DE HARTREE-FOCK.....	51
3.3	TEORIA DO FUNCIONAL DENSIDADE.....	52
3.4	CARGAS ATÔMICAS.....	53
3.5	EFEITO SOLVENTE.....	55
3.6	QUIMIOMETRIA E ESTUDOS QSAR.....	56
3.7	<i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	59
<b>3.7.1</b>	<b>Programa AutoDock.....</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>CÁLCULOS E BIOENSAIOS LARVICIDAS.....</b>	<b>62</b>
4.1	DERIVADOS DE ARIL- E FENOXIMETIL-TIOSSEMICARBAZONAS.....	62
<b>4.1.1</b>	<b>Análise conformacional dos tautômeros tiona e tiol.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Análise configuracional e conformacional dos derivados de tiossemicarbazonas.....</b>	<b>63</b>
4.2	DERIVADOS ÁCIDOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPIÔNICO E ÉSTERES 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPANOATO DE METILA.....	64
<b>4.2.1</b>	<b>Otimização das geometrias moleculares das moléculas não substituídas e seus derivados.....</b>	<b>64</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Análise conformacional das moléculas não substituídas.....</b>	<b>64</b>
4.3	OBTENÇÃO DAS PROPRIEDADES ELETRÔNICAS E EMPÍRICAS.....	66
4.4	EFEITO SOLVENTE.....	66

4.5	ESTUDOS QUIMIOMÉTRICOS .....	67
4.6	<i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	67
4.6.1	<b>Re-docking</b> .....	<b>67</b>
4.6.2	<b><i>Docking</i> dos ligantes ácidos e ésteres 1,2,4-oxadiazólicos e tiossemicarbazônicos</b> .....	<b>68</b>
4.6.3	<b>Análises das interações receptor-ligante</b> .....	<b>69</b>
4.6.4	<b><i>Docking</i> molecular dos inibidores da proteína AeSCP-2 (SCPIs)</b> .....	<b>70</b>
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>71</b>
5.1	DERIVADOS DE ARIL- E FENOXIMETIL-TIOSSEMICARBAZONAS .....	71
5.1.1	<b>Análise conformacional dos tautômeros tiona e tiol</b> .....	<b>71</b>
5.1.2	<b>Análise configuracional e conformacional dos derivados tiossemicarbazônicos</b> .....	<b>71</b>
5.1.3	<b>Seleção dos descritores para o estudo QSAR</b> .....	<b>76</b>
5.1.3.1	Análise de regressão para os derivados tiossemicarbazônicos .....	78
5.2	ESTUDOS QSAR DOS DERIVADOS ÁCIDOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPIÔNICOS.....	82
5.2.1	<b>Análise conformacional da molécula não substuída: Ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônico</b> .....	<b>82</b>
5.2.2	<b>Seleção e cálculos dos descritores estruturais</b> .....	<b>84</b>
5.2.2.1	Análise de regressão para os derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos .....	86
5.3	ESTUDOS QSAR DOS DERIVADOS ÉSTERES 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPANOATO DE METILA.....	91
5.2.2	<b>Análise conformacional da molécula não substuída: 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila</b> .....	<b>91</b>
5.3	PREVISÃO DE NOVOS AGENTES LARVICIDAS .....	99
5.3.2	<b>Derivados aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos</b> .....	<b>99</b>
5.3.3	<b>Derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) propiônicos</b> .....	<b>100</b>
5.3.4	<b>Derivados 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) propanoato de metila</b> .....	<b>103</b>
5.4	ESTUDOS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR .....	104
5.4.2	<b>Re- docking</b> .....	<b>104</b>
5.4.3	<b><i>Docking</i> molecular dos derivados aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos</b> ....	<b>105</b>
5.4.3.1	<i>Docking</i> molecular dos derivados de aril-tiossemicarbazonas .....	105
5.4.3.2	<i>Docking</i> molecular dos derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas .....	108
5.4.4	<b><i>Docking</i> molecular dos derivados ácidos 1,2,4-oxadiazólicos</b> .....	<b>111</b>
5.4.4.1	O que podemos aprender a partir de 1000 conformações de <i>Docking</i> molecular do ácido palmítico e dos derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos no AeSCP-2? .....	117
5.4.5	<b><i>Docking</i> molecular dos derivados ésteres 1,2,4-oxadiazólicos</b> .....	<b>124</b>

5.2.2	Comparação dos resultados de docking molecular dos derivados ácidos e ésteres 1,2,4-oxadiazólicos.....	129
5.2.2	<i>Docking</i> molecular dos inibidores da proteína AeSCP-2 (SCPIs) .....	130
5.2.3	Comparação entre os estudos de <i>docking</i> molecular realizados.....	133
5.2.4	Previsão de um novo agente larvicida a partir de cálculos de <i>docking</i> molecular .....	136
6	CONCLUSÕES.....	141
7	PERSPECTIVAS .....	144
	REFERÊNCIAS.....	145
	APÊNDICE A - CÁLCULOS E BIOENSAIOS LARVICIDAS .....	155
	APÊNDICE B – MATRIZ DE DADOS E CORRELAÇÃO PARA OS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS UTILIZANDO AS CARGAS GAPT E CHELPG .....	157
	APÊNDICE C – MATRIZ DE DADOS E CORRELAÇÃO PARA OS DERIVADOS ÁCIDOS 3-(-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPIÔNICOS UTILIZANDO AS CARGAS GAPT E CHELPG .....	159
	APÊNDICE D – MATRIZ DE DADOS E CORRELAÇÃO PARA OS DERIVADOS 3-(-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPANOATO DE METILA UTILIZANDO AS CARGAS GAPT E CHELPG.....	162
	APÊNDICE E – MATRIZ DE DADOS E CORRELAÇÃO PARA OS DERIVADOS ÁCIDOS 3-(-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPIÔNICOS UTILIZANDO O EFEITO SOLVENTE.....	165
	APÊNDICE F – <i>DOCKING</i> MOLECULAR DOS DERIVADOS ÁCIDOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPIÔNICOS UTILIZANDO A GERAÇÃO DE MIL CONFORMAÇÕES .....	166
	APÊNDICE G – RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS HIDROFÍLICOS .....	178
	APÊNDICE H – DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS.....	181
	ANEXO A – <i>SCORES</i> DE HIDROPATICIDADE DOS AMINOÁCIDOS ...	183
	ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS .....	184
	ANEXO C – CERTIFICADOS DE CONGRESSOS.....	216

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 QUÍMICA MEDICINAL

A necessidade de desenvolvimento de novos compostos químicos, que sejam eficazes em combater ou prevenir enfermidades que ainda não possuem um tratamento específico, e que possibilitem substituir os existentes atualmente a custos menores e dotados de menos ou menores efeitos colaterais, são alguns dos aspectos que permanentemente estimulam a comunidade científica por novas pesquisas. Muitos destes compostos, com potencial para beneficiar a saúde humana, são oriundos de protótipos advindos de produtos naturais, especialmente de espécies vegetais, que têm possibilitado, ao longo dos anos, a descoberta de inúmeras moléculas que apresentam atividade biológica (CECHINEL FILHO et al., 2003). Neste aspecto, vale ressaltar que a síntese orgânica também tem contribuído significativamente, para os principais compostos existentes atualmente no mercado que possam trazer algum benefício a saúde humana (CECHINEL FILHO et al., 2003).

A química medicinal possui um papel importante nesse âmbito pois, compreende o planejamento racional de novas substâncias bioativas, envolvendo, a síntese ou modificação da estrutura molecular de um composto, o isolamento de princípios ativos, elucidação ou confirmação da estrutura molecular, caracterização das propriedades físico-químicas, determinação da atividade biológica, exploração da atividade no nível molecular e o estudo das relações entre estrutura química e atividade biológica (MONTANARI, 1995). Deste modo o desenvolvimento da química medicinal requer a contribuição de diversas áreas de conhecimento, tais como: biofísica, biologia molecular, bioquímica, clínica médica, estatística, físico química, fisiologia, matemática, neurobiologia, patologia, química biológica, química inorgânica, química orgânica, informática e química quântica (AMARAL; MONTANARI, 2002).

A resposta biológica provocada por um composto bioativo ocorre por meio de interações ligante-bioreceptor que são dependentes da estrutura química de ambas as partes interagentes. A Figura 1, mostra de uma forma geral, as interações entre uma enzima e seu substrato, pelo modelo “chave-fechadura” proposto por Emil Fischer. Essa noção de complementaridade pode ser aplicada a interação entre fármacos e seus respectivos receptores biológicos.

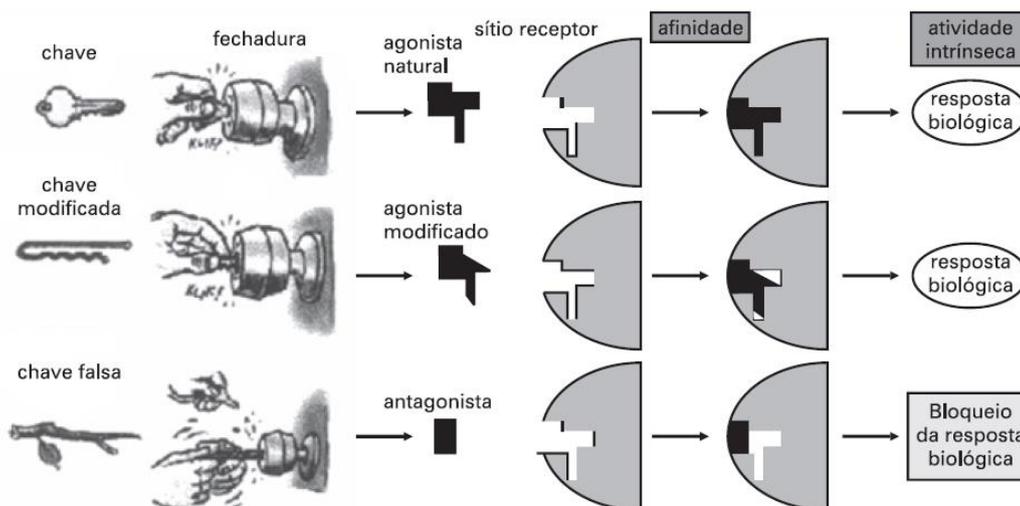


Figura 1 - Representação do modelo chave fechadura e do processo de reconhecimento do ligante por seu receptor biológico (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Estas interações podem ser monitoradas através das propriedades físico-químicas das espécies envolvidas. Estas propriedades expressam características tanto do bioreceptor como da molécula ligante quanto suas naturezas eletrônicas, lipofílicas, de estabilidade termodinâmica, dentre outras. Neste aspecto, a modificação da estrutura molecular de um composto bioativo resulta em alterações nas suas propriedades físico-químicas e, por conseguinte em sua absorção, biodisponibilidade, metabolismo e excreção e, assim, na sua atividade biológica (BARREIRO; FRAGA, 2001; KATZUNG, 1993; TAVARES, 2004).

As propriedades físico-químicas (ou descritores), principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de novos agentes farmacológicos, podem ser usadas para classificar e quantificar as contribuições das mudanças na estrutura química sobre a atividade biológica. Neste contexto, o conhecimento dos valores de cada descritor, permite estimar a contribuição do mesmo frente à atividade biológica do composto em estudo (SCHULTZ et al., 2003; TAVARES, 2004).

A avaliação da importância dos descritores moleculares numa determinada atividade biológica é realizada por meio de estudos das relações estrutura-atividade, SAR (do inglês, *Structure-Activity Relationship*), ou através das relações quantitativas estrutura-atividade, QSAR (do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationship*). As análises SAR, compreendem as relações entre a estrutura química e a atividade biológica de ordem qualitativa ou semi-quantitativa, enquanto, as análises QSAR estas relações são de ordem quantitativa e ocorrem por meio da obtenção de modelos matemáticos, que envolvem

descritores de uma série de compostos com estruturas químicas semelhantes (compostos homólogos) contendo em comum um ou mais grupo(s) farmacofórico(s) e, diferindo entre si por um ou mais grupos substituintes em determinadas posições na estrutura molecular. Estas análises são aplicadas para a investigação da ocorrência de correlação quantitativa entre determinados descritores físico-químicos (e.g. lipofílico, eletrônico e estérico) e propriedades físico-químicas, QSPR (do inglês, *Quantitative Structure-Property Relationship*), ou entre os descritores e a atividade biológica (QSAR) (GAUDIO, 1996; TAVARES, 2004).

A ideia que a atividade biológica depende da estrutura química de uma molécula remonta a segunda metade do século XIX, quando Crum-Brown & Fraser, em 1868, propuseram que a atividade biológica era uma função da constituição molecular (GAUDIO, 1996).

Meyer, em 1899, e Overton, em 1901, concluíram, independentemente, que o efeito narcótico apresentado por diversos compostos não ionizados era dependente do coeficiente de partição clorofórmio-água e que a atividade narcótica observada possuía correlação linear com o aumento do coeficiente de partição (GAUDIO, 1996).

Hansch e colaboradores em 1962 (HANSCH et al., 1962), estudando uma série de derivados de ácidos fenoxiacéticos, concluíram que modelos matemáticos obtidos a partir de estudos QSAR, que combinavam parâmetros físico-químicos relativos aos efeitos eletrônicos, hidrofobicidade e estereoquímica, eram fundamentais para descrever a atividade biológica. Desde a introdução do composto químico no organismo de um ser vivo até o aparecimento da resposta biológica, vários fenômenos ocorrem. A partir disso, certas propriedades intrínsecas do composto químico e do receptor irão determinar a natureza das interações que irão ocorrer entre os dois. Cada contribuição é representada por uma constante de substituinte e a atividade biológica do conjunto de compostos é ajustada através de um modelo linear multidimensional do tipo:

$$\text{Log} \left( \frac{1}{C} \right) = a \log P + b \sigma + c E_s + d$$

Equação 1

onde a dependência da atividade biológica com a lipofilicidade é linear, ou do tipo

$$\text{Log} \left( \frac{1}{C} \right) = -a(\log P)^2 + b \log P + c \sigma + d E_s + e$$

Equação 2

onde a dependência da atividade biológica em relação a lipofilicidade obedece ao modelo parabólico. Nas equações 1 e 2,  $\log P$  é o coeficiente de partição octanol/água,  $(\sigma)$  é a constante eletrônica de Hammett,  $E_s$  é a constante estérica de Taft do substituinte e  $C$  é a concentração molar do composto que produz a resposta biológica. As constantes  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$  e  $e$  são os coeficientes obtidos, por exemplo, através de análise de regressão linear múltipla.

A hidrofobicidade é uma propriedade físico-química que, em geral, desperta um grande interesse em estudos QSAR. Este fato ocorre porque a hidrofobicidade tem a função de avaliar a solubilidade dos compostos, nos processos de absorção (KATZUNG, 1993). Em consequência, sugere-se que a hidrofobicidade interfere na habilidade do fármaco de ação específica em atingir e ligar-se ao sítio receptor, interação que é responsável pela resposta biológica, e também exerce influência sobre a intensidade desta atividade (KATZUNG, 1993).

Entre os descritores estruturais que expressam a hidrofobicidade, destacam-se: o logaritmo decimal do coeficiente de partição octanol-água ( $\log P$ ), a constante lipofílica de Hansch ( $\pi$ ) e a constante  $f$  de Rekker (HANSCH et al., 1962; MANNHOLD et al., 1999). No entanto, somente o uso de descritores experimentais não garante uma boa função resposta (atividade biológica), pois esses descritores, geralmente, não estão disponíveis para alguns substituintes. Portanto, muitas vezes descritores são obtidos através de cálculos teóricos.

Com o avanço computacional, a química teórica-computacional passou a contribuir de forma mais significativa no planejamento racional de compostos com propriedades biológicas, através dos métodos de modelagem molecular. Esses métodos consistem, em um conjunto de ferramentas computacionais que são utilizadas na compreensão de fatores estruturais e eletrônicos de uma molécula ou de um conjunto de moléculas. Entre as características estruturais estão a torsão angular, o volume e as distâncias intra- e intermoleculares. As características eletrônicas por sua vez, compreendem o efeito indutivo e mesomérico, valores de cargas atômicas e energia dos orbitais de fronteira HOMO (do inglês, *highest unoccupied molecular orbital*) e LUMO (do inglês, *lowest occupied molecular orbital*), da molécula (HÖLTJE, 2008).

A conformação molecular está relacionada à posição espacial dos átomos numa molécula, associado a um certo valor de energia e pode ser sondada através de técnicas de modelagem molecular. A computação, por meio de métodos de química quântica (QQ) ou de mecânica molecular (MM) de diferentes conformações moleculares obtidas pela

variação de ângulos de ligação, ângulos torsionais (ou diédricos) e de distância de ligação definem a chamada análise conformacional. Apesar de não haver garantias que a(s) molécula(s) no meio biológico encontra(m)-se na geometria de menor energia, algumas propriedades estruturais como a torsão angular, volume e distância intramoleculares, são normalmente determinadas a partir da conformação de menor energia obtida numa avaliação conformacional realizada.

O comportamento e as características de uma determinada molécula ou de um conjunto de moléculas pertencentes a uma série homóloga (que possuem uma unidade farmacofórica em comum), podem ser investigados através de ferramentas quânticas e clássicas (ANDREONI, 2002; BECK; CLARK, 1998), tendo a química quântica um caráter especial na obtenção de descritores que podem, a princípio, expressar as propriedades energéticas, geométricas e eletrônicas de uma molécula, e suas interações com o meio ou com um bioreceptor. Estes estudos fornecem várias propriedades que podem ser úteis no planejamento de fármacos, pois podem ajudar a explicar relações entre a estrutura molecular e a atividade biológica. Desta forma, tais metodologias se apresentam como ferramenta relevante no processo de planejamento e desenvolvimento de novos agentes farmacológicos.

Ao longo dos anos, o grupo de pesquisa ao qual esta tese está inserida vem desenvolvendo estudos QSAR em compostos com diversas atividades biológicas, tais como, atividades antitumorais (RAMOS; PEREIRA, 1986), hipolipidêmica (CHAPMAN et al., 1983; CHAPMAN; COCOLAS; HALL, 1979; COUTINHO-NETO et al., 1993; HALL et al., 1984; RAMOS; NETO, 1990; WYRICK et al., 1984) e anti-inflamatória (SILVA et al., 2008), utilizando para isso, cálculos de química quântica e análises estatísticas multivariadas que compreendem técnicas de regressão linear múltipla (RLM ou MLR, do inglês: *Multiple Linear Regression*), análise de componentes principais (ACP ou PCA, do inglês: *Principal Component Analysis*) e regressão de mínimos quadrados parciais (RMQP ou PLS, do inglês: *Partial Least Square*).

Em 1986 Ramos e colaboradores (RAMOS; PEREIRA, 1986), realizaram estudos QSAR de uma série de 15 derivados de 3,3-dimetil-1-feniltriazeno (Figura 2), utilizando para isso cálculos de orbitais moleculares semi-empíricos MNDO. Esses estudos envolveram cálculos de parâmetros de natureza eletrônica e análise conformacional e também foram utilizados parâmetros empíricos como, o sigma de Hammet ( $\sigma$ ) e o parâmetro lipofílico de Hansch ( $\pi$ ).

Substituintes (X)	(pC <sub>130</sub> )*
1. H	3,42
2. <i>m</i> -CH <sub>3</sub>	3,37
3. <i>p</i> -CN	2,91
4. <i>m</i> -Cl	3,16
5. <i>m</i> -CF <sub>3</sub>	3,18
6. <i>m</i> -CO <sub>2</sub> H	3,01
7. <i>m</i> -SCH <sub>3</sub>	3,33
8. <i>p</i> -F	3,24
9. <i>p</i> -n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	3,56
10. <i>m</i> -NHCOCH <sub>3</sub>	3,45
11. <i>p</i> -COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	3,16
12. <i>p</i> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	3,43
13. <i>p</i> -CH=CHCO <sub>2</sub> H	2,79
14. <i>p</i> -NO <sub>2</sub>	-
15. <i>p</i> -NH <sub>2</sub>	-

\*pC<sub>130</sub> – Atividade antitumoral

Figura 2 - 15 derivados de 3,3-dimetil-1-feniltriazeno.

Utilizando a técnica de regressão linear múltipla, Ramos e colaboradores (RAMOS; PEREIRA, 1986), encontraram que a atividade antitumoral (pC<sub>130</sub>) dessa classe de compostos era diretamente dependente da energia do orbital LUMO ( $\epsilon_{LUMO}$ ), ou seja, essa atividade biológica aumentava à medida que a energia do LUMO desses compostos fosse mais negativa (equação 3).

$$pC_{130} = 3,510 + 0,173\epsilon_{LUMO}$$

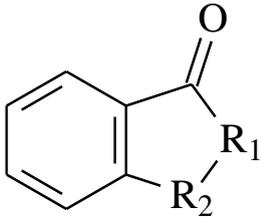
$$(n = 10, R = 0,87 \text{ e } F = 24,92)$$

Equação 3

Também foram realizadas análises de regressões entre a toxicidade desses derivados e os descritores utilizados, mas nenhuma correlação significativa foi encontrada.

Uma das séries de compostos mais estudada por nosso grupo de pesquisa compreende a série de derivados de ftalimidas e ftalimidas N-substituídas, onde suas atividades hipolipidêmicas foram reportadas por Hall e colaboradores (CHAPMAN et al., 1983; CHAPMAN; COCOLAS; HALL, 1979; HALL et al., 1984; WYRICK et al., 1984). Nesse trabalho foi relatado que essa classe de compostos se mostrava efetiva na redução dos níveis de colesterol e triglicérides em roedores, em doses relativamente baixas de 20

mg/Kg/dia, após 16 dias de administração da droga respectivamente. Os estudos referidos por Hall e colaboradores, levaram Ramos e Neto (RAMOS; NETO, 1990) a realizarem o primeiro estudo das relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR) em oito derivados de ftalimidas (Figura 3). Foi observado que pequenas alterações estruturais na ftalimida (derivado 1), levavam a mudanças significativas na atividade desses derivados, como por exemplo, a troca da carbonila da ftalimida (derivado 1) por um grupo NH (derivado 4) faz com que a redução do nível de colesterol, em 16 dias, diminuísse de 43% para 20%. O mesmo foi observado para a redução do nível de triglicerídeos, em 16 dias, diminuindo de 56% para 25%.

	Substituintes		Redução (%)	
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	%C <sub>16</sub>	%T <sub>16</sub>
	1. CO	NH	43	56
	2. CH <sub>2</sub>	NH	13	22
	3. CNH	NH	44	41
	4. NH	NH	20	25
	5. CO	CH(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )	40	37
	6. CO	CH <sub>2</sub>	40	21
	7. CNH	CH <sub>2</sub>	38	41
	8. CO	CHCH <sub>3</sub>	42	39

%C<sub>16</sub> – Colesterol 16 dias  
%T<sub>16</sub> – Triglicerídeos 16 dias

Figura 3 - Oito derivados de Ftalimidas.

Neste trabalho foi utilizado o método computacional semi-empírico AM1 no cálculo dos descritores moleculares, tais como energia dos orbitais HOMO e LUMO, cargas atômicas e momento de dipolo. A partir de um ajuste linear dos dados (utilizando a MLR), Ramos e Neto (RAMOS; NETO, 1990), encontraram que a redução do nível de colesterol era diretamente dependente da energia do orbital LUMO, equação (4).

$$pC_{16} = 2,024 + 0,267\varepsilon_{LUMO}$$

$$(n = 8, R = 0,905 \text{ e } F = 27,15)$$

Equação 4

No que se refere à redução dos níveis de triglicerídeos no sangue, a atividade não só dependia da energia do LUMO, mas também da polaridade verificada na carbonila do anel de cinco membros, conforme a equação (5).

$$pT_{14} = 2,002 + 0,140\varepsilon_{LUMO} - 2,714q_{CO}$$

$$(n = 8, R = 0,902 \text{ e } F = 10,94)$$

Equação 5

A partir das equações obtidas, foi possível planejar dois novos derivados de ftalimidas, que foram previstos teoricamente como mais ativos do que àqueles estudados originalmente pelo grupo da Profa. Hall.

Motivados por esse estudo anterior, Coutinho-Neto e colaboradores (COUTINHO-NETO et al., 1993) estenderam o estudo de QSAR para as *N*-fenilftalimidas e seus derivados (Figura 4).

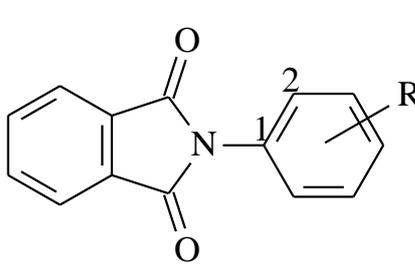
 %C <sub>16</sub> – Colesterol 16 dias %T <sub>14</sub> – Triglicerídeos 14 dias	Substituinte	Redução (%)	
	(R)	%C <sub>16</sub>	%T <sub>14</sub>
	1: H	43	39
	2: <i>o</i> - COCH <sub>3</sub>	57	44
	3: <i>m</i> - COCH <sub>3</sub>	16	26
	4: <i>p</i> - COCH <sub>3</sub>	45	34
	5: <i>o</i> - C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	3	8
	6: <i>m</i> - C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	18	5
	7: <i>p</i> - C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	11	4
	8: <i>o</i> - COOH	23	21
	8: <i>m</i> - COOH	31	29
	10: <i>p</i> - COOH	47	42

Figura 4 - Atividades hipolipidêmicas de *N*-fenilftalimida e seus derivados.

Embora sendo estruturas mais complexas, esse estudo exigiu uma análise conformacional, envolvendo barreira de rotação, e obtenção de descritores moleculares como: energia de orbitais de fronteiras HOMO e LUMO, momentos de dipolo e cargas atômicas, além do parâmetro lipofílico  $\pi$ . A partir da utilização dos métodos de regressão linear múltipla e regressão de mínimos quadrados parciais, encontraram que a redução do nível de colesterol e triglicerídeos era diretamente dependente do descritor  $\pi$ , e da carga do carbono 1 (equações (6) e (7)):

$$pC_{16} = 2,071 + 0,074\pi - 2,984qC_1$$

$$(n = 10, R = 0,84 \text{ e } F = 7,50)$$

Equação 6

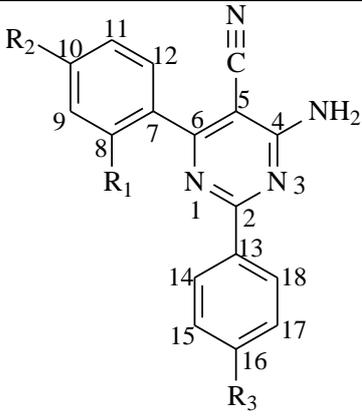
$$pT_{14} = 1,957 + 0,087\pi - 1,207qC_1$$

$$(n = 10, R = 0,87 \text{ e } F = 10,6)$$

Equação 7

A partir dessas equações, foi possível planejar cinco novos agentes hipolipidêmicos, teoricamente mais eficazes do que aqueles determinados experimentalmente. Entre os compostos planejados, o derivado *o*-NO se mostrou o mais ativo entre os demais.

Em 2008, Silva e colaboradores (SILVA et al., 2008) estudaram a atividade anti-inflamatória (AA) de oito derivados de 4-amino-2,6-diarilpirimidina-5-carbonitrila (Figura 5), onde foram, empregados cálculos de estrutura eletrônica B3LYP/6-31G(d,p) e AM1 para o cálculo de descritores eletrônicos.



Compostos	AA (%)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1	4,9	Cl	Cl	OCH <sub>3</sub>
2	10,9	H	F	OCH <sub>3</sub>
3	17,1	H	Cl	OCH <sub>3</sub>
4	20,3	Cl	Cl	H
5	20,7	H	Cl	H
6	38,7	H	H	H
7	47,3	H	F	H
8	47,8	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Figura 5 - Atividade anti-inflamatória de oito derivados de 4-Amino-2,6-diarilpirimidina-5-carbonitrila.

Para a obtenção dos modelos matemáticos, foram empregadas técnicas de regressão nas componentes principais, cuja equação obtida é mostrada abaixo:

$$AA = 25,96(\pm 3,54) - 9,75t_2$$

$$(n = 8, R^2 = 0,68, F = 12,97, p = 0,011)$$

Equação 8

onde,  $t_2$  representa os scores da segunda componente principal, PC2. Os dados obtidos indicaram que compostos potencialmente mais ativos deveriam estar associados a baixos *scores* em PC2. A partir desses estudos duas novas moléculas foram previstas. Uma dessas moléculas, tendo o grupo metoxila substituído na posição R<sub>2</sub>, apresentou uma atividade anti-inflamatória prevista pelo método AM1 de 52,3%. Em concordância com a previsão teórica, essa molécula, quando sintetizada, apresentou uma atividade experimental de 52,8%.

Em 2012, Silva e Ramos (SILVA; RAMOS, 2012) publicaram um estudo QSAR da atividade hipolipidêmica de 16 derivados de 2-fenilindan-1,3-dionas (Figura 6), onde esses derivados foram separados em um conjunto de treinamento (13 compostos) e outro de teste (3 compostos). Nesse trabalho foi utilizado o método AM1, utilizando tanto o método da molécula isolada, assim como, o efeito solvente. Nesse último caso foi utilizado o modelo COSMO (do inglês, *Conductor-like Screening Model*), usando a água como solvente. Além do cálculo dos descritores eletrônicos, foi incluído também nas matrizes de dados, descritores de hidrofobicidade, tais como logP e  $\pi$ .

	Compostos	(%C <sub>16</sub> )	(%T <sub>16</sub> )
	H	40±2	40±4
	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	31±3	51±1
	<i>m</i> -CH <sub>3</sub>	29±3	49±4
	<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	35±3	58±2
	<i>o</i> -Cl	44±4	45±3
	<i>m</i> -Cl	40±4	30±3
	<i>p</i> -Cl	37±3	53±2
	<i>o</i> -COOH	22±2	48±4
	<i>p</i> -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	41±2	19±4
	<i>p</i> -COOH	22±2	05±2
	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	28±2	52±3
	<i>m</i> -OCH <sub>3</sub>	33±5	45±4
	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	41±3	58±4
	2,4-dicloro*	27±6	13±5
	3,4-dimetoxi*	31±3	34±8
	3,4-dicloro*	16±5	11±4

%C <sub>16</sub> – Colesterol 16 dias			
%T <sub>16</sub> – Triglicerídeos 14 dias			

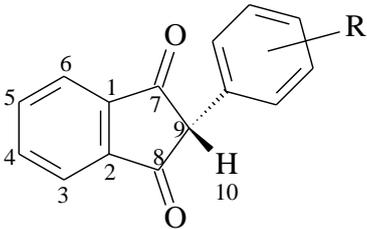
  


Figura 6 - Atividades hipolipidêmicas de dezesseis derivados de 2-fenilindan-1,3-dionas.

Após um estudo estatístico, utilizando para isso MLR e PCA, foi encontrado que a redução dos níveis de colesterol era diretamente dependente da carga atômica do hidrogênio 10, adotando a numeração da Figura 6.

$$pC_{16} = 4,71(\pm 0,67) - 20,66(\pm 4,37)qH_{10}$$

$$(n = 13, R = -0,82, F = 22,38 \text{ e } s = 0,060)$$

Equação 9

Já no caso da redução dos níveis de triglicerídeos no sangue, os resultados revelaram que essa atividade dependia do momento de dipolo, ou seja, quanto menor for esse descritor, mais ativo será o derivado no que concerne à redução dos níveis de triglicerídeos, como mostra a equação (10).

$$pT_{16} = 2,31(\pm 0,26) - 0,19(\pm 0,06)\mu$$

$$(n = 13, R = -0,66, F = 8,66 \text{ e } s = 0,23)$$

Equação 10

A partir das equações obtidas, foi possível planejar um novo derivado de 2-fenilindan-1,3-diona, teoricamente mais ativo do que àqueles estudados pelo grupo da Profa. Hall.

De acordo com o exposto acima, pode-se observar que estudos QSAR desenvolvidos nas últimas três décadas no grupo de pesquisa em que esta tese está inserida, foram bem sucedidos para interpretar resultados conhecidos e para propor derivados potencialmente mais ativos em diferentes classes de compostos. Isto, portanto, nos motivou a empregar esta estratégia em um dos grandes desafios atuais da saúde pública brasileira: a dengue (ALLWINN, 2011; BEEBE et al., 2009; KYLE; HARRIS, 2008; PINAZO DELGADO, 2008).

## 1.2 DENGUE

A dengue é caracterizada como uma doença viral, que tem como agente causador, um arbovírus, pertencente ao gênero *Flavivírus* da família *Flaviviridae*. A enfermidade é transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* (GUZMÁN; KOURI, 2002).

A dengue é uma doença característica de regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais facilitam o desenvolvimento do vetor (JANSEN; BEEBE, 2010), como mostrado na Figura 7. Estima-se que, anualmente, mais de 100 milhões de pessoas sejam infectadas pelo vírus da dengue em todo mundo, sendo 25 mil casos levando a óbito (WILDER-SMITH; SCHWARTZ, 2005).



Figura 7 - Regiões sujeitas à transmissão de dengue. (JANSEN; BEEBE, 2010) .

O ciclo epidemiológico da dengue é principalmente urbano, e a capacidade de transmissão é maior em áreas mais populosas, nos quais os humanos são os hospedeiros e o mosquito é o vetor. O processo de transmissão ocorre, quando a fêmea da espécie vetora é contaminada ao picar um indivíduo infectado na fase virêmica da doença.

O arbovírus pode causar epidemias, as quais constituem um dos maiores problemas de saúde pública no país, que tem como sintomas: febre alta, erupções ou manchas cutâneas avermelhadas, cefaléias e mialgias intensas. A dengue apresenta quatro sorotipos<sup>a</sup> diferentes (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) que podem causar desde a dengue clássica (sintomática ou assintomática), até formas mais graves e letais, como a dengue hemorrágica. A infecção por um destes sorotipos causa imunidade permanente para o mesmo sorotipo, mas somente imunidade parcial e temporária contra os outros três (DE ARAÚJO et al., 2009).

A dengue na sua forma clássica se inicia com o ciclo de replicação viral, com a disseminação do vírus no organismo do indivíduo infectado. Os primeiros sintomas como febre e dor de cabeça surgem após um período que pode variar de 2-10 dias, seguido com intensas dores musculares. Nesta forma clássica o risco de morte é baixo, mesmo sem tratamento específico, porém normalmente ocorre afastamento das pessoas das suas

<sup>a</sup>**Sorotipo** - O sorotipo se refere a grupos de micro-organismos afins (isto é, causadores de uma mesma doença), sendo que cada um deles é determinado pela presença de um antígeno diferente. Por exemplo, se mais de um micro-organismo é responsável por causar a dengue, e eles podem ser detectados e distinguidos por métodos imunológicos, eles podem ser identificados como sorotipo 1, sorotipo 2 e assim por diante.

atividades diárias (FIOCRUZ, 2012; GUZMÁN; KOURI, 2002). Já no caso da dengue hemorrágica, os sintomas são bem mais acentuados, como febre alta, ocorrência de vômitos, manifestações hemorrágicas e insuficiência respiratória. A letalidade é significativamente maior do que na forma clássica (JACOBS, 2005).

Os primeiros relatos históricos sobre a dengue no mundo mencionam a ilha de Java, em meados de 1779 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Nas Américas, a doença é relatada há mais de 200 anos, com epidemias nas regiões do Caribe e nos Estados Unidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A primeira epidemia com confirmação laboratorial no Brasil ocorreu em Boa Vista, Roraima, no ano de 1982, tendo sido isolados, os sorotipos DEN-1 e DEN-4 (OSANAI et al., 1983). Em 1986 ocorreu outro surto de epidemia no estado do Rio de Janeiro, com a identificação do sorotipo DEN-1, onde a doença tomou grande destaque na mídia da época (NOGUEIRA et al., 1988). No ano seguinte, Minas Gerais, São Paulo, Pernambuco, Bahia, Alagoas e Ceará também foram afetadas por epidemias associadas ao sorotipo DEN-1. No ano de 1990, surgiram os primeiros registros de dengue hemorrágica no estado do Rio de Janeiro, tendo sido detectada a presença do sorotipo DEN-2 (NOGUEIRA et al., 1990).

Atualmente, a dengue está presente nos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal, sendo as regiões Nordeste e Sudeste responsáveis por 86% dos casos (CÂMARA et al., 2007). Nos últimos 20 anos, quatro grandes epidemias de dengue foram registradas no Brasil: em 1998, com a predominância do sorotipo DEN-1; em 2002, com a predominância do sorotipo DEN-3; em 2008, com a predominância do sorotipo DEN-2 e, por fim, em 2010, com a predominância do sorotipo DEN-1 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), chegando a quase 1 milhão de casos registrados (PORTAL BRASIL, 2010).

No estado de Pernambuco, os primeiros casos de dengue, associados ao sorotipo DEN-1, foram confirmados em 1987, em 32 dos 184 municípios que compõe o estado, entre eles Recife e Jaboatão dos Guararapes. De janeiro a março de 2011 as 10 cidades de Pernambuco com o maior número de casos registrados de dengue foram: Afogados da Ingazeira, São José do Egito, Itaquitinga, Jataúba, Condado, Carnaúba, Fernando de Noronha, Limoeiro, Sanguinho e Timbaúba (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Uma possível estratégia adotada contra essa doença é compreender o papel do vetor transmissor.

### 1.3 O VETOR DA DENGUE: *Aedes Aegypti*

O *Aedes aegypti* é um mosquito essencialmente urbano, que vive no interior e em volta dos domicílios, ou em local de grande movimentação de pessoas, onde as fêmeas da espécie têm uma maior possibilidade de alimentação e disponibilidade de mais *criadouros* (pneus, latas, recipientes de garrafas, cisternas destampadas, etc) para desovar. Quando adulto mede aproximadamente 0,5 cm de comprimento, e apresenta uma coloração preta e pequenas manchas brancas, nas pernas e no dorso (Figura 8).



Figura 8 - *Aedes aegypti*.

Os mosquitos se desenvolvem através de metamorfose completa e o ciclo de vida do *Aedes aegypti* dividi-se em quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva (estágios: L1, L2, L3 e L4), pupa e mosquito adulto (Figura 9).

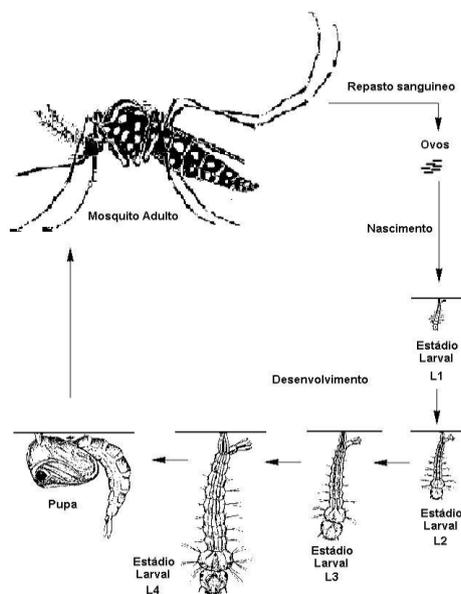


Figura 9 - Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.

Em condições adequadas de temperatura, umidade e disponibilidade de alimentos, o tempo entre o estágio de ovo até a fase adulta, varia em média de 10 a 13 dias (FORATTINI, 1965). Os ovos medem, aproximadamente 1 mm de comprimento, sendo capazes de resistir a longos períodos de dessecação, que podem prolongar-se por mais de um ano (FORATTINI, 1995). Essa resistência apresentada pelos ovos do mosquito torna-se um entrave para sua erradicação e também se torna um importante fator de adaptação ao meio. Essa condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim um dos principais fatores de disseminação do mosquito (FORATTINI, 1995).

Durante os períodos quentes e chuvosos, ocorre um aumento populacional do *Aedes aegypti*, devido à elevação da temperatura e intensificação das chuvas, fatores que propiciam à eclosão dos ovos, originando as larvas, que por sua vez se transformam em pupas e evoluem para os mosquitos adultos (NEVES FILHO et al., 2009).

As fêmeas da espécie possuem uma particularidade chamada de “discordância gonotrófica”, que as faz picar mais de uma pessoa por oviposição, ou seja, a fêmea realiza um repasto sanguíneo antes de colocar os ovos. Essas características possibilitam entender, a relação direta entre a distribuição do mosquito com o número de pessoas infectadas pelo vírus da dengue (JANSEN; BEEBE, 2010).

Diferentemente do pernilongo doméstico (*Culex quinquefasciatus*), que possui hábitos noturnos, o *Aedes aegypti* apresenta hábitos diurnos, picando suas vítimas no início da manhã e no fim da tarde. Por ser um mosquito discreto, o *Aedes aegypti* é dificilmente percebido quando está se alimentando de sangue, e também é muito arisco, fugindo a qualquer movimento brusco.

#### 1.4 FORMAS DE CONTROLE DO *Aedes aegypti*

Apesar de muitos esforços, uma vacina efetiva e simultânea contra os quatro sorotipos do vírus da dengue, ainda não foi desenvolvida (HALSTEAD; DEEN, 2002). Atualmente, essa situação se tornou ainda mais complicada, pois recentemente um quinto sorotipo foi relatado (NORMILE, 2013). Além disso, a intensa movimentação das populações e a adaptação do vetor às condições ocupacionais dos grandes centros urbanos, são apontados como fatores determinantes para a velocidade de propagação da doença. Assim, para o controle de transmissão da dengue os Programas de Controle tomam

medidas direcionadas para a eliminação ou de controle do vetor, tais como: uso de larvicidas, monitoramento entomológico, controle biológico e campanhas de informação pública (ROSE, 2001; SUAYA et al., 2007).

A estratégia mais adotada para a eliminação do mosquito é através do uso de inseticidas químicos, que geralmente pertence à classe dos organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrinas e piretróides. Alguns inseticidas utilizados no combate ao mosquito *Aedes aegypti* são mostrados na Figura 10:

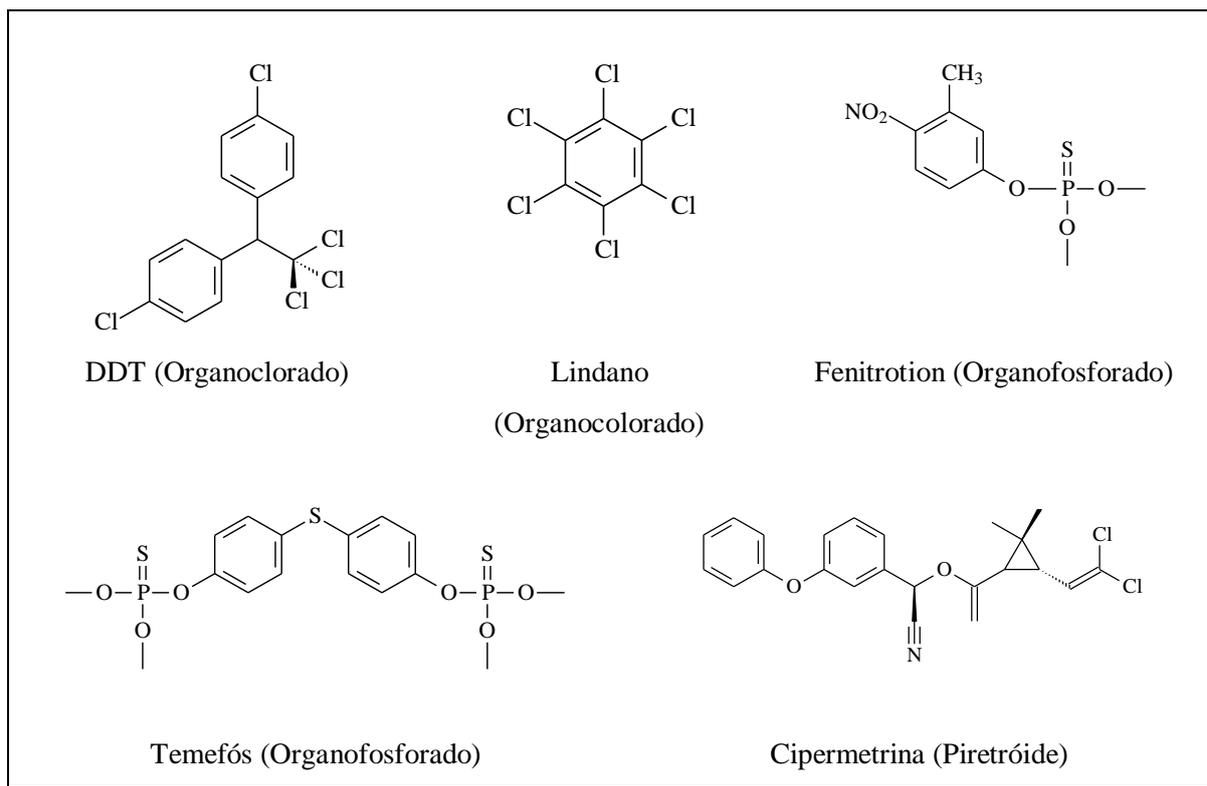


Figura 10 - Alguns inseticidas utilizados para o combate do *Aedes aegypti*.

O primeiro inseticida de efeito prolongado, que apresentava propriedades residuais, foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um composto organoclorado. Esse composto quando usado em domicílios, permanecia ativo contra os insetos por um longo período de tempo (BRAGA; VALLE, 2007). Embora o modo de ação do DDT nunca tenha sido claramente estabelecido, sabe-se que ele atua no canal de sódio, provavelmente mantendo-o aberto e destruindo o equilíbrio dos íons sódio e potássio dos axônios, impedindo, assim, a transmissão normal de impulsos nervosos nos insetos (BRAGA; VALLE, 2007).

O efeito obtido com o DDT trouxe uma grande esperança a população, e o mesmo começou a ser usado descontroladamente, e em concentrações cada vez mais altas. Em pouco tempo, porém, o DDT foi deixado de ser usado, pois foi observado que esse

composto causava efeitos indesejáveis aos ecossistemas, além de serem tóxicos para o homem.

Os inseticidas organofosforados, descobertos após os organoclorados, foram utilizados em saúde pública por apresentarem muitas vantagens em relação aos organoclorados, como, biodegradabilidade e não serem acumulativos em tecidos vivos. No entanto, essas substâncias são quimicamente instáveis, o que torna obrigatória a renovação periódica de sua aplicação. Além disso, são mais tóxicos para o homem e animais que os organoclorados, mesmo em doses relativamente baixas (BEATY; MARQUARDT, 1996). No Brasil, o organofosforado temefós, é utilizado como larvicida no controle do *Aedes aegypti* desde o ano 1967. Entretanto, em 2005, (PAVÃO; LEÃO, 2005), mostraram por cálculos de estrutura eletrônica que um desses organofosforados utilizados no combate ao mosquito *Aedes aegypti*, o temefós, possui capacidade de interagir com a guanina em níveis tão ou mais elevados do que os conhecidos carcinógenos químicos aflatoxinas e benzopirenos. Após a ocorrência das epidemias de dengue em 1986, o uso dessa classe de inseticidas foi intensificado; no entanto, no ano de 1999, o piretróide cipermetrina, substituiu os compostos organofosforados no controle da forma adulta do mosquito na maior parte do país.

Em 2004, Braga e colaboradores (BRAGA et al., 2004) por meio de bioensaios larvicidas empregando o composto temefós, em larvas de *Aedes aegypti*, coletadas em 12 municípios dos estados do Rio de Janeiro, Sergipe e Alagoas, relataram a resistência dessas larvas a esse organofosforado. No mesmo ano, Luna e colaboradores (LUNA et al., 2004), avaliando a suscetibilidade do *Aedes aegypti* ao inseticida cipermetrina, revelaram que a espécie também apresentou resistência a esse inseticida. Em 2006, foi reportado a resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em quatro municípios de grande porte do estado do Ceará (LIMA et al., 2006). Além do uso de inseticidas químicos, o controle de vetores, pode-se fazer também pelo uso de agentes biológicos. Para isso, utilizam-se organismos predadores, patógenos ou parasitas naturais, capazes de parasitar ou preda os mosquitos em uma de suas fases evolutivas. Em particular, utilizam-se algumas bactérias do gênero *Bacillus*, visto que as mesmas produzem toxinas específicas para esses vetores, que provocam a mortalidade das larvas. As duas espécies mais utilizadas para esse fim são o *Bacillus sphaericus* (Bs) e *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). O Bti é usado, principalmente, para controle da espécie do gênero *Aedes* (DE ARAÚJO et al., 2007), no entanto, os insetos podem desenvolver resistência a esse tipo de controle biológico

(JAYARAMAN et al., 2005; TABASHNIK, 2001). Vale salientar, que a produção do Bti em larga escala não é um processo simples (POOPATHI; ARCHANA, 2012).

Com o surgimento de formas resistentes do mosquito aos inseticidas mais frequentemente utilizados, vem crescendo a busca por inseticidas alternativos. Nesse contexto, tem aumentado a procura por extratos vegetais ou óleos essenciais, que sejam eficazes no combate ao mosquito adulto ou na fase larval. Esses inseticidas alternativos podem ser obtidos através de espécies vegetais, que por sua vez, são fontes alternativas e naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, já que as mesmas são produzidas pelo vegetal em resposta a ataques de patógenos. Os metabólitos produzidos pelas plantas para proteção contra microorganismos e insetos predadores, são candidatos naturais na descoberta de novos produtos no combate a insetos e vetores de doenças, como o *Aedes aegypti*. Muitos estudos vêm mostrando a atividade de produtos naturais, como inseticidas e larvicidas, para o controle de mosquitos do gênero *Aedes*. Como exemplo, podemos citar o extrato das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* que contém o piretro, que foi o primeiro produto natural utilizado como inseticida no combate a mosquitos adultos.

Em 2002, Park e colaboradores (PARK et al., 2002), relataram a atividade larvicida de compostos derivados do fruto da espécie *Piper nigrum*, conhecida popularmente no Brasil como “pimenta preta” ou “pimenta do reino”, frente a larvas do mosquito *Aedes aegypti* no estágio L3. Os compostos ativos foram identificados como isobutilamidas, onde suas estruturas com os respectivos valores de LC<sub>50</sub> são mostrados na Figura 11.

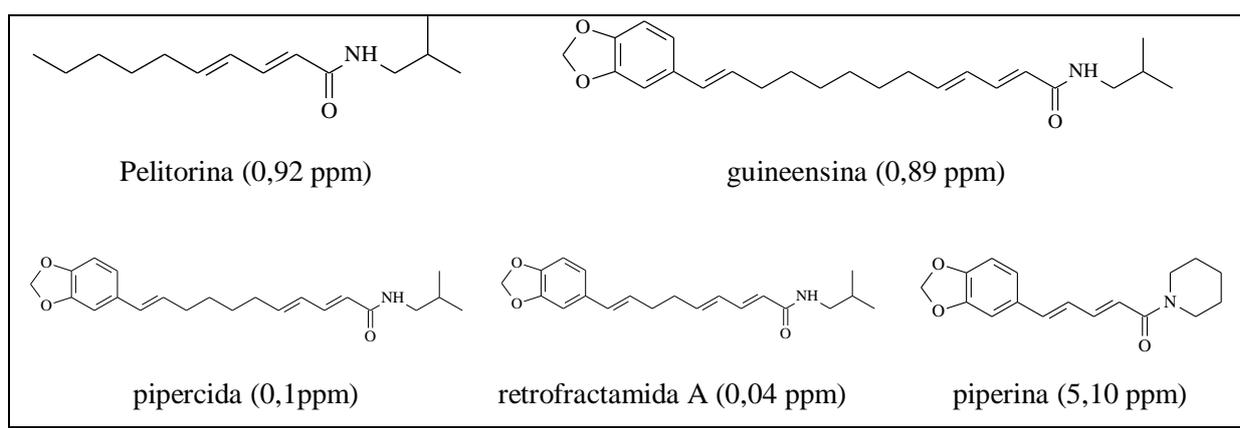


Figura 11 - Atividades larvicidas para o *A. aegypti* de estruturas isobutilamidas, isoladas do fruto da *Piper nigrum* (PARK et al., 2002).

Observando a Figura 11 podemos notar que os valores de LC<sub>50</sub> da pelitorina, guineesina, pipercida e refractamida A são bem menores quando comparados com o

inseticida comercial piperina. De acordo com as estruturas, nota-se que todas elas possuem um grupo isobutilamida numa extremidade na cadeia, com exceção da piperina que possui uma amida cíclica. Esse último grupo causa uma diminuição na atividade do composto, sugerindo que a baixa atividade desse composto pode estar relacionada a impossibilidade desta porção da molécula de formar ligação de hidrogênio com algum bioreceptor. Já os óleos essenciais obtidos da inflorescência da espécie *Piper marginatum*, conhecida como “pimenta de cheiro”, apresentou também uma alta atividade larvicida, quando testado em larvas de *Aedes aegypti* no estágio L4, cujo valor do LC<sub>50</sub> foi de 20 ppm (AUTRAN et al., 2009).

Em 2009, Cheng e colaboradores (CHENG et al., 2009) avaliaram a atividade larvicida dos óleos essenciais extraídos das folhas de duas espécies de *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla* frente à larvas no 4º estágio do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Os resultados revelaram que o óleo do *Eucalyptus camaldulensis* apresentou uma alta atividade larvicida contra as duas espécies do mosquito, com LC<sub>50</sub> de 31,0 e 55,3 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente em 24 h de exposição. Além disso, doze compostos foram isolados desses óleos e também demonstraram atividade frente às mesmas espécies do mosquito, dos quais o α-terpeno mostrou-se o mais ativo, com LC<sub>50</sub> de 14,7 e 25,2 µg mL<sup>-1</sup> em larvas do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus*, respectivamente.

Em 2013, Senthilkumar e colaboradores (SENTHILKUMAR; JAYARAMAN; VENKATESALU, 2013) avaliaram a atividade larvicida do óleo essencial extraído de folhas da espécie *Feronia limonia* contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*. O óleo essencial extraído, apresentou um LC<sub>50</sub> de 11,59 ppm em 24 horas de exposição.

Como podemos perceber as propriedades larvicidas, presentes em diversas espécies de plantas, tem despertado o interesse da comunidade científica, já que os inseticidas usados em programas de combate a insetos vetores são muitas vezes tóxicos e/ou poluentes. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de novos agentes larvicidas para o controle de insetos vetores, preferencialmente que sejam viáveis economicamente, além de seletivos e biodegradáveis, buscando dar maior garantia à população.

Além dos compostos derivados de extratos vegetais e óleos essenciais como descrito anteriormente, também vem sendo relatado na literatura um número significativo de compostos orgânicos sintéticos, que apresentam também atividade larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti*. Nesse caso, estudos de relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR) e relações estrutura-atividade (SAR), baseado em séries homólogas de compostos

foram desenvolvidos para compreender quais propriedades físico-químicas contribuem diretamente na atividade larvicida dos mesmos.

No que diz respeito a estudos de SAR, Souza e colaboradores (DE SOUSA et al., 2010) avaliaram a atividade larvicida de uma série de *para*-benzoquinonas, (Figura 12), frente a larvas do mosquito *Aedes aegypti* no estágio L3. Os resultados mostraram que a introdução de grupos alquilas (substituintes hidrofóbicos) no composto não substituído (**H**), acarretava uma diminuição nos valores de LC<sub>50</sub> desses derivados. Através desses resultados, os autores, chegaram à conclusão de que a hidrofobicidade seria um descritor importante relacionado à atividade larvicida, ou seja, quanto mais hidrofóbico fosse o composto, mais ativo era o mesmo.

	<b>R</b>	<b>LC<sub>50</sub> (ppm)</b>
	H	90
	2-metil	61
	2,5,-dimetil	57
	2-isopropil-5-metil	48
	2,6-dimetil	42
	2-isopropil	33

Figura 12 - Derivados *para*-benzoquinônicos, com seus respectivos valores de LC<sub>50</sub> para larvas do *A.aegypti* no estágio L3 (DE SOUSA et al., 2010).

Em 2011, Santos e colaboradores (SANTOS et al., 2011) estudaram uma série de monoterpenos, onde a atividade larvicida desses compostos foi avaliada frente ao estágio L3 do *Aedes aegypti*, com valores de LC<sub>50</sub> entre 27 a 554 ppm, em 24h de exposição, como mostra a Figura 13. Os autores observaram que a substituição de duplas ligações por epóxidos e a presença de grupos hidroxilas na estrutura cíclica desses compostos provocava uma diminuição na atividade larvicida

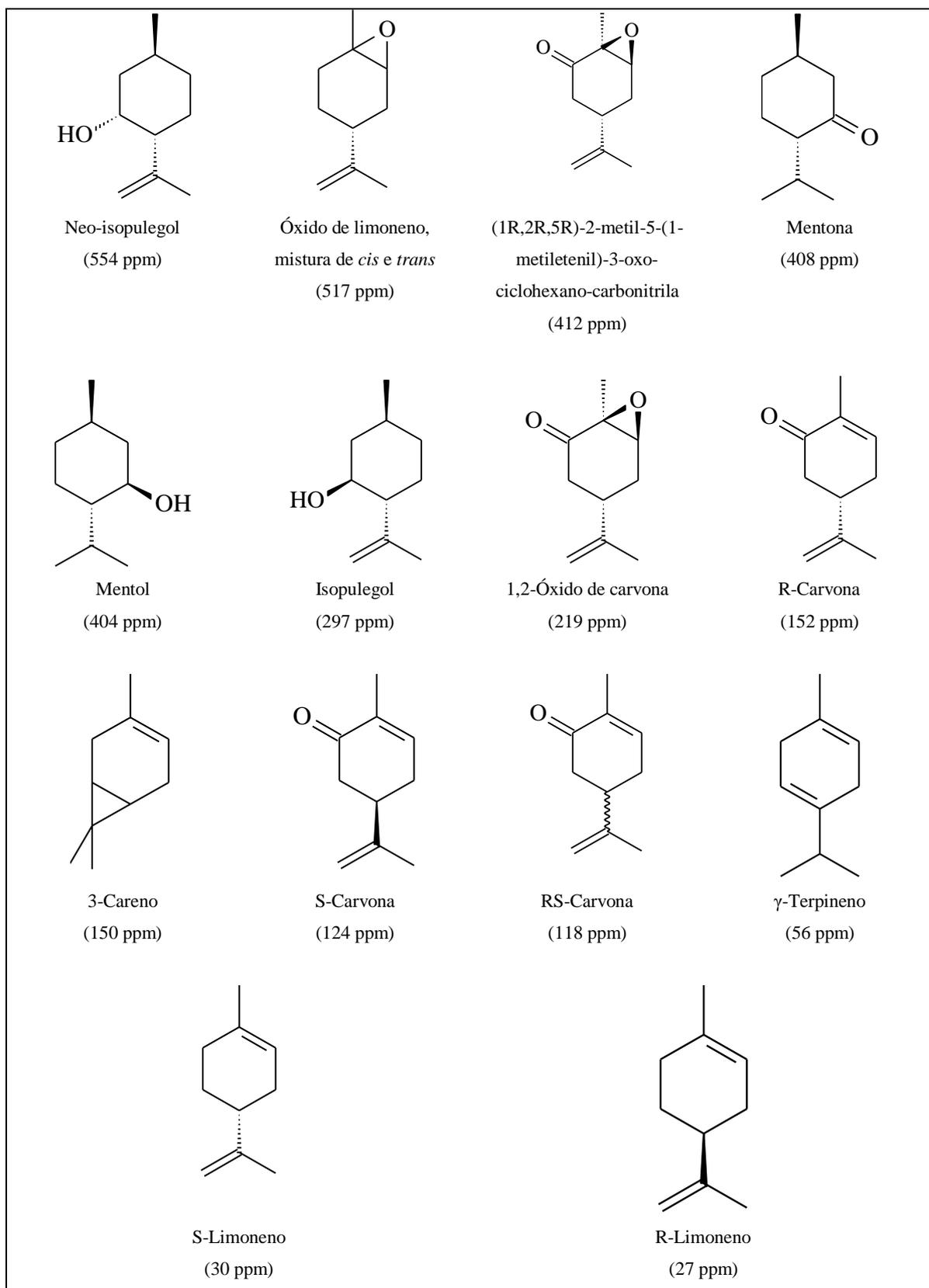


Figura 13 - Derivados de monoterpênos com suas respectivas atividades larvicidas, frente a larvas de *Aedes aegypti* no estágio L3 (SANTOS et al., 2011).

Dentre os compostos avaliados, o mais ativo foi o R-limoneno (27 ppm), enquanto o menos ativo foi o neo-isopulegol (554 ppm). Esse comportamento provavelmente deve-se ao aumento da polaridade, indicando que o aumento da lipofilicidade parece desempenhar um papel importante no aumento da atividade larvídica desses compostos.

Em 2006, Duong e colaboradores (DUONG et al., 2006) sintetizaram uma série de benzoatos *para*-substituídos de triorganoestanho (Figura 14), onde a atividade larvídica desses compostos foram avaliadas em larvas do *Aedes aegypti* no estágio L2. Os resultados mostraram que os benzoatos trifenilestanho foram mais ativos ( $LC_{50}$  variando de 0,3 a 0,89 ppm) em relação aos triclorohexilestanho ( $LC_{50}$  variando de 0,51 a 2,65 ppm), em 24h de exposição. O composto mais ativo da série foi o *p*-clorobenzoato que apresentou um valor de  $LC_{50}$  de 0,3 ppm.

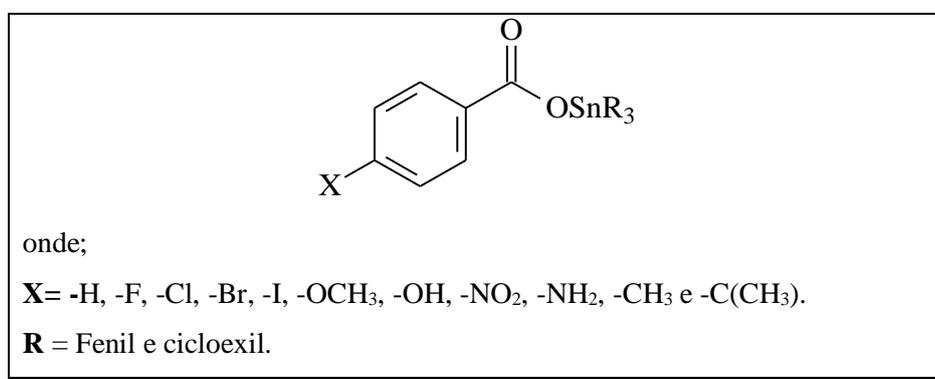


Figura 14 - Estrutura geral da série triorganoestanho benzoatos *para* substituídos presentes na (DUONG et al., 2006).

Song e colaboradores (SONG et al., 2007), em 2007, sintetizaram uma série de 2,2,3,3-tetrametilpropanocarboxilatos (Figura 15), onde R= metil, etil, n-propil, n-butil, fenil e cicloexil para avaliar a atividade larvídica desses compostos frente ao estágio L2 do *Aedes aegypti*. Os valores de  $LC_{50}$  obtidos foram 0,9; 1,23; 0,27; 0,2; 0,14; 0,15; 0,48 ppm, respectivamente, em 24h de exposição.

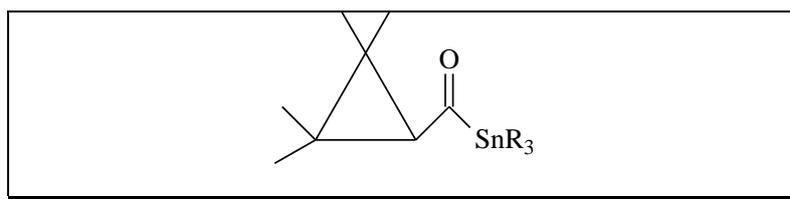


Figura 15 - Estrutura geral da série 2,2,3,3-tetrametilpropanocarboxilatos presentes na (SONG et al., 2007).

Em 2009, Hansch e Verma (HANSCH; VERMA, 2009), revisando os trabalhos de Duong e colaboradores (DUONG et al., 2006) e Song e colaboradores (SONG et al., 2007), realizaram estudos QSAR com as séries de triorganoestanho benzoatos *para*-substituídos e 2,2,3,3-tetrametilpropanocarboxilatos, onde foi possível avaliar a atividade larvicida desses compostos em função de descritores físico-químicos utilizados.

$$\text{Log}\left(\frac{1}{IC_{50}}\right) = -0,21(\pm 0,10)\pi_x + 0,32(\pm 0,16)MR_x + 5,73(\pm 0,12)$$

$$(n = 10, R^2 = 0,789, F = 13,088 \text{ e } s = 0,078)$$

Equação 11

$$\text{Log}\left(\frac{1}{IC_{50}}\right) = 0,54(\pm 0,36)\pi_x + 5,19(\pm 0,66)$$

$$(n = 6, R^2 = 0,811, F = 17,164 \text{ e } s = 0,237)$$

Equação 12

$$\text{Log}\left(\frac{1}{IC_{50}}\right) = 0,22(\pm 0,08)\pi_x + 0,13(\pm 0,08)E_{s-x} + 5,74(\pm 0,11)$$

$$(n = 10, R^2 = 0,849, F = 19,679 \text{ e } s = 0,080)$$

Equação 13

A partir dessas equações 11, 12 (série do triorganoestanho benzoatos *para*-substituídos) e 13 (série do 2,2,3,3-tetrametilpropanocarboxilatos) é possível notar que para essas séries estudadas, a atividade larvicida está diretamente relacionada ao descritor lipofílico de Hansch ( $\pi$ ), a refratividade molar (MR) e ao parâmetro estérico de Taft ( $E_s$ ), reafirmando mais uma vez que a hidrofobicidade é um fator importante na descrição da atividade larvicida.

## 1.5 OS SISTEMAS ESTUDADOS

### 1.5.1 Uma breve introdução à história dos larvicidas sintéticos na UFPE

A síntese de compostos larvicidas na UFPE teve início em 2006, quando Bluntritt (BLUMTRITT, 2006) na tentativa de sintetizar compostos amídicos que apresentassem atividades larvicidas, observou que seus precursores ácidos carboxílicos eram mais ativos que as respectivas amidas.

Entre os anos de 2006 e 2007, um conjunto de ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl) propiônicos foram sintetizados por Neves Filho e colaboradores e tiveram suas atividades larvicidas frente as larvas do *A. aegypti* em L4 avaliadas pelo Grupo de Ecologia Química do DQF/UFPE.

Ainda em 2007, Tébéka (TÉBÉKA, 2007) realizou um estudo QSAR em 8 dos 9 derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propiônicos, utilizando para isso descritores clássicos. A partir de uma Regressão Linear Múltipla dos dados, foi encontrado que a atividade larvicida era diretamente dependente do descritor  $\sigma$  de Hammett, e do quadrado do coeficiente de partição octanol/água ( $\log P$ ) como mostra a Equação abaixo:

$$\text{Log}(LC_{50}) = 2,42 - 0,1(\log P)^2 - 0,53\sigma$$

Equação 14

A partir desses estudos um novo derivado potencialmente mais ativo que os demais foi previsto em 6,8 ppm e seu valor experimental de 2,5 ppm foi posteriormente verificado pelo colaborador do grupo, o Prof. Luis Kanis, da Unisul (SC).

Em 2009, Neves Filho e colaboradores (NEVES FILHO et al., 2009) publicaram a metodologia de síntese da série ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propiônicos sob condições de irradiação focal de microondas. Além da síntese, foram publicadas as atividades larvicidas desses compostos frente à larvas do mosquito *Aedes aegypti* no estágio L4.

Em 2010, Espíndola e colaboradores (ESPÍNDOLA, 2010) sintetizaram uma série de derivados aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos, onde suas atividades larvicidas foram avaliadas frente ao estágio L4 do *Aedes aegypti* pelo Grupo de Ecologia Química do DQF/UFPE. Apesar de muitos derivados de tiossemicarbazonas relatados na literatura apresentarem atividade inseticida, esse estudo foi pioneiro na aplicação desses compostos contra a forma larval do mosquito *Aedes aegypti*.

Em 2011 Alves e colaboradores (ALVES, 2011), sintetizaram uma série de derivados 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoato de metila. As atividades larvicidas desses compostos foram avaliadas frente ao estágio larval L4 do *Aedes aegypti*, também pelo Grupo de Ecologia Química do DQF/UFPE.

Devido a existência de resultados experimentais para três classes de compostos:

- (i) Dezessete derivados aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos (ESPÍNDOLA, 2010).

(ii) Nove derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos (NEVES FILHO et al., 2009).

(iii) Quatorze derivados 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila (ALVES, 2011),

cujas características estruturais apontavam ser potentes agentes larvicidas, decidiu-se nesse presente trabalho de tese realizar estudos QSAR e de *docking* molecular das mesmas.

### 1.5.2 Derivados de Tiossemicarbazonas

Tiossemicarbazonas e semicarbazonas são compostos que apresentam uma ampla atividade biológica e são considerados uma importante classe de compostos, cujas propriedades tem sido extensivamente estudada na química medicinal (BERALDO, 2004). Esses compostos vêm despertando o interesse de vários grupos de pesquisas, devido as suas diferentes bioatividades, tais como: atividade antiviral (TEITZ et al., 1994), antitumoral (FEUN et al., 2002), antibacteriana (KOVALA-DEMERTZI et al., 2003), dentre outras. A Figura 16 mostra alguns derivados de tiossemicarbazonas e suas atividades biológicas.

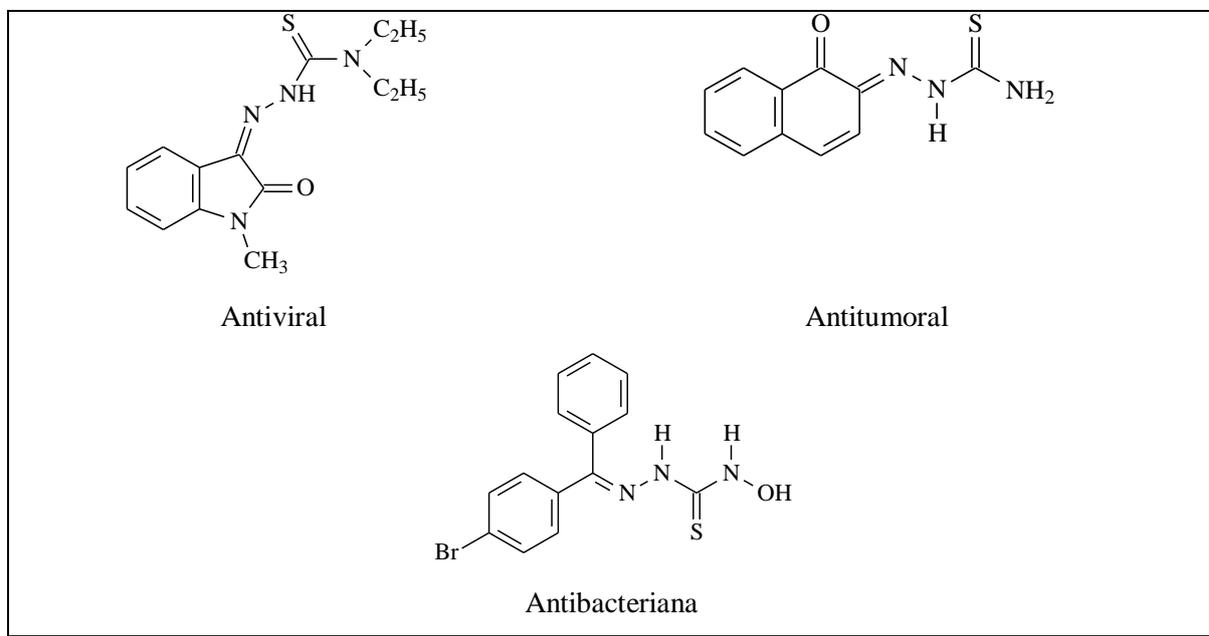


Figura 16 - Alguns derivados tiossemicarbazônicos e suas atividades biológicas.

Estruturalmente, a diferença entre os compostos semicarbazônicos e tiossemicarbazônicos deve-se a presença de um grupo carbonila (C=O) em lugar de um

grupo tiocarbonila (C=S), onde sua estrutura química e numeração segundo a IUPAC (PANICO, 1998) pode ser vista na Figura 17a:

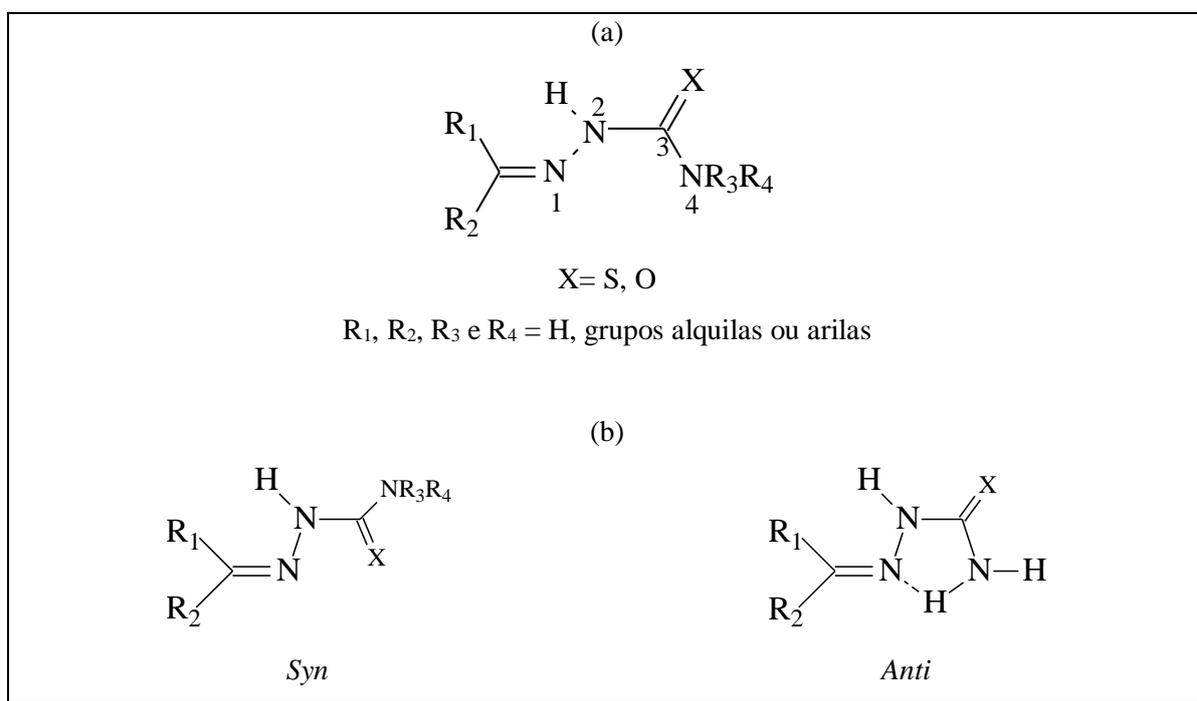


Figura 17 - (a) Estrutura geral das tiosemicarbazonas e semicarbazonas, (b) Arranjo conformacional das tiosemicarbazonas (na estrutura *syn* os substituintes em R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> são diferentes de hidrogênio).

Do ponto de vista molecular e eletrônico, as tiosemicarbazonas não substituídas na posição 4, apresentam uma estrutura quase planar, com o átomo de enxofre em posição *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina. No entanto, esse arranjo é favorecido devido a contribuições de fatores eletrônicos e estéricos, onde o fator mais importante, para essa estrutura planar deve-se a presença do átomo de enxofre em posição *anti*, possibilitando assim a formação de ligação de hidrogênio intramolecular entre o átomo de nitrogênio da função imina e os hidrogênios da tioamida. No entanto, essa estrutura altera-se consideravelmente com a adição de grupos substituintes na posição 4, favorecendo a conformação *syn* entre o nitrogênio da imina e o átomo de enxofre (Figura 17b).

As tiosemicarbazonas são estruturas que apresentam uma alta deslocalização eletrônica, principalmente quando grupos aromáticos estão ligados ao carbono da função imina, podendo assim coexistir em equilíbrio tautomérico nas formas tiona e tiol (Figura 18).

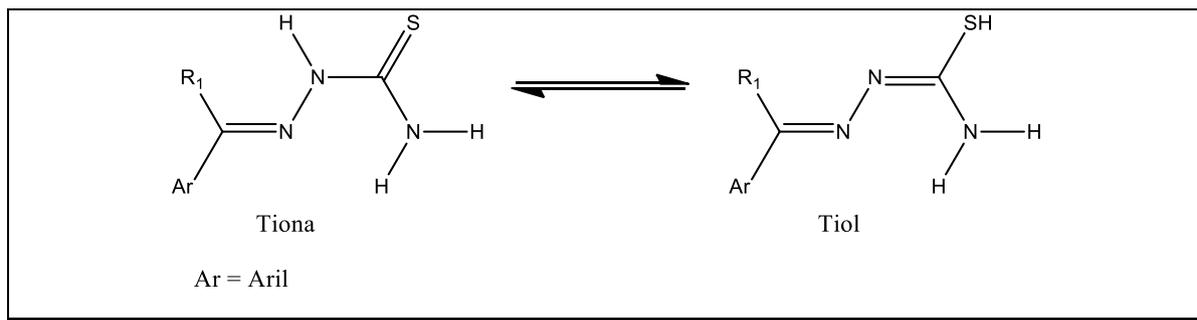


Figura 18 - Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas.

O primeiro sistema estudado nesse trabalho, compreende uma série de dezessete derivados de aril- e fenoximetil-tiossemicarbazonas (DA SILVA et al., 2015a). Esses compostos, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dezessete derivados de aril- e fenoximetil- tiossemicarbazonas.

 (1s-10t)				 (11t-17t)	
Numeração <sup>a</sup>	R <sub>1</sub>	n	X	Numeração <sup>a</sup>	R <sub>2</sub>
<b>1s</b>	<i>p</i> -F	0	O	<b>11t</b>	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>
<b>2s</b>	3,4-diCl	0	O	<b>12t</b>	H
<b>3t</b>	3-NO <sub>2</sub> , 4-Br	0	S	<b>13t</b>	<i>m</i> -Cl
<b>4t</b>	<i>p</i> -OH	0	S	<b>14t</b>	<i>p</i> -Br
<b>5t</b>	<i>m</i> -CHNNHCSNH <sub>2</sub>	0	S	<b>15t</b>	<i>p</i> -Cl
<b>6t</b>	<i>p</i> -F	0	S	<b>16t</b>	2,3-diCl
<b>7t</b>	<i>p</i> -Cl	0	S	<b>17t</b>	3,4-diCl
<b>8t</b>	H	1	S		
<b>9t</b>	<i>p</i> -Br	0	S		
<b>10t</b>	3,4-diCl	0	S		

Adaptada da (DA SILVA et al., 2015a).

<sup>a</sup> As letras “s” e “t” após os números refere-se aos derivados semicabazônicos e tiossemicarbazônicos respectivamente.

### 1.5.3 Derivados 1,2,4-Oxadiazólicos

Compostos heterocíclicos de 5 membros, vem sendo extensivamente estudados, devido as suas propriedades farmacológicas (ELOY, 1965). Uma dessas classes são os compostos heterocíclicos aromáticos 1,2,4-oxadiazólicos, que na sua estrutura cíclica de 5 membros, possuem dois átomos de nitrogênio e um de oxigênio, além de duas ligações duplas, sendo considerado um sistema conjugado. Além do 1,2,4-oxadiazol, existem outros três isômeros relacionados (como mostra a Figura 19), onde os anéis 1,2,4-oxadiazol e 1,3,4-oxadiazol, têm sido os mais estudados, uma vez que têm apresentados melhores resultados farmacológicos (FILHO, 2002).

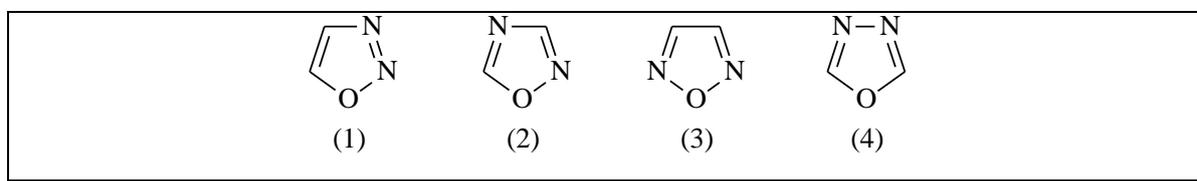


Figura 19 - Estruturas dos isômeros oxadiazólicos: (1) 1,2,3-Oxadiazol; (2) 1,2,4-Oxadiazol; (3) 1,2,5-Oxadiazol; (4) 1,3,4-Oxadiazol.

Várias moléculas bioativas, que apresentam o anel 1,2,4-oxadiazol, têm demonstrado uma grande variedade de atividades biológicas, tais como: analgésica (ANTUNES; SRIVASTAVA, 1996), anti-inflamatória (BEZERRA et al., 2005), anti-tumoral (YU et al., 2005), anti-microbiana (TYRKOV; SUKHENKO, 2004), dentre outras. Algumas substâncias bioativas contendo o anel 1,2,4-oxadiazol são mostradas na Figura 20:

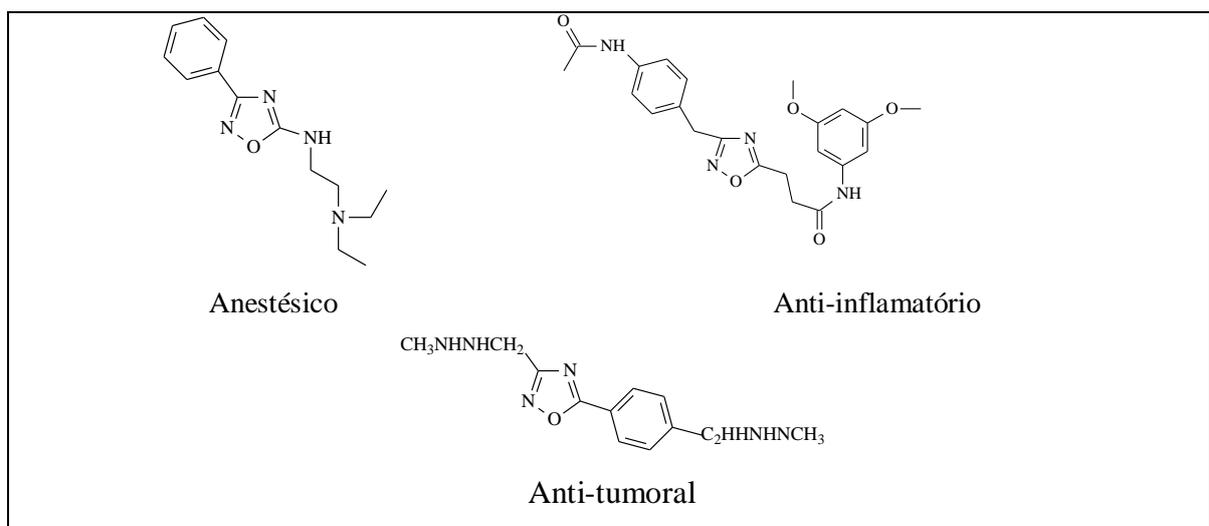
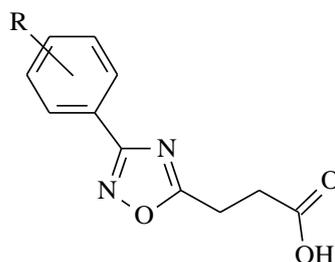


Figura 20 - Alguns 1,2,4-oxadiazóis e suas atividades biológicas.

### 1.5.3.1 Derivados Ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionicos

O segundo sistema estudado, compreende uma série de 9 derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionicos (Tabela 2), onde esses compostos foram sintetizados por Neves Filho e colaboradores sob irradiação focal de micro-ondas (NEVES FILHO et al., 2009).

Tabela 2 - Nove derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionicos.



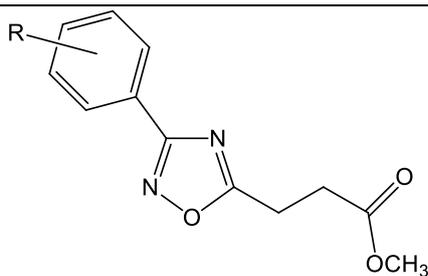
Numeração <sup>a</sup>	Substituintes (R)
<b>1a</b>	H
<b>2a</b>	<i>p</i> - F
<b>3a</b>	<i>p</i> - OCH <sub>3</sub>
<b>4a</b>	<i>o</i> - CH <sub>3</sub>
<b>5a</b>	<i>m</i> - CH <sub>3</sub>
<b>6a</b>	<i>p</i> - CH <sub>3</sub>
<b>7a</b>	<i>p</i> - NO <sub>2</sub>
<b>8a</b>	<i>p</i> - Cl
<b>9a</b>	<i>p</i> - Br

<sup>a</sup> A letra “a” após os números refere-se aos derivados ácidos 1,2,4-oxadiazólicos.

### 1.5.3.2 Derivados 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoato de metila

O terceiro sistema estudado, compreende uma série de quatorze derivados 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoato de metila (Tabela 3), sintetizados por Alves e colaboradores (ALVES, 2011).

Tabela 3 - Quatorze derivados de 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoato de metila.



Numeração <sup>a</sup>	Substituintes (R)
1e	<i>o</i> - OCH <sub>3</sub>
2e	<i>m</i> - OCH <sub>3</sub>
3e	H
4e	<i>p</i> - F
5e	<i>p</i> - NO <sub>2</sub>
6e	<i>p</i> - OCH <sub>3</sub>
7e	<i>p</i> - CH <sub>3</sub>
8e	<i>m</i> - Cl
9e	<i>m</i> - CH <sub>3</sub>
10e	<i>p</i> - Cl
11e	3,5 - DiCl <sub>2</sub>
12e	<i>p</i> - Br
13e	<i>p</i> - I
14e	3,4 - DiCl <sub>2</sub>

<sup>a</sup> A letra “e” após os números refere-se aos derivados ésteres 1,2,4-oxadiazólicos.

## 1.6 ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR DOS DERIVADOS ÁCIDOS E ÉSTERES 1,2,4-OXADIAZÓLICOS E TIOSSEMICARBAZÔNICOS

Como uma tentativa de compreender como os nossos compostos em estudo atuam na mortalidade das larvas do *Aedes aegypti*, foi realizado um estudo de *docking* molecular nessas três séries de compostos, com a proteína AeSCP-2 (*Aedes aegypti* Sterol Carrier Protein-2) (KREBS; LAN, 2003). Essa proteína é responsável pelo transporte intracelular do colesterol em insetos, pois os mesmos dependem de fontes exógenas de colesterol para atuar na biossíntese de esteróides. Os lipídeos, assim como o colesterol, desempenham diversas funções nos insetos, por exemplo, atuam como importantes reservas energéticas

fundamentais em algumas situações de grande demanda metabólica, tais como o vôo e a produção de ovos, além de constituírem estruturas celulares (ATTELA; MAJEROWICZ; GONDIM, 2012). A proteína *AeSCP-2* apresenta níveis elevados de expressão no intestino médio desses vetores durante seu estágio larval, tendo uma forte afinidade com a molécula de colesterol. Portanto, compostos que inibem o modo de ação dessa proteína, podem se tornar potentes candidatos a atuarem no controle desse vetor.

Em 2003, Dyer e colaboradores (DYER et al., 2003) publicaram a estrutura de raios-X de alta resolução (1,35 Å) da proteína *AeSCP-2* co-cristalizada com o ácido palmítico ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ ), como pode ser visto na Figura 21.

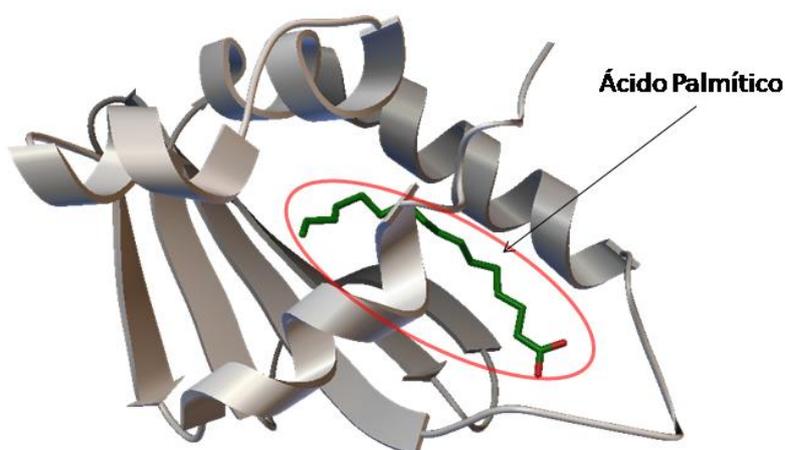


Figura 21 - Proteína *AeSCP-2* co-cristalizada com ácido palmítico (adaptado de (DYER et al., 2003)). (verde). Código PDB (1PZ4).

Nesse trabalho os autores relataram que a cabeça polar do ácido palmítico, realiza ligações de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo de aminoácido ARG24 e também com os resíduos de GLN25 e VAL26, enquanto a cauda metilênica do ácido palmítico interage hidrofobicamente com os resíduos de LEU45, MET46, LEU102, ILE99, LEU64, MET90, MET66, ILE74, PHE32, MET71, ILE12, ILE106, PHE105, SER108 e LEU16. A Figura 22 mostra as principais interações (polares e hidrofóbicas) entre o ácido palmítico e os resíduos de aminoácido presentes no sítio ativo da proteína *AeSCP-2*.

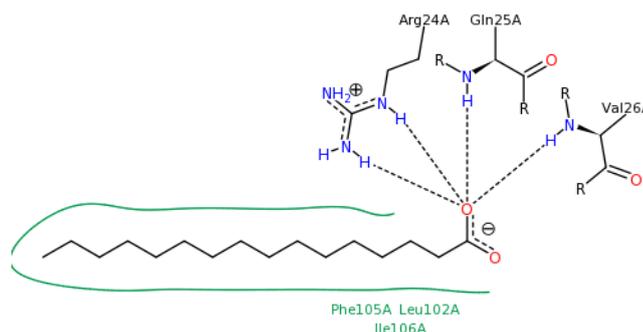


Figura 22 - Principais interações entre o ácido palmítico com a proteína *AeSCP-2*. Figura extraída do PDB (*Proten Data Bank*). As linhas pontilhadas representam as ligações de hidrogênio, enquanto a linha verde as interações hidrofóbicas. Código PDB (1PZ4).

Em 2005, Lan e colaboradores (KIM; WESSELY; LAN, 2005) relataram a descoberta de inibidores químicos (inibidores de SCPIs) da proteína *AeSCP-2*, onde esses compostos possuem um caráter hidrofóbico e atuam na redução da absorção do colesterol *in vivo*. Esses inibidores quando testados apresentaram valores de  $IC_{50}$  entre  $0,042 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,35 \mu\text{mol L}^{-1}$ , enquanto o valor do  $IC_{50}$  para o colesterol foi de  $0,113 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 23). Esses resultados mostraram que esses inibidores competiram com a molécula de colesterol, e possuíram uma alta afinidade de ligação com a proteína *AeSCP-2*, além de se mostrarem potentes agentes larvicidas.

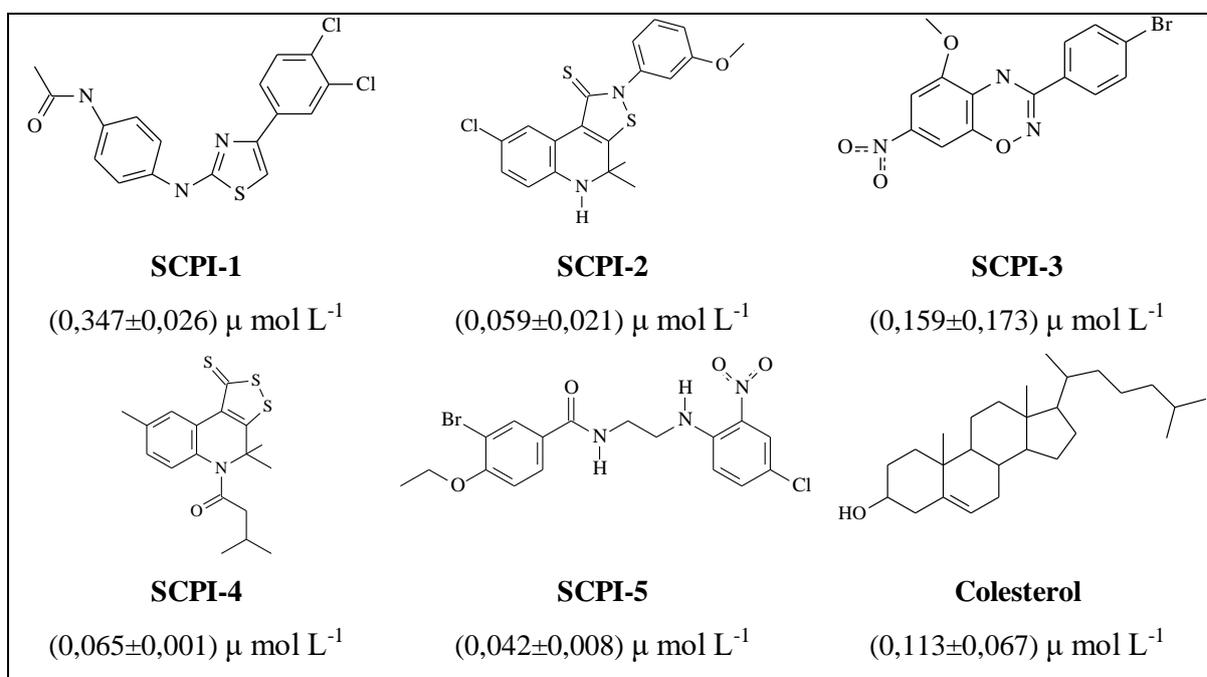


Figura 23 - Valores de  $IC_{50}$  para inibidores da proteína *AeSCP-2* (SCPIs). Adaptado de (KIM; WESSELY; LAN, 2005).

## 2 TESE

- Levando em consideração a observação prévia que a não formação de ligação de hidrogênio diminui a atividade das isobutilamidas da espécie *Piper nigrum* (PARK et al., 2002);
- Dos primeiros resultados usando a MLR (série de ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propiónicos) obtidos por Tebeka (TÉBÉKA, 2007), apontarem a necessidade de aumentar o caráter hidrofóbico para a obtenção de um novo composto mais potente;
- E pelo fato das três séries apresentarem elementos estruturais equivalentes ao ácido palmítico, ou seja, uma cabeça polar e uma porção de natureza hidrofóbica;

isto nos levou a:

**Proposição da Tese:** O *AeSCP-2* é um dos receptores biológicos responsáveis pela ação larvicida para as três classes de compostos, derivados (tio)semicarbazônicos, derivados ácidos 1,2,4-oxadiazólicos e derivados ésteres-1,2,4-oxadiazólicos.

**Hipóteses:** Modelos de QSAR baseados na estrutura destes compostos deverão ser similares. Portanto, para as três classes de compostos investigados deverão surgir modelos similares de interação com o receptor *AeSCP-2*.

**Testes:** Desenvolvimento de modelos de regressão estatística entre o  $LC_{50}$  a partir de um conjunto de descritores da atividade larvicida, obtidos a partir de cálculos de estrutura eletrônica para as três classes de compostos. Cálculos de *docking* molecular das três classes de compostos, usando como molde de complexação o sítio de interação do ácido palmítico no *AeSCP-2*.

**Ferramentas e Materiais:** Programas computacionais de cálculos de parâmetros geométricos, eletrônicos, estéricos, de lipofilicidade para os compostos das três classes. Programa de análise de regressão linear múltipla para desenvolvimento dos modelos de QSAR. Programa de cálculo de formas de interação entre os ligantes e o bioreceptor *AeSCP-2*. Estes cálculos foram realizados nos computadores do Laboratório de Química Computacional do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 TÉCNICAS COMPUTACIONAIS

Em estudos QSAR, cálculos de química quântica representam uma ferramenta importante para a obtenção de descritores eletrônicos que podem estar associados com a função resposta de um sistema. Métodos quânticos de elucidção de geometria molecular são amplamente utilizados, por serem capazes de prever o comportamento de propriedades eletrônicas, energética e a natureza das ligações químicas (CARVALHO, 2004).

O cálculo de propriedades eletrônicas de um sistema são, em geral, baseados na resolução da equação de Schrödinger independente do tempo, mostrada na equação 15.

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad \text{Equação 15}$$

Onde,  $H$  é o operador Hamiltoniano,  $\Psi$  é a função de onda do sistema, que depende das coordenadas espaciais e de spin de todas as partículas (elétrons e núcleos) e  $E$  corresponde à energia do sistema. Esta é uma equação de autovalores e autovetores, e sua resolução exata está restrita a sistemas monoelétrônicos. O operador Hamiltoniano é composto pelos operadores de energia cinética eletrônico, de energia cinética nuclear e de energia potencial que descrevem as atrações eletrostáticas elétron-núcleo e as repulsões eletrostáticas núcleo-núcleo e elétron-elétron, sendo, portanto, necessário realizar algumas aproximações para a resolução referente a sistemas multieletrônicos.

Uma das aproximações mais utilizadas é a aproximação de Born-oppenheimer (BOA, do inglês: *Born-Oppenheimer Approximation*) (ATKINS; FRIEDMAN, 2011), que consiste em separar os movimentos eletrônico e nuclear do sistema, baseado na ideia de que o movimento dessas partículas é pouco acoplado. Com a aproximação, o problema de determinação da energia molecular fica dividido em dois: um problema eletrônico e outro nuclear.

O problema eletrônico é resolvido para uma configuração fixa dos núcleos, dando origem a superfície de energia potencial que em seguida pode ser utilizada para resolver as equações de movimentos nucleares. A energia total da molécula, para uma dada configuração nuclear, é obtida como a soma da energia da parte eletrônica e da repulsão

nuclear já que a contribuição proveniente da energia cinética nuclear é considerada nula, pois está incluída de maneira paramétrica no movimento eletrônico.

### 3.2 O MÉTODO DE HARTREE-FOCK

A metodologia mais utilizada para resolução da equação de Schrödinger para sistemas multieletrônicos é o método de Hartree-Fock. Esse método consiste na aproximação da função de onda de  $n$  elétrons como um produto de  $n$  funções de onda com um elétron (produto de Hartree), ou seja, cada elétron pode interagir com uma distribuição de carga gerada pelos demais elétrons. Esse método denominado modelo das partículas independentes consegue transformar a equação de Schrödinger dependente de  $n$  elétrons em  $n$  equações de um elétron.

Nesse sentido Hartree propôs que um procedimento variacional fornece os melhores valores para essas funções de um elétron. Logo em seguida, Fock generalizou as equações de Hartree para um produto de funções de spin orbitais de um elétron antissimetrizadas (determinante de Slater). Esse é o método denominado de método Hartree-Fock (HF) (FOCK, 1930). Entretanto, a função de onda HF não é uma representação completa da estrutura eletrônica de uma molécula, devido ao fato da interação, ou correlação efetiva, entre elétrons não acontecer por meio de um potencial médio. Este fato impõe um limite máximo de aprimoramento no valor da energia, mesmo que se utilize a melhor função de onda HF. A diferença entre a energia exata e a energia HF é conhecida como a energia de correlação.

$$E_{corr} = E_{exata} - E_{HF} \quad \text{Equação 16}$$

Apesar de pequena, a inclusão da mesma é de fundamental importância para descrever adequadamente diversas propriedades moleculares.

Métodos pós-HF incluem a correlação eletrônica, onde em sua maioria são baseados na teoria da perturbação de muitos corpos (MBPT, do inglês, *Many Body Perturbation Theory*), nos quais encontram-se os métodos de Møller-Plesset (MP $n$ , onde  $n$  é a ordem da correção), de *Coupled-Cluster* (CC) e de integração de configurações (CI, do inglês, *Configuration Interaction*).

Além disso, também é possível utilizar métodos baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT, do inglês *Density Functional Theory*), os quais vêm sendo largamente utilizados devido aos seus relativos baixos custos computacionais, quando comparados com os métodos pós-HF.

### 3.3 TEORIA DO FUNCIONAL DENSIDADE

A teoria do funcional densidade, foi formalizada através dos teoremas de Hohenberg e Kohn. O formalismo DFT utiliza a densidade eletrônica,  $\rho(\vec{r})$ , como variável principal, tornando a energia dependente desta, ou seja, um funcional de densidade.

O primeiro teorema de Hohenberg-Kohn estabelece que o potencial externo (termo no hamiltoniano referente a atração elétron-núcleo) é um funcional único de  $\rho(\vec{r})$ , além de uma constante aditiva. O segundo teorema estabelece que, havendo qualquer aproximação da densidade eletrônica, a energia total será sempre maior ou igual a energia obtida com a densidade eletrônica do sistema. Ou seja, esse teorema permite utilizar o princípio variacional, além disto, permite definir um funcional universal que define um potencial externo e uma função de onda (tentativa) para o sistema

Em 1965, Kohn e Sham (KOHN; SHAM, 1965) introduziram a ideia de usar um sistema de referência de partículas independentes. Com isto a energia de troca e correlação,  $E_{XC}[\rho]$ , passou a incluir não somente o termo de interação elétron-elétron não clássica, mas também a parte residual da energia cinética, resultante da consideração do sistema de partículas não interagentes.

A descrição do termo  $E_{XC}[\rho]$  dá origem aos vários funcionais existentes que são divididos em puros e híbridos. Os orbitais puros se baseiam apenas em termos da DFT e podem ser divididos de acordo com a aproximação utilizada, isto é, *local* ou *gradiente generalizado*. A aproximação da densidade local (LDA) separa o termo  $E_{XC}[\rho]$  em um termo de troca e um de correlação. A aproximação do gradiente generalizado (GGA) surge naturalmente como forma de melhorar a aproximação LDA através de termos resultantes do gradiente como uma expansão de Taylor e corrigindo o comportamento assintótico do funcional (MORGON; COUTINHO, 2007). Os funcionais híbridos incluem uma porcentagem de energia de troca obtida com o método de Hartree-Fock (HF), ou seja,

existe uma maleabilidade na parametrização do termo de troca e correlação, o que permite a melhoria do funcional para o cálculo de determinadas propriedades.

Dentre os métodos híbridos, o B3LYP foi o funcional utilizado no presente trabalho, no qual o termo de troca e correlação é mostrado na equação 17:

$$E_{XC}^{B3LYP} = E_{XC}^{LSDA} + a_0(E_{XC}^{HF} - E_{XC}^{LSDA}) + a_x E_X^{B88} + a_c E_c^{LYP} + (1 - a_c) E_c^{VWN} \quad \text{Equação 17}$$

Onde,  $E_X^{LSDA}$  é o funcional de troca e correlação da densidade local com spin (KOHN; SHAM, 1965),  $E_{XC}^{HF}$  é o funcional de troca exato,  $E_X^{B88}$  é o funcional de troca GGA de Becke (BECKE, 1988),  $E_c^{LYP}$  é o funcional de correlação não-local de Lee e colaboradores (LEE; YANG; PARR, 1988) e  $E_c^{VWN}$  representa o funcional parametrizado por Vosko e colaboradores (VOSKO; WILK; NUSAIR, 1980). Os termos  $a_0$ ,  $a_x$  e  $a_c$  são parâmetros de ajuste para as energias de atomização molecular, de valores iguais a 0,20; 0,72 e 0,81 respectivamente

Para a realização desse trabalho, o funcional híbrido B3LYP foi utilizado com o conjunto de funções de base 6-311++G(d,p) para os derivados aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos. No entanto, para os derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos e ésteres 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila foi utilizado a função de base 6-311G(d,p).

### 3.4 CARGAS ATÔMICAS

As cargas atômicas são utilizadas em diversos estudos, desde análises conformacionais até a previsão e racionalização da reatividade química, passando por estudos de efeito dos substituintes (WIBERG; BRENEMAN, 1990) e estudos de correlações entre a estrutura química e a atividade biológica (DIXON; JURIS, 1992; KIREEV; FETISOV; ZEFIROV, 1994), sendo um parâmetro de grande importância nesse último, pois mostra a influência que o substituinte produz na estrutura da molécula. No entanto, ao contrário de várias propriedades eletrônicas, as cargas atômicas não são observáveis, ou seja, não são valores esperados de uma função de onda, e podem ser calculadas de várias formas diferentes (GUADAGNINI; BRUNS; DE SOUZA, 1996). Devido a esta variedade de métodos a comparação dos valores absolutos das cargas atômicas calculadas, segundo diferentes métodos, passa a não apresentar significado.

Porém, todas as metodologias para o cálculos de cargas atômicas devem seguir alguns critérios (GUADAGNINI; BRUNS; DE SOUZA, 1996):

- A soma das cargas de todos os átomos na molécula deve ser igual à carga da mesma;
- As cargas atômicas devem respeitar a simetria molecular e permanecer invariantes em operações como rotação e translação;
- Devem obedecer a eletronegatividade atômica, e possuir uma interpretação física clara, sendo portanto compatíveis com a intuição química;
- Devem ser obtidas por métodos que não envolvam altos custos computacionais;
- Não devem apresentar uma dependência elevada com o conjunto de funções de base e devem tender a um limite bem definido quando o conjunto de funções de base tende a ser completo;
- Devem reproduzir o momento dipolar e o potencial eletrostático molecular.

A seguir são descritas de forma sucinta três metodologias de partição de cargas utilizadas neste trabalho, a partição de cargas de Mulliken, cargas obtidas a partir do potencial eletrostático (CHELPG, do inglês: *Charges from Electrostatic Potential Grid Based*) e por fim as cargas obtidas a partir dos tensores polares atômicos (GAPT, do inglês, *Generalized Atomic Polar Tensor*)

A análise populacional de Mulliken (MULLIKEN, 1955) é a partição de carga mais conhecida e utilizada pelos químicos e fundamenta-se na teoria dos orbitais moleculares, onde uma vez definida a função de onda do sistema, a densidade eletrônica é diretamente obtida. Além disso, todas as variáveis para efetuar essa análise populacional são obtidas diretamente, não sendo necessário nenhum custo computacional adicional. No entanto, a consideração arbitrária da divisão populacional da região de recobrimento como sendo igualitária entre os átomos participantes da ligação, resulta em valores de cargas atômicas que podem não refletir a realidade. Essa equipartição resulta numa reprodução inapropriada do momento de dipolo molecular calculado (GUADAGNINI; BRUNS; DE SOUZA, 1996).

Outro modelo amplamente difundido é o das cargas derivadas do potencial eletrostático molecular quântico, que baseia-se no cálculo de um conjunto de cargas atômicas pontuais de modo a representar da melhor maneira possível o potencial eletrostático (WILLIAMS; YAN, 1988). Há procedimentos para cálculos de cargas

parciais com base no potencial eletrostático, como as cargas CHELPG (BRENEMAN; WIBERG, 1990), no qual as cargas atômicas são ajustadas para reproduzir o potencial eletrostático em um conjunto de pontos ao redor da molécula. As cargas derivadas do potencial eletrostático são fisicamente mais satisfatórias quando comparadas com as cargas de Mulliken. Devido ao seu método de cálculo, as cargas derivadas do potencial reproduzem satisfatoriamente o potencial eletrostático molecular, o que é relevante no processo de interações intermoleculares. No entanto, o método CHELPG possui uma desvantagem, ou seja, o método não é sensível em relação à mudança de grupos substituintes (WIBERG; RABLEN, 1993) devido a imensa polarizabilidade da densidade eletrônica ao redor dos átomos (WILLIAMS, 1994). Esse fator deve ser levado em consideração quanto ao uso desse modelo de cargas para o estudo de efeito de substituintes (GUADAGNINI; BRUNS; DE SOUZA, 1996).

Proposto por Cioslowsky (CIOSLOWSKI, 1989a, 1989b), o modelo GAPT baseia-se no cálculo químico quântico das derivadas dos momentos dipolares em relação as coordenadas do núcleo. Este método é baseado na partição de propriedades eletrônicas em contribuições atômicas. Para o cálculo GAPT é necessário que a molécula esteja na sua geometria de equilíbrio, pois seus valores são obtidos a partir de parâmetros vibracionais. Portanto, o método GAPT não se aplica a moléculas fora da geometria de equilíbrio, como por exemplo estruturas do estado de transição. Esta limitação aplica-se também ao método CHELPG. Resultados mais satisfatórias utilizando-se as cargas GAPT tem sido alcançados no estudo de interpretação de bandas e intensidades na região do infravermelho (DE OLIVEIRA; DE ARAÚJO, 2007).

Como dito anteriormente, estas três metodologias de cargas foram utilizadas nas três séries de derivados estudadas neste trabalho, como uma tentativa de obter modelos de QSAR que pudessem explicar a dependência da atividade larvicida em função da estrutura molecular desses derivados.

### 3.5 EFEITO SOLVENTE

Ao estudarmos a química e a bioquímica, podemos perceber que a maior parte das reações envolvidas nos processos ocorre em fase líquida. Há muito se sabe da importância do solvente na condução de reações químicas, o qual afeta a velocidade das reações e

determina a formação dos produtos (PARKER, 1969). Desta forma, modelos teóricos capazes de incluir o efeito que o meio exerce nas reações podem ser de grande valor.

Modelos contínuos são ferramentas para a modelagem de soluções líquidas que consideram o solvente como um contínuo de constante dielétrica uniforme  $\epsilon$ .

O método mais popular é o modelo contínuo polarizável (PCM, do inglês: *Polarizable Continuum Model*), introduzido por Tomasi e colaboradores (MIERTUŠ; SCROCCO; TOMASI, 1981; TOMASI; CAMMI; MENNUCCI, 1999). O PCM utiliza um modelo quântico para descrever o soluto, onde o potencial da superfície é determinado pela diferenciação numérica e sua interação com o solvente é computada de maneira auto-consistente. A cavidade da molécula é definida por meio de esferas atômicas de raio proporcional ao raio de Van der Waals acrescidos de aproximadamente 20% para o desenho da cavidade. Esse modelo tem sido bastante utilizado, principalmente para análise de propriedades que dependem pouco de interações específicas entre soluto e solvente.

Neste trabalho, foi empregado o modelo PCM, utilizando para isso cálculos de orbitais moleculares B3LYP/6-311G (d,p), como uma forma de entender o comportamento dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propiónicos num meio onde se tenha solvatação.

### 3.6 QUIMIOMETRIA E ESTUDOS QSAR

Em várias áreas da ciência, frequentemente é necessário estabelecer modelos de relações quantitativas entre um fenômeno observado e um conjunto de variáveis independentes que se acredita ter uma relação na descrição do fenômeno. Com esses modelos, em geral, deseja-se descrever o fenômeno observado através de previsões não apenas para dentro, mas principalmente fora dos limites dos pontos investigados.

A RLM, do ponto de vista estatístico, é um método de regressão linear que relaciona uma variável dependente Y, que representa uma atividade biológica qualquer, dos compostos de uma série em estudo, com as variáveis independentes X, que são os descritores, que correspondem às propriedades físico-químicas desses compostos.

Para a modelagem dos compostos em estudo, assume-se que existe uma reta capaz de ajustar todos os valores da variável dependente, que pode ser representada pela equação 18.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n + \varepsilon \quad \text{Equação 18}$$

onde,  $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_n$  são parâmetros do modelo e  $\varepsilon$  é o erro relacionado à determinação de  $y$  (PIMENTEL; NETO, 1996). Um modelo linear de regressão fornecerá valores previstos de  $y$ , ( $y_p$ ), para cada valor correspondente de  $x_i$  associado, através da obtenção do conjunto de parâmetros  $b = (b_0, b_1, \dots, b_n)$  que mais se aproximam dos coeficientes  $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_n$  correspondentes. Observe que, no conjunto  $b$ ,  $n$  é o número total de variáveis (ou descritores). O resíduo deixado –  $e$  – corresponde à diferença entre os valores experimentais (ou observados) ( $y$ ) e os previstos ( $y_p$ ), estes últimos modelados pelos coeficientes  $b$ . O objetivo da modelagem é prever  $y_p$ , deixando assim o menor valor possível dos resíduos. Além disso, espera-se, que não haja falta de ajuste no modelo, que os resíduos deixados pelo modelo apresentem um caráter completamente aleatório, quando plotados em um gráfico contra as variáveis  $x_i$  (gráfico dos resíduos), indicando, assim, que o modelo estimado é adequado.

Espera-se ainda que a relação entre  $y$  e  $y_p$  seja linear, e é importante ressaltar que o modelo é dito linear devido à linearidade da relação estabelecida entre as variáveis  $y$  e  $x_i$ . Ainda, que uma ou mais variáveis seja do tipo  $x^2$ , o modelo linear é mantido, pois o modelo é uma função linear dos parâmetros  $b$ , e não das variáveis.

Os parâmetros  $b$  são calculados de acordo com a equação matricial 19, na qual os termos estão em negrito para indicar que são matriciais:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \cdot (\mathbf{X}^t \mathbf{y}) \quad \text{Equação 19}$$

onde  $\mathbf{X}^t$  é a matriz de dados transposta e,  $(\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1}$  representa o inverso do produto da transposta da matriz de dados pela mesma e  $\mathbf{y}$  é o vetor que contém o valor das atividades observadas.

De uma forma geral, é sempre possível reconhecer nos dados a seguinte organização: uma atividade biológica  $y$  está diretamente correlacionada através de um conjunto de parâmetros lineares a um conjunto  $X$  de variáveis físico-químicas, de modo que  $X = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ , onde  $n$  é o número total de variáveis. Um dos objetivos da QSAR é encontrar o conjunto de parâmetros  $b$  que possibilitem definir a função expressa pela equação 19, através da equação matricial 20 mostrada a seguir:

$$y_p = \mathbf{X} \mathbf{b}$$

Equação 20

A equação de QSAR (modelo matemático) obtida ao final do estudo permitirá descobrir quantitativamente, como as variáveis estão relacionadas com a atividade, e a partir de sua interpretação será possível saber como variar as mesmas para obter melhores valores da atividade biológica, com a proposição de compostos potencialmente ativos.

Após a construção do modelo de RLM, é necessário avaliar a qualidade do mesmo, isto é, verificar a sua capacidade de previsão, assim como os resíduos deixados pelo modelo. Uma das principais formas de avaliação, consiste na quantificação do poder previsivo (ERIKSSON; JOHANSSON, 1996). O grau de previsibilidade do modelo é testado através da validação cruzada (*cross validation*) que consiste em: (a) retirar um grupo de compostos da modelagem (denominado conjunto de teste); (b) reconstruir o modelo sem esses compostos; (c) utilizar esse modelo para calcular a atividade biológica do(s) composto(s) excluído(s). Isto deve ser efetuado após a obtenção da equação de QSAR com os demais compostos incluídos no modelo, denominados conjunto de treinamento. Para que a separação dos compostos em grupo de teste e treinamento não interfira na qualidade do modelo é importante que se tenha um número significativo de compostos. Além disso, deve-se verificar no grupo de teste, que os compostos não tenham características muito diferenciadas dos demais, pois como consequência não teriam sua atividade biológica adequadamente prevista pelo modelo, por se localizarem em regiões extremas de previsão, o que simultaneamente diminuiria a qualidade do modelo.

Um meio de avaliação para um modelo estatístico, bastante usado, é a análise da variância, denominada ANOVA (do inglês: *Analysis of Variance*), baseada na distribuição de Fischer. A ANOVA compreende a quantificação de parâmetros como a soma quadrática dos desvios em torno da média dos valores de  $y$ , ou soma quadrática total ( $SQ_T$ ), separando-se a mesma em soma quadrática devida à regressão ( $SQ_R$ ) e soma quadrática residual ( $SQ_F$ ). Avaliam-se também as médias quadráticas dos desvios devidos à regressão ( $MQ_R$ ) e aos resíduos ( $MQ_F$ ). Por fim, obtém-se o coeficiente de variação, ou de determinação ( $R^2$ ), que corresponde à divisão de  $SQ_R$  por  $SQ_T$ , a fim de conhecer a porcentagem de variação explicada pelo modelo desenvolvido. Como o valor de  $R^2$  situa-se no intervalo entre 0 e 1, pois  $SQ_R$  é necessariamente menor que  $SQ_T$ , por definição, então, quanto mais próximo da unidade for o valor de  $R^2$ , maior é a variabilidade explicada pelo modelo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

A ANOVA, em geral, não abrange o teste de Fischer, que é geralmente realizado em paralelo. Este teste tem como objetivo obter o valor do índice F, dividindo-se  $MQ_R$  por  $MQ_r$  e comparando-se com o valor tabelado correspondente ao número de graus de liberdade do problema. Caso F calculado seja maior que o tabelado, cerca de três vezes para um intervalo de confiança de 95%, então é possível afirmar que a regressão é significativa.

O estudo da relação dos descritores físico-químicos com a atividade larvicida da série ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionics, 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoate de metila e derivados aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos, foram analisados utilizando a Regressão Linear Múltipla.

### 3.7 DOCKING MOLECULAR

O *docking* molecular é uma técnica de modelagem molecular, que tem como objetivo prever o modo de ligação de uma pequena molécula (ligante) em um sítio de um alvo molecular (receptor), e na quantificação da afinidade de ligação entre o receptor e o ligante (KITCHEN et al., 2004).

O processo de reconhecimento molecular de um ligante no sítio de um alvo molecular ocorre por complementaridade química entre as estruturas em estudo. Neste processo, uma ou ambas as partes podem sofrer mudanças estruturais. Além disso, o processo de reconhecimento molecular é um processo dinâmico e complexo, onde um grande número de interações intermoleculares entre o ligante e o receptor são envolvidas (KITCHEN et al., 2004).

Devido à sua complexidade, o processo de *docking* é geralmente dividido em duas partes: (i) aplicação de um algoritmo que tem por objetivo a busca dos possíveis modos de ligação entre o ligante e o receptor, (ii) previsão da afinidade de ligação de um ligante a um receptor, ou seja, o cálculo da energia de interação (função *score*) que é aplicada para eleger os modos de ligação teoricamente mais próximos do modo de ligação “real”, classificando-os de acordo com as suas energias de interação (VERDONK et al., 2003).

Em 1982, Kuntz desenvolveu o primeiro programa de realização de *docking* molecular, chamado de DOCK. Atualmente, existem inúmeros programas de *docking* comerciais, tais como: GOLD, AutoDock, FlexX entre outros (KLEBE, 2006).

Nesse trabalho, foi empregado o programa AutoDock 4.2, (MORRIS et al., 2009) para o estudo das interações ligante-receptor dos derivados ácidos e ésteres 1,2,4-oxadiazólicos e tiossemicarbazônicos no alvo escolhido como candidato. O AutoDock foi escolhido para a realização desse estudo, pois além de ser um programa amplamente utilizado, o mesmo é de livre acesso e tem apresentado bons resultados na comparação de dados obtidos *in silico* com dados obtidos a partir de testes biológicos (ADINARAYANA; DEVI, 2011; GAI et al., 2010; TIWARI et al., 2009).

### 3.7.1 Programa AutoDock

O programa Autodock utiliza grades de energia (*grid*), geradas pelo programa AutoGrid, que tem a função de reduzir o custo computacional. Para a construção dessa grade de energia, é realizado um pré-cálculo da energia de interação entre os átomos do ligante e do receptor, para posteriormente serem utilizadas pelo programa AutoDock para a determinação da energia total de interação entre a macromolécula e o ligante (KITCHEN et al., 2004; MORGON; COUTINHO, 2007).

A afinidade de ligação calculada pelo Autodock corresponde à diferença entre as energias do ligante e da proteína no estado isolado, e a energia do complexo formado após a realização do *docking*. Esta avaliação é separada em duas partes: primeiramente é avaliada a variação da energia intramolecular das moléculas isoladas, em seguida é avaliada a variação de energia intermolecular resultante da formação do complexo proteína-ligante (HUEY et al., 2007). O campo de força inclui seis termos de interação entre pares de átomos e uma estimativa da entropia conformacional perdida durante a ligação ( $\Delta S_{conf}$ ).

$$\Delta G = (V_{ligado}^{L-L} - V_{n\tilde{a}o-ligado}^{L-L}) + (V_{ligado}^{P-P} - V_{n\tilde{a}o-ligado}^{P-P}) + (V_{ligado}^{P-L} - V_{n\tilde{a}o-ligado}^{P-L} + \Delta S_{conf}) \text{ Equação 21}$$

Onde *L* se refere ao “ligante” e *P* se refere a “proteína”. O primeiro termo entre parênteses corresponde as energias intramoleculares para os estados complexado e isolado do ligante, e os termos do segundo parênteses são as energias intramoleculares para os estados complexado e isolado da proteína. A variação de energia em função das interações intermoleculares entre os estados complexado e isolado está descrita no terceiro parênteses.

Cada parâmetro utilizado no cálculo da energia inclui as contribuições energéticas de dispersão/repulsão, ligação de hidrogênio, interação eletrostática e desolvatação.

$$V = W_{vdw} \sum_{ij} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{ij} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{ij} (S_i V_j + S_j V_i) e^{-\left( \frac{r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)} \quad \text{Equação 22}$$

onde, os  $W_i$ 's são constantes de ajuste em cada termo, obtidas a partir de uma série de dados experimentais de complexos macromolécula-ligante. O primeiro termo é um potencial 6/12 para interações de dispersão/repulsão de Van der Waals. O segundo termo é associado às ligações de hidrogênio direcionais. O terceiro termo representa as interações eletrostáticas (potencial de Coulomb). O termo final é um potencial de desolvatação baseado no volume ( $V$ ) dos átomos ao redor de um dado átomo, ponderado por um parâmetro de solvatação e um termo exponencial baseado em distância.

O programa AutoDock, utiliza um algoritmo genético Lamarckiano (LGA) (MORRIS et al., 1998), implementado como um algoritmo de busca local, como método de busca conformacional. Nesse método, inicialmente é gerado uma população de indivíduos, sendo cada indivíduo uma possível solução para o problema de *docking* e cada conformação referente ao ligante, representa um “cromossomo” composto de “genes” que representam os graus de liberdade rotacional, translacional e conformacional do ligante.

A avaliação de cada solução do processo de *docking* é realizada com base na energia de interação do complexo (ligante-proteína) e pela energia intramolecular do ligante. Posteriormente, as soluções são classificadas e as de melhor pontuação são submetidas a processos de recombinação e mutação para a geração de novas soluções. Ao final do processo, as soluções semelhantes são agrupadas em agrupamentos (*clusters*) e esses são ordenados de acordo com a energia. A diferença entre as soluções de *docking* são avaliadas pelo valor do RMSD (do inglês, *Root Mean Square Deviation*), em Angstroms (Å).

## 4 CÁLCULOS E BIOENSAIOS LARVICIDAS

Nesta seção descreveremos como foram feitas as análises conformacionais e configuracionais para cada série de compostos estudada nesse trabalho, além dos cálculos dos descritores utilizados para a obtenção dos modelos de QSAR. Também mostraremos como foram realizados os estudos de *docking* molecular desses compostos na proteína escolhida como alvo.

Como a resposta biológica é um aspecto fundamental numa QSAR, mesmo não tendo desenvolvido os bioensaios larvicidas, uma descrição de como os mesmos foram realizados é apresentado no Apêndice A.

### 4.1 DERIVADOS DE ARIL- E FENOXIMETIL-TIOSSEMICARBAZONAS

#### 4.1.1 Análise conformacional dos tautômeros tiona e tiol

Nosso primeiro passo foi investigar a estabilidade das formas tiona e tiol das tiossemicarbazonas. Para isto, foi escolhido o composto **12t** da série estudada, onde seus tautômeros são mostrados na Figura 24.

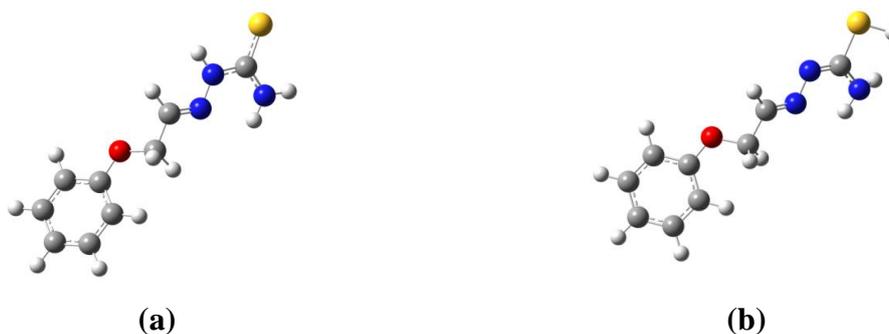


Figura 24 - Formas tautoméricas do derivado 12t. (a) Tiona, (b) Tiol.

A estabilidade dessas estruturas foi avaliada através do cálculo da energia livre de Gibbs padrão calculadas para esses dois tautômeros a temperatura de 298,15 K e pressão de 1 bar, como veremos na seção 5.1.1.

#### 4.1.2 Análise configuracional e conformacional dos derivados de tiossemicarbazonas

Uma vez que os descritores calculados, para serem utilizados em nossos estudos de QSAR dependem da geometria molecular dos compostos, o primeiro passo para a modelagem desses compostos, foi investigar a configuração (*E* ou *Z* em relação à dupla ligação aril-C=N) e a conformação dos isômeros (*syn* ou *anti* em torno da ligação parcial dupla (NN=CS), como pode ser visto na Figura 25.

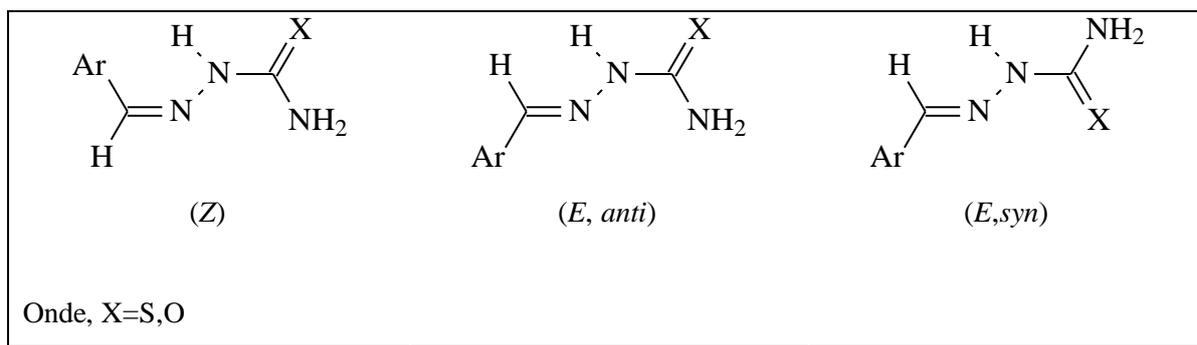


Figura 25 - Representação geral das possíveis conformações e configurações para as classes de compostos (tio)semicarbazônicos investigados.

Publicações anteriores das estruturas de raios-X dos derivados de *p*-fluorbenzaldeído tiossemicarbazonas (FERRARI et al., 2000), 3- e 4-R-piridina tiossemicarbazonas (onde R=formila e acetila) (MENDES et al., 2001), 4-R-piridina *N*(4)-metil e 4-R-piridina *N*(4)-etiliossemicarbazonas (onde R=formila e acetila) (BERALDO et al., 2001) e 2-acetiltofeno tiossemicarbazonas (DE LIMA et al., 2002), apontaram a existência apenas do isômero *E* tomando como referência a ligação C=N desses derivados. Por essa razão em nossos estudos, assumimos apenas a configuração *E* na estrutura de todas as espécies calculadas. Por outro lado, a estabilidade das conformações *anti* e *syn* em torno da ligação parcial dupla NN=CS foi avaliada através da energia livre de Gibbs padrão calculadas para as duas conformações, como veremos adiante na seção 5.1.2 dos resultados e discussões.

## 4.2 DERIVADOS ÁCIDOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPIÔNICO E ÉSTERES 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPANOATO DE METILA

### 4.2.1 Otimização das geometrias moleculares das moléculas não substituídas e seus derivados

Conforme foi descrito na seção anterior, as geometrias moleculares otimizadas e as propriedades eletrônicas das moléculas não substituídas e de seus derivados foram obtidas mediante cálculos de orbitais moleculares B3LYP/6-311G(d,p) usando o programa GAUSSIAN 09 (G09) (FRISCH et al., 2009). No processo de otimização foi seguida a seguinte rotina: (i) as geometrias das moléculas não substituídas mostradas na Figura 26, foram inicialmente otimizadas utilizando os critérios internos de convergência padrões do programa G09, e em seguida, (ii) usamos esse resultado como ponto de partida no processo de otimização das geometrias moleculares dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos.

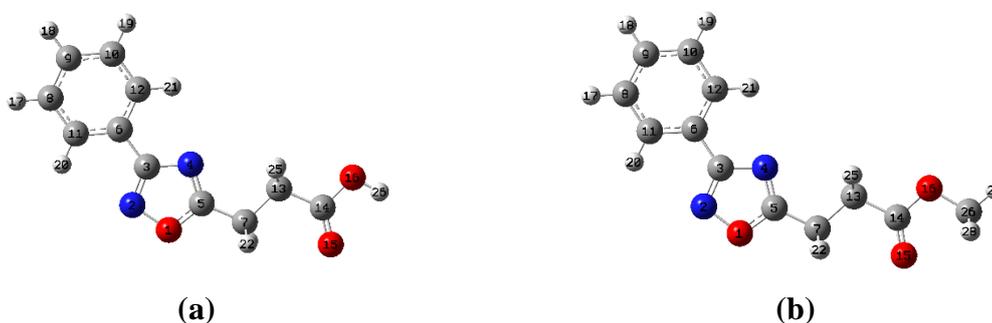


Figura 26 - Moléculas não substituídas. (a) ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il) propiônico, (b) 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.

### 4.2.2 Análise conformacional das moléculas não substituídas

Antes da determinação das barreiras de rotação interna dos compostos não substituídos, foi realizada uma análise conformacional em relação a ligação C5-C7, como mostra a Figura 27.

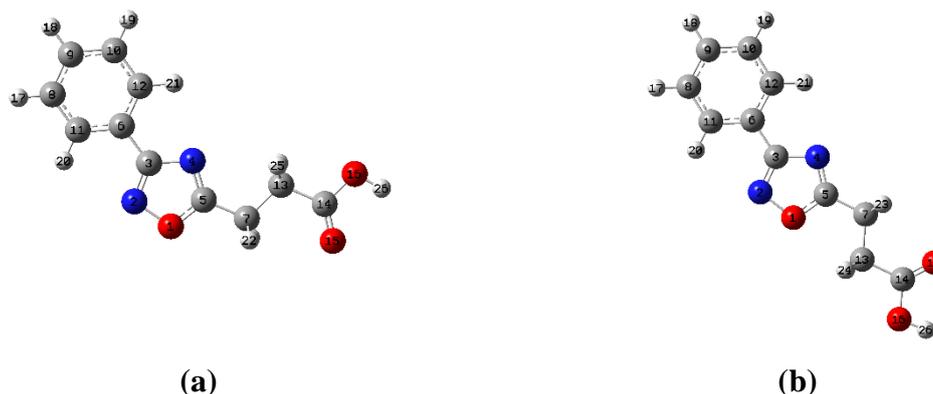


Figura 27 - Molécula não substituída do ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il) propiônico. (a) Conformação 1, (b) Conformação 2.

A estabilidade dessas conformações também foi avaliada através da energia livre de Gibbs padrão, calculada a temperatura de 298,15 K e pressão de 1 bar como veremos adiante na seção 5.2.1 dos resultados e discussões.

A partir da forma mais estável dentre as apresentadas na Figura 27, o cálculo da barreira de rotação em torno da ligação C3-C6 foi realizada para o derivado não substituído ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônico (Figura 28.a) e éster 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila (Figura 28.b).

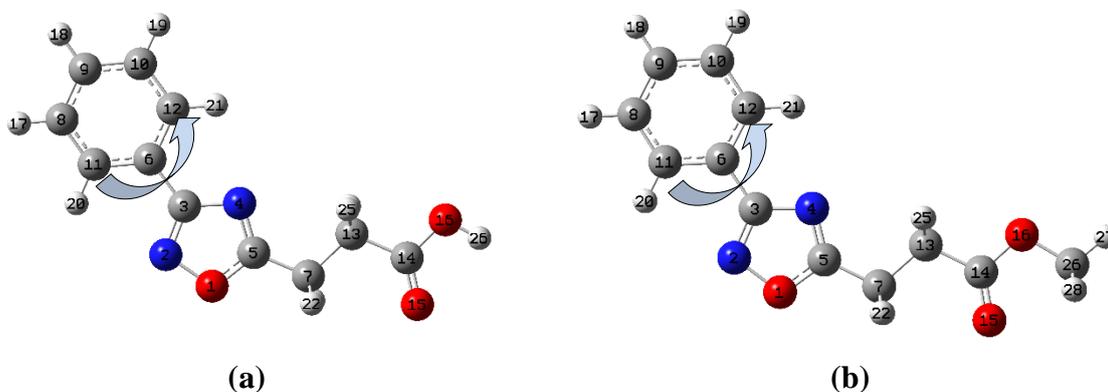


Figura 28 - Esquema da rotação do grupo fenil para análise da barreira de rotação.

Nesse procedimento, as barreiras de rotação foram avaliadas variando-se gradualmente, a cada 10 graus, os ângulos diédricos C11C6C3N2, enquanto as demais distâncias e ângulos de ligação e diédricos eram completamente otimizados. Isso permitiu construir um gráfico, para o cálculo B3LYP/6-311G(d,p), da energia total relativa como função do ângulo diédrico C11C6C3N2, como veremos adiante 5.2.1.

### 4.3 OBTENÇÃO DAS PROPRIEDADES ELETRÔNICAS E EMPÍRICAS

A partir das geometrias otimizadas, foram extraídas as respectivas propriedades eletrônicas empregadas em nossos estudos de relações quantitativas estrutura-atividade dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionic, 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoate de metila e aril- e fenoximetil-tiossemicarbazonas. Nesse trabalho as propriedades eletrônicas empregadas foram:

- (i) Momento de dipolo molecular,
- (ii) Energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, e
- (iii) Cargas atômicas utilizando as partições de Mulliken, CHELPG e GAPT.

Além desses descritores quânticos, incluímos também em nossas matrizes de dados, dois descritores lipofílicos:

- (iv) Parâmetro lipofílico de Hansch ( $\pi$ ), e
- (v) Logaritmo decimal do coeficiente de partição ( $\log P$ ).

O cálculo da medida da hidrofobicidade ( $\log P$ ) desses compostos foi obtida utilizando o programa EPI Suite 1.67.

### 4.4 EFEITO SOLVENTE

Em nossos estudos QSAR, os descritores eletrônicos para os derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionic foram também calculados utilizando o efeito do solvente empregando o modelo PCM.

Para realizar esses cálculos foi utilizado o programa G09, nesse procedimento, as estruturas desses derivados foram otimizadas novamente, empregando agora o modelo PCM (do inglês: *Polarizable Continuum Model*), utilizando a água como solvente.

## 4.5 ESTUDOS QUIMIOMÉTRICOS

As atividades larvicidas, os parâmetros eletrônicos e lipofílicos foram organizados na forma de matrizes de dados  $\mathbf{X}_{n,p}$ , onde as linhas e colunas estão relacionadas aos  $n$  compostos e  $p$  descritores moleculares, respectivamente, nas séries dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionic, ésteres 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoate de metila e aril- e fenoximetil-tiossemicarbazonas. A partir de cada matriz  $\mathbf{X}_{n,p}$  foi calculado a matriz dos coeficientes de correlação, que permitiu avaliar quais os descritores que estavam mais correlacionados com a atividade larvicida. Estes, então, foram utilizados para a geração da RLM (modelo QSAR), através do programa Statistica 6.0.

As equações de QSAR foram analisadas no sentido de avaliar quais propriedades contribuíam mais significativamente nos valores das atividades e de que modo, i.e., positivamente ou negativamente. A partir dessa análise e das equações obtidas, novos compostos foram projetados e suas atividades avaliadas pelos nossos colaboradores experimentais.

## 4.6 DOCKING MOLECULAR

### 4.6.1 Re-docking

A estrutura cristalográfica da proteína AeSCP-2 foi obtida a partir do banco de dados *Protein Data Bank* (ID: 1PZ4). O software AutoDock 4.2 foi utilizado para realizar os estudos no alvo da proteína.

Antes da realização do *docking* nas três séries de compostos estudadas nesta tese para o alvo biológico selecionado, foi preciso realizar uma validação dos protocolos de *docking* através do chamado processo de *re-docking*. Nessa validação, o próprio ligante co-cristalizado da estrutura do complexo, foi submetido ao processo de *docking* para tentar reproduzir o “encaixe” original no sítio ativo em estudo. Para isso a macromolécula (AeSCP-2) foi considerada uma proteína rígida e as moléculas de água presentes na estrutura da macromolécula original foram excluídas.

Em geral os resultados de *docking* são confiáveis dependendo da similaridade entre o modo de ligação experimental e o modo de ligação calculado para a conformação de menor energia. Como usual (MORGON; COUTINHO, 2007), nesse trabalho foi aceito

como metodologia validada, todos os resultados que apresentaram valores de  $\text{RMSD} \leq 2,0$  Å em relação a estrutura co-cristalizada experimental.

O *re-docking* do ácido palmítico no sítio ativo da proteína, foi realizado de acordo com o protocolo mencionado anteriormente. Nas simulações de *docking*, a seleção do melhor encaixe foi realizada pelo critério de menor energia.

Foram utilizados três *grids* diferentes na tentativa de buscar o “melhor” *grid* para a realização do *docking* das três séries estudadas. Para isso o tamanho dos *grids* foi ajustado de modo a incluir o sítio ativo da proteína, onde as dimensões do *grid* nos eixos X, Y e Z foram respectivamente: (i) 50x50x50 Å, (ii) 60x60x60 Å e (iii) 70x70x70 Å, e o espaçamento do *grid* foi de 0,375 Å.

#### **4.6.2 Docking dos ligantes ácidos e ésteres 1,2,4-oxadiazólicos e tiossemicarbazônicos.**

O *docking* dos derivados ácidos e ésteres 1,2,4-oxadiazólicos e tiossemicarbazônicos no sítio ativo da proteína AeSCP-2, foi realizado utilizando o programa Autodock 4.2, onde as ligações rotacionáveis dos ligantes foram mantidas livres e a proteína foi tratada como uma macromolécula rígida.

As estruturas dos ligantes otimizadas (seção 4.2.1) foram utilizadas como ponto de partida para o processo de docagem no sítio ativo da proteína.

O programa *AutoDockTools* foi utilizado para preparar e analisar as simulações computacionais realizadas. O programa *AutoGrid 4.0* foi utilizado para gerar os mapas para os ligantes. As dimensões da caixa do *grid* nos eixos X, Y e Z foram, respectivamente, 50x50x50 Å ao redor do sítio ativo e o espaçamento usado foi de 0,375 Å.

Na tentativa de entendermos melhor como nossos compostos interagem com o sítio ativo da proteína escolhida como alvo, decidimos realizar um estudo de *docking* mais detalhado para apenas uma das séries estudadas nesta tese. Em particular, a série escolhida foi a dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionicos. Esse estudo consistiu na geração de mil conformações para cada derivado nesta série. Nas séries dos derivados ésteres 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoato de metila e dos aril- e fenoximetil-tiossemicarbazonas, foram geradas apenas 10 conformações em cada série.

### 4.6.3 Análises das interações receptor-ligante

Após a realização das simulações de *docking* molecular, as interações entre a proteína *AeSCP-2* e os ligantes derivados dos compostos tiossemicarbazônicos e dos ácidos e ésteres 1,2,4-oxadiazólicos, foram avaliados com o auxílio do programa *ligPlus* (v 1.4.5) (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

Esse programa tem a função de avaliar o comportamento entre o receptor e o ligante, e identifica as interações intermoleculares que ocorreram na formação do complexo, gerando mapas 2D que mostram o tipo de interação que foi realizada entre a proteína e o ligante. Um exemplo dessas representações 2D pode ser observada na Figura 29.

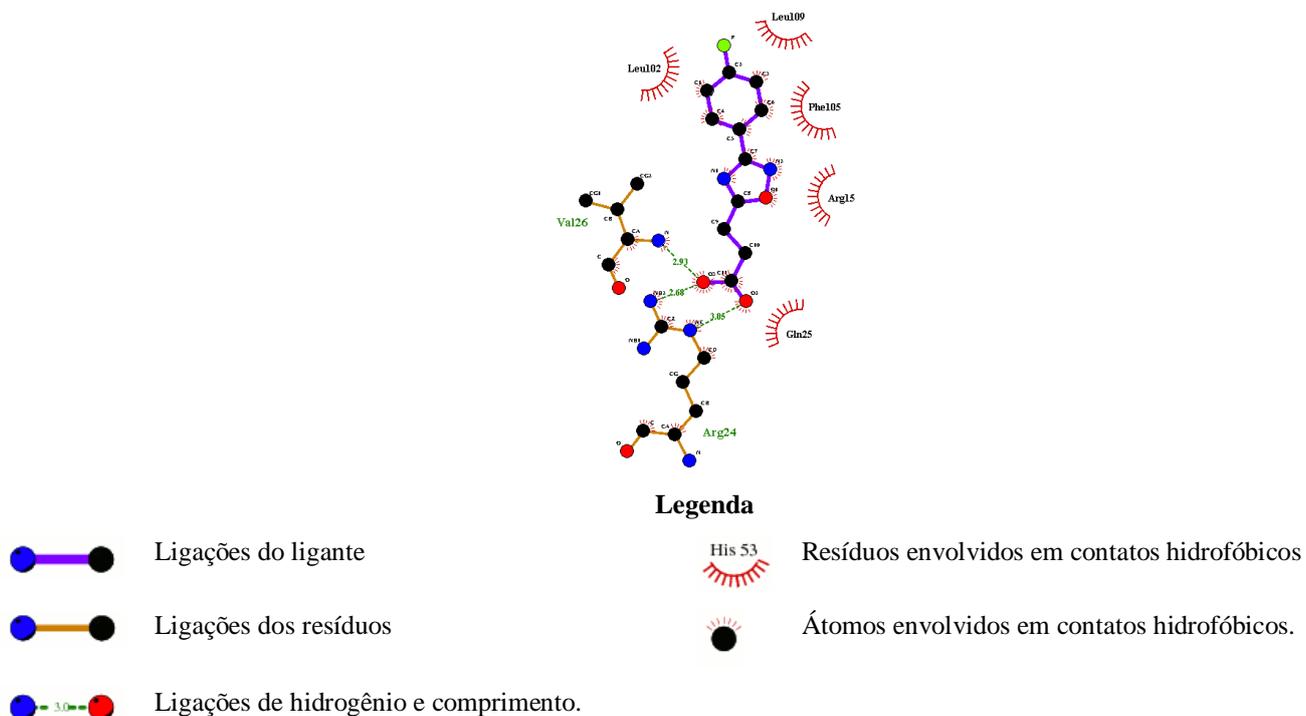


Figura 29 - Exemplo de um arquivo de saída do programa LigPlus. Representação 2D gerada automaticamente pelo programa, mostrando o tipo de interação realizada (ver a legenda) entre a proteína e o ligante.

Nesse trabalho, foram analisadas ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas realizadas entre os átomos do ligante e do receptor.

#### 4.6.4 *Docking* molecular dos inibidores da proteína *AeSCP-2* (SCPIs)

Uma forma de avaliação da metodologia utilizada nesse trabalho, foi a realização do *docking* molecular dos inibidores da proteína *AeSCP-2* relatados por Lan e colaboradores (KIM; WESSELY; LAN, 2005). Como discutido na seção 1.6, esses inibidores quando testados se mostraram potentes agentes larvicidas e possuíram uma alta afinidade de ligação com essa proteína. Portanto, decidimos realizar esse estudo na tentativa de encontramos um eventual padrão da atividade larvicida em função da energia de ligação desses compostos, no sítio ativo dessa proteína.

Para a realização do *docking* desses compostos foi utilizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, ou seja, o programa AutoGrid 4.0 foi utilizado para gerar os mapas para os ligantes. As dimensões da caixa do *grid* nos eixos X, Y e Z foram respectivamente 50x50x50 Å e o espaçamento utilizado foi de 0,375 Å.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 DERIVADOS DE ARIL- E FENOXIMETIL-TIOSSEMICARBAZONAS

#### 5.1.1 Análise conformacional dos tautômeros tiona e tiol

As energias livre de Gibbs padrão B3LYP/6-311++G(d,p) para as formas tiona e tiol do derivado não substituído **12t** são apresentadas na Figura 30.

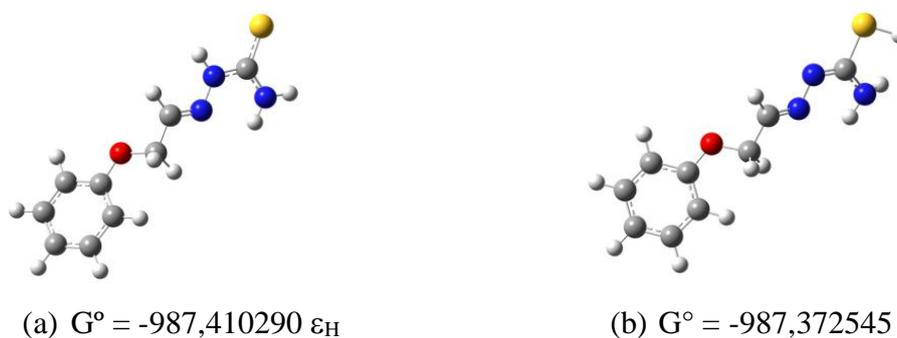
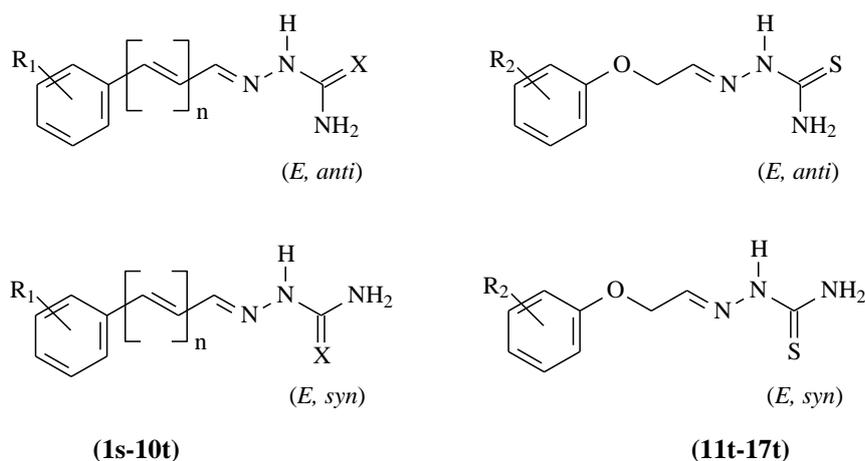


Figura 30 - Energias livre de Gibbs padrão B3LYP/6-311++G(d,p) do derivado 12t nas formas: (a) tiona e (b) tiol.

Como mostra a Figura 30, a forma tiol apresentou uma energia livre mais alta que a forma tiona, indicando que esta última é a forma mais estável. Por essa razão, nesta tese adotamos a forma tiona para todos os demais derivados.

#### 5.1.2 Análise configuracional e conformacional dos derivados tiossemicarbazônicos

Antes da realização dos estudos de QSAR para esses derivados, foi necessária uma avaliação da estabilidade das conformações *anti* e *syn* em torno da ligação dupla parcial NN=CS (Esquema 1).



Composto	R <sub>1</sub>	n	X	Composto	R <sub>2</sub>
1s	<i>p</i> -F	0	O	11t	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>
2s	3,4-diCl	0	O	12t	H
3t	3-NO <sub>2</sub> , 4-Br	0	S	13t	<i>m</i> -Cl
4t	<i>p</i> -OH	0	S	14t	<i>p</i> -Br
5t	<i>m</i> -CHNNHCSNH <sub>2</sub>	0	S	15t	<i>p</i> -Cl
6t	<i>p</i> -F	0	S	16t	2,3-diCl
7t	<i>p</i> -Cl	0	S	17t	3,4-diCl
8t	H	1	S		
9t	<i>p</i> -Br	0	S		
10t	3,4-diCl	0	S		

Esquema 1 - Representação geral das possíveis configurações e conformações dos derivados de tiossemicarbazonas estudadas nesse trabalho. Adaptado de (DA SILVA et al., 2015a).

Uma vez que esses compostos apresentam três domínios químicos, quais sejam, o substituinte do grupo aril (R), a unidade espaçadora CH ou OCH<sub>2</sub>CH (UE) e o heteroátomo X=(O,S), cada composto será representado pela tríade [R;UE;X].

Para a avaliação da estabilidade das duas conformações (*syn* e *anti*), foi calculada a energia livre de Gibbs padrão para cada derivado (Tabela 4) utilizando o conjunto de função de base B3LYP/6-311++G(d,p) (DA SILVA et al., 2015b).

Tabela 4 - Cálculos B3LYP/6-311++G(d,p) da energia livre de Gibbs padrão<sup>a</sup>, do momento de dipolo elétrico, da menor frequência vibracional harmônica e da diferença de energia livre de Gibbs padrão entre as conformações *syn* e *anti* do isômero *E*. Adaptado de (DA SILVA et al., 2015b).

Número	Composto (R;UE;X)	<i>Syn</i>			<i>anti</i>			$\Delta G^0$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
		$G^0$	$\mu$	$\nu_1$	$G^0$	$\mu$	$\nu_1$	
		( $\epsilon_H$ )	(D)	(cm <sup>-1</sup> )	( $\epsilon_H$ )	(D)	(cm <sup>-1</sup> )	
1s	(4-F;CH;O)	-649,045519	5,61	42,0	-649,057077	2,38	33,4	-7,25
2s	(3,4-DiCl;CH;O)	-1469,031055	5,37	32,4	-1469,042708	1,65	26,8	-7,31
3t	(3-NO <sub>2</sub> ,4-Br;CH;S)	-3650,829505	5,34	24,7	-3650,843120	4,26	24,3	-8,54
4t	(4-OH;CH;S)	-947,968453	4,35	34,1	-947,983487	6,02	37,2	-9,43
5t	(5-FTSC;CH;S)	-1513,220541	4,63	16,3	-1513,234814	4,28	15,1	-8,96
6t	(4-F;CH;S)	-972,000578	6,06	33,8	-972,015363	3,70	37,0	-9,28
7t	(4-Cl;CH;S)	-1332,356854	6,11	35,4	-1332,371675	3,50	35,0	-9,30
8t	(H;CH=CH-CH;S)	-950,118099	5,96	26,1	-950,134200	5,97	31,0	-10,10
9t	(4-Br;CH;S)	-3446,278182	6,11	35,6	-3446,293100	3,50	32,1	-9,36
10t	(3,4-DiCl;CH;S)	-1791,985694	5,43	25,5	-1792,000329	3,13	29,4	-9,18
11t	(4-OCH <sub>3</sub> ;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-1101,768777	4,03	19,4	-1101,783947	5,92	17,4	-9,52
12t	(H;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-987,243034	4,88	24,0	-987,258250	4,82	22,4	-9,54
13t	(3-Cl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-1446,877531	4,20	16,9	-1446,892287	4,66	18,7	-9,26
14t	(4-Br;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-3560,798445	5,57	17,5	-3560,813237	2,93	15,9	-9,28
15t	(4-Cl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-1446,876855	5,58	19,5	-1446,891718	2,94	17,4	-9,32
16t	(2,3-DiCl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-1906,501534	3,29	13,3	-1906,515805	5,52	15,9	-8,96
17t	(3,4-DiCl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-1906,505957	5,27	15,3	-1906,520747	1,77	18,3	-9,28

<sup>a</sup> Os cálculos termodinâmicos foram realizados na temperatura de 298,15 K e na pressão de 1 bar.

A partir da Tabela 4, pode-se observar que ambos os confôrmeros *syn* e *anti* representam pontos de mínimo na superfície de energia potencial. O confôrmero *anti*, como esperado, apresenta a estrutura mais estável, com valores médios de  $\Delta G^0$  de 7,3 kcal.mol<sup>-1</sup> e 9,3 kcal.mol<sup>-1</sup> para a semicarbazona e tiossemicarbazona, respectivamente. É possível observar também que essa diferença de energia não depende nem da natureza do substituinte (R), nem da natureza da unidade espaçadora (-CH= ou -O-CH<sub>2</sub>-CH=) entre o anel aromático e a porção (tio)semeicarbazida.

A fim de facilitar a análise dos dados de polaridade da Tabela 4, alguns cálculos adicionais foram realizados para a uréia ( $\mu$  =3,88 D), tiouréia ( $\mu$  =5,00 D), formaldeído-tiossemicarbazona ( $\mu$  =4,50 D) e fenil-tiossemicarbazona ( $\mu$  =5,46 D). Na Tabela 4 podemos destacar alguns aspectos:

- (i) Em primeiro lugar, a diferença entre o momento de dipolo elétrico entre a tiouréia e a uréia é de 1,1 D. Essa diferença é observada também entre os derivados **6t** e **1s**, 1,3 D e entre os compostos **10t** e **2s**, 1,5 D.
- (ii) Em segundo lugar, os derivados que possuem a conformação *anti*, substituídos na posição *para* são mais estáveis e possuem um momento de dipolo menor do que o confôrmero *syn* correspondente. As exceções são para os compostos não substituídos na posição *para* **8t** e **12t** onde os momentos de dipolo são praticamente os mesmos em ambos os confôrmeros, no entanto, alguns derivados com a conformação *anti* apresentaram momentos de dipolo maiores do que a conformação *syn* correspondente, como por exemplo, os derivados **4t**, **11t** e **16t**.

Com base nessas informações, podemos perceber que a baixa polaridade dos derivados das conformações *anti* (mais estável), pode representar um aspecto vantajoso para promover uma interação hidrofóbica no ambiente biológico. Como o momento de dipolo é um descritor vetorial, além da sua magnitude o mesmo possui uma orientação e um sentido. A direção do dipolo nas estruturas otimizadas (*E/anti*) são mostradas na Figura 31:

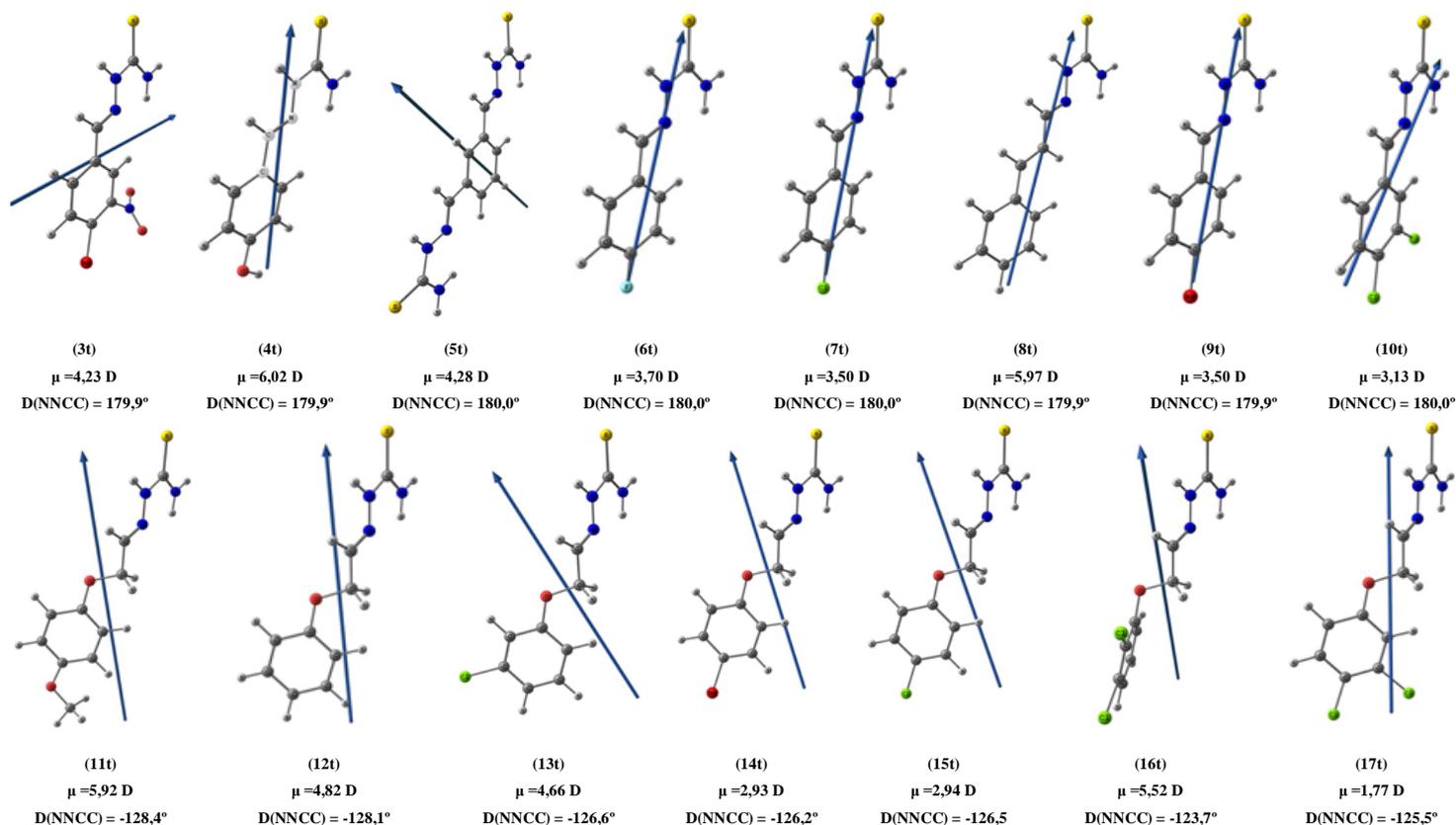


Figura 31 - Magnitude e orientação do momento de dipolo para o conformero *E/anti* dos derivados tiossemicarbazônicos. Ângulo diédrico entre as os grupamentos aril/fenoxi e a porção tiossemicarbazida. Adaptado de (DA SILVA et al., 2015b).

A Figura 31 mostra que o momento de dipolo da maioria dos derivados está orientado principalmente ao longo do eixo da ligação C=S, com exceção dos derivados **3t** e **5t**, cujos substituintes NO<sub>2</sub>- e H<sub>2</sub>N(C=S)NH-N=CH-, respectivamente, são no tipo e na posição mais diferenciados que os demais. Pode-se notar também que os derivados com os maiores momentos de dipolo **3t-5t**, **11t** e **12t** não apresentam uma atividade larvicida elevada (ver Tabela 5, seção 5.1.3). A introdução de um substituinte halogênio na posição *para* do grupo fenil, diminui o momento de dipolo em 1,8-2,0 D, mas sua orientação é mantida para os derivados **6t**, **7t** e **9t**, em relação a fenil-tiossemicarbazona não substituída ( $\mu = 5,46 \text{ D}$ ). O mesmo efeito de diminuição do momento de dipolo com substituintes halogênicos na posição *para* é observado também para os derivados **14t** e **15t** em relação ao derivado **12t** (não substituído), no entanto, a orientação do momento de dipolo é para fora da ligação C=S, em direção ao átomo de oxigênio na porção fenoximetil. Esta alteração está relacionada com o grupo espaçador -O-CH<sub>2</sub>-CH= que promove uma torção (na faixa de -123,70 a 128,40°) entre os fragmentos da tio-semicarbazida e fenoximetil. Além disso,

a introdução de um segundo átomo de cloro na posição *meta* do anel fenílico causa uma diminuição ainda maior do momento de dipolo. Ele varia de 3,50 D em **7t** (*p*-Cl) a 3,13 D em **10t** (3,4- DiCl) e de 2,94 D em **15t** (*p*-Cl) a 1,77 D em **17t** (3,4- DiCl).

### 5.1.3 Seleção dos descritores para o estudo QSAR

Para a obtenção de um modelo de regressão linear satisfatório, é desejável que os dados da resposta biológica possuam uma variância apreciável. Apresentamos na Tabela 5, os valores da atividade larvicida dos compostos dessa primeira série homóloga estudada.

Tabela 5 - Dezesete derivados de (tio)semicarbazonas com os respectivos valores da atividade larvicida.

Composto (R;UE;X)	Numeração	Faixa de Concentração (ppm)	LC <sub>50</sub> (ppm)	LC <sub>50</sub> ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	Log(1/LC <sub>50</sub> )
<i>Aril-tiossemicarbazonas</i>					
(4-F;CH;O)	1s	> 200	> 200	>1103,9	-
(3,4-diCl;CH;O)	2s	> 200	> 200	>861,8	-
(3-NO <sub>2</sub> ,4-Br;CH;S)	3t	> 200	> 200	>659,8	-
(4-OH;CH;S)	4t	> 200	> 200	>1024,4	-
(5-FTSC;CH;S)	5t	> 200	> 200		-
(4-F;CH;S)	6t	50-90	61,3	310,8	3,507
(4-Cl;CH;S)	7t	20-60	28,8	134,8	3,873
(H;CH=CH-CH;S)	8t	28-50	28,4	138,3	3,860
(4-Br;CH;S)	9t	20-50	31,7	122,8	3,910
(3,4-diCl;CH;S)	10t	16-20	17,3	69,7	4,157
<i>Fenoximetill-tiossemicarbazonas</i>					
(4-OCH <sub>3</sub> ;OCH <sub>2</sub> CH;S)	11t	80-160	120,4	503,1	3,298
(H;OCH <sub>2</sub> CH;S)	12t	80-160	112,7	538,5	3,268
(3-Cl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	13t	50-80	70,0	287,2	3,542
(4-Br;OCH <sub>2</sub> CH;S)	14t	20-40	26,5	92,0	4,036
(4-Cl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	15t	20-30	21,9	89,9	4,046
(2,3-diCl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	16t	10-30	19,5	70,1	4,154
(3,4-diCl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	17t	5-9	5,8	20,9	4,680

Felizmente se observa que tal variância está presente na Tabela 5. Note que o composto **17t** é 15 vezes mais ativo que o composto **6t**. Observa-se também da Tabela 5

que, de acordo com Cheng e colaboradores (CHENG, 2003), os derivados **1s-5t**, **11t** e **12t** podem ser considerados inativos ( $LC_{50} > 100$  ppm), o derivado **6t** e **13t** podem ser considerados ativos ( $100 \text{ ppm} > LC_{50} > 50$  ppm), ao passo que os derivados **7t**, **8t**, **9t** e **10t** podem ser considerados bastante ativos ( $LC_{50} < 50$  ppm).

Ao comparar as atividades de dois derivados aril-tiossemicarbazônicos **6t** e **10t** com seus análogos semicarbazônicos **1s** e **2s**, nota-se que esses últimos não apresentaram atividade larvicida ( $LC_{50} > 200$  ppm). Os compostos **6t** e **10t**, respectivamente, diferem estruturalmente desses dois derivados semicarbazônicos **1s** e **2s** apenas pela presença do grupo tiocarbonila (C=S) em lugar do grupo carbonila (C=O). Portanto, podemos inferir que a função tiocarbonila contribui de forma significativa para o aumento da atividade larvicida desses derivados.

Em relação ainda as aril-tiossemicarbazonas, podemos observar que o composto dissustituído no anel aromático com átomos de cloro **10t** mostrou-se bastante ativo em relação ao seu correspondente monoclorado **7t**. Esse comportamento foi observado também por Bordas e colaboradores (BORDAS et al., 1989), avaliando a atividade larvicida de diferentes biuretos. Eles observaram que compostos dissustituídos com átomos de cloro nas posições 3 e 4 do anel fenílico, apresentavam uma atividade larvicida maior, em relação ao seu derivado monossustituído.

Em relação aos derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas avaliadas, apenas os compostos **11t** e **12t** não apresentaram atividade larvicida ( $LC_{50} > 100$  ppm). O derivado **13t** mostrou-se ativo, enquanto os derivados **14t**, **15t**, **16t** e **17t** são bastante ativos.

Ao compararmos as atividades larvicidas das aril-tiossemicarbazonas **7t**, **9t** e **10t**, as quais não possuem a unidade espaçadora (-O-CH<sub>2</sub>) em sua estrutura, com as respectivas fenoximetil-tiossemicarbazonas **15t**, **14t**, e **17t**, nota-se que esses últimos causaram uma mortalidade superior em larvas do *Aedes aegypti*, por exemplo, para o composto **17t**, o valor de  $LC_{50}$  foi de  $20,9 \mu\text{molL}^{-1}$ , um valor numérico bem menor que aquela obtida para seu análogo aril-tiossemicarbazônico **10t** ( $69,7 \mu\text{molL}^{-1}$ ). Então, a presença desse grupamento químico parece ter contribuído para o aumento da atividade larvicida.

Ainda com relação às fenoximetil-tiossemicarbazonas, nota-se que os derivados **14t** e **15t** se mostraram bastante ativos, quando comparados com o derivado não substituído **12t** no anel fenílico. Esses resultados corroboram também com aqueles obtidos por Neves Filho e colaboradores (NEVES FILHO et al., 2009) indicando mais uma vez que a

presença de halogênios tais como “Br” e “Cl” substituídos na posição *para* do anel fenílico contribui para um aumento da atividade larvicida.

Observando ainda a Tabela 5, pode-se notar que o derivado **11t**, que possui o substituinte metoxila na posição *para* do anel fenílico, apresentou um valor de LC<sub>50</sub> maior quando comparado ao composto não substituído **12t**. Esse resultado mostra mais uma vez que a presença de grupos doadores de elétrons na posição *para* do anel fenílico, acarreta uma diminuição da atividade larvicida, de forma semelhante ao trabalho publicado por Simas e colaboradores (SIMAS et al., 2004), e também no trabalho de Neves Filho e colaboradores (NEVES FILHO et al., 2009), onde nesse último, a presença do grupo metoxila não contribuiu para o aumento da atividade desses compostos.

#### 5.1.3.1 Análise de regressão para os derivados tiossemicarbazônicos

A partir das conformações de menor energia ( $E_{\text{anti}}$ ), as propriedades eletrônicas foram calculadas pelo método B3LYP/6-311++G(d,p). Estes valores, juntamente com a atividade larvicida e os descritores de lipoficidade logP e  $\pi$ , são mostrados na Tabela 6. Vale salientar, que os melhores resultados dos nossos estudos de QSAR foram obtidos utilizando a partição de Mulliken, portanto todas as matrizes de dados e correlação, assim como os modelos matemáticos apresentados neste capítulo correspondem a esta partição de carga. No entanto, as matrizes de dados, correlação e modelos matemáticos obtidos para as outras partições de cargas estão presentes nos Apêndices B, C e D deste trabalho. Isto vale também para os derivados ácidos e ésteres 1,2,4-oxadiazólicos que serão apresentados nas seções 5.2.2 e 5.3.1.

Tabela 6 - Atividade larvicida experimental, descritores eletrônicos B3LYP/6-311++G(d,p) e lipofílicos para os derivados aril e fenoximetil-tiosemicarbazônicos.

Números (R)	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ (D)	ε <sub>HOMO</sub> (eV)	ε <sub>LUMO</sub> (eV)	<sup>1</sup> Δε (eV)	<sup>2</sup> Σq <sub>benzeno</sub> (e)	qC <sub>5</sub> (e)	qN <sub>1</sub> (e)	qN <sub>2</sub> (e)	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
6t	3,507	3,702	-6,045	-2,224	3,821	-0,370	0,778	0,192	-0,033	2,180	4,752	0,140	0,020
7t	3,873	3,503	-6,078	-2,336	3,742	-1,050	0,522	0,179	-0,035	2,630	6,917	0,710	0,504
9t	3,910	3,502	-6,084	-2,357	3,727	0,043	1,054	0,227	-0,047	2,870	8,237	0,860	0,740
10t	4,157	3,133	-6,185	-2,507	3,678	-1,681	-0,006	0,179	-0,035	3,270	10,693	1,420	2,020
11t	3,298	5,915	-5,968	-1,589	4,379	-0,565	-0,187	0,082	-0,020	2,090	4,368	-0,020	0,000
12t	3,268	4,816	-6,088	-1,634	4,454	-0,675	0,037	0,078	-0,018	2,010	4,040	0,000	0,000
13t	3,542	4,665	-6,159	-1,746	4,413	-0,989	-0,534	0,082	-0,023	2,650	7,023	0,860	0,740
14t	4,036	2,932	-6,168	-1,753	4,414	-0,495	-0,049	0,082	-0,019	2,900	8,410	0,710	0,504
15t	4,046	2,936	-6,164	-1,748	4,417	-1,000	-0,349	0,081	-0,019	2,650	7,023	1,420	2,020
16t	4,154	5,516	-6,108	-1,713	4,395	-1,377	-1,465	0,090	-0,011	3,300	10,890	1,420	2,020
17t	4,680	1,774	-6,212	-1,825	4,387	-1,571	-0,849	0,088	-0,023	3,300	10,890	0,140	0,020

A partir da matriz de dados (Tabela 6) foi obtida a matriz dos coeficientes de correlação (Tabela 7).

Tabela 7 - Matriz dos coeficientes de correlação dos parâmetros presentes na Tabela 6 para os derivados aril- e fenoximetil-tiosemicarbazônicos.

	Log (1/LC <sub>50</sub> )	μ	ε <sub>HOMO</sub>	ε <sub>LUMO</sub>	Δε	Σq <sub>anel</sub>	qC <sub>5</sub>	qN <sub>1</sub>	qN <sub>2</sub>	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
Log 1/(LC <sub>50</sub> )	<b>1,00</b>	-0,69	-0,83	-0,17	0,00	-0,61	-0,45	-0,03	-0,00	0,92	0,92	0,93	0,85
μ	-0,69	<b>1,00</b>	0,78	0,38	0,22	0,23	-0,16	-0,20	0,35	-0,46	-0,44	-0,47	-0,33
ε <sub>HOMO</sub>	-0,83	0,78	<b>1,00</b>	0,11	-0,10	0,58	0,35	0,16	-0,09	-0,74	-0,74	-0,76	-0,69
ε <sub>LUMO</sub>	-0,17	0,38	0,11	<b>1,00</b>	0,98	0,01	-0,62	-0,93	0,89	-0,26	-0,24	-0,28	-0,18
Δε	0,00	0,22	-0,10	0,98	<b>1,00</b>	-0,11	-0,70	-0,97	0,91	-0,10	-0,08	-0,12	-0,04
Σq <sub>anel</sub>	-0,61	0,23	0,58	0,01	-0,11	<b>1,00</b>	0,69	0,28	-0,33	-0,61	-0,63	-0,66	-0,76
qC <sub>5</sub>	-0,45	-0,16	0,35	-0,62	-0,70	0,69	<b>1,00</b>	0,75	-0,82	-0,46	-0,50	-0,48	-0,60
qN <sub>1</sub>	-0,03	-0,20	0,16	-0,93	-0,97	0,28	0,75	<b>1,00</b>	-0,94	0,07	0,05	0,07	-0,02
qN <sub>2</sub>	-0,00	0,35	-0,09	0,89	0,91	-0,33	-0,82	-0,94	<b>1,00</b>	-0,04	-0,01	-0,03	0,08
logP	0,92	-0,46	-0,74	-0,26	-0,10	-0,61	-0,46	0,07	-0,04	<b>1,00</b>	1,00	1,00	0,95
(logP) <sup>2</sup>	0,92	-0,44	-0,74	-0,24	-0,08	-0,63	-0,50	0,05	-0,01	1,00	<b>1,00</b>	0,99	0,96
π	0,93	-0,47	-0,76	-0,28	-0,12	-0,66	-0,48	0,07	-0,03	1,00	0,99	<b>1,00</b>	0,96
π <sup>2</sup>	0,85	-0,33	-0,69	-0,18	-0,04	-0,76	-0,60	-0,02	0,08	0,95	0,96	0,96	<b>1,00</b>

A partir de um ajuste linear dos dados, foi encontrada a seguinte equação de regressão entre Log(1/LC<sub>50</sub>), μ e logP, como pode ser visto a seguir.

$$\text{Log} \left( \frac{1}{\text{LC}_{50}} \right) = 2,490(\pm 0,335) - 0,112(\pm 0,0356)\mu + 0,671(\pm 0,0912)\log P \quad \text{Equação 23}$$

$$n=10; R = 0,97; R^2 = 0,94; F = 54,61; s = 0,12; p= 0,00005$$

Os valores entre parênteses correspondem aos desvios-padrão dos coeficientes da equação. O valor de  $R^2$  é alto, e explica 94% da variabilidade da atividade.

A partir da equação 23 os valores de  $\text{Log} (1/\text{LC}_{50})$  foram previstos. Seus valores são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividades larvicidas obtidas dos dados experimentais e previstos para os derivados aril- e fenoximetil-tiosemicarbazônicos usando a equação 23.

<b>Números</b>	<b>Substituintes (R)</b>	<b>LC<sub>50</sub> (prev.)</b> <b>(μ mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LC<sub>50</sub> (exp.)</b> <b>(μ mol L<sup>-1</sup>)</b>
<b>6t</b>	<i>p</i> -F	289,7	310,8
<b>7t</b>	<i>p</i> -Cl	137,4	134,8
<b>9t</b>	<i>p</i> -Br	94,6	122,8
<b>10t</b>	3,4-diCl	46,5	69,7
<b>11t</b>	<i>p</i> -Br	588,8	503,1
<b>12t</b>	<i>p</i> -Cl	502,3	538,5
<b>14t</b>	<i>p</i> -Br	78,0	92,0
<b>15t</b>	<i>p</i> -Cl	115,1	89,9
<b>16t</b>	2,3-diCl	81,8	70,1
<b>17t</b>	3,4-diCl	31,2	20,9

Como podemos notar há, em geral, uma boa concordância entre valores experimentais e previstos.

A partir da tabela 8, valores de  $\text{Log} (1/\text{LC}_{50})$  previstos foram plotados contra seus correspondentes valores experimentais, como mostra a Figura 32.

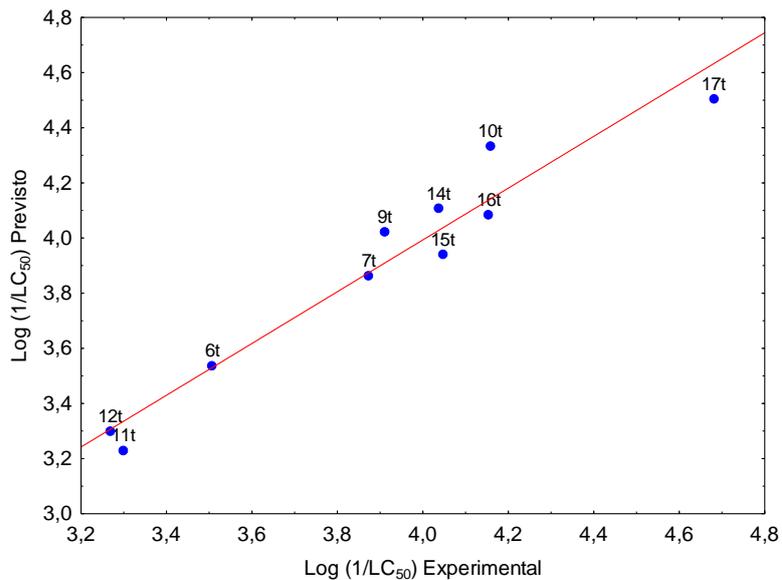


Figura 32 - Valores previstos de  $\text{Log}(1/LC_{50})$  usando a equação (23) *versus* seus correspondentes valores experimentais.

A Figura 33 mostra o gráfico dos resíduos *versus* os valores previstos. Pode-se observar que os resíduos possuem uma distribuição aleatória, garantindo assim que não há falta de ajuste do modelo.

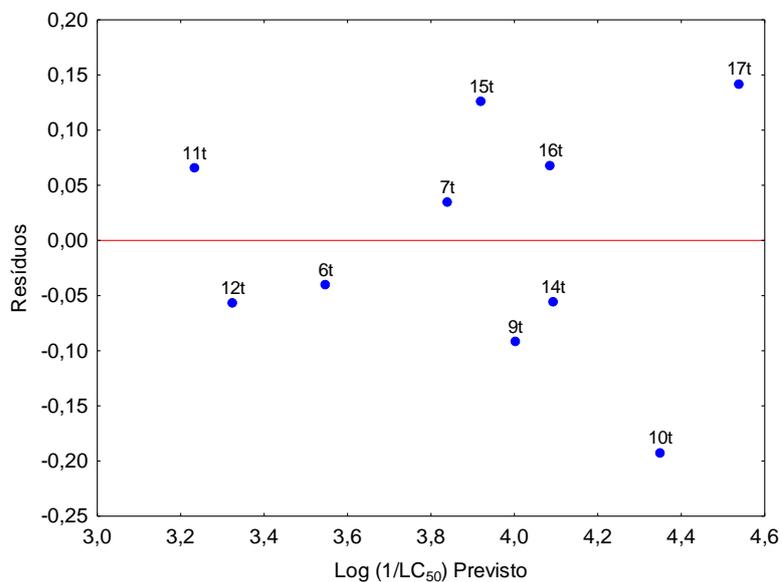


Figura 33 - Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo.

## 5.2 ESTUDOS QSAR DOS DERIVADOS ÁCIDOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPIÔNICOS

### 5.2.1 Análise conformacional da molécula não substituída: Ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônico

Como dito no item 4.2.2 do capítulo 4 desta tese, a estabilidade foi avaliada calculando a energia livre de Gibbs padrão para ambas as conformações, como mostrados na Figura 34.

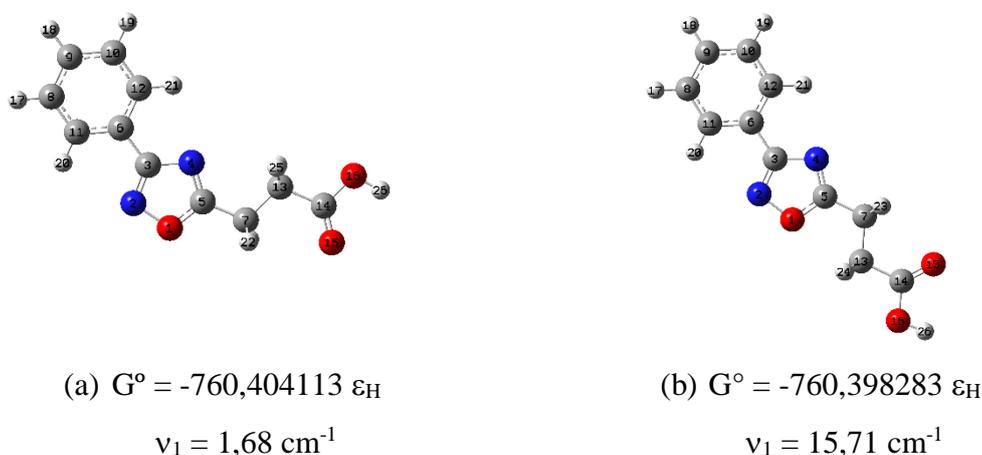


Figura 34 - Molécula não substituída do ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il) propiônico. (a) Conformação 1, (b) Conformação 2, com seus respectivos valores de energia livre padrão ( $G^\circ$ ) e menor frequência de vibração harmônica.

Como podemos observar na Figura 34, ambas as conformações são mínimos na superfície de energia potencial. Entretanto, a conformação 1 se mostrou mais estável que 2, portanto em nossos estudos para essa série utilizamos apenas a conformação 1 para a realização de todos os cálculos.

A Figura 35 mostra o resultado do cálculo B3LYP/6-311G(d,p) (fase gás) da barreira de energia de rotação do grupo fenil em torno da ligação C3–C6, variando-se a cada 10 graus o ângulo diédrico C11C6C3N2.

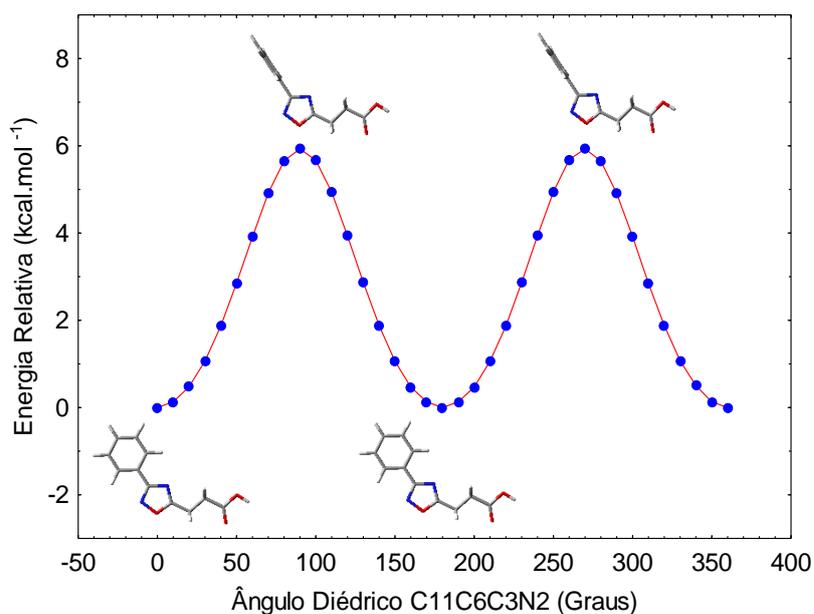
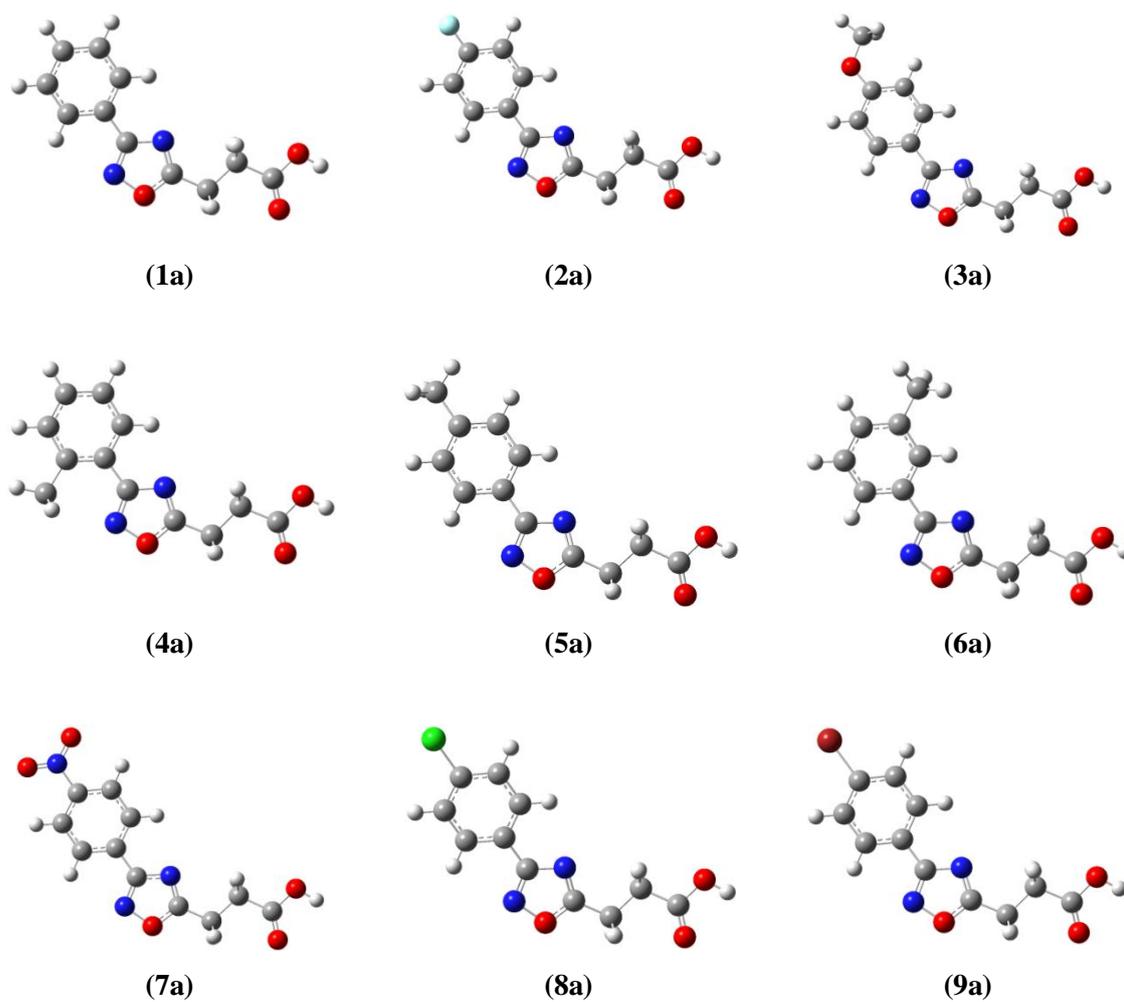


Figura 35 - Gráfico da barreira de rotação em torno da ligação C3–C6 para a molécula não substituída do ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónico usando o método B3LYP/6-311G(d,p).

Como podemos observar, a análise conformacional revela dois pontos de mínimos essencialmente degenerados, que correspondem aos ângulos diédricos de 0° e 180° e de dois máximos de mesma energia em 90° e 270°, devido a quase completa simetria do grupo fenila em torno do anel 1,2,4-oxadiazol.

Ainda no gráfico da Figura 35, é possível calcular o valor da barreira de energia entre o mínimo e o máximo global para a molécula do ácido 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónico, que é de, aproximadamente, 5,93 kcal.mol<sup>-1</sup>.

As estruturas otimizadas para a molécula não substituída e seus 8 derivados substituídos são mostradas na Figura 36, a seguir.



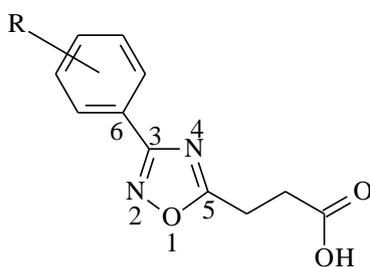
**Legenda:** ● Hidrogênio ● Carbono ● Nitrogênio ● Oxigênio ● Cloro ● Bromo ● Flúor

Figura 36 - Estruturas otimizadas B3LYP/6-311G(d,p) para os nove derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos.

## 5.2.2 Seleção e cálculos dos descritores estruturais

Apresentamos na Tabela 9 os valores das atividades larvicidas dos compostos da série ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos.

Tabela 9 - Nove derivados ácidos 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos com os respectivos valores da atividade larvicida.



Números	Substituintes (R)	LC <sub>50</sub> (ppm)	LC <sub>50</sub> (μmolL <sup>-1</sup> )	Log(1/LC <sub>50</sub> )
<b>1a</b>	H	98,86	453,0	3,344
<b>2a</b>	<i>p</i> -F	81,20	343,8	3,464
<b>3a</b>	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	71,50	288,0	3,541
<b>4a</b>	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	70,90	305,3	3,515
<b>5a</b>	<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	65,80	283,3	3,548
<b>6a</b>	<i>m</i> -CH <sub>3</sub>	63,80	274,7	3,561
<b>7a</b>	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	50,50	191,9	3,717
<b>8a</b>	<i>p</i> -Cl	28,10	111,2	3,954
<b>9a</b>	<i>p</i> -Br	15,20	51,2	4,291

A alta atividade apresentada pelos derivados **8a** e **9a**, com LC<sub>50</sub> = 111,2 e 51,2 μ mol L<sup>-1</sup> respectivamente sugere que a presença de átomos de halogênios ligados ao anel fenílico na posição *para* (F, Cl e Br), está associada a um aumento da atividade larvicida. No entanto, o derivado **2a** apresentou um valor de LC<sub>50</sub> bem maior em relação aos compostos **8a** e **9a**. Segundo Hernandez e colaboradores (HERNANDES et al., 2010) a presença de substituintes volumosos, como os átomos de “Cl” e “Br”, permitem, geralmente, uma maior interação com o sítio ativo de alguns alvos biológicos importantes, pois facilita a ligação nas “cavidades” mais profundas da estrutura molecular desses receptores biomoleculares. Dessa forma, o menor volume do átomo de “F” no composto **2** pode estar relacionado à menor atividade larvicida, sugerindo a relevância deste efeito estérico descrito.

### 5.2.2.1 Análise de regressão para os derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionic

A partir das conformações mais estáveis, as propriedades eletrônicas especificadas anteriormente, ou seja, energia do orbital molecular mais alto ocupado ( $\epsilon_{\text{HOMO}}$ ), energia do orbital molecular mais baixo desocupado ( $\epsilon_{\text{LUMO}}$ ), momento dipolar ( $\mu$ ) e cargas atômicas ( $q_{\text{oi}}$ ), foram calculadas para o método B3LYP/6-311G(d,p), e não foram observadas frequências imaginárias. Estes valores B3LYP/6-311G(d,p) são mostrados na Tabela 10, juntamente com os descritores lipofílicos  $\pi$  e  $\log P$ , além das atividades larvicidas da molécula não substituída e de seus 8 derivados.

Tabela 10 - Atividades larvicidas, descritores eletrônicos B3LYP/6-311G(d,p) e lipofílicos da série ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionic.

Números (R)	Log(1/LC <sub>50</sub> )	$\mu$ (D)	$\epsilon_{\text{HOMO}}$ (eV)	$\epsilon_{\text{LUMO}}$ (eV)	$^1\Delta\epsilon$ (eV)	$q_{\text{C}_3}$ (e)	$q_{\text{C}_6}$ (e)	$q_{\text{N}_2}$ (e)	$q_{\text{N}_4}$ (e)	$q_{\text{O}_1}$ (e)	$^2\Sigma q_{\text{benzeno}}$ (e)	$^3\Sigma q_{\text{anel}}$ (e)	logP	(logP) <sup>2</sup>	$\pi$	$\pi^2$
<b>1a</b>	3,344	2,598	-6,874	-1,506	5,368	0,259	-0,190	-0,142	-0,365	-0,224	-0,501	-0,133	1,780	3,170	0,000	0,000
<b>2a</b>	3,464	2,445	-6,859	-1,562	5,297	0,263	-0,205	-0,144	-0,367	-0,222	-0,225	-0,130	1,980	3,920	0,140	0,020
<b>3a</b>	3,541	2,418	-6,184	-1,265	4,919	0,261	-0,205	-0,150	-0,368	-0,226	-0,282	-0,144	1,860	3,460	-0,020	0,000
<b>4a</b>	3,515	2,232	-6,762	-1,412	5,350	0,255	-0,164	-0,156	-0,372	-0,226	-0,488	-0,161	2,330	5,430	0,560	0,314
<b>5a</b>	3,548	2,834	-6,627	-1,404	5,224	0,257	-0,187	-0,144	-0,366	-0,225	-0,472	-0,139	2,330	5,430	0,560	0,314
<b>6a</b>	3,561	2,988	-6,725	-1,440	5,284	0,257	-0,185	-0,142	-0,366	-0,224	-0,474	-0,136	2,330	5,430	0,560	0,314
<b>7a</b>	3,717	4,868	-7,610	-2,938	4,672	0,266	-0,179	-0,134	-0,364	-0,216	-0,190	-0,107	1,600	2,560	-0,280	0,078
<b>8a</b>	3,954	2,624	-6,900	-1,754	5,146	0,263	-0,194	-0,141	-0,366	-0,221	-0,414	-0,125	2,420	5,860	0,710	0,504
<b>9a</b>	4,291	2,561	-6,821	-1,761	5,060	0,263	-0,192	-0,141	-0,366	-0,221	-0,446	-0,125	2,670	7,130	0,860	0,740

<sup>1</sup> $\Delta\epsilon$  – Diferença de energia entre os orbitais de fronteira ( $\epsilon_{\text{LUMO}} - \epsilon_{\text{HOMO}}$ ).

<sup>2</sup> $\Sigma q_{\text{benzeno}}$  – Somatório das cargas dos átomos de carbono do anel fenílico.

<sup>3</sup> $\Sigma q_{\text{anel}}$  – Somatório das cargas dos átomos do anel 1,2,4-oxadiazol.

A partir dessa matriz de dados, foi obtida a matriz dos coeficientes de correlação; os valores mais significativos (R) entre as variáveis selecionadas e as atividades larvicidas, são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Matriz de correlação das atividades das variáveis calculadas com o método B3LYP/6-311G(d,p) da série ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionic.

	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ	ε <sub>HOMO</sub>	ε <sub>LUMO</sub>	Δε	qC <sub>3</sub>	qC <sub>6</sub>	qN <sub>2</sub>	qN <sub>4</sub>	qO <sub>1</sub>	Σq <sub>benzeno</sub>	Σq <sub>anel</sub>	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
Log(1/LC <sub>50</sub> )	<b>1,00</b>	0,08	-0,18	-0,31	-0,38	0,48	-0,06	0,34	0,21	0,47	-0,03	0,42	0,60	0,65	0,56	0,84
μ	0,08	<b>1,00</b>	-0,79	-0,91	-0,73	0,52	0,26	0,73	0,60	0,79	0,51	0,73	-0,50	-0,46	-0,51	-0,19
ε <sub>HOMO</sub>	-0,18	-0,79	<b>1,00</b>	0,91	0,37	-0,52	-0,39	-0,69	-0,47	-0,87	-0,33	-0,72	0,30	0,27	0,29	0,00
ε <sub>LUMO</sub>	-0,31	-0,91	0,91	<b>1,00</b>	0,73	-0,71	-0,24	-0,72	-0,53	-0,94	-0,55	-0,81	0,40	0,35	0,41	0,03
<sup>1</sup> Δε	-0,38	-0,73	0,37	0,73	<b>1,00</b>	-0,71	0,10	-0,47	-0,39	-0,65	-0,68	-0,61	0,39	0,34	0,44	0,07
qC <sub>3</sub>	0,48	0,52	-0,52	-0,71	-0,71	<b>1,00</b>	-0,46	0,68	0,58	0,84	0,75	0,86	-0,32	-0,28	-0,36	-0,03
qC <sub>6</sub>	-0,06	0,26	-0,39	-0,24	0,10	-0,46	<b>1,00</b>	-0,19	-0,36	0,01	-0,40	-0,27	0,14	0,14	0,16	0,21
qN <sub>2</sub>	0,34	0,73	-0,69	-0,72	-0,47	0,68	-0,19	<b>1,00</b>	0,95	0,83	0,32	0,96	-0,23	-0,18	-0,22	0,07
qN <sub>4</sub>	0,21	0,60	-0,47	-0,53	-0,39	0,58	-0,36	0,95	<b>1,00</b>	0,64	0,23	0,87	-0,28	-0,25	-0,27	-0,05
qO <sub>1</sub>	0,47	0,79	-0,87	-0,94	-0,65	0,84	0,01	0,83	0,64	<b>1,00</b>	0,56	0,92	-0,25	-0,20	-0,27	0,10
Σq <sub>benzeno</sub>	-0,03	0,51	-0,33	-0,55	-0,68	0,75	-0,40	0,32	0,23	0,56	<b>1,00</b>	0,51	-0,62	-0,60	-0,67	-0,49
Σq <sub>anel</sub>	0,42	0,73	-0,72	-0,81	-0,61	0,86	-0,27	0,96	0,87	0,92	0,51	<b>1,00</b>	-0,29	-0,24	-0,30	0,04
logP	0,60	-0,50	0,30	0,40	0,39	-0,32	0,14	-0,23	-0,28	-0,25	-0,62	-0,29	<b>1,00</b>	1,00	0,99	0,91
(logP) <sup>2</sup>	0,65	-0,46	0,27	0,35	0,34	-0,28	0,14	-0,18	-0,25	-0,20	-0,60	-0,24	1,00	<b>1,00</b>	0,99	0,93
π	0,56	-0,51	0,29	0,41	0,44	-0,36	0,16	-0,22	-0,27	-0,27	-0,67	-0,30	0,99	0,99	<b>1,00</b>	0,90
π <sup>2</sup>	0,84	-0,19	0,00	0,03	0,07	-0,03	0,21	0,07	-0,05	0,10	-0,49	0,04	0,91	0,93	0,90	<b>1,00</b>

Da Tabela 11, os descritores que apresentam os maiores coeficientes de correlação com as atividades larvicidas são: a carga atômica do carbono 3 (qC<sub>3</sub>) e do oxigênio 1 (qO<sub>1</sub>), somatório das cargas dos átomos do anel 1,2,4-oxadiazólico (Σq<sub>anel</sub>), além dos descritores lipofílicos π<sup>2</sup> e (logP)<sup>2</sup>. Observando os valores de R, nota-se que alguns descritores são altamente correlacionados entre si; por exemplo, a carga atômica do carbono 3 apresenta um coeficiente de correlação de 0,84 com a carga do oxigênio 1, mostrando que são variáveis linearmente dependentes, e, portanto, não devem ser simultaneamente empregados numa mesma equação de regressão. Da Tabela 11, podemos notar que um melhor ajuste linear pode ser obtido fazendo-se uma regressão linear múltipla para Log (1/LC<sub>50</sub>), com: (i) a carga do carbono 3 mais o descritor empírico π<sup>2</sup>, (ii) a carga atômica do carbono 3 juntamente com o descritor (logP)<sup>2</sup>, obtendo assim dois excelentes modelos matemáticos para a descrição da atividade larvicida. As equações de regressão linear múltipla para Log (1/LC<sub>50</sub>) e esses descritores são mostradas a seguir:

$$\text{Log} \left( \frac{1}{\text{LC}_{50}} \right) = -7,11(\pm 1,59) + 40,39(\pm 6,11)qC_3 + 0,98(\pm 0,087)\pi^2 \quad \text{Equação 24}$$

$$n=9; R = 0,98; R^2 = 0,97; F = 83,38; s = 0,063; p = 0,00004$$

$$\text{Log} \left( \frac{1}{\text{LC}_{50}} \right) = -12,11(\pm 2,88) + 57,54(\pm 10,92)qC_3 + 0,16(\pm 0,027)(\text{logP})^2 \quad \text{Equação 25}$$

$$n=9; R = 0,95; R^2 = 0,90; F = 26,26; s = 0,11; p = 0,0011$$

Os valores entre parênteses correspondem ao valor de um desvio-padrão do coeficiente da variável (descriptor molecular) correspondente nas equações. Neste trabalho, utilizamos o critério que desvios padrões menores que 50% do valor dos coeficientes, tornam o descriptor aceitável na equação.

A qualidade desses modelos tem por base os altos valores de  $R^2$ , pois a equação 24 é capaz de explicar 97% da variância da atividade, enquanto a equação 25 explica 90%. Além disso, as equações de regressão apresentam valores de F grande.

A partir das equações 24 e 25 valores de  $LC_{50}$  foram previstos, cujos valores são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Atividades larvicidas experimentais e previstas para a série dos ácidos 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos usando a equação 24. Os valores entre parênteses foram previstos com a equação 25.

Números	Substituintes	$LC_{50}$ (prev.) ( $\mu$ mol $L^{-1}$ )	$LC_{50}$ (exp.) ( $\mu$ mol $L^{-1}$ )
1a	H	445,7 (444,6)	453,0
2a	<i>p</i> - F	293,8 (198,2)	343,8
3a	<i>p</i> - OCH <sub>3</sub>	369,8 (306,2)	288,0
4a	<i>o</i> - CH <sub>3</sub>	318,4 (329,9)	305,3
5a	<i>p</i> - CH <sub>3</sub>	264,2 (252,3)	283,3
6a	<i>m</i> - CH <sub>3</sub>	264,2 (252,3)	274,7
7a	<i>p</i> - NO <sub>2</sub>	195,0 (219,18)	191,9
8a	<i>p</i> - Cl	98,6 (97,10)	111,2
9a	<i>p</i> - Br	57,8 (60,8)	51,2

Como podemos notar há, em geral, uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos, sendo que a maior diferença é verificada para os derivados **2a** e **3a**.

A partir da Tabela 12, valores de  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  previstos foram plotados contra seus correspondentes valores experimentais, como mostra a Figura 37:

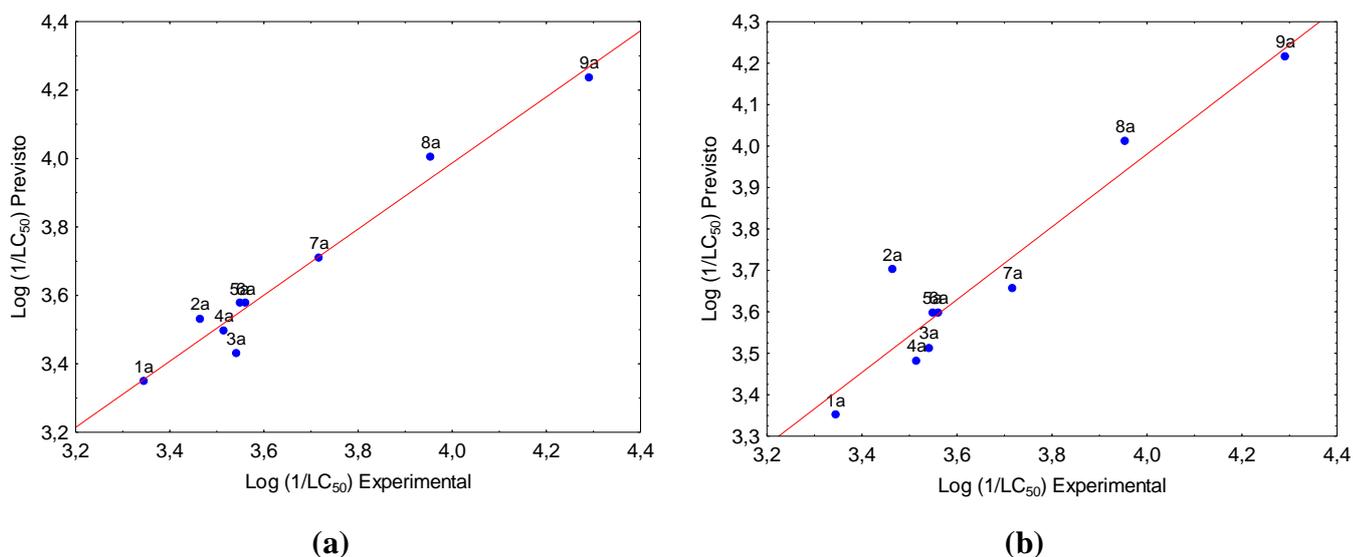


Figura 37 - Valores previstos de  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  versus seus correspondentes valores experimentais: (a) Equação 24 e (b) Equação 25.

Nos gráficos da Figura 38, observa-se uma distribuição aleatória dos resíduos em torno de zero, que corresponde à linha horizontal central. Como os valores dos resíduos estão aleatoriamente distribuídos, e não há nenhum indício de falta de ajuste nos modelos obtidos. Nota-se, também, que o intervalo de valores de resíduos são menores quando calculados com a equação 24 (Figura 38.a) que comparados com aqueles que são calculados com a equação 25 (Figura 38.b).

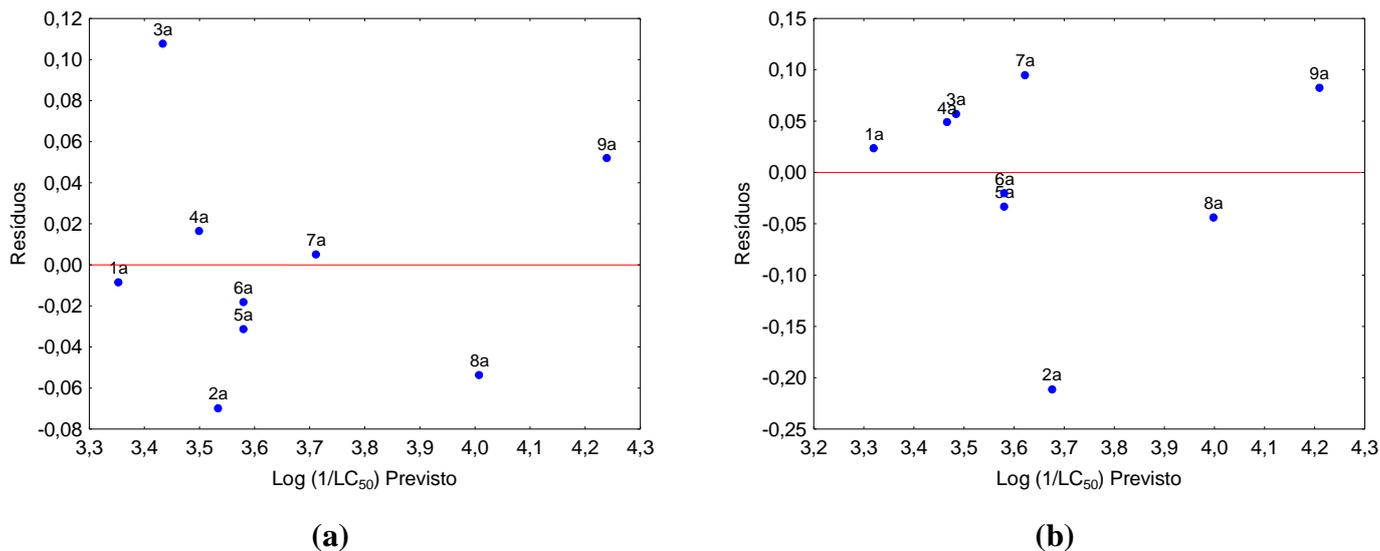


Figura 38 - Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo: a) Equação 24 e b) Equação 25.

A principal diferença entre as equações 24 e 25 é o descritor de hidrofobicidade. Apesar dos parâmetros da regressão e o gráfico dos resíduos serem mais favoráveis a equação 24, vale destacar que o propósito de previsibilidade dessas equações de QSAR podem nos remeter a um substituinte cujo valor do parâmetro  $\pi$  seja pouco confiável (devido a erros experimentais) ou mesmo desconhecido. Por estas razões, a equação 25, onde o  $\log P$  pode ser calculado por programas computacionais torna-se uma alternativa interessante e justifica, portanto, a sua apresentação neste trabalho.

Como explicado no item 4.4 da metodologia, foi utilizado o modelo do efeito solvente, a fim de obter outros modelos de QSAR. Apesar do esforço computacional, a introdução da descrição do solvente não mostrou-se significativa do ponto de vista do modelo de QSAR. As matrizes de dados, de correlação e as equações de regressão podem ser apreciadas no Apêndice E desta tese.

### 5.3 ESTUDOS QSAR DOS DERIVADOS ÉSTERES 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPANOATO DE METILA

#### 5.2.2 Análise conformacional da molécula não substituída: 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila

A Figura 39 mostra o resultado B3LYP/6-311G(d,p) da barreira de energia de rotação interna do grupo fenil em torno da ligação C3–C6, variando-se a cada 10 graus o ângulo diédrico C11C6C3N2.

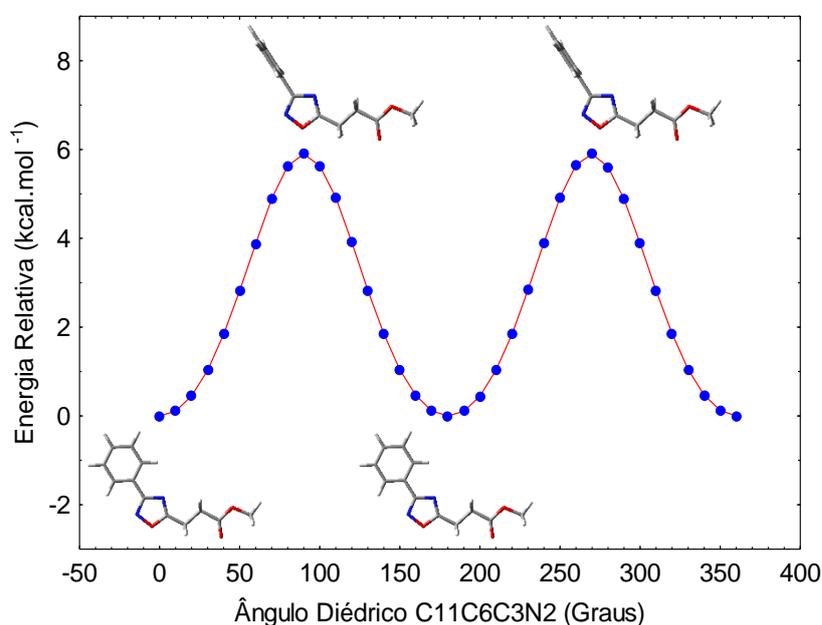


Figura 39 - Gráfico da barreira de rotação em torno da ligação C3–C6 para a molécula não substituída de 3-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila usando o método B3LYP/6-311G(d,p).

Podemos observar também nesse gráfico, que a metodologia utilizada revela dois pontos de mínimos e máximos degenerados. Os pontos de mínimos correspondem aos ângulos diédricos de 0 e 180°, enquanto os máximos são observados em 90° e 270°, como mostra a Figura 39.

Ainda no gráfico da Figura 39, pode-se calcular o valor da barreira de energia, que é de aproximadamente 5,93 kcal/mol, ou seja, o mesmo valor revelado pela molécula não substituída da série de ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos. As estruturas otimizadas para os 14 derivados dessa série são mostradas a seguir.

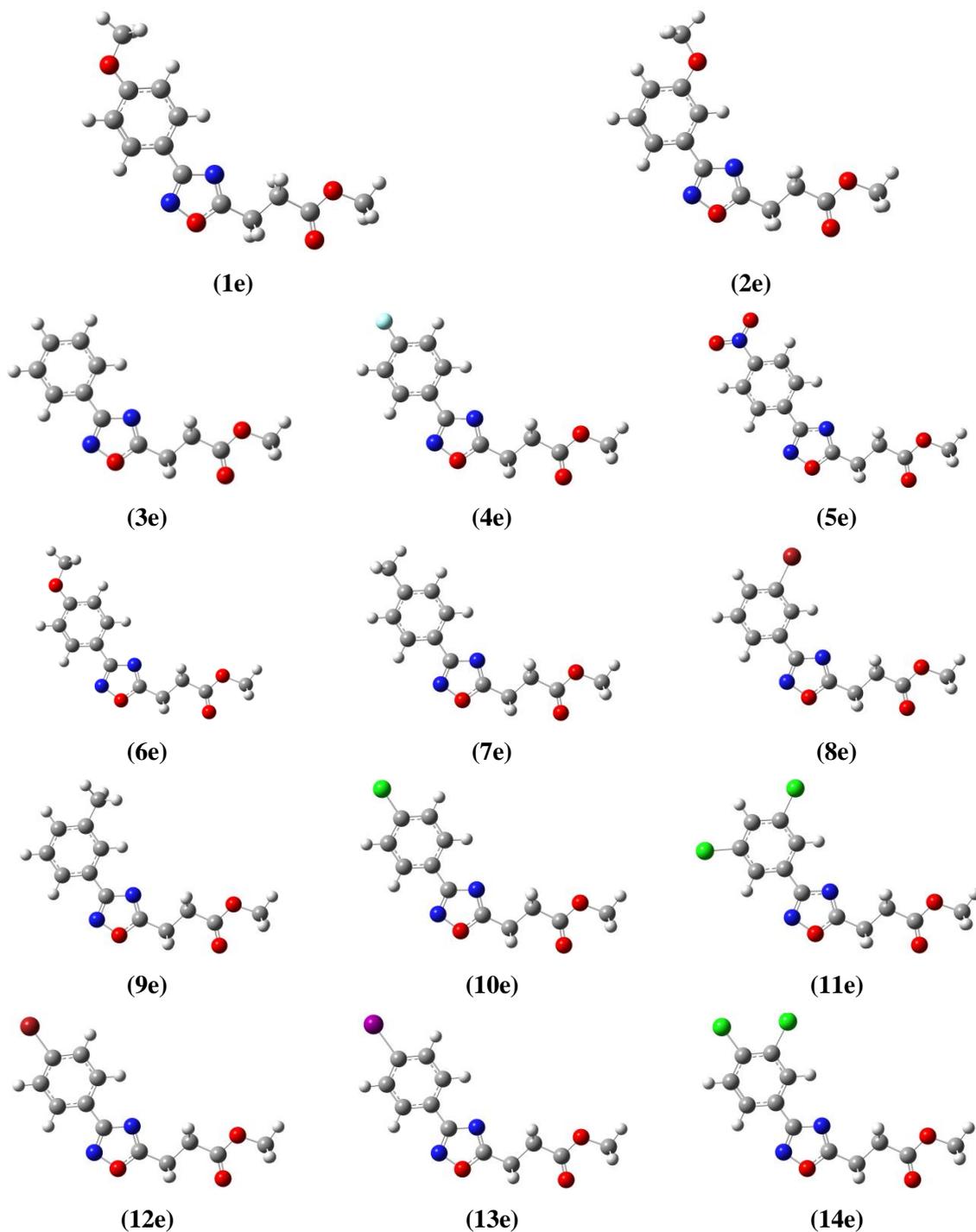


Figura 40 - Estruturas otimizadas para os doze derivado 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il) propanoato de metila, usando o método B3LYP/6-311G(d,p).

Como foi dito anteriormente, essa terceira série de compostos também foi sintetizada e tiveram suas atividades larvicidas avaliadas no DQF/UFPE, frente ao estágio L4 do *Aedes aegypti*. Os resultados destes bioensaios realizados são mostrados na Tabela 13, com seus respectivos valores de LC<sub>50</sub>.

Tabela 13 - Quatorze derivados 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila com os respectivos valores da atividade larvicida.

Números	Substituintes (R)	LC <sub>50</sub> (ppm)	LC <sub>50</sub> (μ mol L <sup>-1</sup> )	Log (1/LC <sub>50</sub> )
1e	<i>o</i> - OCH <sub>3</sub>	>100	>381,3	-
2e	<i>m</i> - OCH <sub>3</sub>	>100	>381,3	-
3e	H	30,65	132,0	3,879
4e	<i>p</i> - F	27,55	110,1	3,958
5e	<i>p</i> - NO <sub>2</sub>	23,73	85,6	4,068
6e	<i>p</i> - OCH <sub>3</sub>	21,26	81,1	4,091
7e	<i>p</i> - CH <sub>3</sub>	18,68	75,9	4,120
8e	<i>m</i> - Br	15,91	51,1	4,292
9e	<i>m</i> - CH <sub>3</sub>	14,39	58,4	4,234
10e	<i>p</i> - Cl	6,29	23,6	4,627
11e	3,5 - DiCl <sub>2</sub>	5,81	19,3	4,714
12e	<i>p</i> - Br	5,08	16,3	4,788
13e	<i>p</i> - I	2,68	7,5	5,125
14e	3,4 - DiCl <sub>2</sub>	2,54	8,4	5,076

Podemos observar na Tabela 13, que de acordo com Cheng e colaboradores (CHENG, 2003), dos 14 derivados de 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il) propanoato de metila, avaliados, apenas os compostos 1e e 2e não apresentaram atividade larvicida, com valores

de LC<sub>50</sub> superiores a 100 ppm, enquanto todos os outros derivados dessa série se mostraram bastante ativos (LC<sub>50</sub> < 50 ppm).

Pode-se observar na Tabela 13 que os derivados 3-(3-*para*-substituído-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila, dissustituídos no anel aromático com átomos de cloro **11e** e **14e** (LC<sub>50</sub> = 19,3 e 8,4 μ mol L<sup>-1</sup>) mostraram-se mais ativos em relação ao composto monoclorado **10e** (23,6 μ mol L<sup>-1</sup>), como relatado por Bordas e colaboradores (BORDAS et al., 1989).

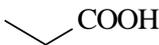
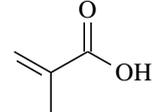
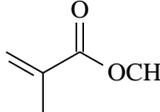
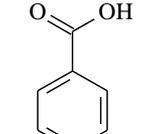
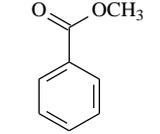
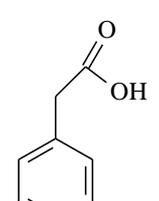
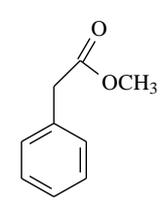
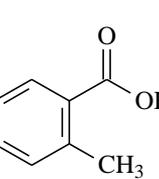
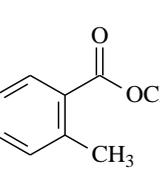
Ao comparar as atividades larvicidas dos derivados ésteres 3-(3-*para*-substituído-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila, com seus respectivos ácidos 3-(3-*para*-substituído-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos, percebe-se que os ésteres são mais ativos (Tabela 14). Por exemplo, para os compostos substituídos com o cloro na posição *para* o valor de LC<sub>50</sub> para o éster **10e** foi de 23,6 μ mol L<sup>-1</sup>, ou seja, um valor numérico bem menor que o obtida para seu análogo ácido **8a** (LC<sub>50</sub>=111,2 μ mol L<sup>-1</sup>).

Tabela 14 - Comparação entre os valores de LC<sub>50</sub> e logP dos ésteres com seus respectivos ácidos 1,2,4-oxadiazólicos.

Substituinte	LC <sub>50</sub> (μ mol L <sup>-1</sup> )		logP	
	Éster	Ácido	Éster	Ácido
H	132,0	453,0	2,07	1,78
<i>p</i> - F	110,1	343,8	2,27	1,98
<i>p</i> - NO <sub>2</sub>	85,6	191,9	1,88	1,60
<i>p</i> - OCH <sub>3</sub>	81,1	288,0	2,15	1,86
<i>p</i> - CH <sub>3</sub>	75,9	283,2	2,61	2,33
<i>m</i> - CH <sub>3</sub>	58,4	274,7	2,61	2,33
<i>p</i> - Cl	23,6	111,2	2,71	2,42
<i>p</i> - Br	16,3	51,2	2,96	2,67

Comparando-se os valores de logP dos ácidos em relação aos ésteres (Tabela 14), pode-se observar que esses últimos derivados apresentaram um valor de logP maior. Esses resultados corroboram com dados experimentais da literatura (SANGSTER, 1989), como mostra a Tabela 15.

Tabela 15 - Comparação entre os valores de logP experimentais entre alguns ácidos com seus respectivos ésteres. Adaptado de (SANGSTER, 1989).

Ácidos	logP	Ésteres	logP
	-0,17		0,18
	0,93		1,38
	1,87		2,20
	1,41		1,83
	2,46		2,75

Pode-se observar na Tabela 15, que o valor do logP do éster é sempre maior do que o do ácido correspondente, corroborando com nossos valores de logP calculados.

Para esta terceira série de compostos, também foram realizados cálculos de orbitais B3LYP/6-311G(d,p). A partir das conformações mais estáveis, as propriedades eletrônicas especificadas no capítulo anterior foram calculadas e aqui também não foram observadas frequências imaginárias. Estes valores são mostrados na Tabela 16, juntamente com o descritor  $\pi$  e logP, além das atividades larvicidas desses derivados.

Tabela 16 - Atividades larvicidas, descritores eletrônicos B3LYP/6-311G (d,p), e lipofílicos da série 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.

Números (R)	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ (D)	ε <sub>HOMO</sub> (eV)	ε <sub>LUMO</sub> (eV)	<sup>1</sup> Δε (eV)	qC <sub>3</sub> (e)	qC <sub>6</sub> (e)	qN <sub>2</sub> (e)	qN <sub>4</sub> (e)	qO <sub>1</sub> (e)	<sup>2</sup> Σq <sub>benzeno</sub> (e)	<sup>3</sup> Σq <sub>anel</sub> (e)	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
3e	3,879	3,091	-6,838	-1,466	5,372	0,258	-0,190	-0,142	-0,365	-0,224	-0,503	-0,138	2,070	4,285	0,000	0,000
4e	3,958	3,109	-6,284	-1,523	5,301	0,262	-0,205	-0,144	-0,367	-0,223	-0,226	-0,136	2,270	5,153	0,140	0,020
5e	4,068	5,463	-7,573	-2,912	4,661	0,265	-0,178	-0,134	-0,363	-0,217	-0,192	-0,112	1,880	3,534	-0,280	0,078
6e	4,091	4,644	-6,165	-1,196	4,969	0,260	-0,205	-0,149	-0,369	-0,227	-0,283	-0,150	2,150	4,622	-0,020	0,000
7e	4,120	3,224	-6,596	-1,362	5,234	0,256	-0,187	-0,144	-0,366	-0,226	-0,471	-0,145	2,610	6,812	0,560	0,314
9e	4,234	3,472	-6,694	-1,402	5,292	0,256	-0,185	-0,142	-0,366	-0,225	-0,475	-0,142	2,610	6,812	0,560	0,314
10e	4,627	3,301	-6,868	-1,717	5,151	0,263	-0,195	-0,141	-0,366	-0,222	-0,416	-0,130	2,710	7,344	0,710	0,504
11e	4,714	3,497	-7,264	-2,015	5,249	0,261	-0,202	-0,136	-0,365	-0,218	-0,329	-0,121	3,350	11,223	1,420	2,020
12e	4,788	3,248	-6,792	-1,724	5,068	0,262	-0,192	-0,141	-0,366	-0,222	-0,447	-0,131	2,960	8,762	0,860	0,740
13e	5,125	3,217	-6,637	-1,727	4,911	0,261	-0,190	-0,141	-0,365	-0,222	-0,762	-0,131	3,230	10,433	1,120	1,250
14e	5,076	2,633	-7,017	-1,926	5,091	0,264	-0,200	-0,139	-0,366	-0,220	-0,348	-0,124	3,350	11,223	1,420	2,020

A partir da matriz acima, foi obtida a matriz dos coeficientes de correlação (Tabela 17):

Tabela 17 - Matriz de correlação das atividades e das variáveis calculadas com o método B3LYP/6-311G (d,p) da série 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.

	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ	ε <sub>HOMO</sub>	ε <sub>LUMO</sub>	Δε	qC <sub>3</sub>	qC <sub>6</sub>	qN <sub>2</sub>	qN <sub>4</sub>	qO <sub>1</sub>	Σq <sub>benzeno</sub>	Σq <sub>anel</sub>	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
Log(1/LC <sub>50</sub> )	1,00	-0,41	-0,10	-0,18	-0,23	0,39	-0,15	0,33	0,13	0,40	-0,45	0,39	0,90	0,91	0,88	0,84
μ	-0,41	1,00	-0,22	-0,49	-0,71	0,25	0,33	0,17	0,18	0,19	0,48	0,21	-0,61	-0,57	-0,62	-0,42
ε <sub>HOMO</sub>	-0,10	-0,22	1,00	0,90	0,26	-0,56	-0,34	-0,95	-0,83	-0,92	-0,37	-0,93	-0,04	-0,09	-0,08	-0,30
ε <sub>LUMO</sub>	-0,18	-0,49	0,90	1,00	0,65	-0,71	-0,42	-0,89	-0,79	-0,91	-0,35	-0,94	0,02	-0,03	0,01	-0,24
<sup>1</sup> Δε	-0,23	-0,71	0,26	0,65	1,00	-0,60	-0,34	-0,33	-0,30	-0,42	-0,13	-0,47	0,12	0,09	0,17	-0,01
qC <sub>3</sub>	0,39	0,25	-0,56	-0,71	-0,60	1,00	-0,17	0,51	0,26	0,74	0,42	0,76	0,11	0,15	0,10	0,30
qC <sub>6</sub>	-0,15	0,33	-0,34	-0,42	-0,34	-0,17	1,00	0,42	0,71	0,15	-0,28	0,24	-0,27	-0,27	-0,28	-0,29
qN <sub>2</sub>	0,33	0,17	-0,95	-0,89	-0,33	0,51	0,42	1,00	0,89	0,94	0,13	0,94	0,26	0,30	0,28	0,47
qN <sub>4</sub>	0,13	0,18	-0,83	-0,79	-0,30	0,26	0,71	0,89	1,00	0,73	-0,12	0,77	0,03	0,07	0,05	0,19
qO <sub>1</sub>	0,40	0,19	-0,92	-0,91	-0,42	0,74	0,15	0,94	0,73	1,00	0,28	0,99	0,28	0,34	0,30	0,53
Σq <sub>benzeno</sub>	-0,45	0,48	-0,37	-0,35	-0,13	0,42	-0,28	0,13	-0,12	0,28	1,00	0,25	-0,43	-0,41	-0,40	-0,20
Σq <sub>anel</sub>	0,39	0,21	-0,93	-0,94	-0,47	0,76	0,24	0,94	0,77	0,99	0,25	1,00	0,24	0,29	0,25	0,48
logP	0,90	-0,61	-0,04	0,02	0,12	0,11	-0,27	0,26	0,03	0,28	-0,43	0,24	1,00	1,00	1,00	0,92
(logP) <sup>2</sup>	0,91	-0,57	-0,09	-0,03	0,09	0,15	-0,27	0,30	0,07	0,34	-0,41	0,29	1,00	1,00	0,99	0,94
π	0,88	-0,62	-0,08	0,01	0,17	0,10	-0,28	0,28	0,05	0,30	-0,40	0,25	1,00	0,99	1,00	0,93
π <sup>2</sup>	0,84	-0,42	-0,30	-0,24	-0,01	0,30	-0,29	0,47	0,19	0,53	-0,20	0,48	0,92	0,94	0,93	1,00

Da Tabela 17, podemos notar que um bom ajuste linear pode ser obtido fazendo-se uma regressão linear múltipla para Log (1/LC<sub>50</sub>), com os descritores qC<sub>3</sub> e logP obtendo

assim um excelente modelo matemático para a descrição da atividade larvicida. A equação de regressão linear múltipla para  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  e esses descritores é mostrada a seguir:

$$\text{Log}\left(\frac{1}{\text{LC}_{50}}\right) = -9,08(\pm 1,39) + 44,13(\pm 16,93)qC_3 + 0,75(\pm 0,097)\log P \quad \text{Equação 26}$$

n=11; R = 0,95; R<sup>2</sup> = 0,90; F = 36,22; s = 0,16; p= 0,0001

Os valor de R<sup>2</sup> é alto e capaz de explicar 90% da variabilidade da atividade larvicida.

A partir da equação 26 valores de LC<sub>50</sub> foram previstos (Tabela 18).

Tabela 18 - Atividades larvicidas obtidas dos dados experimentais e previstos da série 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila usando a equação 26.

Números	Substituintes (R)	LC <sub>50</sub> (prev.) (μ mol L <sup>-1</sup> )	LC <sub>50</sub> (exp.) (μ mol L <sup>-1</sup> )
3e	H	138,7	132,0
4e	<i>p</i> - F	65,3	110,1
5e	<i>p</i> - NO <sub>2</sub>	94,6	85,6
6e	<i>p</i> - OCH <sub>3</sub>	98,6	81,1
7e	<i>p</i> - CH <sub>3</sub>	66,8	75,9
9e	<i>m</i> - CH <sub>3</sub>	66,8	58,4
10e	<i>p</i> - Cl	27,6	23,6
11e	3,5 - DiCl <sub>2</sub>	11,2	19,3
12e	<i>p</i> - Br	19,7	16,3
13e	<i>p</i> - I	13,8	7,5
14e	3,4 - DiCl <sub>2</sub>	8,3	8,4

Como podemos notar há, em geral, uma boa concordância entre valores experimentais e previstos.

Também foi gerado um gráfico dos valores de  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  previstos *versus* os valores experimentais, como mostra a Figura 41.

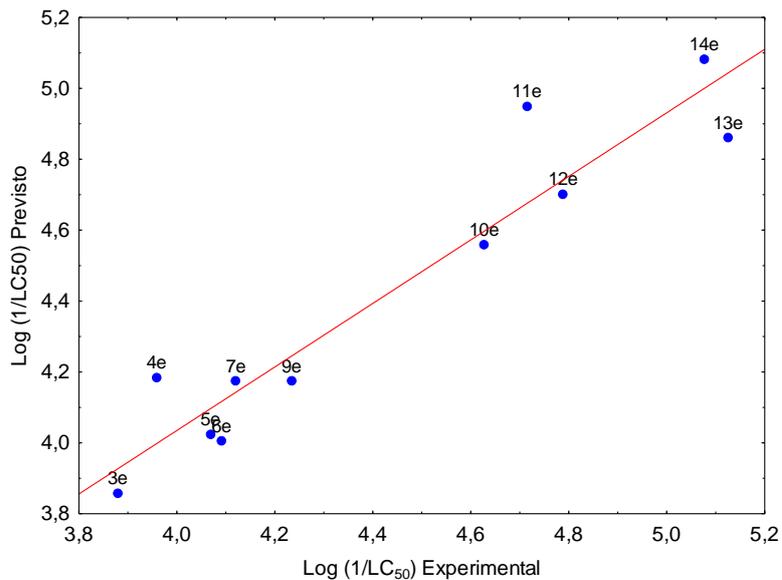


Figura 41 - Valores previstos do  $\text{Log}(1/LC_{50})$  versus seus correspondentes valores experimentais usando a equação 26.

No gráfico da Figura 42, observa-se uma distribuição aleatória dos resíduos em torno de zero. Como os resíduos estão aleatoriamente distribuídos, o modelo obtido para essa série de compostos segue uma distribuição linear.

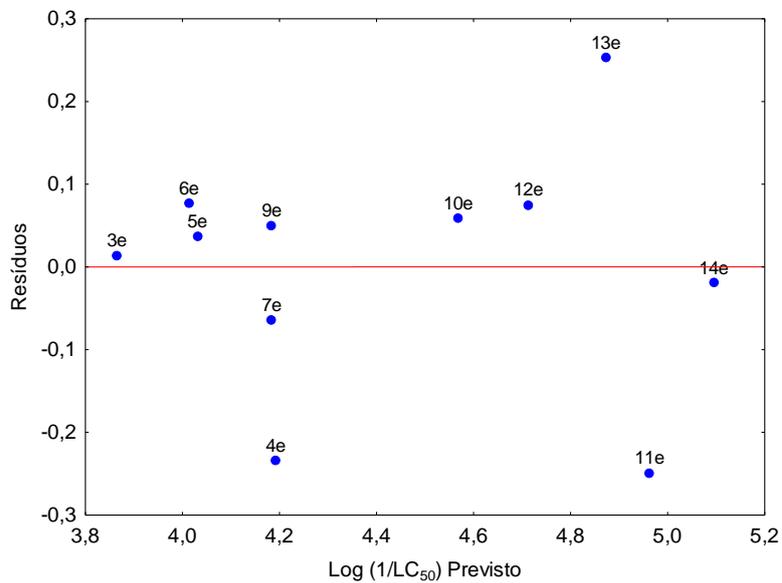


Figura 42 - Gráfico dos resíduos deixados pelo modelo.

### 5.3 PREVISÃO DE NOVOS AGENTES LARVICIDAS

#### 5.3.2 Derivados aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos

A equação de QSAR obtida para essa série revela a importância da hidrofobicidade na descrição da atividade larvicida. A equação 23 mostra que essa atividade depende do momento de dipolo molecular ( $\mu$ ) e do coeficiente de partição octanol/água ( $\log P$ ), com coeficientes negativo e positivo respectivamente.

É importante salientar, em se tratando de  $LC_{50}$ , compostos mais ativos deverão estar associados a valores baixos desta grandeza. Portanto, uma pequena concentração é suficiente para a obtenção de 50% da letalidade larval, ou seja, a qualidade larvicida de um composto está relacionada à quantidade necessária do mesmo para surtir o efeito desejado, de modo que compostos mais ativos são eficientes em baixas concentrações.

O modelo obtido para essa série sugere que substituintes que diminuem o momento de dipolo e aumentam o coeficiente de partição octanol/água garantem aos compostos menores valores de  $LC_{50}$ .

Para essa série, foi projetado um novo derivado, **18t** que exibiu uma alta atividade larvicida depois de sintetizado. Também analisou-se um composto que exibiu atividade intermediária **13t** e outro que não apresentou atividade larvicida **4t**. Esses compostos não foram utilizados no conjunto de treinamento, para a obtenção da equação 23. Esses compostos com suas estruturas otimizadas, são mostrados na Figura 43.

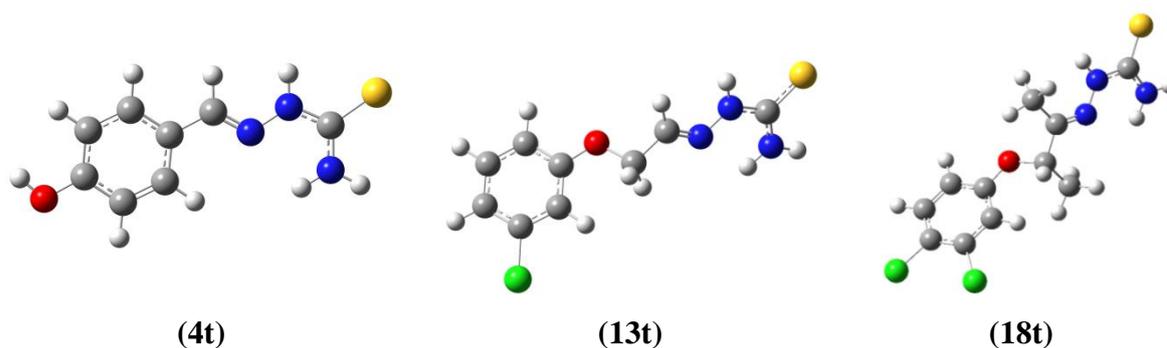


Figura 43 - Composto projetado 18t e derivados analisados 4t e 13t utilizando a equação 23.

Os valores dos descritores  $\log P$  e  $\mu$ , bem como as atividades larvicidas previstas pela equação (23) e experimentais estão apresentadas na Tabela 19:

Tabela 19 - Descritores físico-químicos, com as atividades larvicidas previstas (equação 23) e experimentais.

Derivados	logP	$\mu$ (D)	LC <sub>50</sub> (prev.) ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	LC <sub>50</sub> (exp.) ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )
<b>4t</b>	0,56	6,02	6434,0	>1024,4
<b>13t</b>	2,65	4,66	179,38	287,2
<b>18t</b>	4,87	3,31	4,10	3,95

O derivado projetado **18t** apresentou uma atividade larvicida prevista de 4,10  $\mu$  mol L<sup>-1</sup> e quanto sintetizado sua atividade foi de 3,95  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>, mostrando que o modelo obtido realiza boas previsões fora do conjunto de treinamento.

Também foi prevista a atividade do derivado **13t** que apresentou atividade larvicida intermediária. O valor de LC<sub>50</sub> previsto para esse derivado foi de 179,38  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>, enquanto seu valor experimental foi de 287,2  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>.

Ainda na Tabela 19 podemos observar que o composto **4t** é inativo, frente a larvas dos mosquitos *aedes aegypti* (LC<sub>50</sub>> 1024,4  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>). Esse composto também foi analisado com a equação 23, onde sua atividade prevista foi de 6434,0  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>, indicando que a previsão feita pelo nosso modelo é bastante satisfatória.

### 5.3.3 Derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il) propiônicos

Observando as equações 24 e 25, nota-se que a atividade larvicida é linearmente dependente de um descritor eletrônico ( $qC_3$ ) e de dois descritores empíricos que expressam a hidrofobicidade (logP ou  $\pi$ ).

Os modelos obtidos nesse trabalho indicam que para a projeção teórica de um novo agente larvicida, potencialmente mais ativo que os demais compostos utilizados no conjunto de treinamento, sugerem a introdução de um substituinte no anel fenílico que, de acordo com nossas equações de QSAR obtidas, apresente as seguintes características:

- (i) Ser um substituinte “retirador de elétrons”, pois dessa forma o efeito indutivo provocado por esse substituinte irá deixar mais positiva a carga atômica do carbono 3.
- (ii) Introduzir um substituinte que confira aos novos compostos projetados um acentuado caráter hidrofóbico.

Isto produz menores valores de LC<sub>50</sub>.

Essas características, correspondem a importância anteriormente observadas na literatura, tanto no que diz respeito ao descritor hidrofóbico (DE SOUSA et al., 2010; HANSCH; VERMA, 2009; SANTOS et al., 2011), assim como o efeito eletrônico (NEVES FILHO et al., 2009), para a descrição de uma alta atividade larvicida frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

A fim de verificar a previsibilidade desse modelo, e tomando como referência essas características, fomos consultar na literatura especializada, substituintes que pudessem atender a essas condições. Para isso, foi consultado valores de  $\sigma$  de Hammet de vários substituintes ligados diretamente ao anel fenílico, capazes de retirar carga do carbono 3 de acordo com a numeração adotada nesse trabalho. Também foi analisado o quanto esses substituintes aumentavam ou não a hidrofobicidade dos compostos a serem previstos, garantindo assim um aumento ou não das atividades dos mesmos. Após essas análises, foram realizadas simulações com substituintes que não fizeram parte do conjunto de treinamento. Tomando como base as características acima, foi possível planejar quatro novos agentes larvicidas, mais ativos do que aqueles empregados no conjunto de treinamento, cujos substituintes são mostrados na Figura 44:

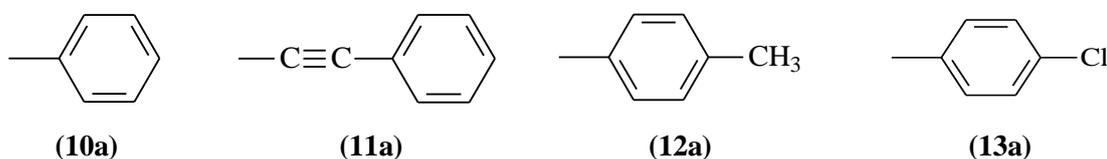


Figura 44 - Substituintes utilizados na previsão dos 4 novos derivados bastante ativos.

Os quatro compostos, com suas estruturas já otimizadas, são mostradas na Figura 45:

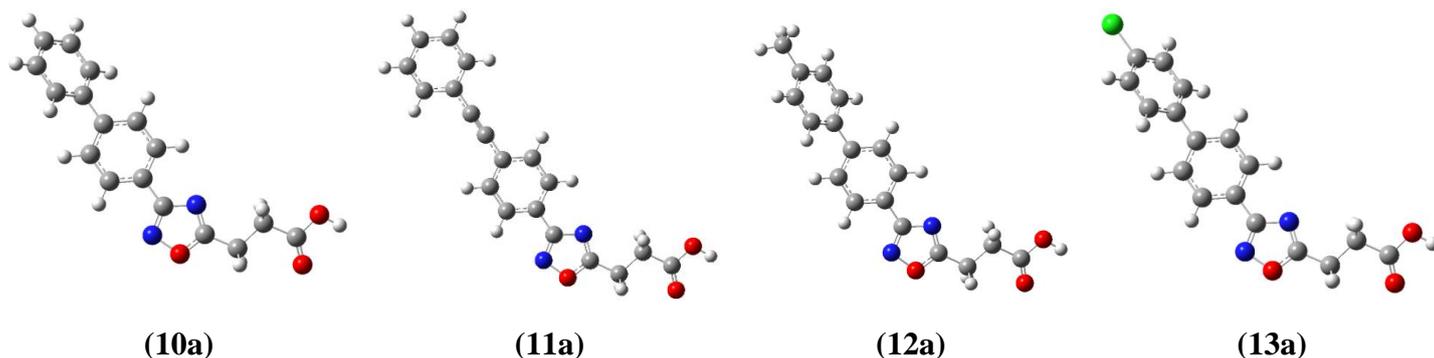


Figura 45 - Compostos previstos, utilizando as equações 24 e 25 obtidas por estudos QSAR.

Os valores dos descritores  $(\log P)^2$ ,  $\pi^2$  e  $qC_3$ , bem como as atividades larvicidas previstas pelas equações 24 e 25 e experimentais estão apresentadas na Tabela 20:

Tabela 20 - Descritores físico-químicos, atividades larvicidas previstas (equação 25) e experimentais para os três derivados ácidos propostos. Os valores entre parênteses indicam a previsão com a equação 24.

Derivados	$\pi^2$	$(\log P)^2$	$qC_3$ (e)	LC <sub>50</sub> (prev.) ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	LC <sub>50</sub> (exp.) ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )
<b>10a</b>	3,84	12,53	0,255	24,0 (0,11)	55,3
<b>11a</b>	-	14,52	0,249	23,6 ( - )	23,9
<b>12a</b>	-	16,73	0,255	5,12 ( - )	13,4
<b>13a</b>	-	17,53	0,256	3,34 ( - )	7,45

Observando a Tabela 20, nota-se que os novos derivados **10a**, **11a**, **12a** e **13a**, se mostraram de fato bastante ativos, quando sintetizados por nosso grupo de pesquisa, com valores de LC<sub>50</sub> de 55,3; 23,9; 13,4 e 7,45  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os derivados **11a**, **12a** e **13a** apresentaram atividades larvicidas bem maiores em relação ao composto **9a** (LC<sub>50</sub>=51,2  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>), enquanto o derivado **10a** apresentou um valor de LC<sub>50</sub> semelhante a esse último derivado. Esses resultados corroboraram também com os obtidos por Neves Filho e colaboradores (NEVES FILHO et al., 2009), indicando mais uma vez que a presença de substituintes do grupo dos halogêneos, nesse caso o cloro no derivado **13a**,



Tabela 21 - Descritores físico-químicos, com as atividades larvicidas previstas (equação 26) e experimentais.

Derivados	logP	qC <sub>3</sub> (e)	LC <sub>50</sub> (prev.) (μ mol L <sup>-1</sup> )	LC <sub>50</sub> (exp.) (μ mol L <sup>-1</sup> )
<b>2e</b>	2,15	0,258	120,7	>381,3
<b>8e</b>	2,96	0,260	19,9	51,10
<b>15e</b>	3,89	0,254	8,98	6,07

O composto projetado foi o **15e** que apresentou uma atividade larvicida prevista de 8,98 μ mol L<sup>-1</sup> e quando sintetizado sua atividade foi de 6,07 μ mol L<sup>-1</sup> (Tabela 21). Nesta tabela podemos ainda notar que o composto **2e**, conforme esperado, apresentou atividade larvicida baixa, seu LC<sub>50</sub> previsto foi de 120,7 μ mol L<sup>-1</sup>, enquanto seu valor experimental foi maior que 381,3 μ mol L<sup>-1</sup>.

Também decidimos excluir um composto do conjunto de treinamento **8e** a fim de testar a previsibilidade da equação 26. A atividade experimental desse composto foi de 51,10 μ mol L<sup>-1</sup> enquanto o valor previsto foi de 19,9 μ mol L<sup>-1</sup>.

## 5.4 ESTUDOS DE *DOCKING* MOLECULAR

### 5.4.2 Re- docking

Como explicado no item 4.6.1 da metodologia, foram realizados cálculos de *docking* molecular para as três séries de compostos estudadas nesse trabalho, utilizando para isso três *grids* diferentes, com tamanhos de (i) 50x50x50 Å (ii) 60x60x60 Å (iii) 70x70x70 Å. Os resultados do *re-docking*, considerando a conformação mais estável para esses três *grids* apresentaram valores de RMSD iguais a 0,96 Å; 0,97 Å e 1,12 Å e energias de ligação de -8,18; -8,18 e -8,09 kcal.mol<sup>-1</sup> respectivamente. A comparação por sobreposição estrutural com o complexo original revelou um modo de ligação similar à conformação original. A Figura 47 mostra a pose cristalográfica original (verde) e após o *Re-Docking* (marrom) do ácido palmítico no sítio de ligação, para o *grid* 50x50x50 Å, pois o mesmo apresentou o menor valor do RMSD e a maior energia de ligação.

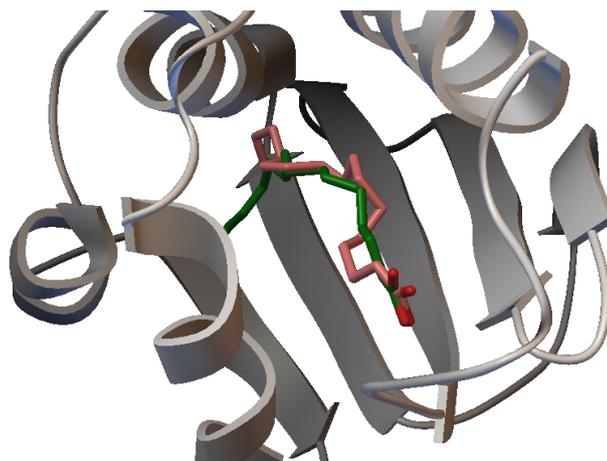


Figura 47 - Sobreposição do ácido palmítico original (verde) e da melhor pose de *docking* (marrom), com RMSD=0,96 Å.

Esses mesmos parâmetros foram utilizados no *docking* molecular dos derivados: (i) aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos, (ii) ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos e (iii) 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.

### 5.4.3 *Docking* molecular dos derivados aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos

Esta série de compostos, foi estudada via *docking* molecular, na proteína AeSCP-2. Nesse estudo, essa série foi dividida em dois grupos: (i) quatro derivados de aril-tiossemicarbazonas e (ii) sete derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas.

#### 5.4.3.1 *Docking* molecular dos derivados de aril-tiossemicarbazonas

Os resultados obtidos para os *dockings* desses derivados indicaram que todos os compostos ficaram localizados no sítio ativo da proteína. Isso pode ser observado na Figura 48, onde são mostrados os derivados **6t**, **7t**, **9t** e **10t** interagindo com alguns resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo do AeSCP-2.

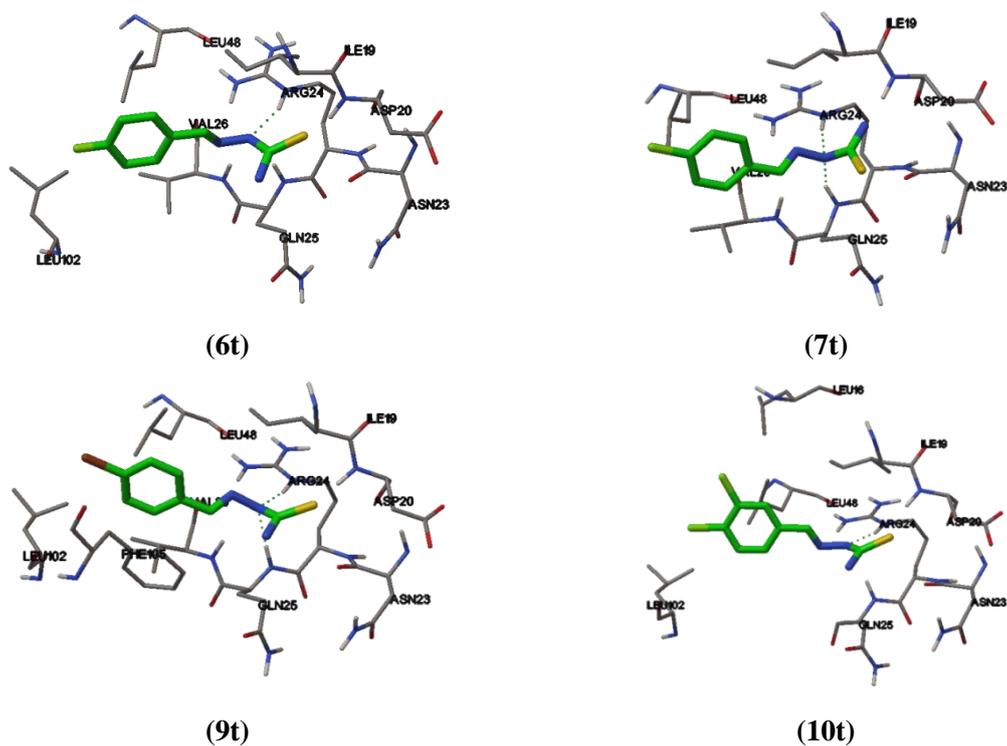


Figura 48 - Ilustração dos complexos da proteína *AeSCP-2* com os derivados de aril-tiossemicarbazonas. Os derivados de aril-tiossemicarbazonas estão representados pela cadeia verde.

A Figura 49 mostra a sobreposição das melhores poses de *docking* obtidas para esses 4 derivados.

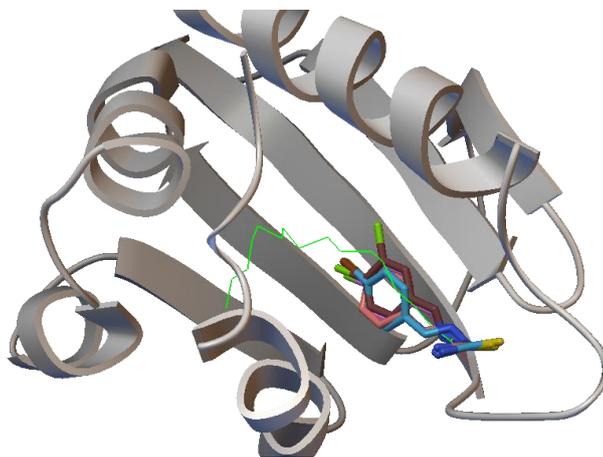


Figura 49 - Estruturas do ácido palmítico (linha verde) e derivados de aril-tiossemicarbazonas sobrepostas após *docking* molecular na proteína *AeSCP-2*.

As melhores poses de encaixe selecionadas no estudo de *docking* (interações entre essa proteína e os derivados), foram analisadas com o programa *ligplus* (Figura 50).

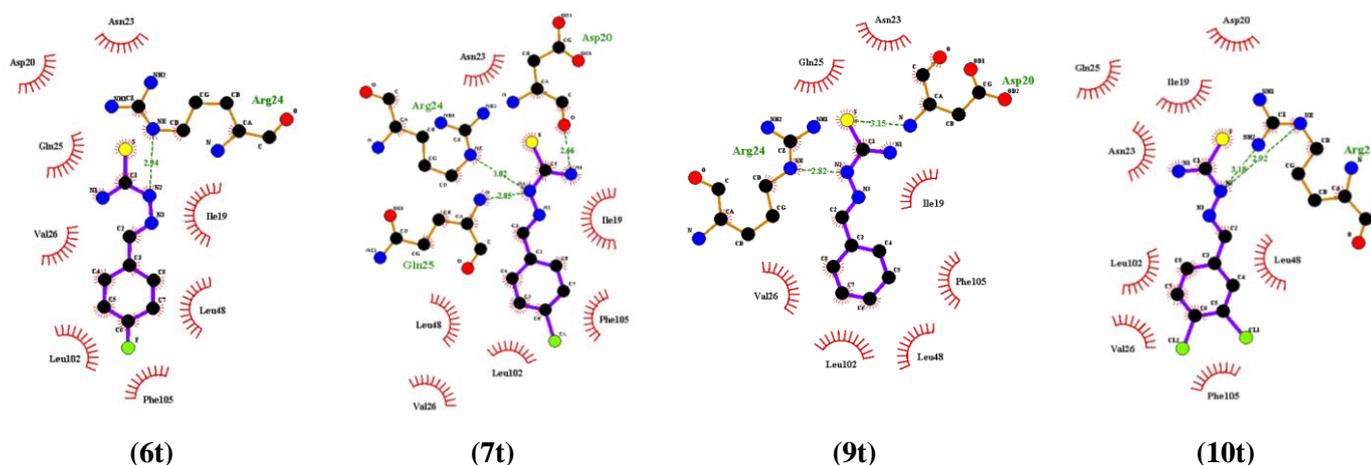


Figura 50 - Interações hidrofóbicas e polares com os derivados de aril-tiossemicarbazonas e a proteína AeSCP-2.

Os complexos formados entre os ligantes **9t** e **10t** se mostraram mais estáveis que os demais, com energias de ligação de  $-6,90$  e  $-7,14$  kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente.

A Tabela 22 mostra os valores das energias de ligação de cada complexo formado após o *docking*, e os tipos de interações realizadas com os resíduos de aminoácidos.

Tabela 22 - Energias de ligação, tipo de interação para cada complexo (proteína-derivado), após o estudo de *docking* dos derivados de aril-tiossemicarbazonas.

Substituintes (R)	Números	Ligações de Hidrogênio	Interações Hidrofóbicas	Energia de Ligação (kcal.mol <sup>-1</sup> )
<i>p</i> -F	<b>6t</b>	<b>ARG24.</b>	ILE19, ASP20, ASN23, GLN25, VAL26, LEU48, LEU102, PHE105.	-6,09
<i>p</i> -Cl	<b>7t</b>	<b>ASP20, ARG24, GLN25.</b>	ILE19, ASN23, VAL26, LEU48, LEU102, PHE105.	-6,67
<i>p</i> -Br	<b>9t</b>	<b>ASP20, ARG24.</b>	ILE19, ASN23, GLN25, VAL26, LEU48, LEU102, PHE105.	-6,90
3,4-diCl	<b>10t</b>	<b>ARG24.</b>	ILE19, ASP20, ASN23, GLN25, VAL26, LEU48, LEU102, PHE105.	-7,14

Podemos observar na Tabela 22 que o derivado **10t** (mais potente), possui uma maior energia de ligação com o AeSCP-2. Além disso, podemos observar que os resíduos envolvidos nas interações com esses derivados, são praticamente os mesmos envolvidos na interação com o ácido palmítico na estrutura de raios-X publicada por Dyer e colaboradores (DYER et al., 2003), que são os resíduos de **ARG24**, **ILE19**, **ASN23**, **VAL26**, **LEU48**, **LEU102** e **PHE105**

#### 5.4.3.2 *Docking* molecular dos derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas

A Figura 51 mostra a sobreposição dos derivados **11t-18t** das fenoximetil-tiossemicarbazonas no AeSCP-2.

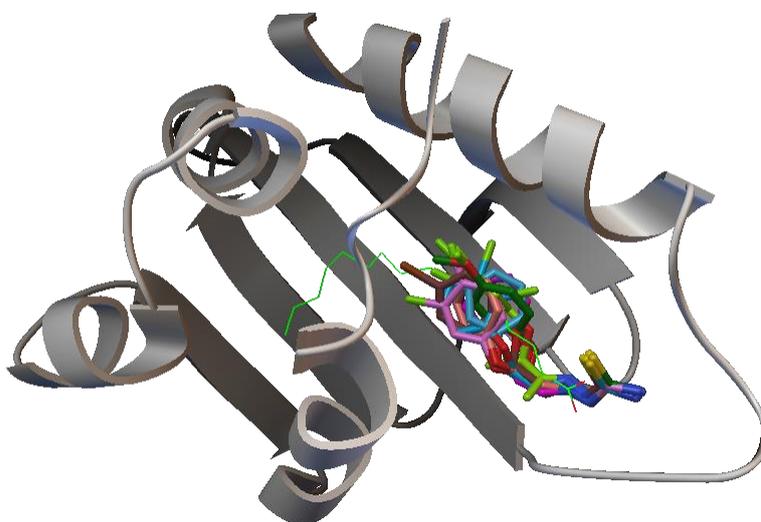


Figura 51 - Estruturas do ácido palmítico (linha verde) e 8 derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas, sobrepostas após *docking* molecular no AeSCP-2.

As interações entre os resíduos de aminoácidos dessa proteína com estes derivados são mostradas na Figura 52.

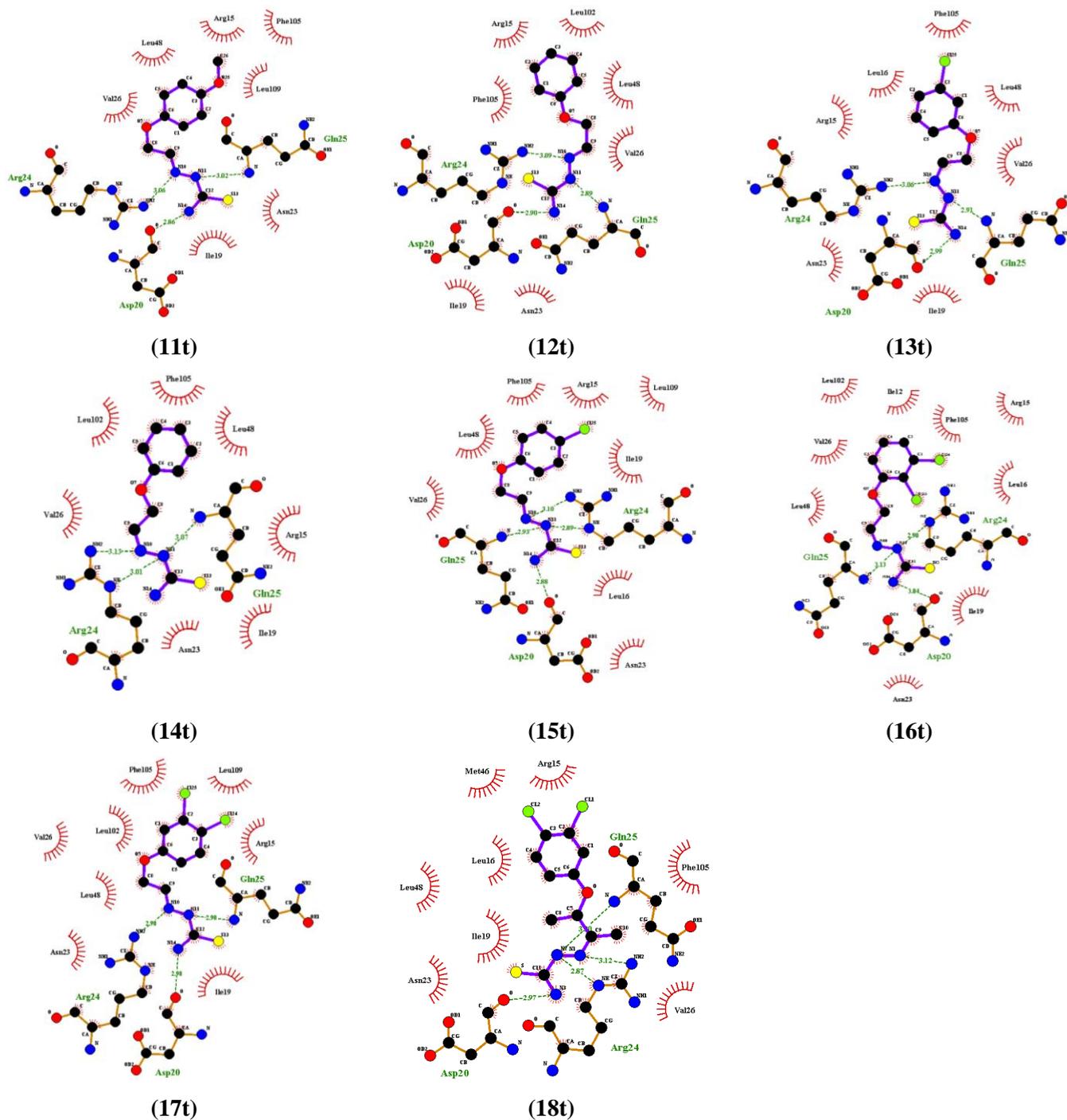


Figura 52 - Interações hidrofóbicas e polares para os derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas.

A Tabela 23 mostra os valores das energias de ligações de cada complexo formado, além das interações realizadas pelos mesmos com os resíduos de aminoácidos presentes na proteína escolhida como alvo.

Tabela 23 - Energias de ligação, tipo de interação para cada complexo após o estudo de *docking* molecular dos derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas.

Substituintes (R)	Números	Ligações de Hidrogênio	Interações Hidrofóbicas	Energia de Ligação (Kcal.mol <sup>-1</sup> )
<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	<b>11t</b>	ASP20, ARG24, GLN25	ARG15, ILE19, ASN23, VAL26, LEU48, LEU109, PHE105.	-6,68
H	<b>12t</b>	ASP20, ARG24, GLN25	ARG15, ILE19, ASN23, VAL26, LEU48, LEU102, PHE105.	-6,65
<i>m</i> -Cl	<b>13t</b>	ASP20, ARG24, GLN25	ARG15, LEU16, ILE19, ASN23, LEU48, PHE105, VAL26.	-7,16
<i>p</i> -Br	<b>14t</b>	ARG24, GLN25	ARG15, ILE19, ASN23, VAL26, LEU48, LEU102, PHE105.	-7,50
<i>p</i> -Cl	<b>15t</b>	ASP20, ARG24, GLN25	ARG15, LEU16, ILE19, ASN23, VAL26, LEU48, LEU109, PHE105.	-7,16
2,3-diCl	<b>16t</b>	ASP20, ARG24, GLN25	ILE12, ARG15, LEU16, ILE19, ASN23, VAL26, LEU48, LEU102, PHE105.	-7,71
3,4-diCl	<b>17t</b>	ASP20, ARG24, GLN25	ARG15, ILE19, ASN23, VAL26, LEU48, LEU102, PHE105, LEU109.	-7,90
3,4-diCl	<b>18t</b>	ASP20, ARG24, GLN25	ARG15, ILE19, ASN23, VAL26, LEU16, MET46, LEU48, PHE105.	-8,47

A Tabela 23 mostra que os resíduos envolvidos nas interações com esses ligantes, são praticamente os mesmos envolvidos na interação com o ácido palmítico na estrutura de raios-X publicada por Dyer e colaboradores (DYER et al., 2003), que são os resíduos de ARG24, GLN25, ARG15, ILE19, ASN23, VAL26, LEU48 e PHE105.

A fim de comparar os resultados obtidos através das simulações de *docking*, com os valores de atividade larvicida, foi gerado um gráfico dos valores do Log(1/LC<sub>50</sub>) em função das energias de ligação (em módulo) de cada complexo obtido (Figura 53).

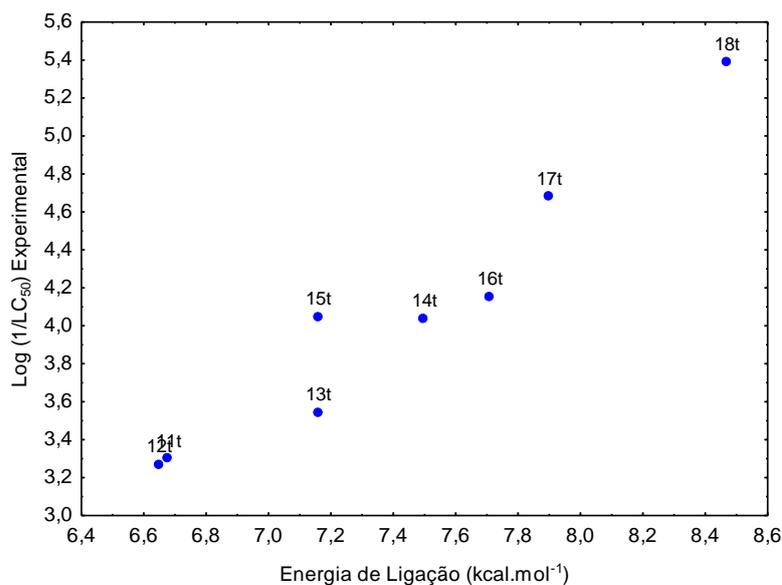


Figura 53 - Atividade larvicida experimental dos derivados de fenoximetil-tiossemicarbazonas *versus* a energia de ligação (em módulo) do complexo formado.

De acordo com a Figura 53 os compostos que apresentam uma maior interação com o sítio ativo da proteína, são aqueles que apresentam a maior atividade larvicida, no caso os compostos **17t** e **18t**. Vale salientar, que o derivado **18t** foi previsto através de nossos estudos QSAR como um derivado mais potente que os demais da série. Como esperado o mesmo apresenta uma maior energia de interação com o *AeSCP-2*.

#### 5.4.4 *Docking* molecular dos derivados ácidos 1,2,4-oxadiazólicos

Os doze derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionics foram também estudados via *docking* molecular no *AeSCP-2*.

Os resultados obtidos para os *dockings* desses derivados indicaram que todos os compostos ficaram localizados no sítio ativo da proteína. Isso pode ser observado na Figura 54, onde são mostrados os derivados **1a** e **10a** que são bons exemplos do padrão de ligação desses 12 derivados no *AeSCP-2*.

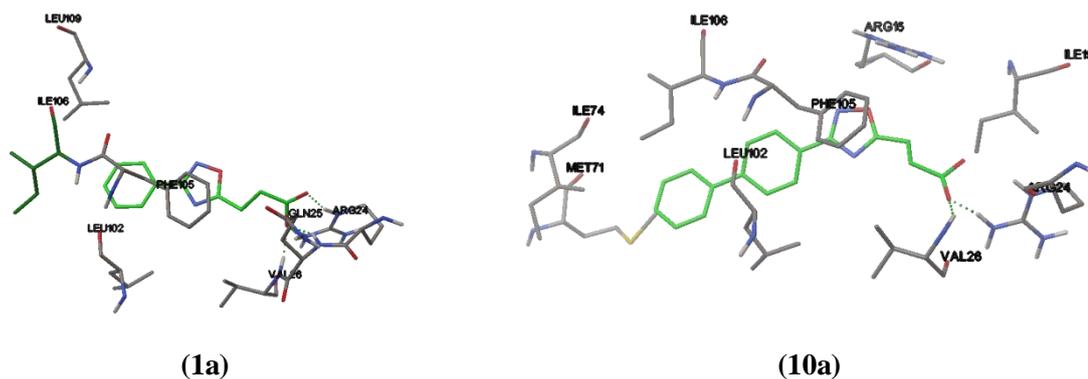


Figura 54 - Ilustração dos complexos da proteína AeSCP-2 com os derivados 1a e 10a de ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propionicos. Os derivados estão representados pela cadeia verde.

A Figura 55 mostra a sobreposição das melhores soluções de *docking*, obtidos para os derivados **1a-9a** e **10a-13a** na estrutura do alvo da proteína AeSCP-2.

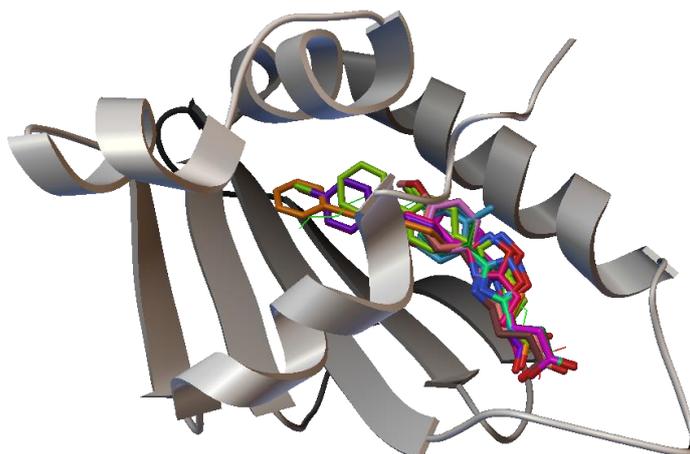


Figura 55 - Estruturas do ácido palmítico e derivados oxadiazólicos, sobrepostas após *docking* molecular no AeSCP-2.

As melhores poses de encaixe selecionadas no estudo de *docking* molecular (interações entre essa proteína e os derivados), foram analisadas com o programa *ligplus* (Figura 56).

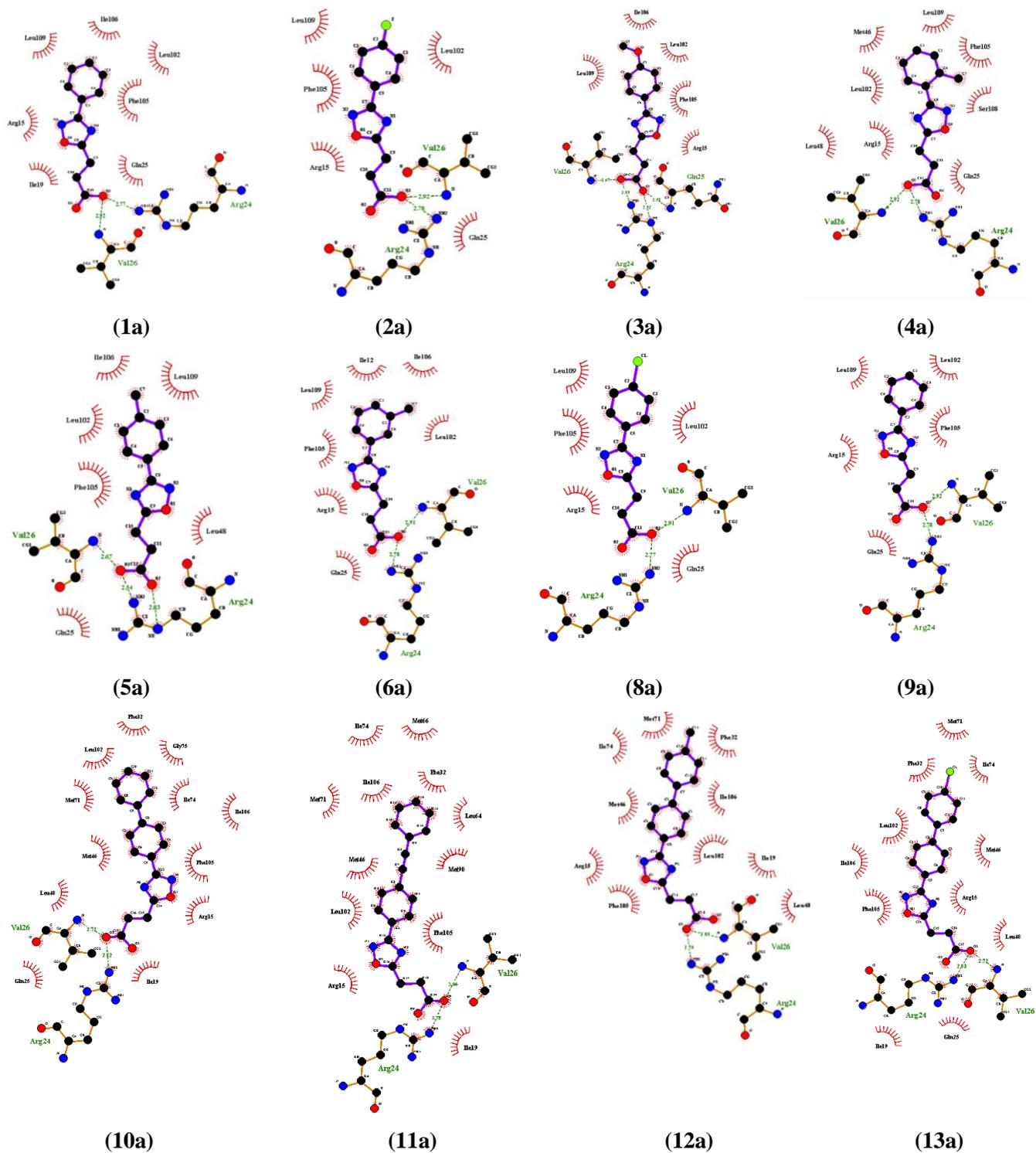


Figura 56 - Interações hidrofóbicas e polares dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos com o *AεSCP-2*.

As simulações realizadas, revelaram que esses compostos possuem o mesmo padrão de ligação do ácido palmítico com o *AεSCP-2*. Isso pode ser observado devido à orientação do grupo carboxilato para fora do ambiente hidrofóbico, devido à realização de

interações polares do mesmo com os resíduos de aminoácidos ARG24 e VAL26 (Figura 56), além de várias interações hidrofóbicas desses ligantes com os vários resíduos de aminoácidos presentes na região hidrofóbica do AeSCP-2 .

Avaliando a energia de cada complexo formado, após o estudo de *docking*, os complexos formados com os ligantes **12a** e **13a** apresentaram as maiores energias de ligação -10,03 e -10,06 kcal mol<sup>-1</sup> respectivamente, indicando que essas estruturas são mais estáveis no AeSCP-2 que as demais analisadas.

A Tabela 24 mostra os valores das energias de ligação de cada complexo formado, e os tipos de interações realizadas com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo.

Tabela 24 - Energias de ligação e tipo de interações para cada complexo (proteína-derivado), após o estudo de *docking* da série ácidos 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propionicos.

Substituintes (R)	Números	Resíduos envolvidos em Ligações de Hidrogênio com a porção COOH	Resíduos envolvidos em Interações Hidrofóbicas com a porção <i>p</i> -X-Ph dos compostos	Energia de Ligação (kcal.mol <sup>-1</sup> )
H	<b>1a</b>	(ARG24, VAL26)	(ILE19, ARG15, GLN25, LEU102, PHE105, ILE106, LEU109)	-8,82
<i>p</i> -F	<b>2a</b>	(ARG24, VAL26)	(ARG15, GLN25, LEU102, PHE105, LEU109)	-8,76
<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	<b>3a</b>	(ARG24, GLN25, VAL26)	(ARG15, LEU102, PHE105, ILE106, LEU109)	-9,03
<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	<b>4a</b>	(ARG24, VAL26)	(ARG15, GLN25, MET46, LEU48, LEU102, PHE105, SER108, LEU109)	-9,22
<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	<b>5a</b>	(ARG24, VAL26)	(GLN25, LEU48, LEU102, PHE105, ILE106, LEU109)	-9,29
<i>m</i> -CH <sub>3</sub>	<b>6a</b>	(ARG24, VAL26)	(ILE12, ARG15, GLN25, LEU102, PHE105, ILE106, LEU109)	-9,27
<i>p</i> -Cl	<b>8a</b>	(ARG24, VAL26)	(ARG15, GLN25, LEU102, PHE105, LEU109)	-9,37
<i>p</i> -Br	<b>9a</b>	(ARG24, VAL26)	(ARG15, GLN25, LEU102, PHE105, LEU109)	-9,62
<i>p</i> -Ph	<b>10a</b>	(ARG24, VAL26)	(ARG15, ILE19, GLN25, PHE32, MET46, LEU48, MET71, ILE74, GLY75, LEU102, PHE105, ILE106)	-9,61
Ph-C≡C-Ph-	<b>11a</b>	(ARG24, VAL26)	(ARG15, ILE19, PHE32, MET46, LEU64, MET66, MET71, ILE74, LEU102, PHE105, ILE106)	-9,92
<i>p</i> -CH <sub>3</sub> Ph	<b>12a</b>	(ARG24, VAL26)	(ARG15, ILE19, PHE32, MET46, LEU48, MET71, ILE74, LEU102, PHE105, ILE106)	-10,03
<i>p</i> -ClPh	<b>13a</b>	(ARG24, VAL26)	(ARG15, ILE19, GLN25, PHE32, MET46, LEU48, MET71, ILE74, LEU102, PHE105, ILE106)	-10,06

De acordo com a Tabela 24, os resíduos de aminoácidos mais importantes (presentes em todos os complexos) da proteína AeSCP-2 envolvidos nas interações (polares e hidrofóbicas) com os ligantes, são praticamente os mesmos envolvidos na interação com o ácido palmítico na estrutura de raios-X publicada por Dyer e colaboradores (DYER et al., 2003), que são os resíduos de ARG24, VAL26, GLN25, LEU102, PHE105, LEU109. Pode-se observar na Tabela 24 que os derivados **10a-13a**,

podem acessar um número maior de resíduos hidrofóbicos quando comparados com os derivados **1a-9a**. Isso pode ser atribuído ao tamanho destes derivados, pois a introdução do segundo anel fenílico proporciona a esses compostos um maior “enterramento” na região hidrofóbica do AeSCP-2.

A fim de comparar os resultados obtidos através das simulações realizadas, foi montado um gráfico com os valores do  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  em função das energias de ligação (em módulo) de cada complexo obtido (Figura 57).

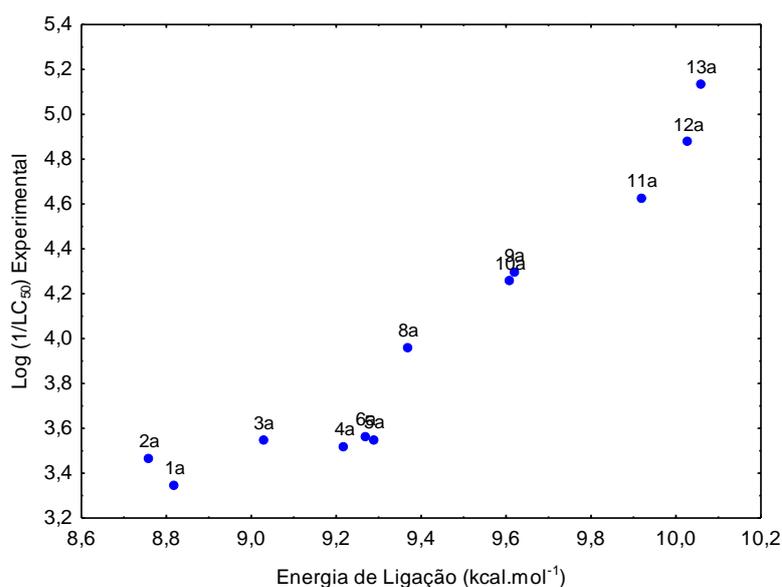


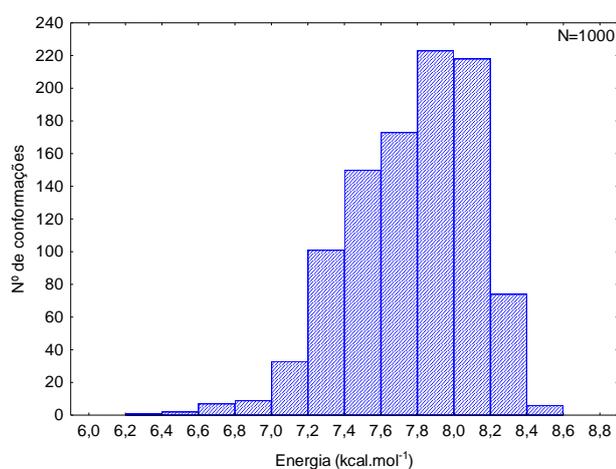
Figura 57 - Atividade larvicida experimental dos derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos *versus* energia de ligação (em módulo) do complexo formado.

Pode-se observar no gráfico acima que os compostos que apresentam maiores atividades larvicidas (aqueles com maiores valores do  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$ ) são geralmente aqueles com as maiores energias de ligação (maior afinidade com o AeSCP-2). Nesse sentido, destacam-se os compostos **12a** e **13a** que foram previstos através de nossos estudos QSAR.

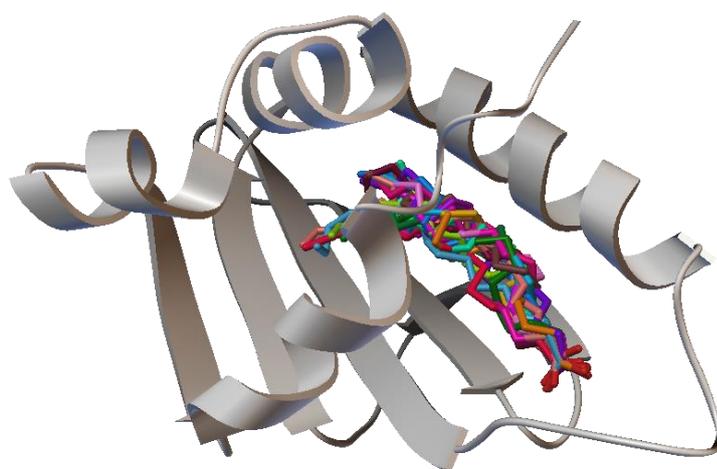
Como dito no item 4.6.2 da metodologia, um estudo mais detalhado dessa série de ácidos 1,2,4-oxadiazólicos foi realizado. Esse estudo, consistiu na geração de mil conformações para cada derivado, ao invés de dez como no default do programa AutoDock. Esses resultados são apresentados na próxima seção.

#### 5.4.4.1 O que podemos aprender a partir de 1000 conformações de Docking molecular do ácido palmítico e dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos no AeSCP-2?

Como descrito na seção anterior, nesse estudo também foram realizados cálculos de *re-docking* para validar o *docking* dos nossos compostos na proteína escolhida como alvo. O resultado do *re-docking* do ácido palmítico no AeSCP-2 apresentou uma energia de ligação de  $-8,32 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , considerando a pose mais estável. No entanto, como esse cálculo foi desenvolvido para mil conformações o valor médio da energia foi de  $-7,78 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , ou seja, bem menor do que os valores médios das energias de ligação dos nossos compostos nesse alvo, como será visto em breve. A Figura 58.a mostra a distribuição das energias de ligação (em módulo) obtidas após *re-docking* do ácido palmítico, enquanto a Figura 58.b mostra a sobreposição de vinte confôrmeros (de um total de mil) escolhidos aleatoriamente no AeSCP-2.



(a)



(b)

Figura 58 - *Re-docking* do ácido palmítico: (a) Distribuição das energias de ligação, (b) sobreposição de 20 conformações do ácido palmítico no AeSCP-2.

Como o ácido palmítico possui uma cadeia metilênica longa, um número significativo de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos podem ser sondados na região hidrofóbica do AeSCP-2. A frequência dos resíduos de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas com o ácido palmítico podem ser vistos na Figura 59.

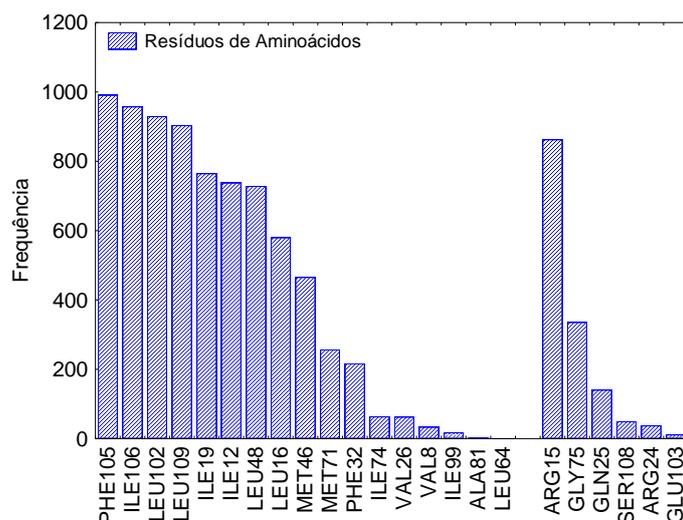
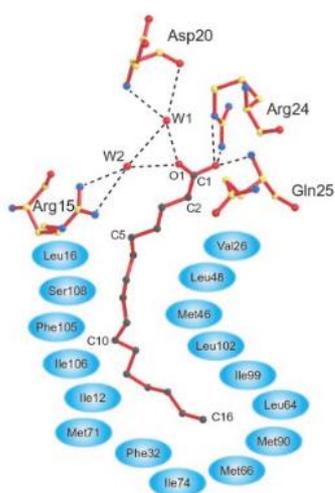
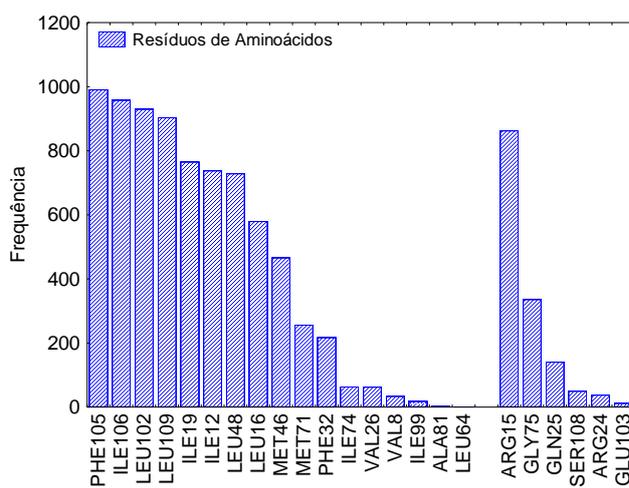


Figura 59 - Frequência dos resíduos de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas com o ácido palmítico.

Como citado na introdução deste trabalho, em 2003, Dyer e colaboradores (DYER et al., 2003) publicaram a estrutura de raios-X dessa proteína co-cristalizada com o ácido palmítico, onde dezesseis resíduos de aminoácidos interagem hidrofobicamente com esse ácido (Figura 60.a). Nossos resultados de *re-docking* identificaram treze resíduos durante a busca conformacional (Figura 60.b), mostrando que os parâmetros utilizados para a realização do *docking* nesse estudo foram adequados.



(a)



(b)

Figura 60 - (a) Resíduos hidrofóbicos (azul) interagindo com o ácido palmítico (DYER et al., 2003), (b) frequência de interação dos resíduos hidrofóbicos após *re-docking*.

A Figura 61 mostra os resultados de *docking* para o composto **1a** que é um bom exemplo para ilustrar o padrão de ligação dos 12 derivados em estudo. Uma vez que o *docking* do derivado **7a** (*p*-NO<sub>2</sub>) foi bastante diferente dos demais, considerou-se o mesmo como um *outlier* e não foi incluído na análise a seguir. Os gráficos relativos as distribuições de energia e as Figuras que mostram as sobreposições para os compostos de **1a-13a** são apresentados no Apêndice F.

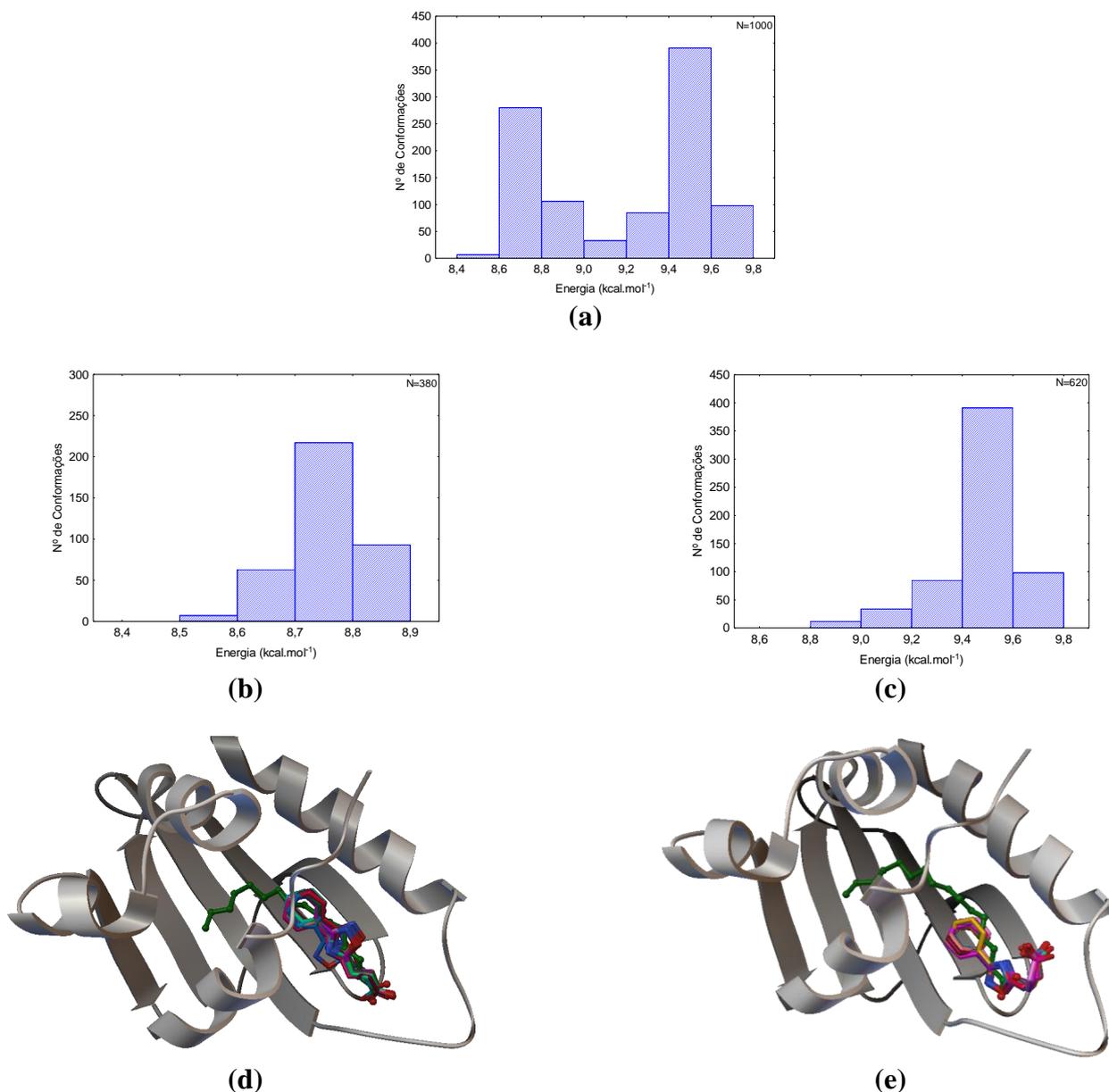
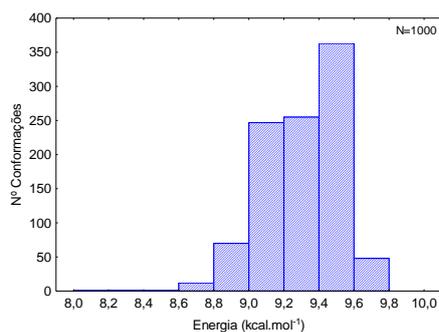
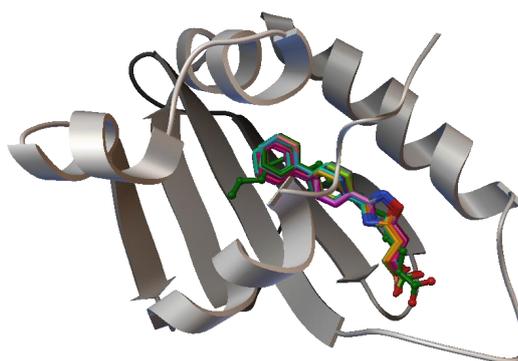


Figura 61 - *Docking* do derivado 1a no AeSCP-2: a) distribuição bimodal de energia, b,c) distribuições individuais relacionados a Figura (a), d,e) sobreposição de 20 estruturas relacionadas com sua respectiva distribuição de energia.



(a)



(b)

Figura 62 - *Docking* do derivado 10a no AeSCP-2: a) distribuição unimodal de energia, b) sobreposição de 20 estruturas aleatórias.

A partir da Figura 61.a podemos observar que o derivado **1a** apresenta uma distribuição de energia de ligação bimodal. Observando cada moda (Figuras 61.b e 61.c) pode-se notar que existe duas maneiras diferentes desse derivado ligar-se a proteína AeSCP-2. Essas estruturas foram chamadas de lineares (Figura 61.d) e dobradas (Figura 61.e), onde a moda da Figura 61.b representa as conformações lineares, enquanto a outra moda (Figura 61.c) representa as conformações dobradas. Em ambos os casos, a estrutura experimental do ácido palmítico é incluída nas sobreposições (DYER et al., 2003) ( Figuras 61.d e 61.e).

Analisando as estruturas dobradas do derivado **1a**, é possível observar que essas conformações exibem uma faixa maior de energias de ligação ( $8,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$  até  $9,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) quando comparadas com as estruturas lineares ( $8,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$  até  $8,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ). Isso pode estar associado a flexibilidade da porção metilênica desses conformêros que, permite ao grupo carboxilato explorar um maior número de resíduos de aminoácidos polares. Por outro lado, as estruturas lineares parece apresentar uma maior sobreposição, além de um maior “enterramento” na região hidrofóbica da proteína AeSCP-2 quando comparadas com as estruturas dobradas. Estes resultados sugerem que o derivado **1a**

possui duas formas de ligação no *AeSCP-2*, ou seja, uma no domínio hidrofílico e outra no hidrofóbico. A Figura 63.a e 63.b mostra a interação do derivado **1a** com os resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos do *AeSCP-2* das conformações lineares e dobradas respectivamente. A Figura 63.c corresponde a distribuição dos resíduos hidrofílicos para as conformações lineares, enquanto a Figura 63.d corresponde as conformações dobradas, onde cada gráfico foi obtido a partir de 100 estruturas escolhidas aleatoriamente do derivado **1a**.

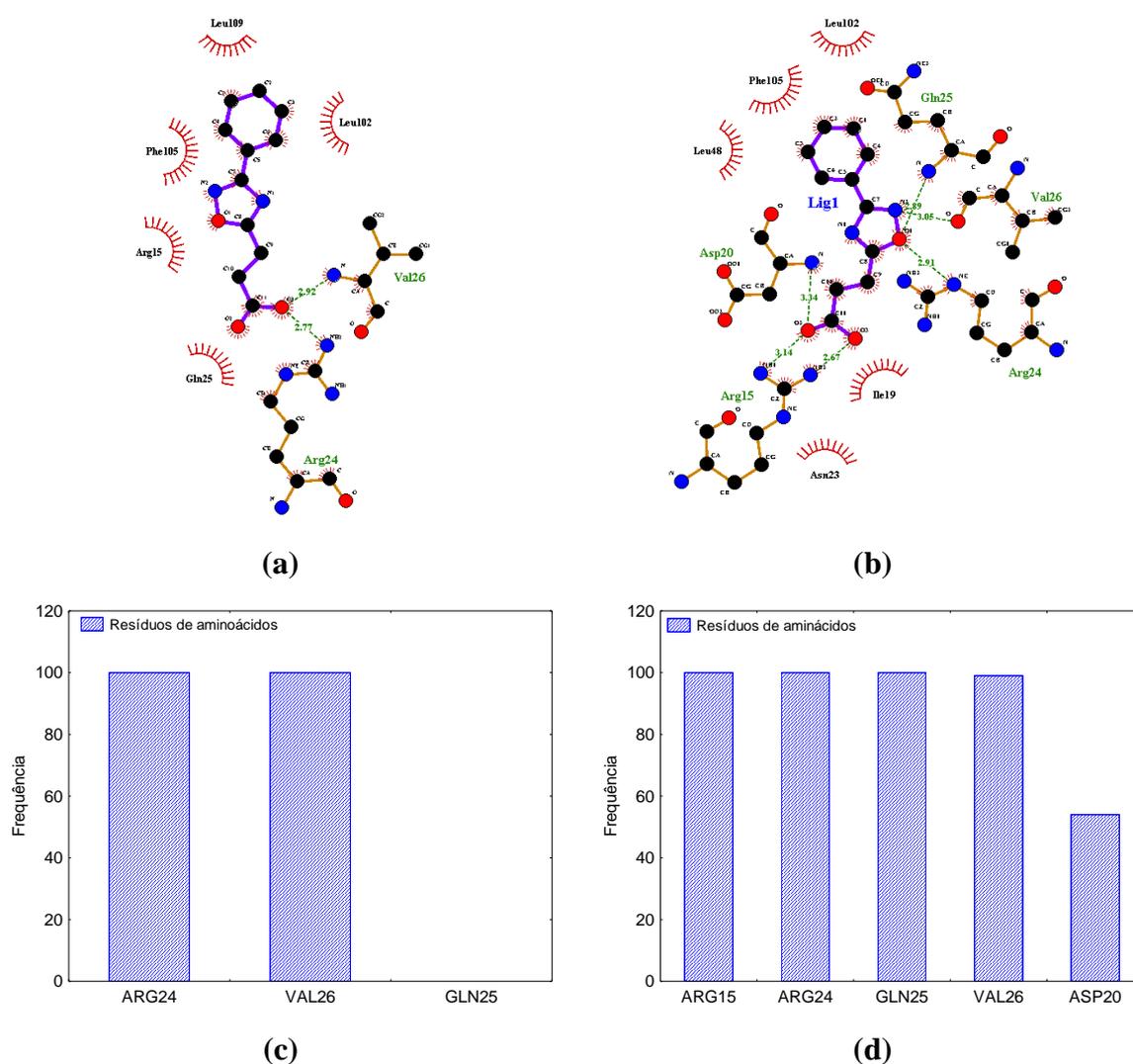


Figura 63 - Interação do derivado **1a** com os domínios hidrofílicos e hidrofóbicos no *AeSCP-2*: a) estrutura linear, b) estrutura dobrada c,d) distribuições individuais relacionados as Figuras (a) e (b) para 100 conformações.

De acordo com a Figura 63 podemos observar que as estruturas dobradas interagem com um maior número de resíduos de aminoácidos polares. A análise para os derivados **1a-9a** pode ser apreciada no Apêndice G. Quando a hidrofobicidade dessa série é aumentada, por

exemplo, a introdução de um segundo grupo fenila (derivados **10a-13a**), nossos resultados de *docking* molecular para o composto **10a**, revelaram apenas uma distribuição de energia unimodal e com energia de ligação mais elevada (Figura 62.a) que os demais derivados da série. O efeito da maior exploração da região hidrofóbica do AeSCP-2 pelo derivado **10a** pode ser observada pela sobreposição dos confôrmeros e a estrutura do ácido palmítico (Figura 62.b). Outra forma de observar esse efeito de exploração da região hidrofóbica, é através da análise da frequência de interação desses resíduos hidrofóbicos com os derivados ácidos 1,2,4-oxadiazólicos. A Figura 64.a e 64.b, mostram as distribuições de resíduos hidrofóbicos da proteína AeSCP-2 que interagem com os derivados **1a** e **10a**, respectivamente. Para os demais derivados os gráficos da distribuição dos resíduos de aminoácidos encontra-se no Apêndice H.

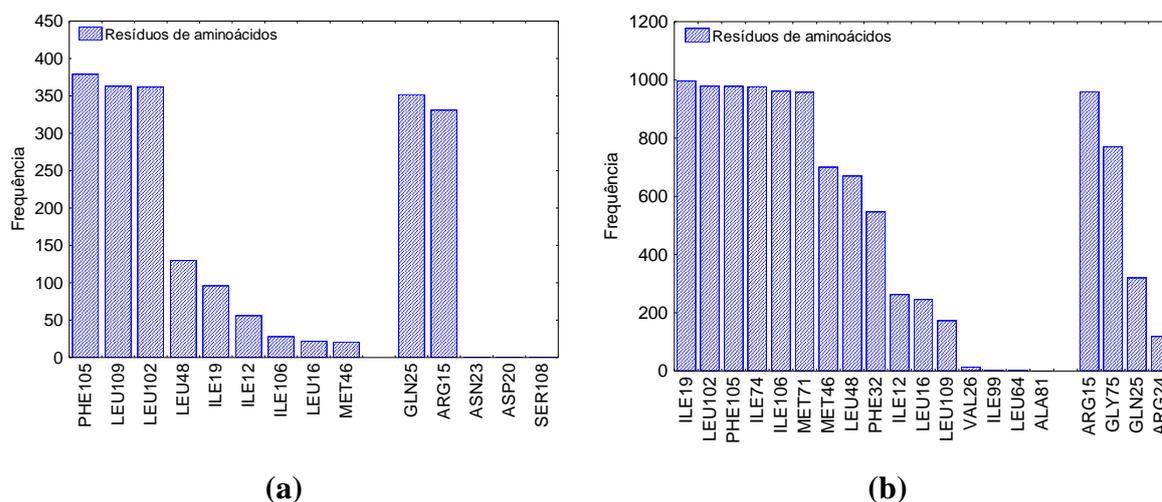


Figura 64 - Distribuição de frequências para os resíduos hidrofóbicos da proteína AeSCP-2 interagindo com: (a) derivado 1a e (b) derivado 10a.

Levando em consideração os *scores* de hidropatia dos aminoácidos,<sup>b</sup> os mesmos possuem a seguinte ordem: ILE > VAL > LEU > PHE > CYS > MET > ALA (os *scores* de hidropaticidade podem ser consultados no Anexo A (KYTE; DOOLITTLE, 1982)). Observando as Figuras 64.a e 64.b, algumas aspectos podem ser comparados: (1) O derivado **10a**, pode sondar um maior número de resíduos hidrofóbicos do que **1a**; (2) no derivado **1a**, estão presentes três resíduos de *scores* com valores de hidropatia intermediária (PHE105, LEU102 e LEU109), enquanto que para o derivado **10a** são

<sup>b</sup> Hidropatia de aminoácidos – Reflete as tendências hidrofílicas e hidrofóbicas combinadas de cada aminoácido. Um índice de hidropaticidade elevado (+) indica uma região hidrofóbica (apolar) de uma proteína, no entanto, um índice hidropático baixo (-) indica uma região hidrofílica (polar) de uma proteína.

observados a presença de três resíduos de alta hidropatia (ILE19, ILE74 e ILE106) e três resíduos de hidropatia intermediária (PHE105, LEU102 e LEU48). Vale salientar, que durante a busca conformacional do derivado **1a** o resíduo ILE106 foi encontrado 28 vezes, enquanto para o derivado **10a** esse mesmo resíduo foi encontrado 962 vezes. A importância das interações hidrofóbicas entre o resíduo isoleucina e anéis aromáticos em sistemas biológicos já foi previamente relatada na literatura. Por exemplo, as interações hidrofóbicas entre a isoleucina e anéis tiazolidínicos e pirimidínicos tem sido associada com a forma reativa V em conformações de enzimas (GUO et al., 1998). Outro exemplo é a importância da isoleucina em interações hidrofóbicas auto-associadas  $\alpha$  e  $\beta$  com os sítios de ligação da espectrina (principal componente estrutural da membrana dos eritrócitos) (GALLAGHER et al., 2004). Observando os resíduos de PHE105 e LEU102 os mesmos interagem tanto com o derivado **1a**, assim como o **10a**. O resíduo de PHE105 interage com o anel 1,2,4-oxadiazólico através de um empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , enquanto o resíduo de LEU102 interage hidrofobicamente com o anel fenílico dos nossos derivados. A capacidade da leucina em fazer interação hidrofóbicas com a porção oxadiazólica já foi reportada na literatura (STEUBER; HEINE; KLEBE, 2007).

A fim de comparar os resultados obtidos através das simulações realizadas, foi montado um gráfico com os valores do  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  em função das energias de ligação (em módulo) de cada complexo obtido (Figura 65).

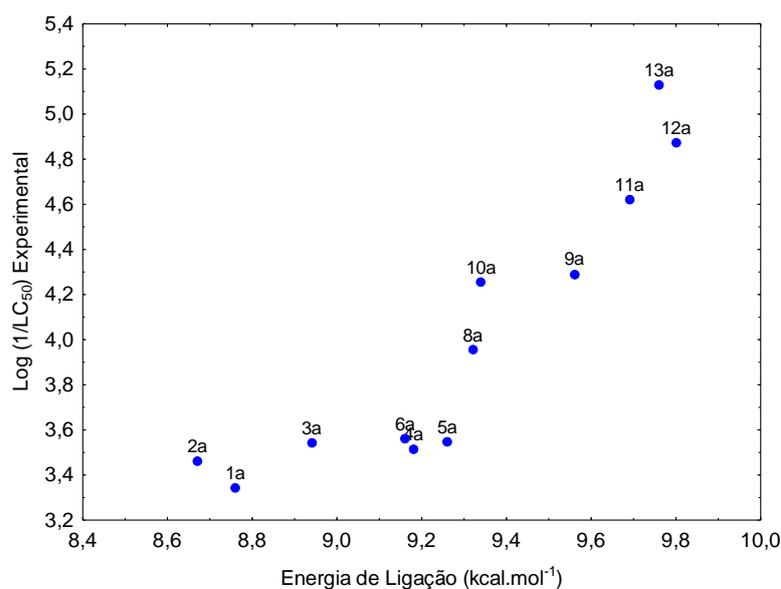


Figura 65 - Atividade larvicida experimental dos derivados ácidos 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propionícos *versus* energia de ligação (em módulo) do complexo formado.

Pode-se observar no gráfico acima que os compostos que apresentam maiores atividades larvicidas (aqueles com maiores valores do  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$ ) são geralmente aqueles com as maiores energias de ligação (maior afinidade com o *AeSCP-2*). Nesse sentido, destacam-se os compostos **12a** e **13a** que foram previstos através de nossos estudos QSAR. Vale salientar que o gráfico obtido para as mil conformações geradas no estudo de *docking* (Figura 65) é semelhante ao obtido no estudo da secção 5.5.5 (Figura 57).

#### 5.4.5 *Docking* molecular dos derivados ésteres 1,2,4-oxadiazólicos

Como foi abordado na introdução desse trabalho, a terceira série estudada corresponde aos derivados 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila. Para essa série de compostos, decidimos também realizar estudos de *docking* desses derivados no *AeSCP-2*.

Os resultados obtidos para o *docking* desses derivados no *AeSCP-2*, são mostrados na Figura 66, onde são mostrados dois derivados, **13e** e **14e** que são bons exemplos do padrão de ligação desses 10 derivados no *AeSCP-2*.

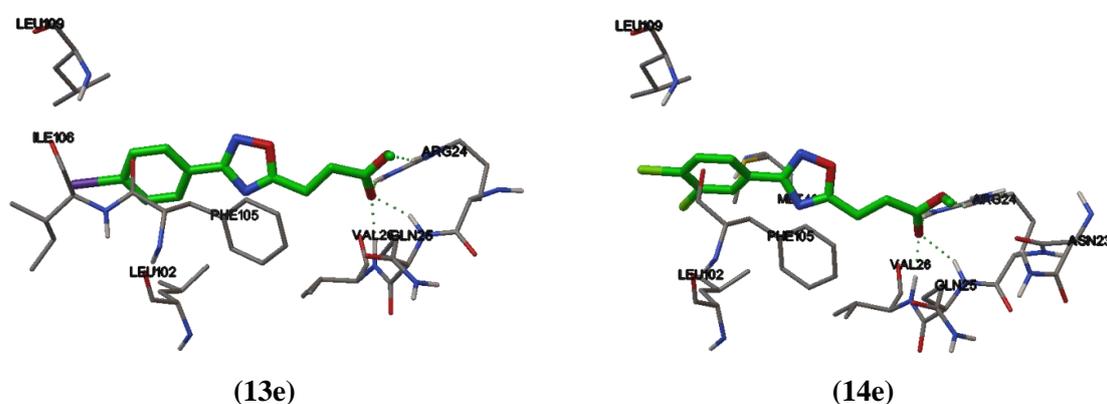


Figura 66 - Ilustração dos complexos da proteína *AeSCP-2* com os derivados **13e** e **14e** da série 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila. Os derivados estão representados pela cadeia verde.

A Figura 67 mostra a sobreposição das melhores soluções de *docking* obtidas para os derivados **3e**, **4e**, **6e**, **7e**, **9e**, **10e**, **12e**, **13e**, **14e** e **15e** no alvo do *AeSCP-2*.

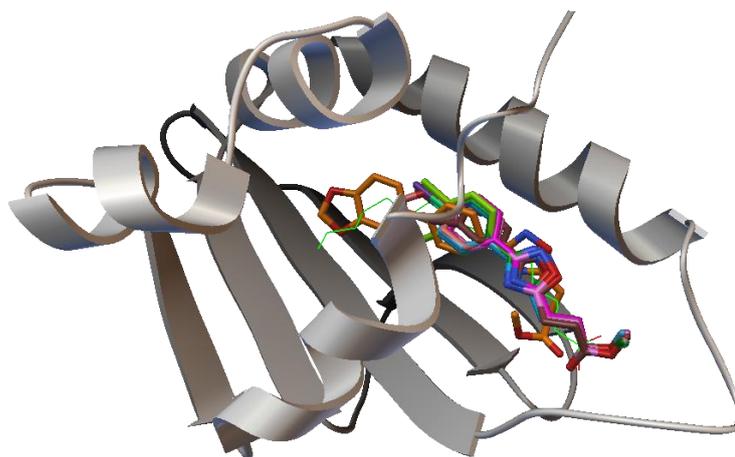


Figura 67 - Estruturas do ácido palmítico e derivados 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il) propanoato de metila sobrepostas após o *docking* no AeSCP-2.

O programa *ligplus* foi novamente utilizado para avaliar os contatos polares e hidrofóbicos desses derivados com o alvo biológico estudado (Figura 68).



Após a simulação realizada, os complexos formados entre os derivados **13e** e **15e** apresentaram as maiores energias de ligação,  $-9,62 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $-9,88 \text{ kcal mol}^{-1}$  respectivamente.

A Tabela 25 mostra os valores das energias de ligação de cada complexo formado, e os tipos de interações realizadas com os resíduos de aminoácidos presentes no AeSCP-2.

Tabela 25 - Energias de ligação e tipo de interações para cada complexo, após o estudo de *docking* molecular da série 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.

Substituintes (R)	Números	Resíduos envolvidos em Ligações de Hidrogênio com a porção COOCH <sub>3</sub>	Resíduos envolvidos em Interações Hidrofóbicas com a porção <i>p</i> -X-Ph dos compostos	Energia de Ligação (kcal.mol <sup>-1</sup> )
H	<b>3e</b>	(ARG24, VAL26)	(ILE12, ARG15, GLN25, LEU102, PHE105, LEU109)	-8,50
<i>p</i> -F	<b>4e</b>	(ARG24, GLN25, VAL26)	(ARG15, ILE19, ASN23, LEU102, PHE105, LEU109)	-8,41
<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	<b>6e</b>	(ARG24, GLN25, VAL26)	(ILE12, ARG15, ILE19, ASN23, LEU102, PHE105, ILE106, LEU109)	-8,65
<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	<b>7e</b>	(ARG24, GLN25, VAL26)	(ARG15, ILE19, ASN23, LEU102, PHE105, LEU109)	-8,93
<i>m</i> -CH <sub>3</sub>	<b>9e</b>	(ARG24, VAL26)	(ARG15, ILE12, ASN23, GLN25, LEU102, ILE106, PHE105, LEU109)	-9,00
<i>p</i> -Cl	<b>10e</b>	(ARG24, VAL26)	(ARG15, ASN23, GLN25, LEU102, PHE105, LEU109)	-9,01
<i>p</i> -Br	<b>12e</b>	(ARG24, GLN25, VAL26)	(ARG15, ILE19, ASN23, LEU102, PHE105, LEU109)	-9,27
<i>p</i> -I	<b>13e</b>	(ARG24, VAL26, GLN25)	(ARG15, ILE19, ASN23, LEU102, PHE105, LEU109)	-9,62
3,4 - DiCl <sub>2</sub>	<b>14e</b>	(ARG24, VAL26, GLN25)	(ARG15, ILE19, ASN23, PHE105, LEU109)	-9,47
	<b>15e</b>	(ARG24, VAL26)	(ARG15, ILE19, PHE32, MET46, LEU48, MET71, ILE74, GLY75, PHE105, ILE106, LEU109)	-9,88

Como mostra a Tabela 25, esses derivados seguem o mesmo padrão de ligação do ácido palmítico com o sítio ativo da proteína *AeSCP-2*, ou seja, a cabeça polar desses compostos realizam ligações polares com os resíduos de **ARG24**, **GLN25** e **VAL26**, enquanto a outra porção interage hidrofobicamente com os resíduos de **LEU102**, **PHE105** e **LEU109** presentes na região hidrofóbica dessa proteína. Podemos observar também que o derivado **15e** pode sondar um maior número de resíduos hidrofóbicos, pela mesma razão apresentada anteriormente no caso dos ácidos 1,2,4-oxadiazólicos.

Também nessa etapa foi feita uma comparação dos resultados obtidos das simulações de *docking*, com os valores de  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  (Figura 69).

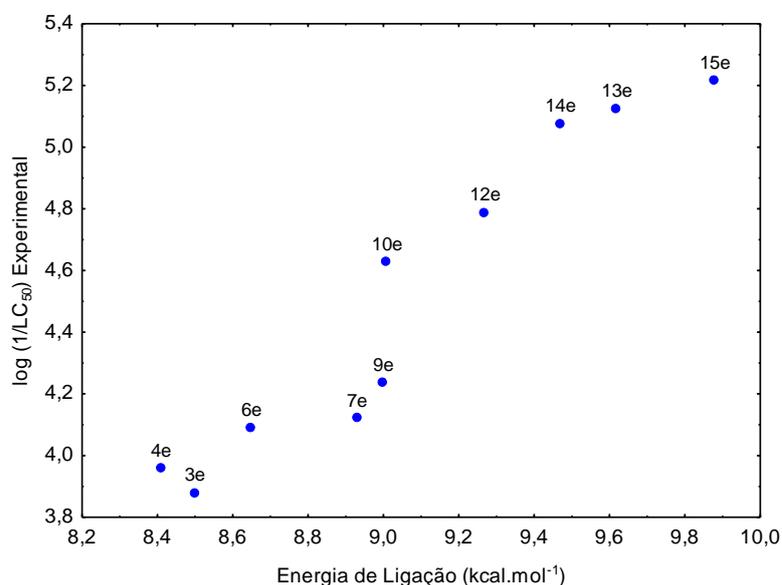


Figura 69 - Atividade larvicida experimental dos derivados 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila *versus* a energia de ligação (em módulo) do complexo formado.

A Figura 69 mostra que os derivados mais potentes apresentam uma maior interação com o *AeSCP-2*, no caso os compostos **13e** e **15e**, onde esse último foi previsto através de nossos estudos QSAR.

### 5.2.2 Comparação dos resultados de docking molecular dos derivados ácidos e ésteres 1,2,4-oxadiazólicos.

Os resultados dos bioensaios larvicidas mostraram que os compostos que pertencem à série 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila, apresentaram atividades larvicidas superiores a de seus ácidos correspondentes.

Foi observado também que os compostos mais potentes de uma mesma série, apresentavam as maiores energias de ligação com o AeSCP-2. Nossos resultados revelaram também que os compostos derivados ácidos 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos apresentaram uma maior afinidade com o sítio ativo da proteína AeSCP-2 quando comparados com seus respectivos derivados 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila, como pode ser observado na Figura 70.

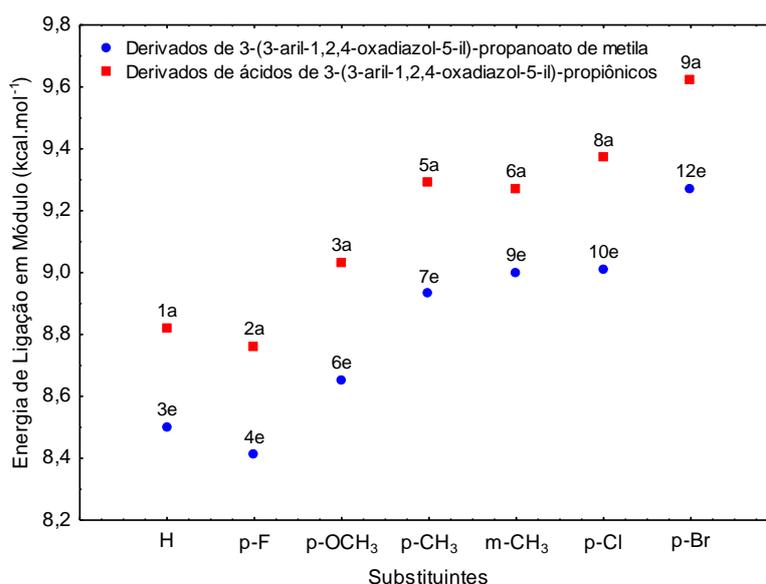


Figura 70 - Comparação entre as energias de ligação (em módulo) dos derivados ácidos 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos e 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila no AeSCP-2.

Pode-se perceber no gráfico acima o mesmo padrão de energia em função da natureza do substituinte, onde observa-se que os derivados substituídos com o bromo na posição *para*, apresentam uma maior interação com o sítio ativo dessa proteína. A diferença de energia entre esses dois complexos (**9a** e **12e**) é de 0,35 kcal. mol<sup>-1</sup>.

Como a diferença de energia entre os derivados das duas séries é relativamente pequena, decidimos nesse ponto avaliar como a energia de ligação desses compostos varia

em função do tamanho do *grid* utilizado. Para isso foram utilizados 3 *grids* diferentes: (1) 50x50x50 Å, (2) 60x60x60 Å e (3) 70x70x70 Å. Os resultados são mostrados na Figura 71.

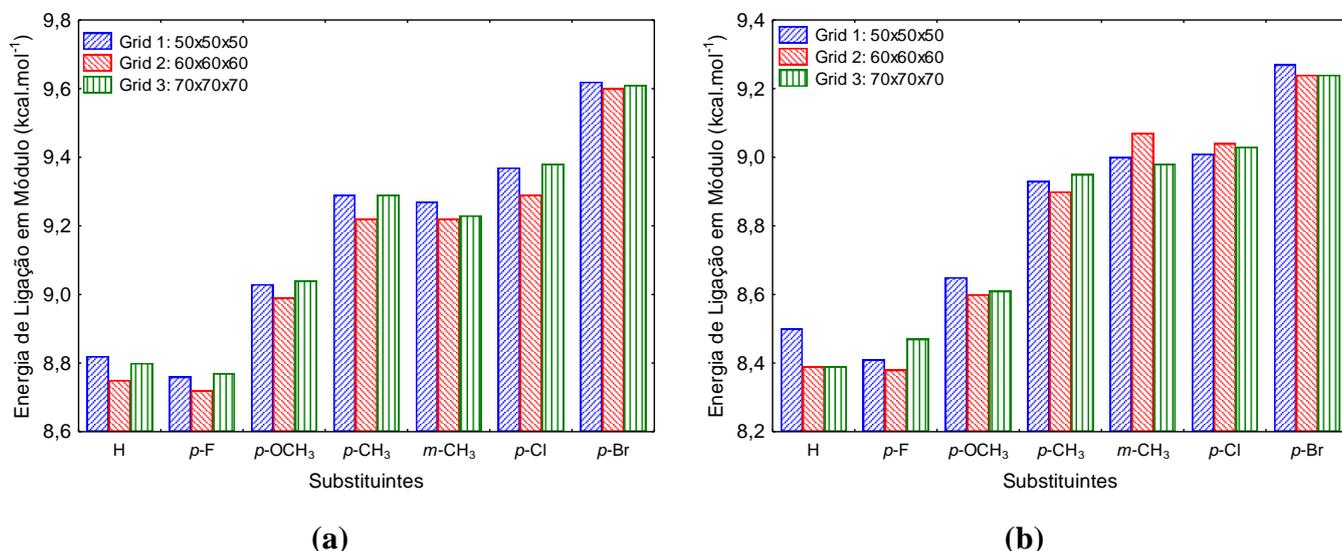


Figura 71 - Comparação entre as energias de ligação dos derivados : (a) ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos e (b) 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila com a proteína AeSCP-2 variando o tamanho do *grid*.

Os gráficos da Figura 71 mostram que a variação das energias de ligação de cada derivado em função dos tamanhos dos *grids* são relativamente pequenas. Podemos observar também que o tamanho do *grid* escolhido em nossas simulações foi adequado, visto que, as maiores energias de ligação observadas correspondem ao *grid* de tamanho 50x50x50 Å.

### 5.2.2 Docking molecular dos inibidores da proteína AeSCP-2 (SCPIs)

Como foi dito no item 4.6.4 desse trabalho, também realizamos estudos de *docking* de três dos cinco inibidores da proteína AeSCP-2 (SCPIs) com esse alvo biológico, afim de validar a metodologia usada nesse trabalho. Esses compostos que foram relatados por Lan e colaboradores (KIM; WESSELY; LAN, 2005), apresentaram valores de IC<sub>50</sub> entre 0,042 μmol L<sup>-1</sup> e 0,35 mol L<sup>-1</sup>, enquanto o valor do IC<sub>50</sub> para o colesterol foi de 0,113 μmol L<sup>-1</sup>. Esses resultados revelaram que esses inibidores competiram com a molécula de colesterol, e possuíram uma alta afinidade de ligação com a proteína AeSCP-2, além de se mostrarem potentes agentes larvicidas.

Os resultados obtidos para o *docking* desses derivados podem ser observados na Figura 72:

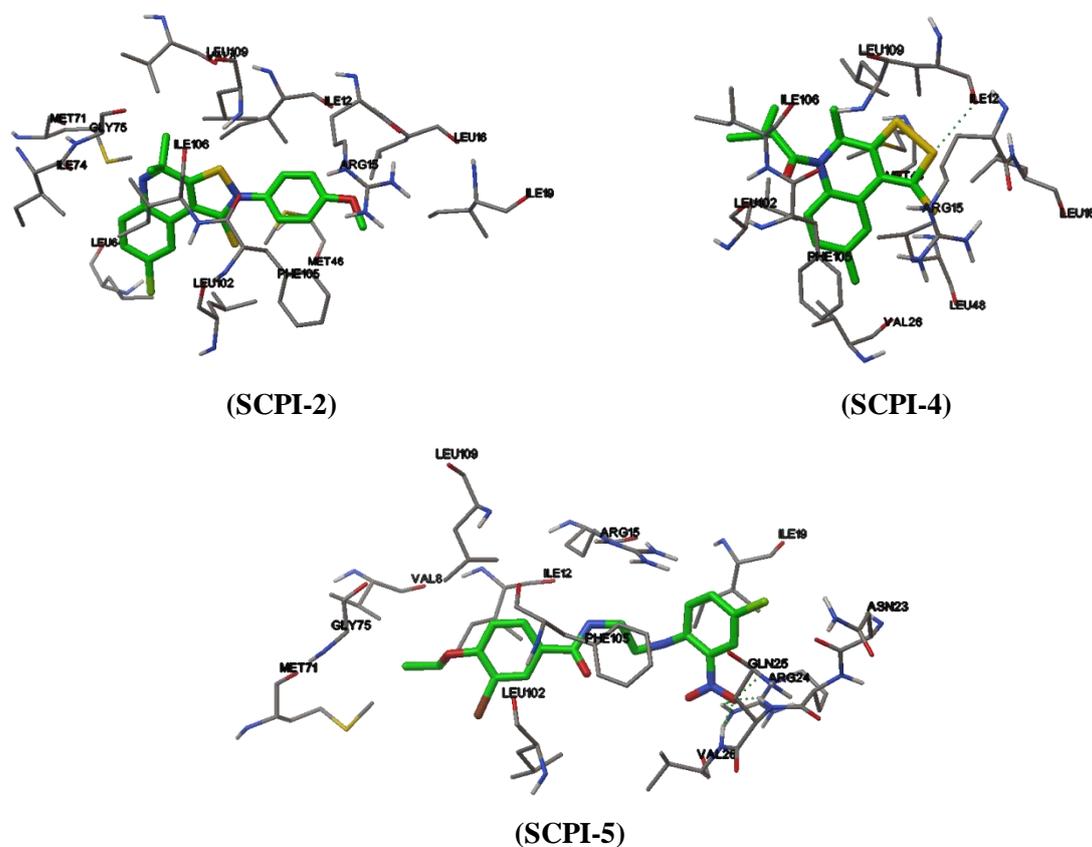


Figura 72 - Ilustração dos complexos da proteína *AeSCP-2* com os SCPIs. Os inibidores estão representados pela cadeia verde.

A Figura 73 mostra a sobreposição das melhores soluções de *docking*, obtidas para os inibidores testados no *AeSCP-2*.

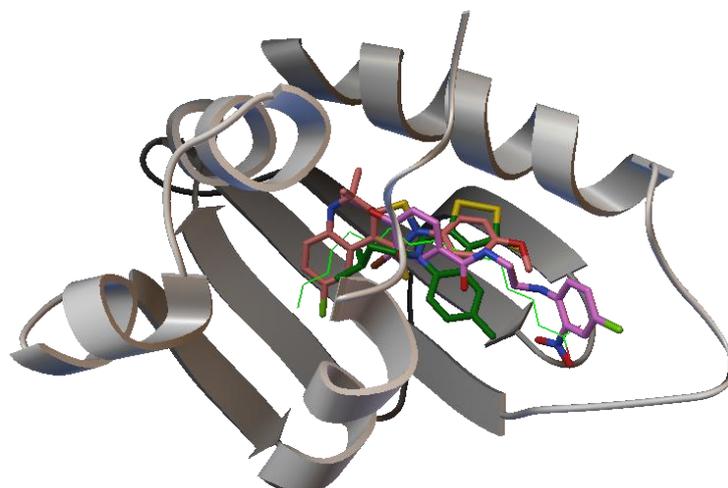


Figura 73 - Estruturas do ácido palmítico (linha verde) e SCPIs após o *docking* molecular no *AeSCP-2*.

A Figura 74 mostra as ligações entre esses SCPIs e os resíduos da proteína *AeSCP-2*:

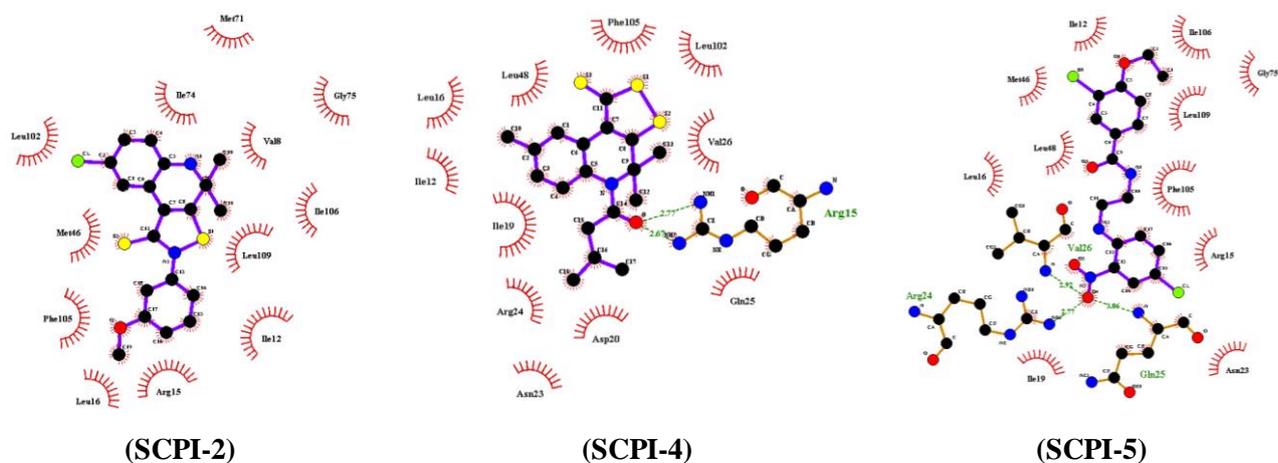


Figura 74 - Interações hidrofóbicas e polares entre os SCPIs e os resíduos de aminoácidos da proteína *AeSCP-2*.

Avaliando a energia de cada complexo obtido, os complexos formados entre os SCPIs e a proteína *AeSCP-2* apresentaram energias de ligação de -7,91; -5,43 e -10,13 kcal.mol<sup>-1</sup> respectivamente.

A Tabela 26 mostra os valores das energias de ligação de cada complexo formado após o *docking*, e os tipos de interações realizadas com os resíduos de aminoácidos presentes no *AeSCP-2*.

Tabela 26 - Energias de ligação e tipo de interações para cada complexo (proteína- SCPIs), após o estudo de *docking* molecular.

Compostos	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	Ligações de Hidrogênio	Interações Hidrofóbicas	Energia de Ligação (kcal. mol <sup>-1</sup> )
SCPI4	0,065±0,001	(ARG15)	(ILE12, ILE19, LEU16, ASP20, ASN23, ARG24, GLN25, VAL26, LEU48, LEU102, PHE105,)	-5,43
SCPI2	0,059±0,021	-	(VAL8, ILE12, ARG15, LEU16, MET46, MET71, ILE74, GLY75, LEU102, PHE105, ILE106, LEU109)	-7,91
SCPI5	0,042±0,008	(ARG24, GLN25, VAL26)	(ILE12, ARG15, LEU16, ILE19, ASN23, MET46, LEU48, GLY75, PHE105, ILE106, LEU109)	-10,13

<sup>a</sup> (KIM; WESSELY; LAN, 2005)

Podemos observar na Tabela 26 que os SCPIs mais potentes, são aqueles que possuem uma maior interação com o AeSCP-2. Isso nos mostra que os parâmetros utilizados (tamanho e espaçamento do *grid*) nas nossas séries de compostos são aceitáveis, pois estes foram capazes também de mostrar uma tendência entre as atividades larvicidas determinadas experimentalmente em função das energias de ligação desses SCPIs.

Observando a Tabela 26, podemos notar que o SCPI5 (inibidor mais potente) interage hidrofílicamente com os resíduos de ARG24, GLN25 e VAL26 e hidrofobicamente com os resíduos ILE12, LEU16, ILE19, MET46, LEU48, PHE105, ILE106, LEU109 que são praticamente os mesmos presentes nas três série de compostos estudadas nesse trabalho.

### 5.2.3 Comparação entre os estudos de *docking* molecular realizados

Após a realização dos cálculos de *docking* molecular para as três séries de compostos estudadas neste trabalho tomando como molde de complexação o AeSCP-2, decidimos realizar uma comparação das energias de ligação dessas três séries de compostos, pois as mesmas apresentaram substituintes em comum nos seus derivados. A

Figura 75 mostra a sobreposição de todos os ligantes (das três séries estudadas) na estrutura do alvo da proteína após a realização do *docking* molecular.

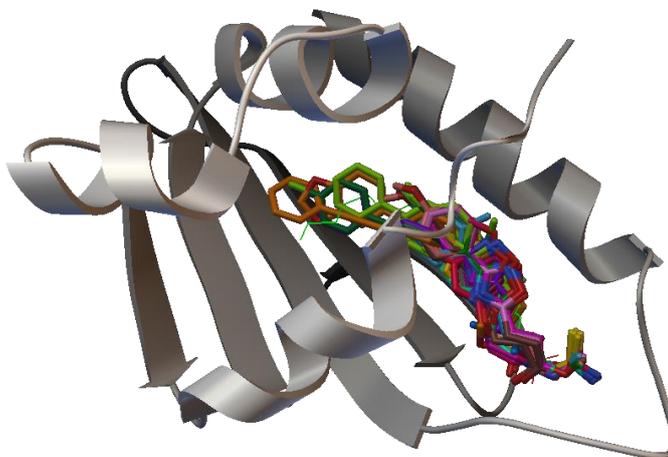


Figura 75 - Estruturas do ácido palmítico (linha verde) e todos os derivados das três séries estudadas após o *docking* no AeSCP-2.

Nossos resultados revelaram que, os resíduos de aminoácidos mais importantes, envolvidos em interações polares e hidrofóbicas em cada série estudada foram:

- Derivados de Aril -Tiossemicarbazonas: ARG15, ASP20, ARG24, ASN23, GLN25, ILE19, LEU48, PHE105 e VAL26.
- Derivados de Fenoximetil -Tiossemicarbazonas: ARG24, GLN25, ARG15, ILE19, ASN23, VAL26, LEU48 e PHE105
- Derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos: ARG24, VAL26, GLN25, LEU102, PHE105, LEU109
- Derivados 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila: ARG24, GLN25 e VAL26, LEU102, PHE105 e LEU109.

Os derivados dessas três séries, possuíram um modo de ligação bastante similar ao ácido palmítico ligado no sítio ativo da proteína AeSCP-2 como visto na estrutura de raios-X publicada por Dyer e colaboradores (DYER et al., 2003).

Decidimos nesse ponto realizar uma comparação entre as energias de ligação das três séries estudadas em função da natureza do substituinte.

A Figura 76 mostra um gráfico da energia de ligação (em módulo) *versus* a natureza dos substituintes dessas três séries.

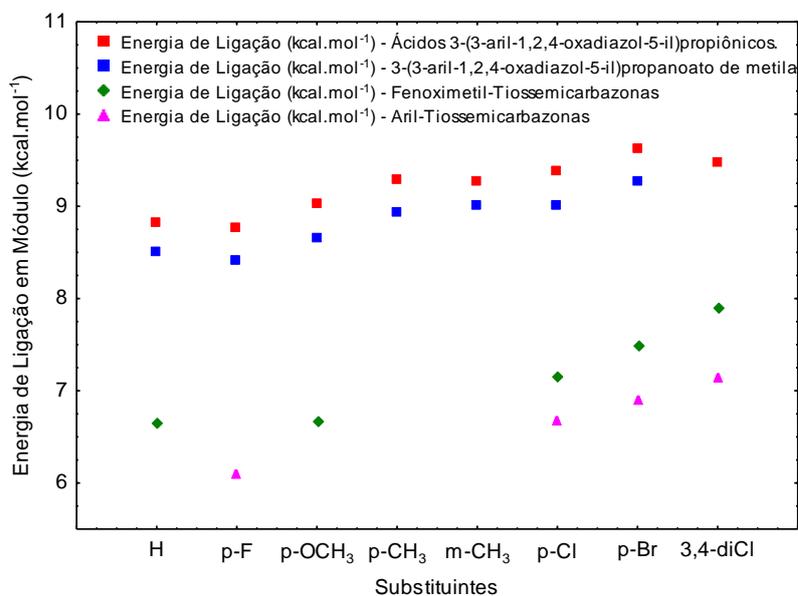


Figura 76 - Comparação entre as energias de ligação (em módulo) das séries estudadas via *docking* molecular com a proteína AeSCP-2.

De acordo com a Figura 76, pode-se observar que a série das tiossemicarbazonas apresentou as mais baixas energias de ligação com o sítio ativo da proteína escolhida como alvo. Esses compostos, quando comparados com as duas outras séries estudadas, apresentaram as menores atividades larvicidas. Observando-se ainda a Figura 76 nota-se que os derivados de aril-tiossemicarbazonas, apresentaram as menores energias de interação com o sítio ativo da proteína. Isso se deve ao fato que esses compostos se mostraram menos ativos do que os demais, de acordo com os bioensaios larvicidas realizados. Como exemplo, podemos comparar as atividades larvicidas dos derivados que possuem o substituinte bromo na posição *para*, dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos, 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila, fenoximetil-tiossemicarbazonas e aril-tiossemicarbazonas, onde suas atividades apresentaram valores de 51,2; 16,3; 92,0 e 122,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente.

Ainda na Figura 76, ao compararmos os derivados das séries ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos e 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila é

possível perceber que esses últimos derivados apresentam uma menor energia de ligação com o AeSCP-2. Como discutido anteriormente, os derivados ésteres 1,2,4-oxadiazólicos, se mostraram mais ativos do que seus correspondentes derivados ácidos 1,2,4-oxadiazólicos, segundo os bioensaios larvicidas realizados e como previsto por nossos estudos de QSAR. Portanto, deveríamos esperar que estes últimos derivados apresentassem uma menor afinidade de ligação com o AeSCP-2, o que não foi observado nas nossas simulações de *docking*. No entanto, essas simulações de *docking* molecular, levam em consideração apenas a energia de interação do ligante com esse alvo específico, enquanto os valores de LC<sub>50</sub> levam em consideração a mortalidade total da larva, ou seja, os derivados ésteres 1,2,4-oxadiazólicos podem estar interagindo parcialmente com esse alvo, causando assim essa diminuição nas energias de ligação. Observando ainda a Figura 76, pode-se notar que a diferença de energia entre os derivados ácidos 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos e 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila é relativamente pequena, variando de 0,27 kcal.mol<sup>-1</sup> (para o derivado *m*-CH<sub>3</sub>) até 0,38 kcal.mol<sup>-1</sup> (para o derivado *p*-OCH<sub>3</sub>). Portanto, mais estudos são necessários a fim de obter uma melhor função resposta dessas observações.

#### **5.2.4 Previsão de um novo agente larvicida a partir de cálculos de *docking* molecular**

Considerando as três séries estudadas nesse trabalho, foi possível observar que a série dos derivados 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila eram mais ativos que os ácidos 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos e estes eram mais ativos que os derivados *aril*- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos. Também foi observado que compostos dissustituídos no anel aromático com átomos de cloro, mostraram-se mais ativos em relação aos compostos monoclorados. Nos itens 5.4.1, 5.4.2 e 5.4.3 utilizando as equações de QSAR obtidas para os derivados tiossemicarbazônicos, ácidos e ésteres 1,2,4-oxadiazólicos, foi possível prever um novo composto para a série das tiossemicarbazonas, quatro compostos mais ativos para a série dos ácidos 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos e 1 composto mais potente para a série dos derivados 3-(3-*aril*-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila. Levando em consideração essas previsões, decidimos nesse ponto realizar a projeção de um composto, utilizando para isso cálculos de *docking* molecular. Para a projeção desse composto, levamos em consideração as “melhores”

características de cada série, para garantir uma alta atividade larvicida do mesmo. O composto projetado foi dividido em 3 grupos químicos:

- (i) Grupo farmacofórico da série 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoato de metila;
- (ii) Introdução de um anel fenílico dissustituído com átomos de cloro nas posições 3 e 4 do grupo farmacofórico anterior;

A estrutura desse composto é mostrada a seguir

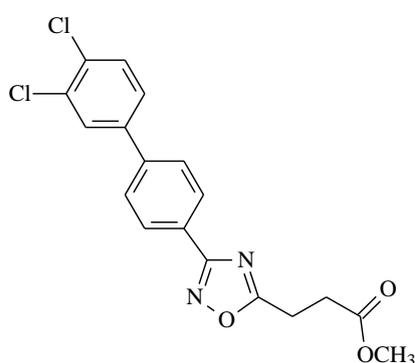


Figura 77 - Novo derivado proposto a partir das “melhores” características das séries estudadas.

Os resultados obtidos para o *docking* desse derivado revelou que o mesmo ficou localizado no sítio ativo do AeSCP-2.

A Figura 78 mostra a sobreposição da melhor solução de *docking* obtida para esse derivado e a pose cristalográfica original (verde) do ácido palmítico no sítio de ligação. A comparação por sobreposição estrutural revelou um modo de ligação bastante similar ao do ácido palmítico.

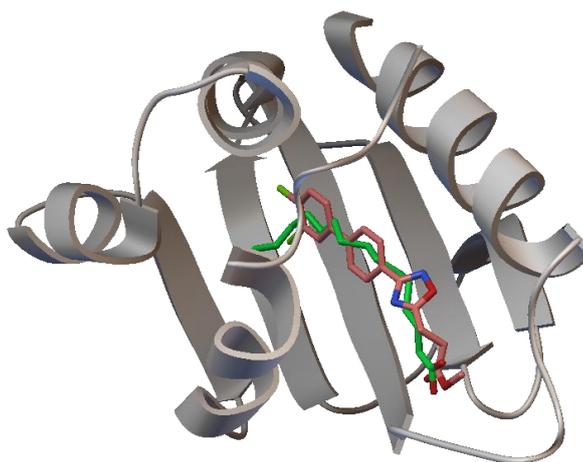


Figura 78 - Estruturas do ácido palmítico (verde) e do novo derivado proposto sobrepostas após o *docking* molecular no AeSCP-2.

Após a simulação realizada, o complexo formado entre esse derivado e a proteína AeSCP-2 apresentou uma energia de ligação de  $-11,66 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , ou seja, maior que os derivados mais ativos de cada série estudada: **18t** ( $-8,47 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ; tiossemicarbazonas), **13a** ( $-10,46 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ; ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propionics) e **15e** ( $-9,88 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ; 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoato de metila). Portanto, esses resultados sugerem que esse composto após sintetizado apresente uma atividade larvicida superior aos demais. É interessante notar também na Figura 78, que o composto projetado tem aproximadamente o mesmo tamanho do ácido palmítico. A distância entre a carbonila do ácido palmítico e o carbono da outra extremidade é de aproximadamente  $14,9 \text{ \AA}$ , enquanto a distância da carbonila do composto projetado até o cloro na posição *para* é de  $15,3 \text{ \AA}$ , sugerindo assim que esses compostos possuam um modo de interação semelhante no sítio ativo dessa proteína.

Para a previsão da atividade desse composto, decidimos realizar uma regressão entre os valores de  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  em função das energias de ligação (E.L) da série de 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-propanoato de metila (Tabela 25). A equação de regressão entre  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  e E.L é mostrada a seguir:

$$\text{Log} \left( \frac{1}{\text{LC}_{50}} \right) = -4,71(\pm 0,98) + 1,02(\pm 0,11)EL \quad \text{Equação 27}$$

$$n=10; R = 0,96; R^2 = 0,92; F=87,95; s=0,16; p = 0,00001$$

A partir da equação 27 valores de  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  foram previstos e plotados contra seus correspondentes valores experimentais, cujo gráfico é mostrado na Figura 79:

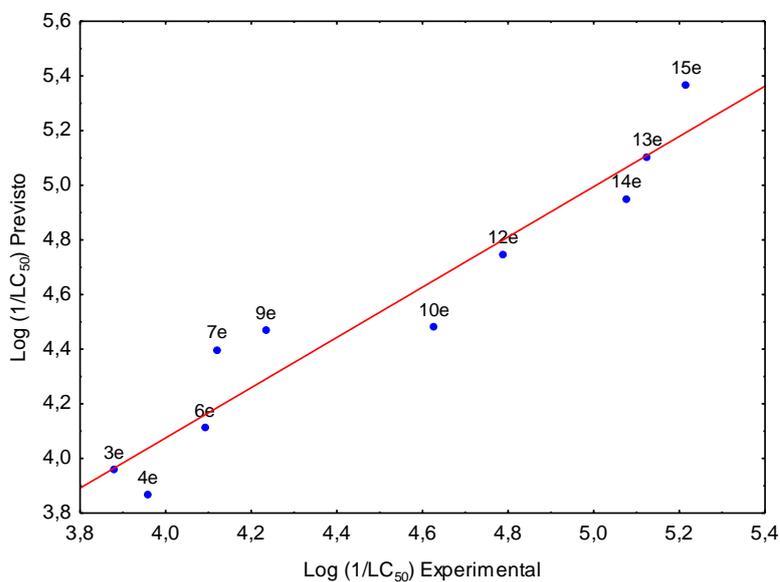


Figura 79 - Valores previstos de  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  usando a equação 27 *versus* seus correspondentes valores experimentais.

Como o composto projetado apresentou uma energia de ligação de  $-11,66 \text{ kcal. mol}^{-1}$ , sua atividade prevista é de  $65,58 \text{ n mol L}^{-1}$ , ou seja, bem mais potente que todos os compostos estudados nesse trabalho, visto que a atividade larvicida dos compostos aqui estudados são da ordem de  $\mu \text{ mol L}^{-1}$ .

As interações entre os resíduos de aminoácidos dessa proteína e esse novo composto são mostradas na Figura 80.

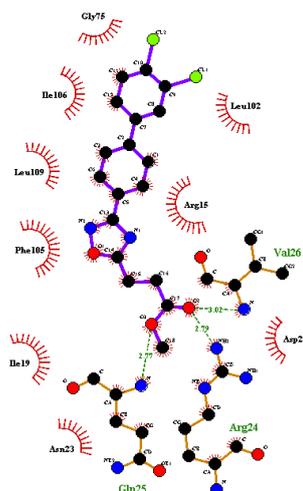


Figura 80 - Interações hidrofóbicas e polares entre o novo derivado e os resíduos de aminoácidos da proteína AeSCP-2.

Como mostra a Figura 80 esse derivado apresentou o mesmo padrão de ligação do ácido palmítico com o sítio ativo da proteína AeSCP-2, ou seja, a cabeça polar desses compostos interagem hidrofílicamente com os resíduos de ARG24, GLN25 e VAL26, enquanto a porção pouco polar interage hidrofobicamente com os resíduos de ARG15, ILE19, ASP20, ASN23, GLY75, LEU102, PHE105, ILE106 e LEU109, presentes na região hidrofóbica dessa proteína.

## 6 CONCLUSÕES

1. A partir de nossos estudos de relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR) em dezessete derivados aril- e fenóximetil tiosemicarbazônicos, nove derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos e quatorze derivados ésteres 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila empregando para isso cálculos de orbitais moleculares B3LYP/6-311G(d,p) para os derivados ácidos e ésteres 1,2,4-oxadiazólicos e B3LYP/6-311++G (d,p) para os derivados tiosemicarbazônicos, além de análises de regressões, foi possível extrair as seguintes conclusões:

a) Derivados aril- e fenoximetil-tiosemicarbazônicos:

- Nossos resultados B3LYP/6-311++G(d,p) revelaram que a atividade larvicida dessa classe de compostos, era diretamente dependente do descritor eletrônico  $\mu$  e do descritor lipofílico logP.
- A partir de nossos modelos, foi possível realizar previsões adequadas da atividade no conjunto de teste (**4t** e **13t**) e também planejar um composto mais potente (**18t**) do que àqueles empregados no conjunto de treinamento.

b) Derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos e ésteres 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila:

- Nossos resultados B3LYP/6-311G(d,p), revelaram que quanto mais positivo forem o descrito eletrônico ( $qC_3$ ) e os descritores hidrofóbicos ( $\pi$  ou logP), mais ativo será o composto no que se refere a atividade larvicida.
- A partir dessas constatações foi possível planejar quatro novos derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos mais potentes do que àqueles usados no conjunto de treinamento, onde esses compostos quando sintetizados se mostraram bastante ativos.
- Também foi possível planejar um derivado de 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila potencialmente ativo (**15e**), o qual apresentou um valor de  $LC_{50}$  experimental de  $6,07 \mu\text{molL}^{-1}$ . O modelo obtido para essa série também foi capaz de realizar previsões do conjunto de teste (**2e** e **8e**).

As atividades larvicidas dessas três séries de compostos se mostraram relativamente superiores ou similares a de muitos óleos essenciais descritos na literatura; tais como aqueles das espécies *Piper marginatum* e a de *Eucalyptus camaldulensis*.

Isso mostra que embora muitas das pesquisas para a obtenção de novos agentes larvicidas contra o *Aedes aegypti* tenha como foco os óleos essenciais e extratos vegetais, compostos de origem sintética, tais como os derivados aqui sintetizados e avaliados biologicamente por nosso grupo, podem surgir como potenciais candidatos a agentes larvicidas.

2. Em relação aos estudos de *docking* molecular nessas três séries de compostos, foi possível obter as seguintes conclusões:

- Nossos resultados revelaram que todos os derivados das três séries estudadas, ficaram localizados no sítio ativo da proteína AeSCP-2 após a simulação de *docking* molecular.
- Os derivados aril- tiossemicarbazônicos interagiram com os resíduos de ARG15, ASP20, ARG24, ASN23, GLN25, ILE19, LEU48, PHE105 e VAL26. No entanto, os derivados fenoximetil-tiossemicarbazônicos interagiram com os resíduos de ARG24, GLN25, ARG15, ILE19, ASN23, VAL26, LEU48 e PHE105, que são, praticamente, os mesmos resíduos presentes na interação do ácido palmítico com o sítio ativo da proteína AeSCP-2.
- Já para os derivados ácidos 3-(2-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiónicos foi observado que, esses compostos realizaram interações polares e hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos de ARG24, VAL26, GLN25, LEU102, PHE105 e LEU109, presentes no sítio ativo da proteína, assim como os derivados ésteres 3-(2-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila interagiram com esses mesmos resíduos.
- No que diz respeito à energia de ligação desses compostos com a proteína escolhida como alvo, percebemos que os compostos mais ativos, possuíam uma maior energia de ligação com a proteína AeSCP-2, indicando que os compostos com maior atividade biológica, são aqueles que apresentaram uma maior interação com esta proteína.

- A partir dos estudos de *docking* molecular foi possível prever um novo derivado com uma atividade larvicida maior do que todos os derivados estudados nesse trabalho. Esse composto está em fase de síntese, afim de comprovar a previsão realizada por esse estudo.
- Nossos cálculos de *docking* molecular, com a proteína *AeSCP-2*, revelaram que essa proteína pode ser um forte candidato como alvo biológico dessas três séries estudadas nesse trabalho.

### 3. Tese

- Levando em consideração:
  - a) os estudos de QSAR, que revelaram modelos matemáticos para a atividade larvicida similares e que foram bem sucedidos na previsão de novos compostos com atividades superiores àquelas do conjunto de treinamento nas três séries estudadas;
  - b) os estudos de *docking* molecular, indicam que os compostos das três séries possuem um modo de ligação bastante similar ao do ácido palmítico no *AeSCP-2*;

Temos elementos favoráveis que a tese proposta é correta, ou seja, que o *AeSCP-2* é um dos receptores biológicos responsáveis pela ação larvicida para as três classes de compostos, derivados (tio)semicarbazônicos, derivados ácidos 1,2,4-oxadiazólicos e derivados ésteres-1,2,4-oxadiazólicos.

## 7 PERSPECTIVAS

O presente trabalho abre outras possibilidades de investigações a serem realizadas. Entre elas podemos elencar:

### 1. Em relação as análises de QSAR:

- Previsão e síntese de novas gerações de compostos com alta atividade larvicida, através de modificações estruturais dos compostos existentes.
- Além da atividade larvicida, incluir na calibração outra função resposta como, por exemplo, a citotoxicidade.

### 2. Em relação aos estudos de *docking* molecular:

- A exemplo do que foi feito para os derivados ácidos 1,2,4-oxadiazólico, ampliar a busca conformacional para um número maior de conformeros nos estudos de *docking* molecular para os derivados tiossemicarbazônicos e ésteres 1,2,4-oxadiazólicos na proteína AeSCP-2.
- Utilização de outras programas de *docking* molecular, como o GOLD, para comparação dos resultados obtidos neste trabalho.
- A título de ampliar a segurança dos compostos investigados, desenvolver estudos comparativos de *docking* em SCP-2 de humanos.

## REFERÊNCIAS

- ADINARAYANA, K. P. S.; DEVI, R. K. Protein-Ligand interaction studies on 2, 4, 6-trisubstituted triazine derivatives as anti-malarial DHFR agents using AutoDock. **Bioinformatics**, v. 6, n. 2, p. 74–77, 26 mar. 2011.
- ALLWINN, R. Significant increase in travel-associated dengue fever in Germany. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 200, n. 3, p. 155–159, ago. 2011.
- ALVES, D. C. B. DA S. **Síntese, avaliação da atividade larvicida e estudo do alvo biológico de protótipos moleculares contendo anéis do 1,2,4-oxadiazol e do isoxazol**. Dissertação (Mestrado)—Programa de Pós Graduação em Química: Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- AMARAL, A. T. DO; MONTANARI, C. A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 25, p. 39–44, maio 2002.
- ANDREONI, W. Density-Functional Theory and Molecular Dynamics: A New Perspective for Simulations of Biological Systems. In: KUBINYI, H.; FOLKERS, G.; MARTIN, Y. C. (Eds.). . **3D QSAR in Drug Design**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. v. 2p. 161–167.
- ANTUNES, R.; SRIVASTAVA, R. M. A New Series of N-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)- alkylphthalimides. I. **Heterocyclic Communications**, v. 2, n. 3, jan. 1996.
- ATKINS, P. W.; FRIEDMAN, R. **Molecular quantum mechanics**. 5th ed ed. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2011.
- ATTELA, G. C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. In: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular - INCT-EM: [s.n.].
- AUTRAN, E. et al. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 100, n. 7, p. 2284–2288, abr. 2009.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre (RS): ArTmed, 2001.
- BARROS NETO, B. DE; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.
- BEATY, B. J.; MARQUARDT, W. C. (EDS.). **The biology of disease vectors**. Niwot, Colo: University Press of Colorado, 1996.
- BECK, B.; CLARK, T. Some biological applications of semiempirical MO theory. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 9, n. 0, p. 131–159, 1 jan. 1998.
- BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**, v. 38, n. 6, p. 3098–3100, 1 set. 1988.

BEEBE, N. W. et al. Australia's Dengue Risk Driven by Human Adaptation to Climate Change. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 5, p. e429, 5 maio 2009.

BERALDO, H. et al. Crystal structures and IR, NMR and UV spectra of 4-formyl- and 4-acetylpyridine N (4)-methyl- and N (4)-ethylthiosemicarbazones. **Journal of Molecular Structure**, v. 559, n. 1–3, p. 99–106, jan. 2001.

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

BEZERRA, N. M. M. et al. Synthesis of 3-aryl-5-decapentyl-1,2,4-oxadiazoles possessing antiinflammatory and antitumor properties. **Il Farmaco**, v. 60, n. 11–12, p. 955–960, nov. 2005.

BLUMTRITT, A. **Síntese e atividade larvicida de alguns compostos amídicos e seus precursores frente às larvas do mosquito Aedes aegypti**. Dissertação (Mestrado)—Programa de Pós Graduação em Química: Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

BORDAS, B. et al. Insecticides-Mechanisms of Action and Resistance Tagungbericht. **Tag.Ber. Akademie Landwirtschaft. – Wissenschaft. DDR, Berlin**, v. 274, p. 157–165, 1989.

BRAGA, I. A. et al. Aedes aegypti resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199–203, mar. 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos e resistência. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

BRENEMAN, C. M.; WIBERG, K. B. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 361–373, abr. 1990.

CÂMARA, F. P. et al. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 192–196, abr. 2007.

CARVALHO, M. DE A. **Aplicações de metodologias teóricas em estudos de QSAR-3D de pirimidinas substituídas**. Dissertação (Mestrado)—Programa de Pós Graduação em Química: Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

CECHINEL FILHO, V. et al. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 230–241, mar. 2003.

CHAPMAN, J. M. et al. Hypolipidemic activity of phthalimide derivatives. 2. N-Phenylphthalimide and derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 237–243, fev. 1983.

CHAPMAN, J. M.; COCOLAS, G. H.; HALL, I. H. Hypolipidemic activity of phthalimide derivatives. 1. N-Substituted phthalimide derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1399–1402, nov. 1979.

CHENG, S. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 99–102, ago. 2003.

CHENG, S.-S. et al. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 452–456, jan. 2009.

CIOSLOWSKI, J. General and unique partitioning of molecular electronic properties into atomic contributions. **Physical Review Letters**, v. 62, n. 13, p. 1469–1471, 27 mar. 1989a.

CIOSLOWSKI, J. A new population analysis based on atomic polar tensors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 22, p. 8333–8336, out. 1989b.

COUTINHO-NETO, M. et al. The Hypolipidemic Activity of N-Phenylphthalimide Derivatives: a QSAR Study. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 4, p. 139–142, 1993.

DA SILVA, J. B. P. et al. Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p. 162–175, jul. 2015a.

DA SILVA, J. B. P. et al. Intermolecular interaction of thiosemicarbazone derivatives to solvents and a potential *Aedes aegypti* target. **Journal of Molecular Structure**, v. 1093, p. 219–227, ago. 2015b.

DE ARAÚJO, A. P. et al. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera:Culicidae). **Biological Control**, v. 41, n. 3, p. 339–347, jun. 2007.

DE ARAÚJO, J. M. G. et al. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. **Journal of Virological Methods**, v. 155, n. 1, p. 34–38, jan. 2009.

DE LIMA, G. M. et al. Structural and spectral studies of thiosemicarbazones derived from 2-acetylthiophene. **Journal of Molecular Structure**, v. 604, n. 2–3, p. 287–291, fev. 2002.

DE OLIVEIRA, B. G.; DE ARAÚJO, R. C. M. . Relação entre transferência de carga e as interações intermoleculares em complexos de hidrogênio heterocíclicos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 791–796, 2007.

DE SOUSA, D. P. et al. Larvicidal activity of para-Benzoquinones. **Parasitology Research**, v. 107, n. 3, p. 741–745, ago. 2010.

DIXON, S. L.; JURIS, P. C. Atomic charge calculations for quantitative structure?property relationships. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 492–504, maio 1992.

DUONG, Q. et al. Larvicidal and structural studies of some triphenyl- and tricyclohexyltin para-substituted benzoates. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 691, n. 8, p. 1775–1779, abr. 2006.

DYER, D. H. et al. The Structural Determination of an Insect Sterol Carrier Protein-2 with a Ligand-bound C16 Fatty Acid at 1.35-Å Resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 40, p. 39085–39091, 3 out. 2003.

ELOY, F. A review of the chemistry of 1,2,4-oxadiazoles. In: **Fortschritte Der Chemischen Forschung**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1965. v. 4/4p. 807–876.

**EPI Suite TM V.1.67**. Washington, DC: Environmental Protection Agency, 2000.

ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E. Multivariate design and modeling in QSAR. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 34, n. 1, p. 1–19, ago. 1996.

ESPÍNDOLA, J. W. P. **Síntese de derivados hidrazônicos como possíveis candidatos a inseticidas larvais frente ao Aedes aegypti e a fármacos para o tratamento da doença de chagas**. Dissertação de (Mestrado)—Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas: Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

FERRARI, M. B. et al. Synthesis, structural characterization and biological activity of p-fluorobenzaldehyde thiosemicarbazones and of a nickel complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 81, n. 1–2, p. 89–97, jul. 2000.

FEUN, L. et al. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 223–229, 1 set. 2002.

FILHO, J. M. DOS S. **Planejamento bioisotérico, síntese e avaliação farmacológica de novos análogos 1,2,4-oxadiazólicos**. Dissertação (Mestrado)—Pós Graduação Biotecnologia de Produtos Bioativos: Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

FIOCRUZ. **Dengue**. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

FOCK, V. Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems. **Zeitschrift für Physik**, v. 61, n. 1–2, p. 126–148, jan. 1930.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica: Culicini: Culex, Aedes e Psorophora**. [s.l.] Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Depto. de Parasitologia, 1965.

FORATTINI, O. P. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 1, p. 157–158, mar. 1995.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09 Rev. A.02**. Wallingford, CT: [s.n.].

GAI, W. et al. Screening of HMG-CoA Reductase Inhibitors from Composite Salvia Miltiorrhiza Using Autodock. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 8, n. 1, p. 51–56, jan. 2010.

GALLAGHER, P. G. et al. Mutation of a highly conserved isoleucine disrupts hydrophobic interactions in the  $\alpha\beta$  spectrin self-association binding site. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 2, p. 229–234, fev. 2004.

GAUDIO, A. C. Modelos clássicos de estudo quantitativo das relações entre estrutura química e atividade biológica. v. 19, n. 3, p. 278–289, 1996.

GUADAGNINI, P. H.; BRUNS, R. E.; DE SOUZA, A. A. Cargas Atômicas em Moléculas. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 148–155, 1996.

GUO, F. et al. Is a Hydrophobic Amino Acid Required To Maintain the Reactive V Conformation of Thiamin at the Active Center of Thiamin Diphosphate-Requiring Enzymes? Experimental and Computational Studies of Isoleucine 415 of Yeast Pyruvate Decarboxylase †. **Biochemistry**, v. 37, n. 38, p. 13379–13391, set. 1998.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, p. 33–42, jan. 2002.

HALL, I. H. et al. Biological Activity of the Hypolipidemic Agent, N2-n-Butylindazolone. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 12, p. 1788–1791, dez. 1984.

HALSTEAD, S. B.; DEEN, J. The future of dengue vaccines. **The Lancet**, v. 360, n. 9341, p. 1243–1245, out. 2002.

HANSCH, C. et al. Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients. **Nature**, v. 194, p. 178, 14 abr. 1962.

HANSCH, C.; VERMA, R. P. Larvicidal activities of some organotin compounds on mosquito larvae: A QSAR study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 260–273, jan. 2009.

HERNANDES, M. et al. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 303–314, 1 mar. 2010.

HÖLTJE, H.-D. (ED.). **Molecular modeling: basic principles and applications**. 3rd, rev. and expanded ed. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.

HUEY, R. et al. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1145–1152, 30 abr. 2007.

JACOBS, M. Dengue. **Medicine**, v. 33, n. 7, p. 18–20, jul. 2005.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 4, p. 272–279, abr. 2010.

JAYARAMAN, K. S. et al. Indian Bt gene monoculture, potential time bomb. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 158, 1 fev. 2005.

KATZUNG, B. G. (ED.). **Basic & clinical pharmacology**. 5. ed., [Nachdr.] ed. Norwalk, Conn: Appleton & Lange, 1993.

KIM, M.; WESSELY, V.; LAN, Q. Identification of mosquito sterol carrier protein-2 inhibitors. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 4, p. 650–657, abr. 2005.

KIREEV, D. B.; FETISOV, V. I.; ZEFIROV, N. S. Approximate molecular electrostatic potential computations: applications to quantitative structure-activity relationships. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 304, n. 2, p. 143–150, fev. 1994.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, nov. 2004.

KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 13–14, p. 580–594, jul. 2006.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, p. A1133–A1138, 15 nov. 1965.

KOVALA-DEMERTZI, D. et al. Platinum(II) and palladium(II) complexes with 2-acetyl pyridine 4N-ethyl thiosemicarbazone able to overcome the cis-platin resistance. Structure, antibacterial activity and DNA strand breakage. **Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine**, v. 16, n. 3, p. 411–418, set. 2003.

KREBS, K. C.; LAN, Q. Isolation and expression of a sterol carrier protein-2 gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 51–60, fev. 2003.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global Spread and Persistence of Dengue. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 71–92, out. 2008.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 105–132, 5 maio 1982.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785–789, 15 jan. 1988.

LIMA, E. P. et al. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 259–263, jun. 2006.

LUNA, J. E. D. et al. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temefos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 842–843, dez. 2004.

MANNHOLD, R. et al. The Lipophilic Behaviour of Organic Compounds: 1. An Updating of the Hydrophobic Fragmental Constant Approach. **Quantitative Structure-Activity Relationships**, v. 17, p. 517–536, 1999.

MENDES, I. C. et al. Structural and spectral studies of thiosemicarbazones derived from 3- and 4-formylpyridine and 3- and 4-acetylpyridine. **Journal of Molecular Structure**, v. 559, n. 1–3, p. 355–360, jan. 2001.

MIERTUŠ, S.; SCROCCO, E.; TOMASI, J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilizaion of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. **Chemical Physics**, v. 55, n. 1, p. 117–129, fev. 1981.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue Instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. 3 ed, rev. ed. Brasília: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAUDE. **Combate a dengue**. Disponível em: <<http://www.combateadengue.com.br/pe-casos-de-dengue-aumentam-75-em-relacao-a-2011/>>. Acesso em: 13 mar. 2013.

MONTANARI, C. A. Química medicinal: Contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, v. 18, n. 1, p. 56–64, 1995.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. R. **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007.

MORRIS, G. et al. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, p. 1639–1662, 1998.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MULLIKEN, R. S. Electronic Population Analysis on LCAO–MO Molecular Wave Functions. I. **The Journal of Chemical Physics**, v. 23, n. 10, p. 1833–1840, out. 1955.

NEVES FILHO, R. A. W. et al. Improved microwave-mediated synthesis of 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)propionic acids and their larvicidal and fungal growth inhibitory properties. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 8, p. 819–825, ago. 2009.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 2, p. 219–225, jun. 1988.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, p. 253–253, jun. 1990.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415–415, 25 out. 2013.

OSANAI, C. H. et al. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 52–54, 1983.

PANICO, R. **A guide to IUPAC nomenclature of organic compounds: recommendations 1993**. Reprinted ed. Oxford: Blackwell Science, 1998.

PARK, I.-K. et al. Larvicidal Activity of Isobutylamides Identified in *Piper nigrum* Fruits against Three Mosquito Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1866–1870, mar. 2002.

PARKER, A. J. Protic-dipolar aprotic solvent effects on rates of bimolecular reactions. **Chemical Reviews**, v. 69, n. 1, p. 1–32, fev. 1969.

PAVÃO, A. C.; LEÃO, M. B. C. Riscos de Carcinogênese química no controle do Aedes. In: Augusto, L.G.S, RM; Martins, P.H. (Org). **Abordagem Ecológica Ensaios para o controle da dengue**, v. 1, n. 1, p. 213–226, 2005.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. DE B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268–277, 1996.

PINAZO DELGADO, M. J. Imported Dengue Hemorrhagic Fever, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1329–1330, ago. 2008.

POOPATHI, S.; ARCHANA, B. Optimization of medium composition for the production of mosquitocidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. **Indian journal of experimental biology**, v. 50, p. 65–71, 2012.

PORTAL BRASIL. **Saúde divulga novo mapa de infestação pelo mosquito da dengue**. Disponível em: <<http://portal.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2010/11/11/saude-divulga-novo-mapa-de-infestacao-pelo-mosquito-da-dengue>>. Acesso em: 11 dez. 2012.

RAMOS, M. N.; NETO, B. DE BARROS. Electronic structure and hypolipidemic activity of phthalimide and related compounds. A QSAR study. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 569–572, jun. 1990.

RAMOS, M. N.; PEREIRA, S. R. Conformation, electronic structure, and biological activity of antitumour triazenes. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 1, p. 131, 1986.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 17–23, fev. 2001.

SANGSTER, J. Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 18, n. 3, p. 1111–1229, jul. 1989.

SANTOS, S. R. L. et al. Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 150–153, jun. 2011.

SCHULTZ, T. W. et al. Quantitative structure–activity relationships (QSARs) in toxicology: a historical perspective. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 622, n. 1–2, p. 1–22, mar. 2003.

SENTHILKUMAR, A.; JAYARAMAN, M.; VENKATESALU, V. Chemical constituents and larvicidal potential of *Feronia limonia* leaf essential oil against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1337–1342, mar. 2013.

SILVA, A. G. DA; RAMOS, M. N. A multivariate statistical analysis of the QSAR of 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones with hypolipidemic activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 9, p. 1747–1755, set. 2012.

SILVA, J. B. P. DA et al. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) of 4-amino-2,6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles with anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 2, p. 337–343, 2008.

SIMAS, N. K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, n. 1, fev. 2004.

SONG, X. et al. Synthesis, larvicidal, QSAR and structural studies of some triorganotin 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarboxylates. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 545–550, jul. 2007.

STEUBER, H.; HEINE, A.; KLEBE, G. Structural and Thermodynamic Study on Aldose Reductase: Nitro-substituted Inhibitors with Strong Enthalpic Binding Contribution. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, n. 3, p. 618–638, maio 2007.

SUAYA, J. A. et al. Cost-effectiveness of annual targeted larviciding campaigns in Cambodia against the dengue vector *Aedes aegypti*: CE of annual targeted larviciding campaigns. **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. 9, p. 1026–1036, 14 set. 2007.

TABASHNIK, B. E. Breaking the code of resistance. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 10, p. 922–924, out. 2001.

TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631–639, ago. 2004.

TÉBÉKA, I. R. M. **Estudo de QSAR de compostos oxadiazólicos com atividade larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti***. Monografia (Graduação)—Graduação em Química: Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

TEITZ, Y. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin- $\beta$ 4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin- $\beta$ -4':4'-diallylthiosemicarbazone. **Antiviral Research**, v. 24, n. 4, p. 305–314, ago. 1994.

TIWARI, R. et al. Carborane Clusters in Computational Drug Design: A Comparative Docking Evaluation Using AutoDock, FlexX, Glide, and Surflex. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 6, p. 1581–1589, 22 jun. 2009.

TOMASI, J.; CAMMI, R.; MENNUCCI, B. Medium Effects on the properties of chemical systems: An overview of recent formulations in the polarizable continuum model (PCM). **International Journal of Quantum Chemistry - INT J QUANTUM CHEM**, v. 75, p. 783–803, 1999.

TYRKOV, A. G.; SUKHENKO, L. T. Synthesis and Antimicrobial Activity of Substituted Nitro-1,2,4-oxadiazole-5-carbaldehyde Hydrazones. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 38, n. 7, p. 376–378, jul. 2004.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 4, p. 609–623, 1 ago. 2003.

VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. **Canadian Journal of Physics**, v. 58, n. 8, p. 1200–1211, ago. 1980.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering**, v. 8, n. 2, p. 127–134, fev. 1995.

WIBERG, K. B.; BRENNEMAN, C. M. Substituent effects. 1. Methyl derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 24, p. 8765–8775, nov. 1990.

WIBERG, K. B.; RABLEN, P. R. Comparison of atomic charges derived via different procedures. **Journal of Computational Chemistry**, v. 14, n. 12, p. 1504–1518, dez. 1993.

WILDER-SMITH, A.; SCHWARTZ, E. Dengue in Travelers. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 9, p. 924–932, set. 2005.

WILLIAMS, D. E. Failure of net atomic charge models to represent the van der Waals envelope electric potential of n-alkanes. **Journal of Computational Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 719–732, jul. 1994.

WILLIAMS, D. E.; YAN, J.-M. Point-Charge Models for Molecules Derived from Least-Squares Fitting of the Electric Potential. In: **Advances in Atomic and Molecular Physics**. [s.l.] Elsevier, 1988. v. 23p. 87–130.

WYRICK, S. D. et al. Hypolipidemic activity of phthalimide derivatives. 7. Structure-activity studies of indazolone analogs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 768–772, jun. 1984.

YU, J. et al. Stereoselective synthesis, structural characterization, and properties of 1,2-O-isopropylidene-3-C-(5-phenyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)- $\beta$ -D-psicopyranose. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 353–361, jan. 2005.

## APÊNDICE A - CÁLCULOS E BIOENSAIOS LARVICIDAS

### 1 BIOENSAIOS LARVICIDAS

#### 1.2 DERIVADOS ÁCIDOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPIÔNICOS

Os bioensaios larvicidas dos derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) propiônicos foram realizados pelo grupo da Professora Dra. Daniela Navarro, do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (DQF/UFPE). Para a avaliação da atividade larvicida desses compostos, foi utilizada a metodologia adaptada da Organização Mundial de Saúde (OMS). A solução de estoque, de concentração 150 ppm, foi preparada pela dissolução de 0,0750g dos derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) propiônicos em 7 mL de etanol e 20 gotas do co-solvente Tween 80, e completou-se o volume até 500 mL de água destilada. Vinte larvas do mosquito *Aedes aegypti* no estágio larval L4 foram colocadas em béqueres contendo soluções dos derivados oxadiazólicos, em uma faixa de concentração obtidas por diluição da solução estoque com água destilada, com a finalidade de determinar a faixa de concentração que cada agente larvicida atua. Os ensaios foram feitos em quadruplicata para cada concentração da amostra, onde a mortalidade das larvas foi determinada após 48 horas de incubação. Os valores de LC<sub>50</sub> foram calculados utilizando a análise Probit com o programa estatístico Statplus 2006.

#### 1.3 DERIVADOS ÉSTERES 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPANOATO DE METILA

Para o teste dessa série de compostos, também foram utilizadas larvas do mosquito *Aedes aegypti* no estágio L4 em um determinado volume de água destilada, distribuídas em recipientes contendo diferentes concentrações da droga-teste solubilizada em uma quantidade mínima de: etanol, DMSO ou de soluções desses solventes com o tensoativo Tween 80. Os testes foram realizados em triplicatas e, foram utilizadas 20 larvas de *Aedes aegypti* onde a atividade larvicida foi avaliada em 48 horas de incubação. Os bioensaios foram realizados em temperatura de 25-27°C, pH 5,0 e ausência de luz. As larvas foram alimentadas com ração animal no início do teste e foram observados após 24 e 48 horas e

exposição. As larvas foram consideradas mortas quando não respondiam ao estímulo ou quando não emergissem a superfície da solução. Os valores de LC<sub>50</sub> foram calculados utilizando a análise Probit com o programa estatístico Statplus 2008, a um nível de confiança de 95%.

#### 1.4 DERIVADOS ARIL- E FENOXIMETIL-(TIO)SEMICARBAZONAS

Para cada derivado dessa série, foi realizado um bioensaio preliminar, o qual teve por finalidade determinar em que faixa de concentração a substância atua. Cada composto primeiramente passou por um teste de solubilidade para determinar qual o co-solvente mais adequado: etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetona ou Tween 80. Após o teste, cada amostra foi solubilizada com o co-solvente Tween 80, e diluída em água destilada, utilizando uma proporção de três gotas deste co-solvente para 50 mL de solução. Para a realização do bioensaio preliminar foi preparada uma solução estoque de concentração 100 ppm em um balão volumétrico de 50 mL. A partir deste estoque, prepararam-se três outras soluções com concentrações de 10, 50 e 100 ppm, dissolvendo-se em água destilada a solução estoque para a realização do teste preliminar da atividade. Vinte larvas do mosquito *Aedes aegypti* no estágio inicial L4 foram colocadas em béqueres contendo a solução. O número de larvas mortas bem como alterações morfológicas e comportamentais foi registrado após 24 horas do início do experimento e novamente após um período de 48 horas. Foram preparadas também soluções controle, que contiveram o co-solvente utilizado (Tween 80) no preparo da solução teste na mesma concentração. De acordo com o resultado obtido nos testes preliminares foram determinadas as concentrações que seriam testadas nos ensaios subsequentes. Os bioensaios seguiram a mesma metodologia utilizada nos testes preliminares e foram realizados em triplicata. Foram realizados vários testes larvicida com um mesmo composto para a definição dos pontos necessários para a construção da curva concentração/mortalidade para o cálculo da LC<sub>50</sub>. Esta, por sua vez, foi calculada através da análise de sobrevivência Probit com o programa estatístico Statplus 2008.

## APÊNDICE B – MATRIZ DE DADOS E CORRELAÇÃO PARA OS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS UTILIZANDO AS CARGAS GAPT E CHELPG

### 1 Matriz de dados e correlação dos descritores dos dos derivados aril- e fenoximetil-tiossemicarbazônicos.

Tabela 1 - Atividade larvicida experimental, descritores eletrônicos B3LYP/6-311++G(d,p) e lipofílicos para os derivados aril e fenoximetil-tiossemicarbazônicos.

Números (R)	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ (D)	ε <sub>HOMO</sub> (eV)	ε <sub>LUMO</sub> (eV)	<sup>1</sup> Δε (eV)	<sup>2</sup> Σq <sub>benzeno</sub> (e)	qC <sub>5</sub> (e)	qN <sub>1</sub> (e)	qN <sub>2</sub> (e)	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
<b>6a</b>	3,507	3,702	-6,045	-2,224	3,821	0,418	-0,047	0,202	-0,697	2,180	4,752	0,140	0,020
<b>7a</b>	3,873	3,503	-6,078	-2,336	3,742	0,163	0,004	0,245	-1,010	2,630	6,917	0,710	0,504
<b>9a</b>	3,910	3,502	-6,084	-2,357	3,727	0,064	0,012	0,260	-1,026	2,870	8,237	0,860	0,740
<b>10a</b>	4,157	3,133	-6,185	-2,507	3,678	0,439	0,088	0,301	-1,024	3,270	10,693	1,420	2,020
<b>11a</b>	3,298	5,915	-5,968	-1,589	4,379	0,844	0,655	0,199	-0,869	2,090	4,368	-0,020	0,000
<b>12a</b>	3,268	4,816	-6,088	-1,634	4,454	0,323	0,742	0,201	-0,860	2,010	4,040	0,000	0,000
<b>13a</b>	4,036	2,932	-6,168	-1,753	4,414	0,611	0,780	0,230	-0,880	2,900	8,410	0,860	0,740
<b>14a</b>	4,046	2,936	-6,164	-1,748	4,417	0,688	0,755	0,225	-0,875	2,650	7,023	0,710	0,504
<b>15a</b>	4,154	5,516	-6,108	-1,713	4,395	0,816	0,575	0,231	-0,880	3,300	10,890	1,420	2,020
<b>16a</b>	4,680	1,774	-6,212	-1,825	4,387	0,955	0,809	0,246	-0,883	3,300	10,890	1,420	2,020
<b>17a</b>	3,507	3,702	-6,045	-2,224	3,821	0,418	-0,047	0,202	-0,697	2,180	4,752	0,140	0,020

Tabela 2 - Matriz dos coeficientes de correlação das variáveis B3LYP/6-311++G(d,p), lipofílicos e das atividades para os derivados aril e fenoximetil-tiossemicarbazônicos.

	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ	ε <sub>HOMO</sub>	ε <sub>LUMO</sub>	Δε	Σq <sub>anel</sub>	qC <sub>5</sub>	qN <sub>1</sub>	qN <sub>2</sub>	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
Log(1/LC <sub>50</sub> )	1,00	-0,69	-0,83	-0,17	0,00	0,35	0,14	0,64	-0,10	0,92	0,92	0,93	0,85
μ	-0,69	1,00	0,78	0,38	0,22	0,06	0,05	-0,49	0,18	-0,46	-0,44	-0,47	-0,33
ε <sub>HOMO</sub>	-0,83	0,78	1,00	0,11	-0,10	-0,20	-0,27	-0,59	0,25	-0,74	-0,74	-0,76	-0,69
ε <sub>LUMO</sub>	-0,17	0,38	0,11	1,00	0,98	0,67	0,91	-0,70	0,47	-0,26	-0,24	-0,28	-0,18
Δε	0,00	0,22	-0,10	0,98	1,00	0,72	0,97	-0,57	0,42	-0,10	-0,08	-0,12	-0,04
Σq <sub>anel</sub>	0,35	0,06	-0,20	0,67	0,72	1,00	0,72	-0,24	0,40	0,25	0,28	0,24	0,37
qC <sub>5</sub>	0,14	0,05	-0,27	0,91	0,97	0,72	1,00	-0,40	0,27	0,02	0,03	0,00	0,07
qN <sub>1</sub>	0,64	-0,49	-0,59	-0,70	-0,57	-0,24	-0,40	1,00	-0,78	0,76	0,75	0,78	0,71
qN <sub>2</sub>	-0,33	0,18	0,25	0,47	0,42	0,40	0,27	-0,78	1,00	-0,47	-0,45	-0,48	-0,38
logP	0,92	-0,46	-0,74	-0,26	-0,10	0,25	0,02	0,76	-0,47	1,00	1,00	1,00	0,95
(logP) <sup>2</sup>	0,92	-0,44	-0,74	-0,24	-0,08	0,28	0,03	0,75	-0,45	1,00	1,00	0,99	0,96
π	0,93	-0,47	-0,76	-0,28	-0,12	0,24	0,00	0,78	-0,48	1,00	0,99	1,00	0,96
π <sup>2</sup>	0,85	-0,33	-0,69	-0,18	-0,04	0,37	0,07	0,71	-0,38	0,95	0,96	0,96	1,00

Equação de regressão mais significativa encontrada:

$$\text{Log} \left( \frac{1}{LC_{50}} \right) = 2,490(\pm 0,335) - 0,112(\pm 0,0356)\mu + 0,671(\pm 0,0912)\log P$$

$$n=10; R = 0,97; R^2 = 0,94; F = 54,61; s = 0,12; p= 0,00005$$

## 2 Matriz de dados e correlação dos descritores dos derivados aril- e fenoximetil – tiosemicarbazônicos utilizando a partição de carga CHELPG.

Tabela 3 - Atividade larvicida experimental, descritores eletrônicos B3LYP/6-311++G(d,p) e lipofílicos para os derivados aril e fenoximetil-tiosemicarbazônicos.

Números (R)	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ (D)	ε <sub>HOMO</sub> (eV)	ε <sub>LUMO</sub> (eV)	<sup>1</sup> Δε (eV)	<sup>2</sup> Σq <sub>benzeno</sub> (e)	qC <sub>5</sub> (e)	qN <sub>1</sub> (e)	qN <sub>2</sub> (e)	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
6a	3,507	3,702	-6,045	-2,224	3,821	-0,190	0,056	-0,282	0,065	2,180	4,752	0,140	0,020
7a	3,873	3,503	-6,078	-2,336	3,742	-0,191	0,180	-0,266	0,083	2,630	6,917	0,710	0,504
9a	3,910	3,502	-6,084	-2,357	3,727	-0,211	0,181	-0,255	0,046	2,870	8,237	0,860	0,740
10a	4,157	3,133	-6,185	-2,507	3,678	-0,064	0,138	-0,233	0,041	3,270	10,693	1,420	2,020
11a	3,298	5,915	-5,968	-1,589	4,379	-0,138	0,378	-0,351	0,098	2,090	4,368	-0,020	0,000
12a	3,268	4,816	-6,088	-1,634	4,454	-0,308	0,485	-0,351	0,093	2,010	4,040	0,000	0,000
13a	4,036	2,932	-6,168	-1,753	4,414	-0,147	0,441	-0,340	0,068	2,900	8,410	0,860	0,740
14a	4,046	2,936	-6,164	-1,748	4,417	-0,149	0,479	-0,342	0,096	2,650	7,023	0,710	0,504
15a	4,154	5,516	-6,108	-1,713	4,395	0,020	0,392	-0,343	0,079	3,300	10,890	1,420	2,020
16a	4,680	1,774	-6,212	-1,825	4,387	-0,006	0,441	-0,340	0,113	3,300	10,890	1,420	2,020
17a	3,507	3,702	-6,045	-2,224	3,821	-0,190	0,056	-0,282	0,065	2,180	4,752	0,140	0,020

Tabela 4 - Matriz dos coeficientes de correlação das variáveis B3LYP/6-311++G(d,p), lipofílicas e das atividades para os derivados aril e fenoximetil-tiosemicarbazônicos.

	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ	ε <sub>HOMO</sub>	ε <sub>LUMO</sub>	Δε	Σq <sub>anel</sub>	qC <sub>5</sub>	qN <sub>1</sub>	qN <sub>2</sub>	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
Log(1/LC <sub>50</sub> )	1,00	-0,69	-0,83	-0,17	0,00	0,75	0,12	0,10	0,03	0,92	0,92	0,93	0,85
μ	-0,69	1,00	0,78	0,38	0,22	-0,14	0,08	-0,29	0,06	-0,46	-0,44	-0,47	-0,33
ε <sub>HOMO</sub>	-0,83	0,78	1,00	0,11	-0,10	-0,43	-0,26	-0,05	0,03	-0,74	-0,74	-0,76	-0,69
ε <sub>LUMO</sub>	-0,17	0,38	0,11	1,00	0,98	0,06	0,89	-0,99	0,74	-0,26	-0,24	-0,28	-0,18
Δε	0,00	0,22	-0,10	0,98	1,00	0,15	0,95	-0,98	0,73	-0,10	-0,08	-0,12	-0,04
Σq <sub>anel</sub>	0,75	-0,14	-0,43	0,06	0,15	1,00	0,10	-0,09	0,10	0,79	0,81	0,79	0,85
qC <sub>5</sub>	0,12	0,08	-0,26	0,89	0,95	0,10	1,00	-0,89	0,70	0,00	0,02	-0,00	0,03
qN <sub>1</sub>	0,10	-0,29	-0,05	-0,99	-0,98	-0,09	-0,89	1,00	-0,79	0,23	0,21	0,24	0,16
qN <sub>2</sub>	0,03	0,06	0,03	0,74	0,73	0,10	0,70	-0,79	1,00	-0,23	-0,21	-0,21	-0,13
logP	0,92	-0,46	-0,74	-0,26	-0,10	0,79	0,00	0,23	-0,23	1,00	1,00	1,00	0,95
(logP) <sup>2</sup>	0,92	-0,44	-0,74	-0,24	-0,08	0,81	0,02	0,21	-0,21	1,00	1,00	0,99	0,96
π	0,93	-0,47	-0,76	-0,28	-0,12	0,79	-0,00	0,24	-0,21	1,00	0,99	1,00	0,96
π <sup>2</sup>	0,85	-0,33	-0,69	-0,18	-0,04	0,85	0,03	0,16	-0,13	0,95	0,96	0,96	1,00

Equação de regressão mais significativa encontrada:

$$\text{Log} \left( \frac{1}{LC_{50}} \right) = 2,490(\pm 0,335) - 0,112(\pm 0,0356)\mu + 0,671(\pm 0,0912)\log P \quad (29)$$

$$n=10; R = 0,97; R^2 = 0,94; F = 54,61; s = 0,12; p= 0,00005$$

**APÊNDICE C – MATRIZ DE DADOS E CORRELAÇÃO PARA OS  
DERIVADOS ÁCIDOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-  
PROPIÔNICOS UTILIZANDO AS CARGAS GAPT E CHELPG**

**1 Matriz de dados e correlação dos descritores dos derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos utilizando as partição de carga GAPT.**

Tabela 1 - Atividades larvicidas, descritores eletrônicos B3LYP/6-311G (d,p) e lipofílicos da série ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos.

Números (R)	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ (D)	ε <sub>HOMO</sub> (eV)	ε <sub>LUMO</sub> (eV)	<sup>1</sup> Δε (eV)	qC <sub>3</sub> (e)	qC <sub>6</sub> (e)	qN <sub>2</sub> (e)	qN <sub>4</sub> (e)	qO <sub>1</sub> (e)	<sup>2</sup> Σq <sub>benzeno</sub> (e)	<sup>3</sup> Σq <sub>anel</sub> (e)	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
1a	3,344	2,598	-6,874	-1,506	5,368	0,607	-0,039	-0,158	-0,621	-0,536	-0,222	-0,091	1,780	3,170	0,000	0,000
2a	3,464	2,445	-6,859	-1,562	5,297	0,630	-0,114	-0,165	-0,628	-0,534	0,336	-0,074	1,980	3,920	0,140	0,020
3a	3,541	2,418	-6,184	-1,265	4,919	0,719	-0,233	-0,175	-0,651	-0,568	0,253	-0,042	1,860	3,460	-0,020	0,000
4a	3,515	2,232	-6,762	-1,412	5,35	0,615	-0,103	-0,132	-0,629	-0,55	-0,192	-0,075	2,330	5,430	0,560	0,314
5a	3,548	2,834	-6,627	-1,404	5,224	0,654	-0,100	-0,162	-0,636	-0,554	-0,180	-0,074	2,330	5,430	0,560	0,314
6a	3,561	2,988	-6,725	-1,440	5,284	0,611	-0,024	-0,159	-0,624	-0,538	-0,196	-0,093	2,330	5,430	0,560	0,314
7a	3,717	4,868	-7,610	-2,938	4,672	0,541	0,103	-0,117	-0,618	-0,553	-0,274	-0,120	1,600	2,560	-0,280	0,078
8a	3,954	2,624	-6,900	-1,754	5,146	0,636	-0,070	-0,154	-0,638	-0,552	0,116	-0,078	2,420	5,860	0,710	0,504
9a	4,291	2,561	-6,821	-1,761	5,06	0,644	-0,071	-0,152	-0,641	-0,559	0,025	-0,076	2,670	7,130	0,860	0,740

Tabela 2 - Matriz de correlação das atividades e das variáveis calculadas com o método B3LYP/6-311G (d,p) da série de ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos. Cargas GAPT.

	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ	ε <sub>HOMO</sub>	ε <sub>LUMO</sub>	Δε	qC <sub>3</sub>	qC <sub>6</sub>	qN <sub>2</sub>	qN <sub>4</sub>	qO <sub>1</sub>	Σq <sub>benzeno</sub>	Σq <sub>anel</sub>	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
Log(1/LC <sub>50</sub> )	1,00	0,08	-0,18	-0,31	-0,38	0,03	0,15	0,18	-0,38	-0,48	0,14	-0,03	0,60	0,65	0,56	0,84
μ	0,08	1,00	-0,79	-0,91	-0,73	-0,71	0,81	0,66	0,53	-0,05	-0,48	-0,79	-0,50	-0,46	-0,51	-0,19
ε <sub>HOMO</sub>	-0,18	-0,79	1,00	0,91	0,37	0,93	-0,93	-0,82	-0,74	-0,30	0,45	0,92	0,30	0,27	0,29	0,00
ε <sub>LUMO</sub>	-0,31	-0,91	0,91	1,00	0,73	0,75	-0,81	-0,77	-0,48	0,07	0,32	0,77	0,40	0,35	0,41	0,03
<sup>1</sup> Δε	-0,38	-0,73	0,37	0,73	1,00	0,14	-0,29	-0,38	0,15	0,63	-0,02	0,21	0,39	0,34	0,44	0,07
qC <sub>3</sub>	0,03	-0,71	0,93	0,75	0,14	1,00	-0,95	-0,82	-0,91	-0,49	0,64	0,97	0,29	0,26	0,26	0,07
qC <sub>6</sub>	0,15	0,81	-0,93	-0,81	-0,29	-0,95	1,00	0,75	0,81	0,35	-0,67	-0,99	-0,22	-0,18	-0,20	0,07
qN <sub>2</sub>	0,18	0,66	-0,82	-0,77	-0,38	-0,82	0,75	1,00	0,58	-0,01	-0,61	-0,73	-0,16	-0,13	-0,16	0,11
qN <sub>4</sub>	-0,38	0,53	-0,74	-0,48	0,15	-0,91	0,81	0,58	1,00	0,75	-0,62	-0,87	-0,40	-0,39	-0,35	-0,31
qO <sub>1</sub>	-0,48	-0,05	-0,30	0,07	0,63	-0,49	0,35	-0,01	0,75	1,00	-0,16	-0,45	-0,15	-0,17	-0,09	-0,28
Σq <sub>benzeno</sub>	0,14	-0,48	0,45	0,32	-0,02	0,64	-0,67	-0,61	-0,62	-0,16	1,00	0,68	0,07	0,05	0,03	-0,07
Σq <sub>anel</sub>	-0,03	-0,79	0,92	0,77	0,21	0,97	-0,99	-0,73	-0,87	-0,45	0,68	1,00	0,28	0,25	0,25	0,03
logP	0,60	-0,50	0,30	0,40	0,39	0,29	-0,22	-0,16	-0,40	-0,15	0,07	0,28	1,00	1,00	0,99	0,91
(logP) <sup>2</sup>	0,65	-0,46	0,27	0,35	0,34	0,26	-0,18	-0,13	-0,39	-0,17	0,05	0,25	1,00	1,00	0,99	0,93
π	0,56	-0,51	0,29	0,41	0,44	0,26	-0,20	-0,16	-0,35	-0,09	0,03	0,25	0,99	0,99	1,00	0,90
π <sup>2</sup>	0,84	-0,19	0,00	0,03	0,07	0,07	0,07	0,11	-0,31	-0,28	-0,07	0,03	0,91	0,93	0,90	1,00

Equações de regressão mais significativas encontradas:

$$\text{Log}\left(\frac{1}{\text{LC}_{50}}\right) = 7,32(\pm 1,12) - 0,86(\pm 0,22)\Delta E + 0,17(\pm 0,034)(\text{logP})^2$$

$$n=9; R = 0,91; R^2 = 0,84; F = 15,36; s = 0,14; p = 0,004$$

$$\text{Log}\left(\frac{1}{LC_{50}}\right) = 6,31(\pm 0,81) - 0,57(\pm 0,16)\Delta E + 1,00(\pm 0,014)(\pi)^2$$

$$n=9; R = 0,95; R^2 = 0,91; F = 29,71; s = 0,10; p = 0,00077$$

## 2. Matriz de dados e correlação dos descritores dos derivados ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propionicos utilizando as partição de ChelpG.

Tabela 3 - Atividades larvicidas, descritores eletrônicos B3LYP/6-311G (d,p) e lipofílicos da série ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propionicos.

Números (R)	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ (D)	ε <sub>HOMO</sub> (eV)	ε <sub>LUMO</sub> (eV)	<sup>1</sup> Δε (eV)	qC <sub>3</sub> (e)	qC <sub>6</sub> (e)	qN <sub>2</sub> (e)	qN <sub>4</sub> (e)	qO <sub>1</sub> (e)	<sup>2</sup> Σq <sub>benzeno</sub> (e)	<sup>3</sup> Σq <sub>anel</sub> (e)	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
1a	3,344	2,598	-6,874	-1,506	5,368	0,607	0,603	-0,122	-0,384	-0,694	-0,208	-0,449	1,780	3,170	0,000	0,000
2a	3,464	2,445	-6,859	-1,562	5,297	0,630	0,637	-0,178	-0,399	-0,697	-0,198	-0,281	1,980	3,920	0,140	0,020
3a	3,541	2,418	-6,184	-1,265	4,919	0,719	0,637	-0,194	-0,403	-0,711	-0,207	-0,300	1,860	3,460	-0,020	0,000
4a	3,515	2,232	-6,762	-1,412	5,35	0,615	0,588	-0,206	-0,299	-0,686	-0,249	-0,379	2,330	5,430	0,560	0,314
5a	3,548	2,834	-6,627	-1,404	5,224	0,654	0,634	-0,179	-0,396	-0,7	-0,205	-0,388	2,330	5,430	0,560	0,314
6a	3,561	2,988	-6,725	-1,440	5,284	0,611	0,632	-0,095	-0,398	-0,702	-0,203	-0,399	2,330	5,430	0,560	0,314
7a	3,717	4,868	-7,610	-2,938	4,672	0,541	0,618	-0,122	-0,374	-0,697	-0,196	-0,354	1,600	2,560	-0,280	0,078
8a	3,954	2,624	-6,900	-1,754	5,146	0,636	0,608	-0,111	-0,389	-0,688	-0,197	-0,286	2,420	5,860	0,710	0,504
9a	4,291	2,561	-6,821	-1,761	5,06	0,644	0,627	-0,132	-0,39	-0,703	-0,201	-0,295	2,670	7,130	0,860	0,740

Tabela 4 - Matriz de correlação das atividades e das variáveis calculadas com o método B3LYP/6-311G (d,p) da série ácidos 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propionicos.

	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ	ε <sub>HOMO</sub>	ε <sub>LUMO</sub>	Δε	qC <sub>3</sub>	qC <sub>6</sub>	qN <sub>2</sub>	qN <sub>4</sub>	qO <sub>1</sub>	Σq <sub>benzeno</sub>	Σq <sub>anel</sub>	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
Log(1/LC <sub>50</sub> )	1,00	0,08	-0,18	-0,31	-0,38	0,07	0,34	-0,12	-0,07	0,30	0,56	0,56	0,60	0,65	0,56	0,84
μ	0,08	1,00	-0,79	-0,91	-0,73	0,07	0,42	-0,08	-0,05	0,40	-0,13	0,73	-0,50	-0,46	-0,51	-0,19
ε <sub>HOMO</sub>	-0,18	-0,79	1,00	0,91	0,37	0,30	-0,48	-0,19	-0,45	-0,24	0,11	-0,55	0,30	0,27	0,29	0,00
ε <sub>LUMO</sub>	-0,31	-0,91	0,91	1,00	0,73	0,10	-0,41	-0,04	-0,15	-0,37	-0,09	-0,82	0,40	0,35	0,41	0,03
<sup>1</sup> Δε	-0,38	-0,73	0,37	0,73	1,00	-0,27	-0,12	0,21	0,40	-0,42	-0,38	-0,92	0,39	0,34	0,44	0,07
qC <sub>3</sub>	0,07	0,07	0,30	0,10	-0,27	1,00	-0,01	-0,82	-0,83	0,66	0,37	0,11	-0,02	-0,03	-0,09	-0,10
qC <sub>6</sub>	0,34	0,42	-0,48	-0,41	-0,12	-0,01	1,00	-0,38	0,06	0,58	-0,18	0,31	0,06	0,08	0,09	0,27
qN <sub>2</sub>	-0,12	-0,08	-0,19	-0,04	0,21	-0,82	-0,38	1,00	0,66	-0,90	-0,26	-0,09	0,10	0,09	0,12	0,09
qN <sub>4</sub>	-0,07	-0,05	-0,45	-0,15	0,40	-0,83	0,06	0,66	1,00	-0,44	-0,19	-0,28	0,13	0,12	0,20	0,15
qO <sub>1</sub>	0,30	0,40	-0,24	-0,37	-0,42	0,66	0,58	-0,90	-0,44	1,00	0,33	0,37	-0,17	-0,15	-0,18	-0,02
Σq <sub>benzeno</sub>	0,56	-0,13	0,11	-0,09	-0,38	0,37	-0,18	-0,26	-0,19	0,33	1,00	0,32	0,22	0,23	0,17	0,27
Σq <sub>anel</sub>	0,56	0,73	-0,55	-0,82	-0,92	0,11	0,31	-0,09	-0,28	0,37	0,32	1,00	-0,25	-0,19	-0,31	0,13
logP	0,60	-0,50	0,30	0,40	0,39	-0,02	0,06	0,10	0,13	-0,17	0,22	-0,25	1,00	1,00	0,99	0,91
(logP) <sup>2</sup>	0,65	-0,46	0,27	0,35	0,34	-0,03	0,08	0,09	0,12	-0,15	0,23	-0,19	1,00	1,00	0,99	0,93
π	0,56	-0,51	0,29	0,41	0,44	-0,09	0,09	0,12	0,20	-0,18	0,17	-0,31	0,99	0,99	1,00	0,90
π <sup>2</sup>	0,84	-0,19	0,00	0,03	0,07	-0,10	0,27	0,09	0,15	-0,02	0,27	0,13	0,91	0,93	0,90	1,00

Equações de regressão mais significativas encontradas:

$$\text{Log}\left(\frac{1}{LC_{50}}\right) = 7,32(\pm 1,12) - 0,86(\pm 0,22)\Delta E + 0,17(\pm 0,034)(\log P)^2$$

$$n=9; R = 0,91; R^2 = 0,84; F = 15,36; s = 0,14; p = 0,004$$

$$\mathbf{Log}\left(\frac{1}{LC_{50}}\right) = \mathbf{6,31(\pm 0,81)} - \mathbf{0,57(\pm 0,16)\Delta E} + \mathbf{1,00(\pm 0,014)(\pi)^2}$$

$$n=9; R = 0,95; R^2 = 0,91; F = 29,71; s = 0,10; p= 0,00077$$

**APÊNDICE D – MATRIZ DE DADOS E CORRELAÇÃO PARA OS  
DERIVADOS 3-(-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPANOATO DE  
METILA UTILIZANDO AS CARGAS GAPT E CHELPG**

**1 Matriz de dados e correlação dos descritores dos derivados ésteres 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila utilizando as partição de carga GAPT.**

Tabela 1 - Atividades larvicidas, descritores eletrônicos B3LYP/6-311G(d,p), lipofílicos da série 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.

Números (R)	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ (D)	ε <sub>HOMO</sub> (eV)	ε <sub>LUMO</sub> (eV)	<sup>1</sup> Δε (eV)	qC <sub>3</sub> (e)	qC <sub>6</sub> (e)	qN <sub>2</sub> (e)	qN <sub>4</sub> (e)	qO <sub>1</sub> (e)	<sup>2</sup> Σq <sub>benzeno</sub> (e)	<sup>3</sup> Σq <sub>anel</sub> (e)	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
3e	3,879	3,091	-6,838	-1,466	5,372	0,608	-0,037	-0,161	-0,627	-0,541	-0,222	-0,094	2,070	4,285	0,000	0,000
4e	3,958	3,109	-6,284	-1,523	5,301	0,631	-0,111	-0,168	-0,633	-0,540	0,339	-0,077	2,270	5,153	0,140	0,020
5e	4,068	5,463	-7,573	-2,912	4,661	0,542	0,106	-0,120	-0,624	-0,559	-0,274	-0,123	1,880	3,534	-0,280	0,078
6e	4,091	4,644	-6,165	-1,196	4,969	0,715	-0,227	-0,179	-0,653	-0,568	0,260	-0,047	2,150	4,622	-0,020	0,000
7e	4,120	3,224	-6,596	-1,362	5,234	0,655	-0,097	-0,165	-0,641	-0,560	-0,180	-0,077	2,610	6,812	0,560	0,314
9e	4,234	3,472	-6,694	-1,402	5,292	0,612	-0,022	-0,162	-0,628	-0,544	-0,195	-0,095	2,610	6,812	0,560	0,314
10e	4,627	3,301	-6,868	-1,717	5,151	0,636	-0,067	-0,157	-0,642	-0,559	0,118	-0,082	2,710	7,344	0,710	0,504
11e	4,714	3,497	-7,264	-2,015	5,249	0,566	0,089	-0,141	-0,630	-0,543	0,401	-0,110	3,350	11,223	1,420	2,020
12e	4,788	3,248	-6,792	-1,724	5,068	0,645	-0,068	-0,156	-0,647	-0,565	0,026	-0,080	2,960	8,762	0,860	0,740
13e	5,125	3,217	-6,637	-1,727	4,911	0,655	-0,065	-0,154	-0,653	-0,575	-0,079	-0,080	3,230	10,433	1,120	1,250
14e	5,076	2,633	-7,017	-1,926	5,091	0,613	-0,011	-0,150	-0,641	-0,556	0,366	-0,091	3,350	11,223	1,420	2,020

Tabela 2 - Matriz de correlação das atividades, das variáveis B3LYP/6-311G (d,p), lipofílicas da série dos ésteres 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.

	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ	ε <sub>HOMO</sub>	ε <sub>LUMO</sub>	Δε	qC <sub>3</sub>	qC <sub>6</sub>	qN <sub>2</sub>	qN <sub>4</sub>	qO <sub>1</sub>	Σq <sub>benzeno</sub>	Σq <sub>anel</sub>	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
Log(1/LC <sub>50</sub> )	1,00	-0,41	-0,10	-0,18	-0,23	0,34	0,19	-0,20	0,10	0,62	0,59	0,28	0,90	0,91	0,88	0,84
μ	-0,41	1,00	-0,22	-0,49	-0,71	0,10	-0,18	0,12	-0,29	-0,12	-0,25	0,39	-0,61	-0,57	-0,62	-0,42
ε <sub>HOMO</sub>	-0,10	-0,22	1,00	0,90	0,26	0,29	-0,37	-0,70	-0,48	-0,58	-0,31	-0,56	-0,04	-0,09	-0,08	-0,30
ε <sub>LUMO</sub>	-0,18	-0,49	0,90	1,00	0,65	0,09	-0,29	-0,49	-0,23	-0,58	-0,22	-0,65	0,02	-0,03	0,01	-0,24
<sup>1</sup> Δε	-0,23	-0,71	0,26	0,65	1,00	-0,31	-0,01	0,13	0,33	-0,29	0,03	-0,47	0,12	0,09	0,17	-0,01
qC <sub>3</sub>	0,34	0,10	0,29	0,09	-0,31	1,00	-0,73	-0,76	-0,54	0,36	0,47	0,56	0,33	0,32	0,28	0,25
qC <sub>6</sub>	0,19	-0,18	-0,37	-0,29	-0,01	-0,73	1,00	0,48	0,34	0,01	-0,38	-0,37	0,05	0,05	0,07	0,03
qN <sub>2</sub>	-0,20	0,12	-0,70	-0,49	0,13	-0,76	0,48	1,00	0,67	-0,04	-0,02	-0,03	-0,12	-0,08	-0,07	0,10
qN <sub>4</sub>	0,10	-0,29	-0,48	-0,23	0,33	-0,54	0,34	0,67	1,00	0,29	0,38	-0,01	0,22	0,26	0,29	0,48
qO <sub>1</sub>	0,62	-0,12	-0,58	-0,58	-0,29	0,36	0,01	-0,04	0,29	1,00	0,77	0,72	0,52	0,55	0,54	0,68
Σq <sub>benzeno</sub>	0,59	-0,25	-0,31	-0,22	0,03	0,47	-0,38	-0,02	0,38	0,77	1,00	0,68	0,69	0,71	0,71	0,83
Σq <sub>anel</sub>	0,28	0,39	-0,56	-0,65	-0,47	0,56	-0,37	-0,03	-0,01	0,72	0,68	1,00	0,24	0,28	0,24	0,44
logP	0,90	-0,61	-0,04	0,02	0,12	0,33	0,05	-0,12	0,22	0,52	0,69	0,24	1,00	1,00	1,00	0,92
(logP) <sup>2</sup>	0,91	-0,57	-0,09	-0,03	0,09	0,32	0,05	-0,08	0,26	0,55	0,71	0,28	1,00	1,00	0,99	0,94
π	0,88	-0,62	-0,08	0,01	0,17	0,28	0,07	-0,07	0,29	0,54	0,71	0,24	1,00	0,99	1,00	0,93
π <sup>2</sup>	0,84	-0,42	-0,30	-0,24	-0,01	0,25	0,03	0,10	0,48	0,68	0,83	0,44	0,92	0,94	0,93	1,00

Equação de regressão mais significativa encontrada:

$$\text{Log}\left(\frac{1}{LC_{50}}\right) = 6,74(\pm 1,08) - 0,67(\pm 0,21)\Delta E + 0,15(\pm 0,016)(\log P)^2$$

$$n=11; R = 0,96; R^2 = 0,92; F = 49,04; s = 0,14; p = 0,00003$$

## 2 Matriz de dados e correlação dos descritores dos derivados 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila utilizando as partição de carga ChelpG.

Tabela 3 - Atividades larvicidas, descritores eletrônicos B3LYP/6-311G (d,p), e lipofílicos da série 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.

Números (R)	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ (D)	ε <sub>HOMO</sub> (eV)	ε <sub>LUMO</sub> (eV)	<sup>1</sup> Δε (eV)	qC <sub>3</sub> (e)	qC <sub>6</sub> (e)	qN <sub>2</sub> (e)	qN <sub>4</sub> (e)	qO <sub>1</sub> (e)	<sup>2</sup> Σq <sub>benzeno</sub> (e)	<sup>3</sup> Σq <sub>anel</sub> (e)	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
3e	3,879	3,091	-6,838	-1,466	5,372	0,529	-0,071	-0,353	-0,640	-0,223	-0,409	0,072	2,070	4,285	0,000	0,000
4e	3,958	3,109	-6,824	-1,523	5,301	0,614	-0,184	-0,382	-0,665	-0,214	-0,276	0,103	2,270	5,153	0,140	0,020
5e	4,068	5,463	-7,573	-2,912	4,661	0,585	-0,107	-0,360	-0,659	-0,212	-0,355	0,114	1,880	3,534	-0,280	0,078
6e	4,091	4,644	-6,165	-1,196	4,969	0,626	-0,217	-0,390	-0,669	-0,220	-0,305	0,097	2,150	4,622	-0,020	0,000
7e	4,120	3,224	-6,596	-1,362	5,234	0,597	-0,162	-0,377	-0,665	-0,221	-0,368	0,091	2,610	6,812	0,560	0,314
9e	4,234	3,472	-6,694	-1,402	5,292	0,592	-0,098	-0,374	-0,659	-0,219	-0,379	0,090	2,610	6,812	0,560	0,314
10e	4,627	3,301	-6,868	-1,717	5,151	0,588	-0,096	-0,380	-0,663	-0,211	-0,292	0,100	2,710	7,344	0,710	0,504
11e	4,714	3,497	-7,264	-2,015	5,249	0,599	-0,164	-0,357	-0,644	-0,211	-0,105	0,116	3,350	11,223	1,420	2,020
12e	4,788	3,248	-6,792	-1,724	5,068	0,602	-0,126	-0,374	-0,669	-0,215	-0,302	0,091	2,960	8,762	0,860	0,740
13e	5,125	3,217	-6,637	-1,727	4,911	0,604	-0,098	-0,381	-0,665	-0,216	-0,317	0,096	3,230	10,433	1,120	1,250
14e	5,076	2,633	-7,017	-1,926	5,091	0,609	-0,129	-0,378	-0,641	-0,204	-0,153	0,104	3,350	11,223	1,420	2,020

Tabela 4 - Matriz de correlação das atividades e das variáveis calculadas com o método B3LYP/6-311G (d,p) da série 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propanoato de metila.

	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ	ε <sub>HOMO</sub>	ε <sub>LUMO</sub>	Δε	qC <sub>3</sub>	qC <sub>6</sub>	qN <sub>2</sub>	qN <sub>4</sub>	qO <sub>1</sub>	Σq <sub>benzeno</sub>	Σq <sub>anel</sub>	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
Log(1/LC <sub>50</sub> )	1,00	-0,41	-0,10	-0,18	-0,23	0,34	0,19	-0,20	0,10	0,62	0,59	0,28	0,90	0,91	0,88	0,84
μ	-0,41	1,00	-0,22	-0,49	-0,71	0,10	-0,18	0,12	-0,29	-0,12	-0,25	0,39	-0,61	-0,57	-0,62	-0,42
ε <sub>HOMO</sub>	-0,10	-0,22	1,00	0,90	0,26	0,29	-0,37	-0,70	-0,48	-0,58	-0,31	-0,56	-0,04	-0,09	-0,08	-0,30
ε <sub>LUMO</sub>	-0,18	-0,49	0,90	1,00	0,65	0,09	-0,29	-0,49	-0,23	-0,58	-0,22	-0,65	0,02	-0,03	0,01	-0,24
<sup>1</sup> Δε	-0,23	-0,71	0,26	0,65	1,00	-0,31	-0,01	0,13	0,33	-0,29	0,03	-0,47	0,12	0,09	0,17	-0,01
qC <sub>3</sub>	0,34	0,10	0,29	0,09	-0,31	1,00	-0,73	-0,76	-0,54	0,36	0,47	0,56	0,33	0,32	0,28	0,25
qC <sub>6</sub>	0,19	-0,18	-0,37	-0,29	-0,01	-0,73	1,00	0,48	0,34	0,01	-0,38	-0,37	0,05	0,05	0,07	0,03
qN <sub>2</sub>	-0,20	0,12	-0,70	-0,49	0,13	-0,76	0,48	1,00	0,67	-0,04	-0,02	-0,03	-0,12	-0,08	-0,07	0,10
qN <sub>4</sub>	0,10	-0,29	-0,48	-0,23	0,33	-0,54	0,34	0,67	1,00	0,29	0,38	-0,01	0,22	0,26	0,29	0,48
qO <sub>1</sub>	0,62	-0,12	-0,58	-0,58	-0,29	0,36	0,01	-0,04	0,29	1,00	0,77	0,72	0,52	0,55	0,54	0,68
Σq <sub>benzeno</sub>	0,59	-0,25	-0,31	-0,22	0,03	0,47	-0,38	-0,02	0,38	0,77	1,00	0,68	0,69	0,71	0,71	0,83
Σq <sub>anel</sub>	0,28	0,39	-0,56	-0,65	-0,47	0,56	-0,37	-0,03	-0,01	0,72	0,68	1,00	0,24	0,28	0,24	0,44
logP	0,90	-0,61	-0,04	0,02	0,12	0,33	0,05	-0,12	0,22	0,52	0,69	0,24	1,00	1,00	1,00	0,92
(logP) <sup>2</sup>	0,91	-0,57	-0,09	-0,03	0,09	0,32	0,05	-0,08	0,26	0,55	0,71	0,28	1,00	1,00	0,99	0,94
π	0,88	-0,62	-0,08	0,01	0,17	0,28	0,07	-0,07	0,29	0,54	0,71	0,24	1,00	0,99	1,00	0,93
π <sup>2</sup>	0,84	-0,42	-0,30	-0,24	-0,01	0,25	0,03	0,10	0,48	0,68	0,83	0,44	0,92	0,94	0,93	1,00

Equação de regressão mais significativa encontrada:

$$\mathbf{Log}\left(\frac{1}{LC_{50}}\right) = \mathbf{6,74(\pm 1,08) - 0,67(\pm 0,21)\Delta E + 0,15(\pm 0,016)(logP)^2}$$

$$n=11; R = 0,96; R^2 = 0,92; F = 49,04; s = 0,14; p= 0,00003$$

**APÊNDICE E – MATRIZ DE DADOS E CORRELAÇÃO PARA OS  
DERIVADOS ÁCIDOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-  
PROPIÔNICOS UTILIZANDO O EFEITO SOLVENTE**

**1 Matriz de dados e correlação dos descritores dos derivados ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos utilizando o efeito solvente (água)**

Tabela 1 - Atividades larvicidas, descritores eletrônicos PCM-B3LYP/6-311G(d,p) e lipofílicos da série ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos.

Derivados (R)	log(LC <sub>50</sub> )	μ (D)	ε <sub>HOMO</sub> (eV)	ε <sub>LUMO</sub> (eV)	Δε (eV)	qC <sub>3</sub> (e)	qC <sub>6</sub> (e)	qN <sub>2</sub> (e)	qN <sub>4</sub> (e)	qO <sub>1</sub> (e)	Σq <sub>benzeno</sub> (e)	Σq <sub>anel</sub> (e)	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
1a	3,344	3,405	-7,003	-1,645	5,357	0,266	-0,186	-0,171	-0,380	-0,234	-0,566	-0,157	1,780	3,170	0,000	0,000
2a	3,464	3,115	-6,932	-1,634	5,298	0,271	-0,201	-0,172	-0,381	-0,234	-0,255	-0,153	1,980	3,920	0,140	0,020
3a	3,541	3,087	-6,320	-1,460	4,860	0,266	-0,204	-0,179	-0,383	-0,237	-0,336	-0,172	1,860	3,460	-0,020	0,000
4a	3,515	2,924	-6,897	-1,549	5,348	0,262	-0,164	-0,179	-0,386	-0,237	-0,553	-0,180	2,330	5,430	0,560	0,314
5a	3,548	3,751	-6,756	-1,567	5,190	0,263	-0,185	-0,174	-0,381	-0,236	-0,538	-0,166	2,330	5,430	0,560	0,314
6a	3,561	3,957	-6,849	-1,613	5,237	0,263	-0,183	-0,172	-0,381	-0,235	-0,540	-0,163	2,330	5,430	0,560	0,314
7a	3,717	5,858	-7,518	-3,043	4,475	0,278	-0,171	-0,159	-0,377	-0,226	-0,168	-0,118	1,600	2,560	-0,280	0,078
8a	3,954	3,292	-6,969	-1,802	5,168	0,272	-0,190	-0,169	-0,380	-0,232	-0,443	-0,145	2,420	5,860	0,710	0,504
9a	4,291	3,241	-6,901	-1,813	5,089	0,272	-0,187	-0,169	-0,380	-0,232	-0,478	-0,146	2,670	7,130	0,860	0,740

Tabela 2 - Matriz de correlação das atividades e das variáveis calculadas com o método PCM-B3LYP/6-311G(d,p) da série ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-propiônicos.

	Log(1/LC <sub>50</sub> )	μ	ε <sub>HOMO</sub>	ε <sub>LUMO</sub>	Δε	qC <sub>3</sub>	qC <sub>6</sub>	qN <sub>2</sub>	qN <sub>4</sub>	qO <sub>1</sub>	Σq <sub>benzeno</sub>	Σq <sub>anel</sub>	logP	(logP) <sup>2</sup>	π	π <sup>2</sup>
Log(1/LC <sub>50</sub> )	1,00	0,04	-0,15	-0,25	-0,26	0,51	0,02	0,38	0,31	0,43	0,06	0,44	0,60	0,65	0,56	0,84
μ	0,04	1,00	-0,72	-0,91	-0,76	0,55	0,42	0,81	0,71	0,79	0,51	0,75	-0,49	-0,45	-0,49	-0,20
ε <sub>HOMO</sub>	-0,15	-0,72	1,00	0,83	0,33	-0,64	-0,60	-0,86	-0,63	-0,85	-0,34	-0,79	0,27	0,23	0,24	-0,02
ε <sub>LUMO</sub>	-0,25	-0,91	0,83	1,00	0,80	-0,79	-0,43	-0,89	-0,72	-0,94	-0,65	-0,88	0,45	0,40	0,47	0,09
Δε	-0,26	-0,76	0,33	0,80	1,00	-0,66	-0,08	-0,59	-0,53	-0,68	-0,74	-0,65	0,48	0,44	0,53	0,17
qC <sub>3</sub>	0,51	0,55	-0,64	-0,79	-0,66	1,00	-0,06	0,84	0,75	0,91	0,77	0,93	-0,29	-0,24	-0,32	0,05
qC <sub>6</sub>	0,02	0,42	-0,60	-0,43	-0,08	-0,06	1,00	0,24	-0,08	0,26	-0,23	0,11	0,07	0,09	0,10	0,21
qN <sub>2</sub>	0,38	0,81	-0,86	-0,89	-0,59	0,84	0,24	1,00	0,92	0,98	0,50	0,98	-0,28	-0,23	-0,28	0,07
qN <sub>4</sub>	0,31	0,71	-0,63	-0,72	-0,53	0,75	-0,08	0,92	1,00	0,85	0,45	0,91	-0,30	-0,26	-0,30	-0,00
qO <sub>1</sub>	0,43	0,79	-0,85	-0,94	-0,68	0,91	0,26	0,98	0,85	1,00	0,60	0,98	-0,31	-0,26	-0,32	0,07
Σq <sub>benzeno</sub>	0,06	0,51	-0,34	-0,65	-0,74	0,77	-0,23	0,50	0,45	0,60	1,00	0,63	-0,59	-0,57	-0,64	-0,42
Σq <sub>anel</sub>	0,44	0,75	-0,79	-0,88	-0,65	0,93	0,11	0,98	0,91	0,98	0,63	1,00	-0,30	-0,25	-0,31	0,06
logP	0,60	-0,49	0,27	0,45	0,48	-0,29	0,07	-0,28	-0,30	-0,31	-0,59	-0,30	1,00	1,00	0,99	0,91
(logP) <sup>2</sup>	0,65	-0,45	0,23	0,40	0,44	-0,24	0,09	-0,23	-0,26	-0,26	-0,57	-0,25	1,00	1,00	0,99	0,93
π	0,56	-0,49	0,24	0,47	0,53	-0,32	0,10	-0,28	-0,30	-0,32	-0,64	-0,31	0,99	0,99	1,00	0,90
π <sup>2</sup>	0,84	-0,20	-0,02	0,09	0,17	0,05	0,21	0,07	-0,00	0,07	-0,42	0,06	0,91	0,93	0,90	1,00

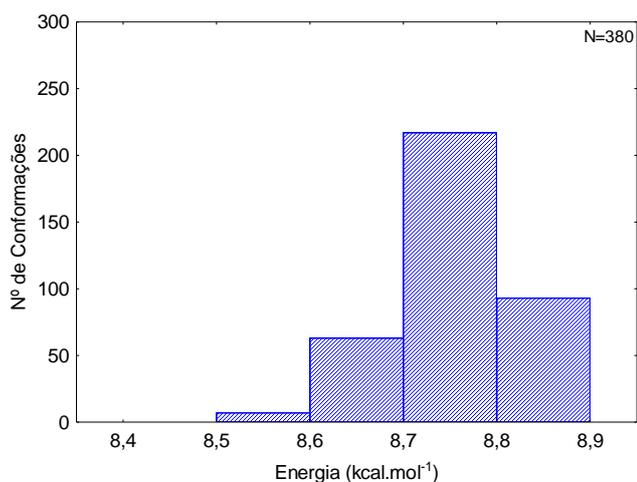
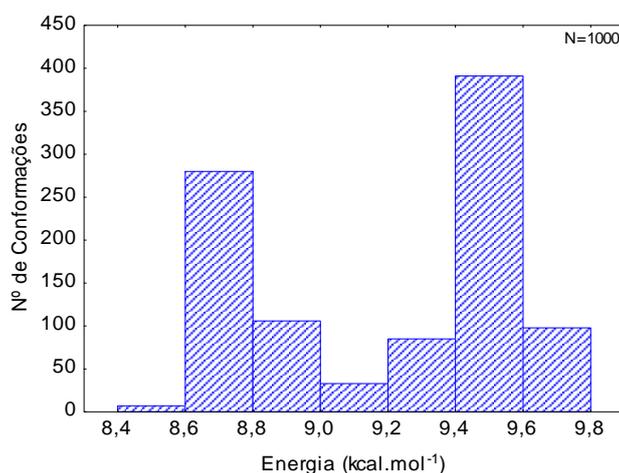
Equação de regressão mais significativa encontrada:

$$\log(LC_{50}) = -7,33(\pm 2,01) - 38,17(\pm 7,35)qC_3 - 0,16(\pm 0,027)(\log P)^2$$

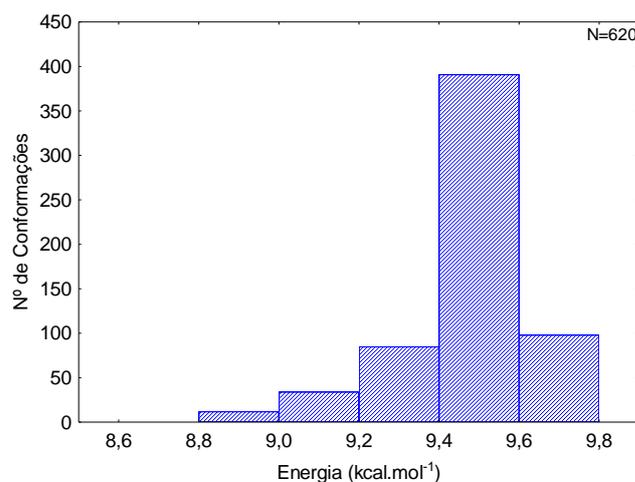
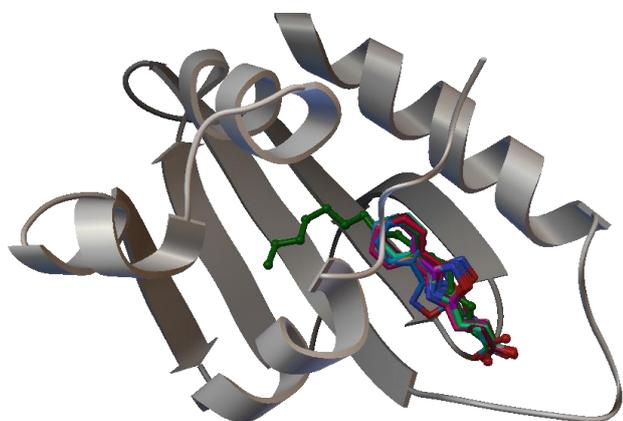
$$n=9; R = 0,95; R^2 = 0,89; F = 25,55; s = 0,11; p = 0,0012$$

**APÊNDICE F – DOCKING MOLECULAR DOS DERIVADOS  
ÁCIDOS 3-(3-ARIL-1,2,4-OXADIAZOL-5-IL)-PROPIÔNICOS  
UTILIZANDO A GERAÇÃO DE MIL CONFORMAÇÕES**

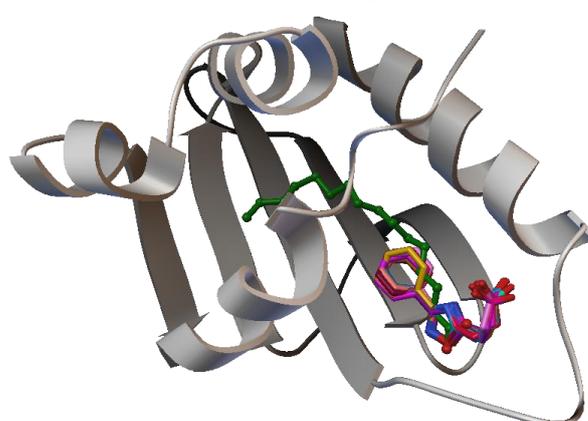
**Derivado 1a**



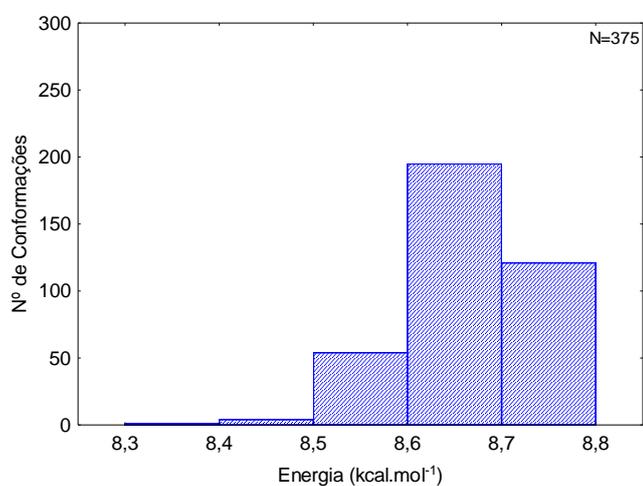
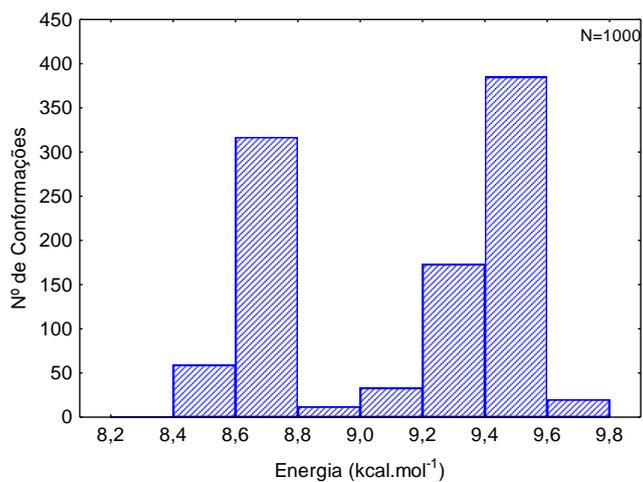
**Mediana = 8,76**



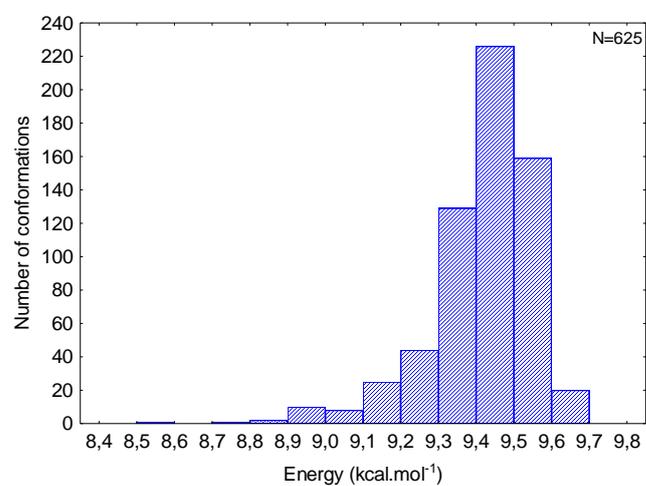
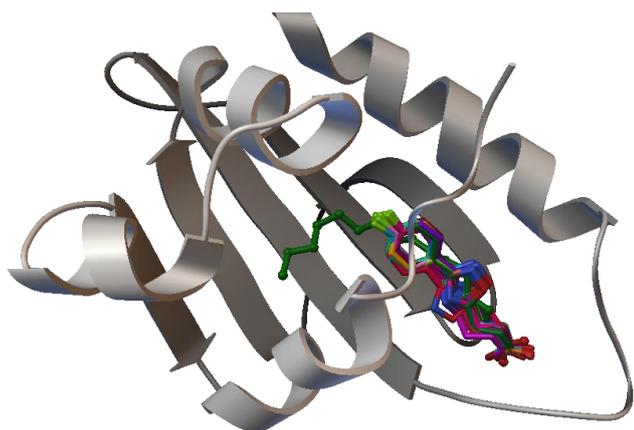
**Mediana = 9,50 (conformações dobradas)**



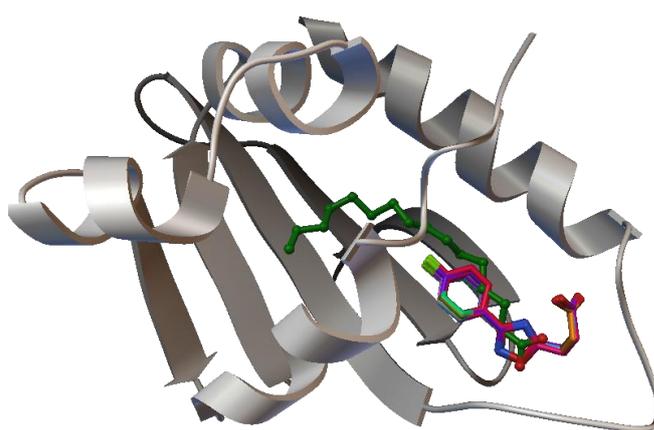
## Derivado 2a

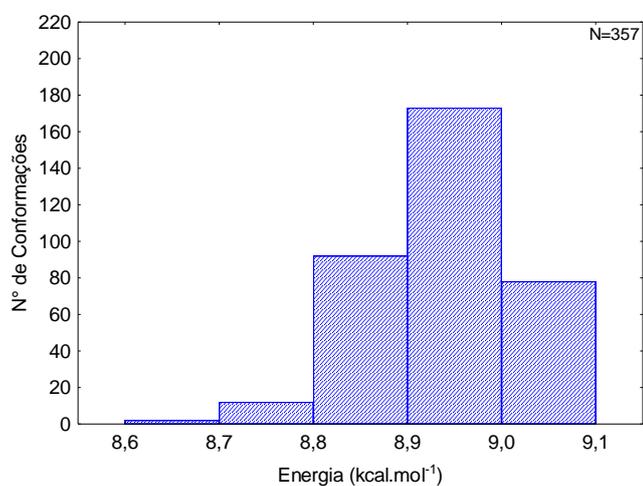
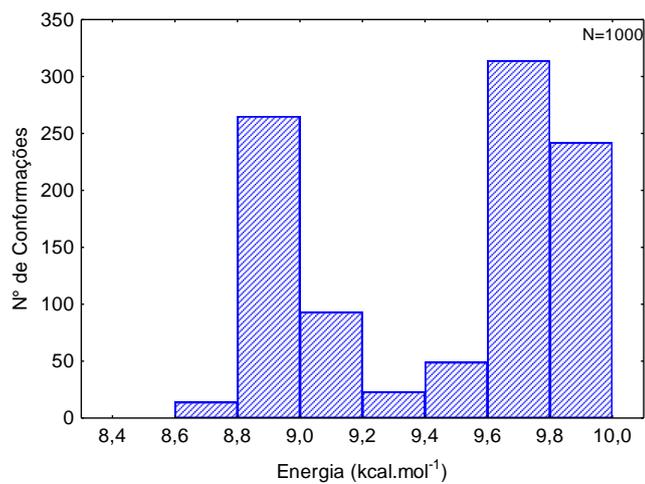
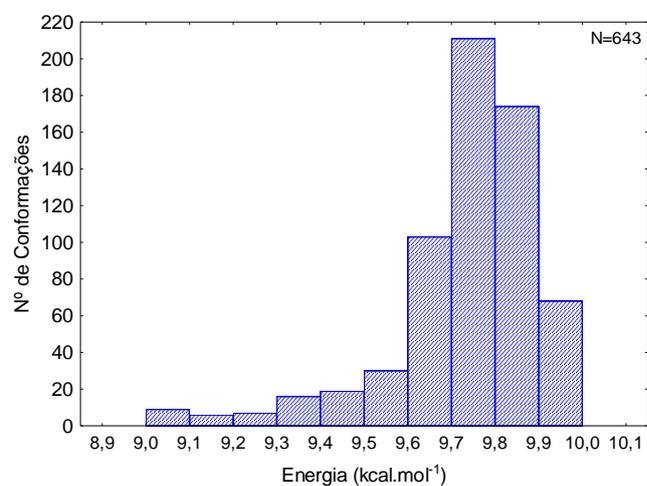
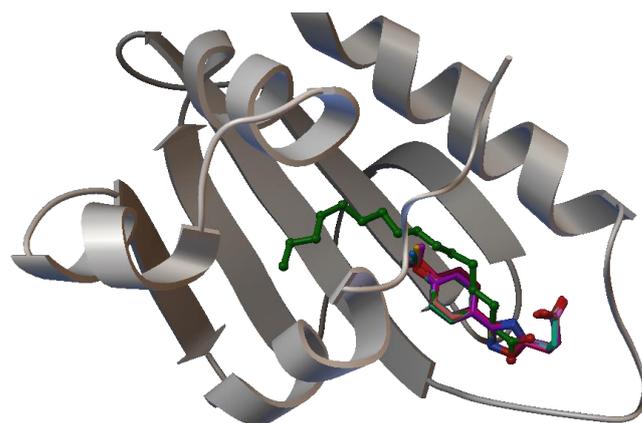
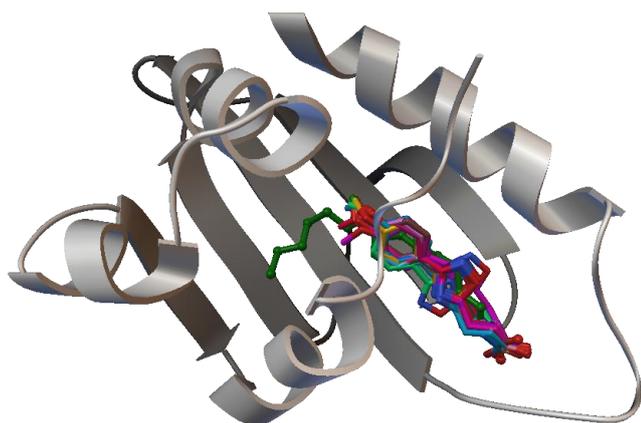


**Mediana = 8,67**

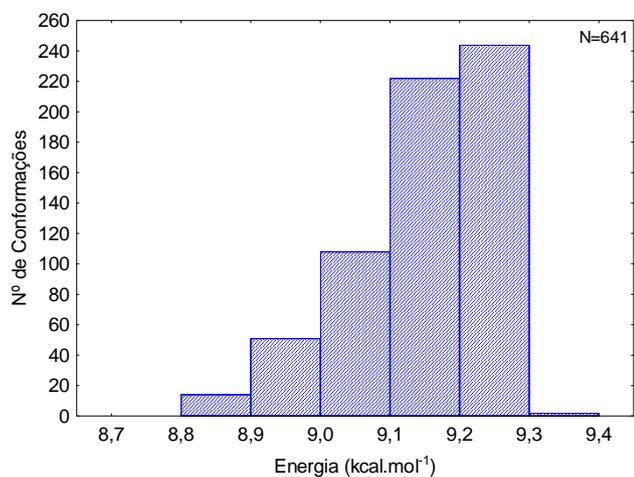
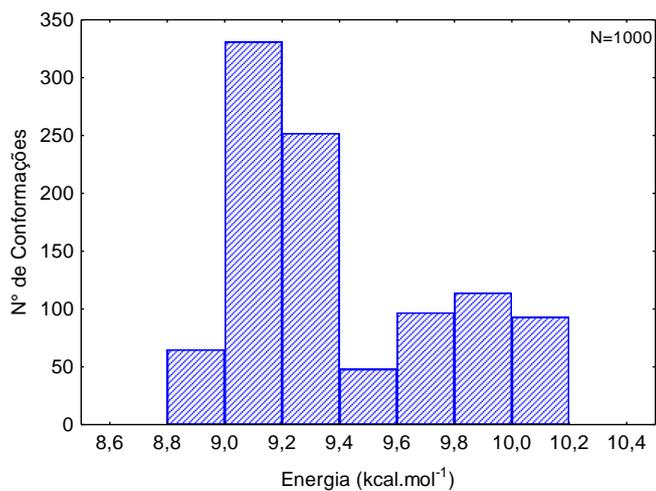


**Mediana = 9,45 (conformações dobradas)**

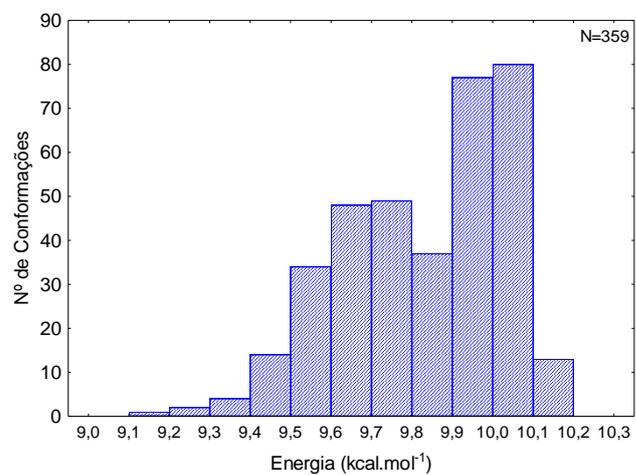
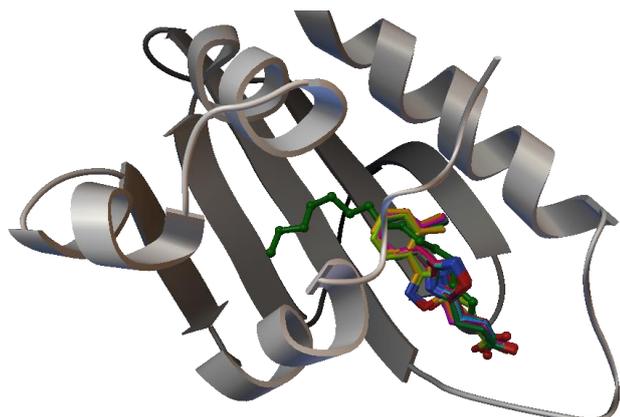


**Derivado 3a****Mediana = 8,94****Mediana = 9,78 (conformações dobradas)**

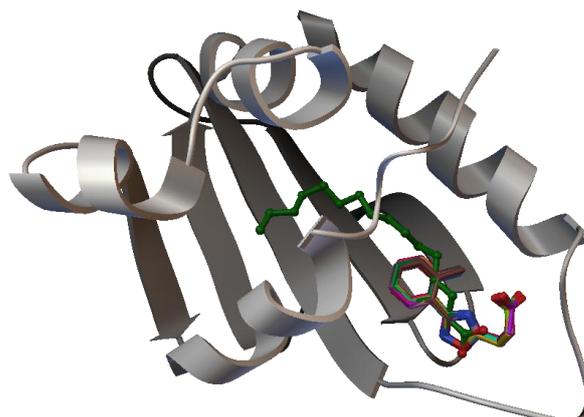
## Derivado 4a



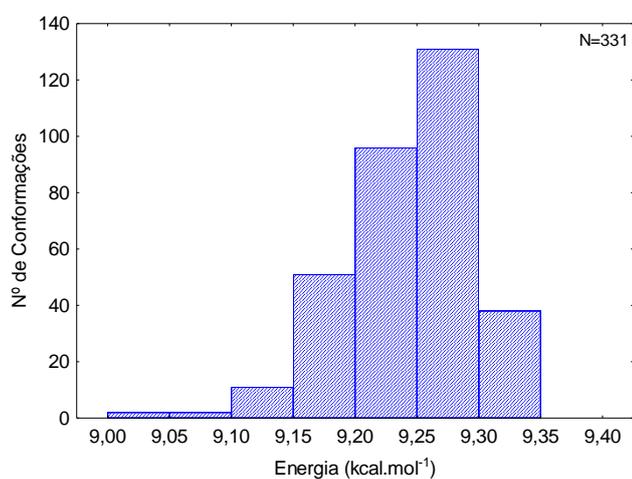
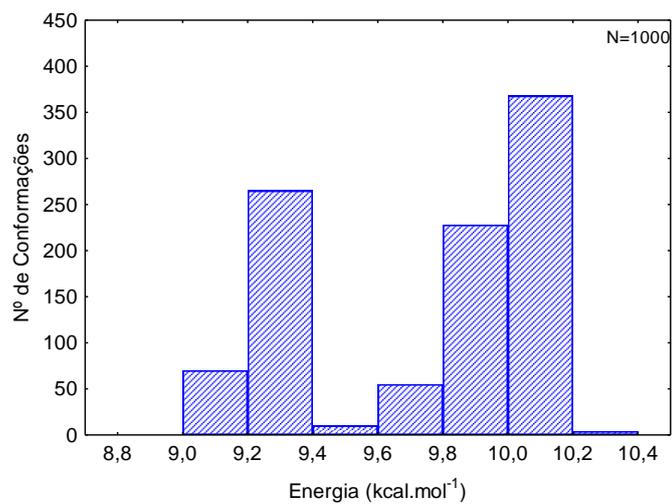
**Mediana = 9,18**



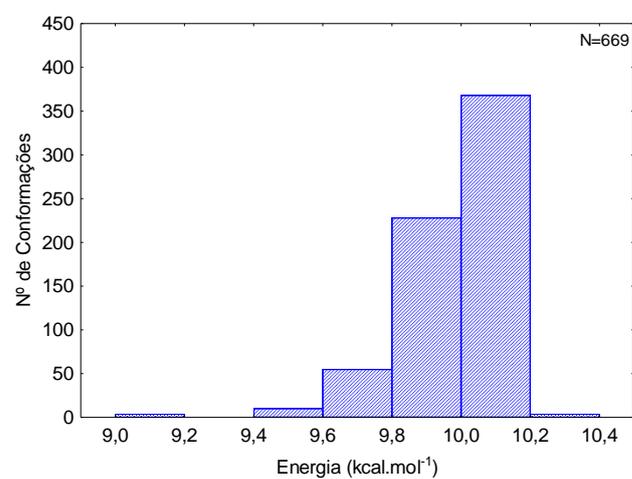
**Mediana = 9,89 (conformações dobradas)**



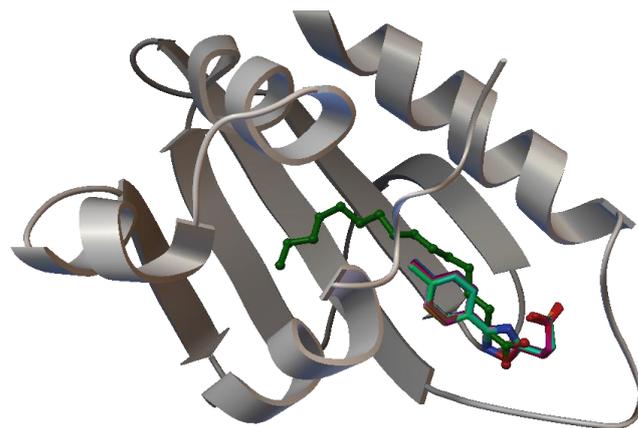
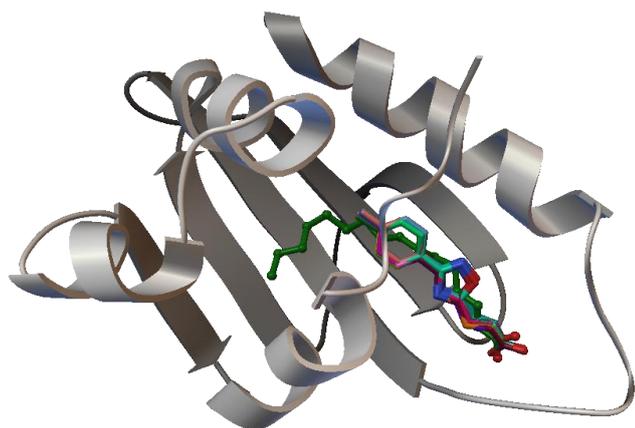
## Derivado 5a



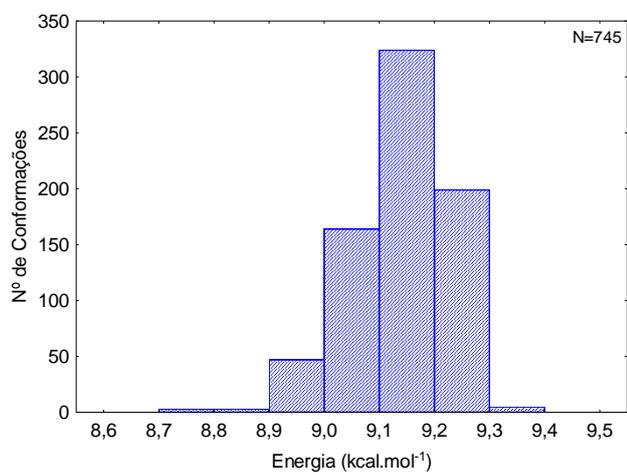
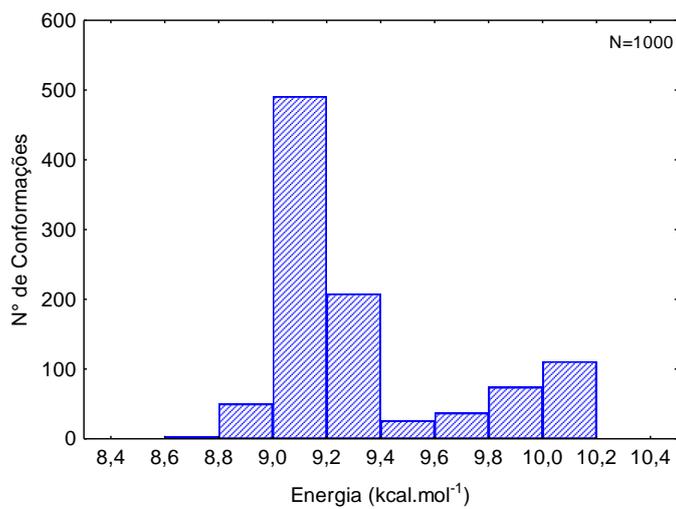
**Mediana = 9,26**



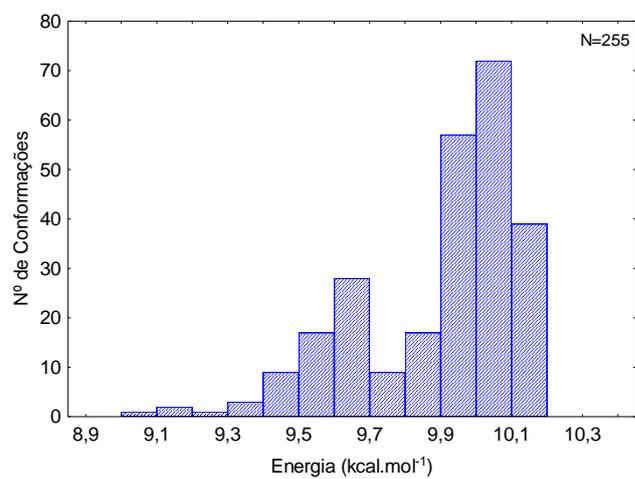
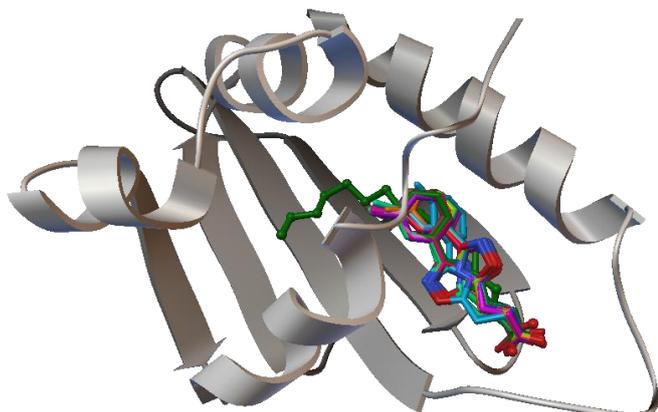
**Mediana = 10,02 (conformações dobradas)**



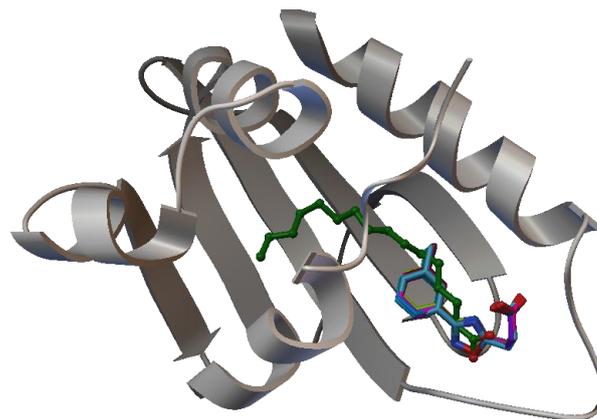
## Derivado 6a

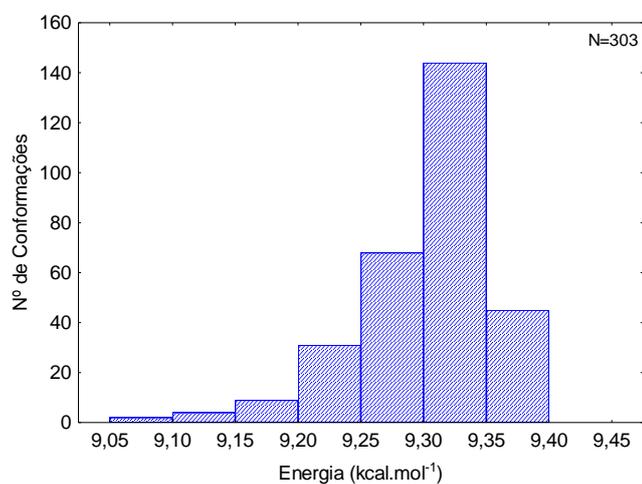
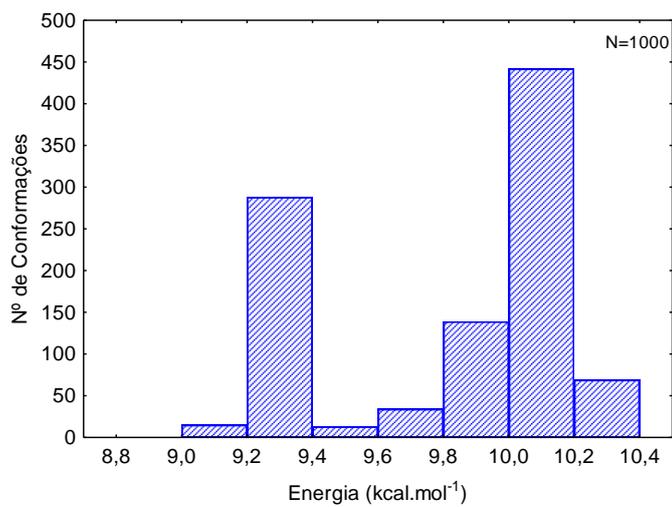


**Mediana = 9,16**

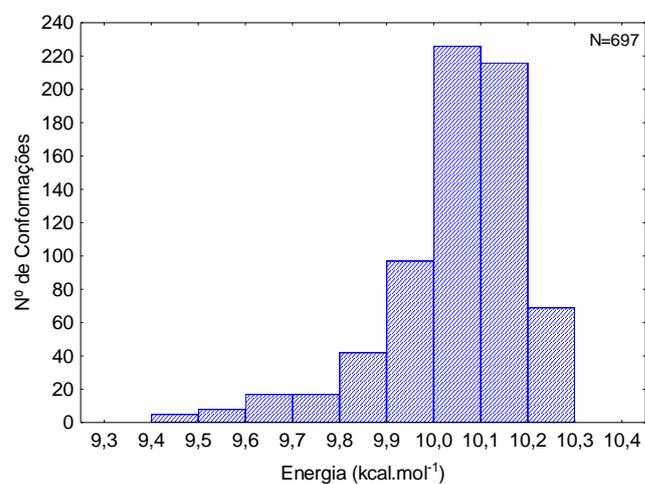
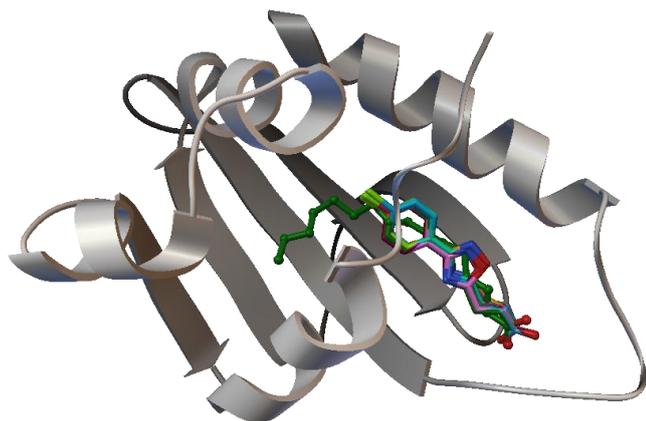


**Mediana = 9,98 (conformações dobradas)**

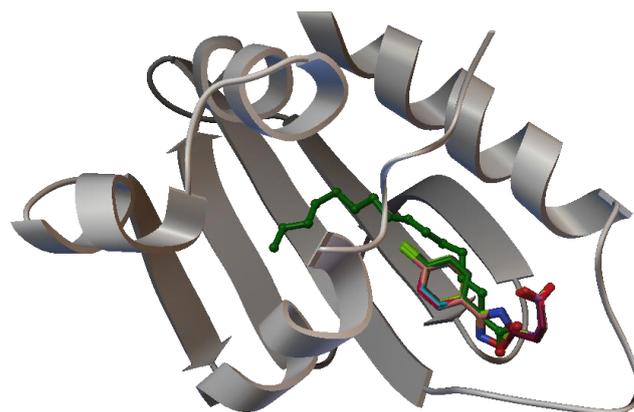


**Derivado 8a**

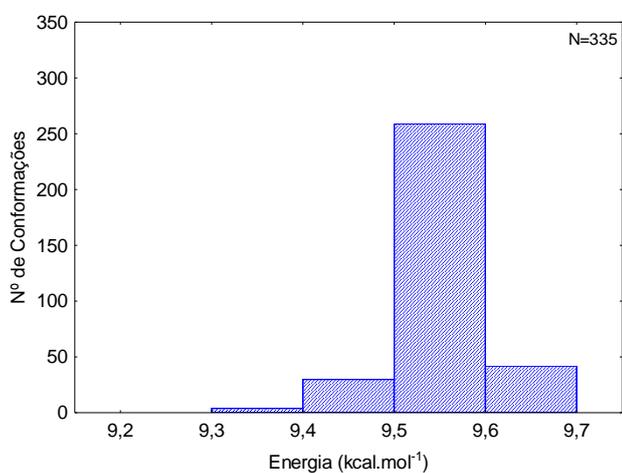
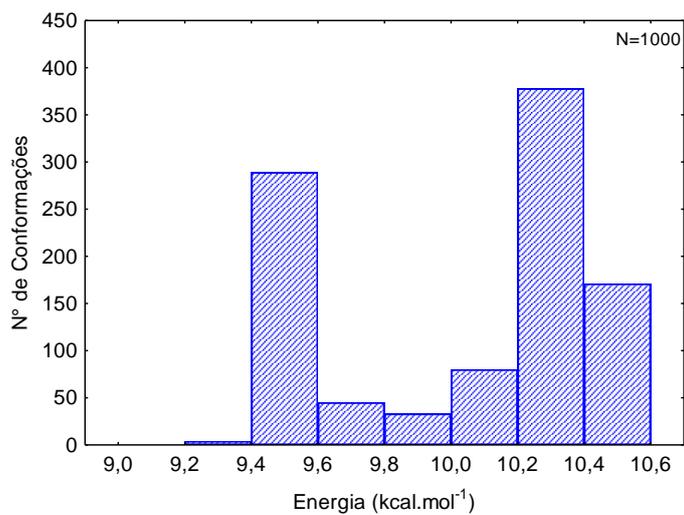
**Mediana = 9,32**



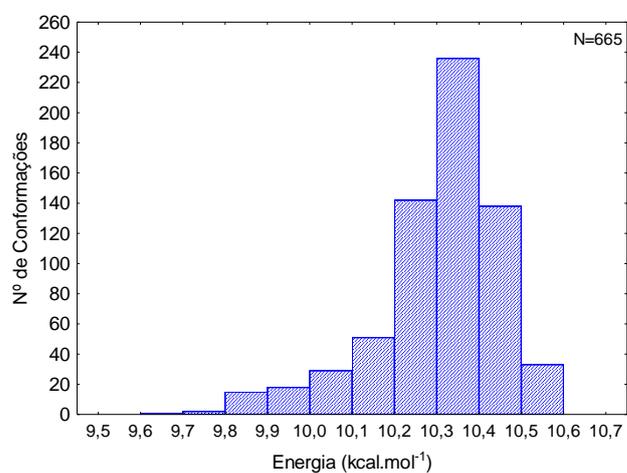
**Mediana = 10,08 (conformações dobradas)**



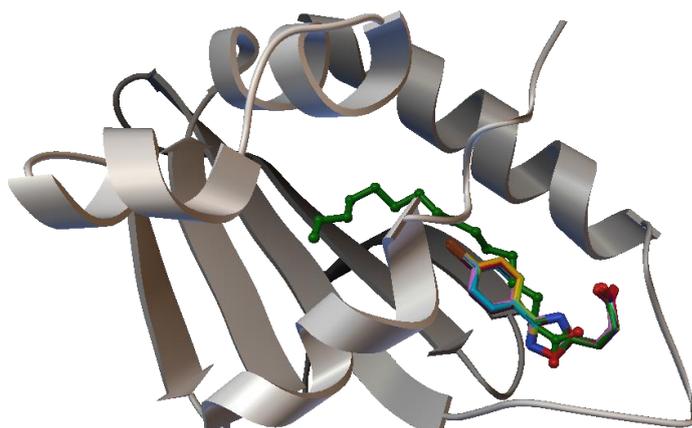
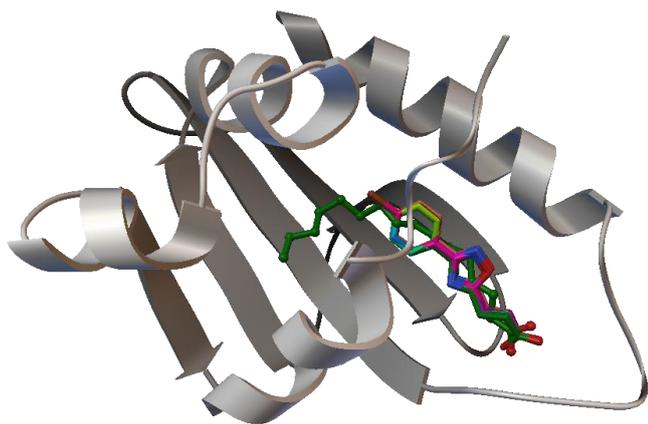
## Derivado 9a

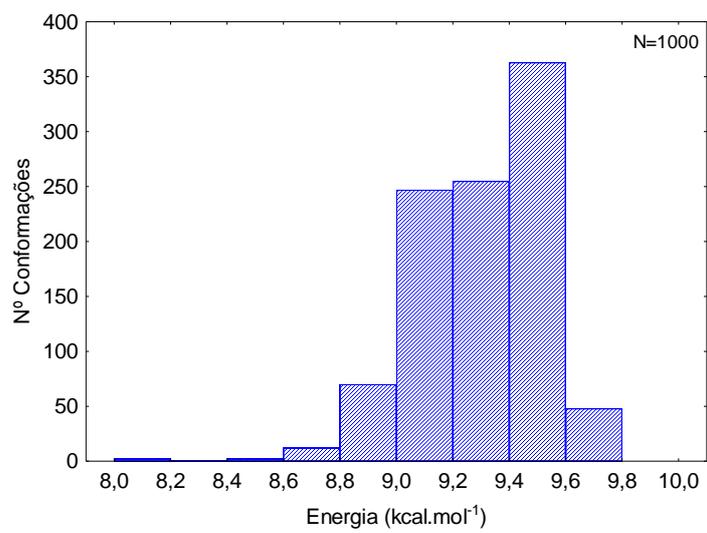


**Mediana = 9,56**

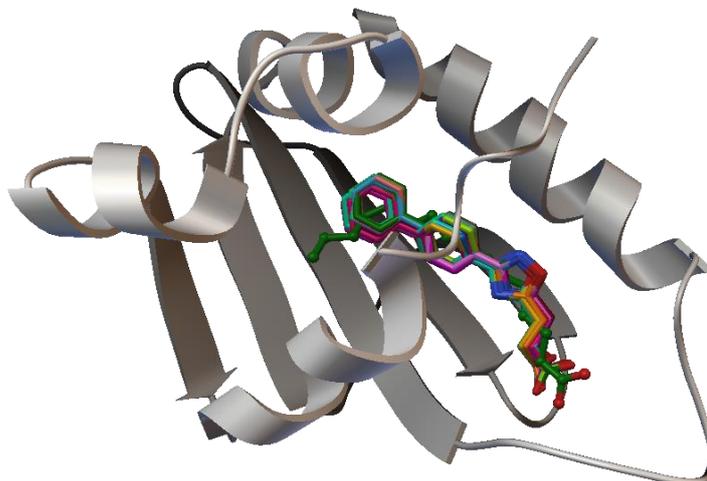


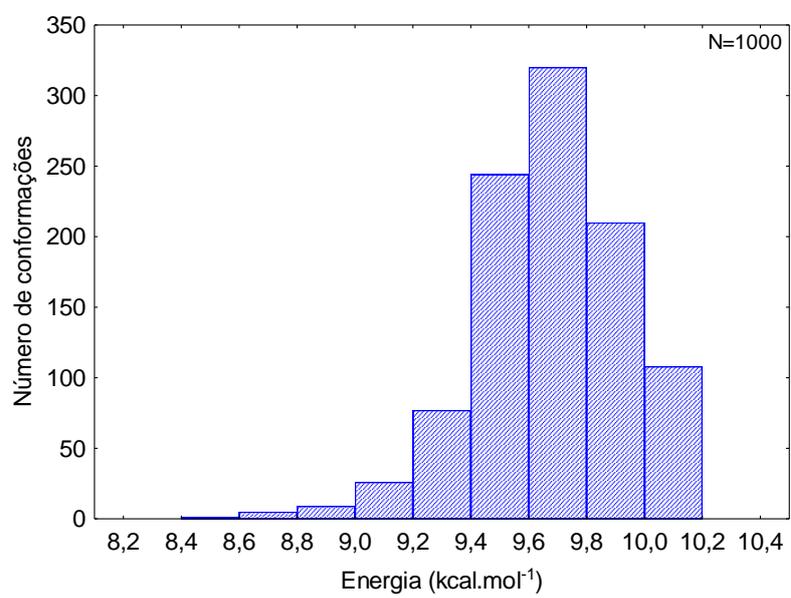
**Mediana = 10,34 (conformações dobradas)**



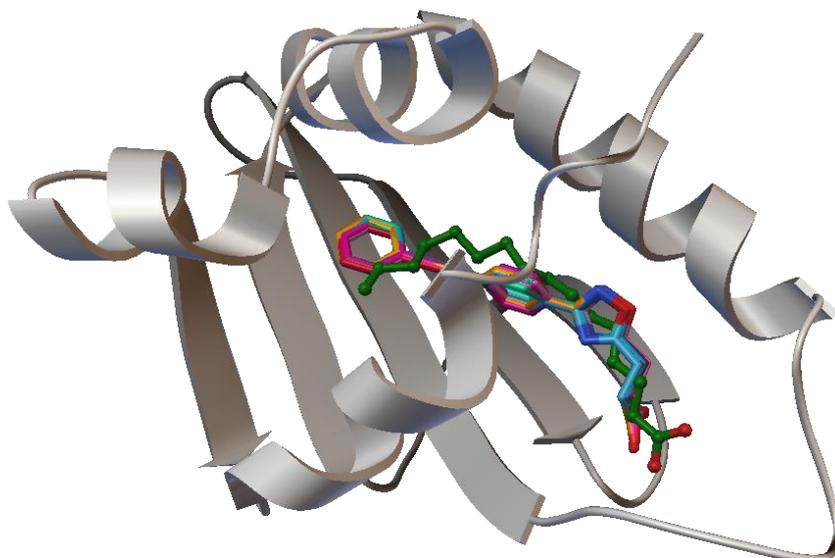
**Derivado 10a**

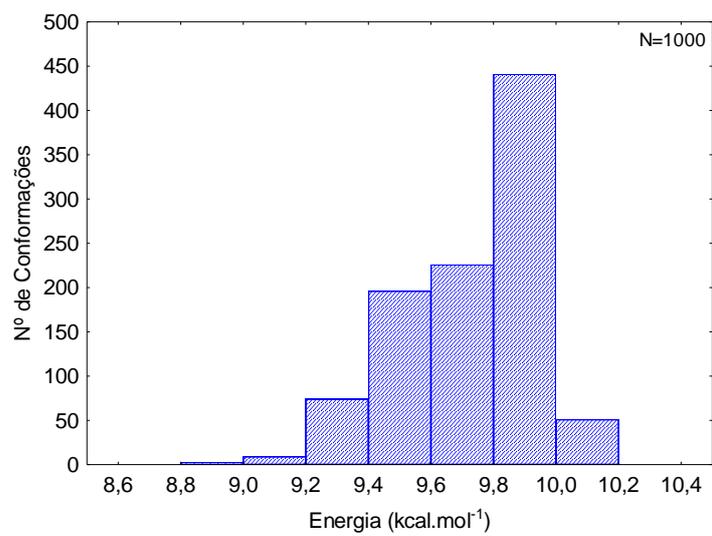
**Mediana = 9,34**



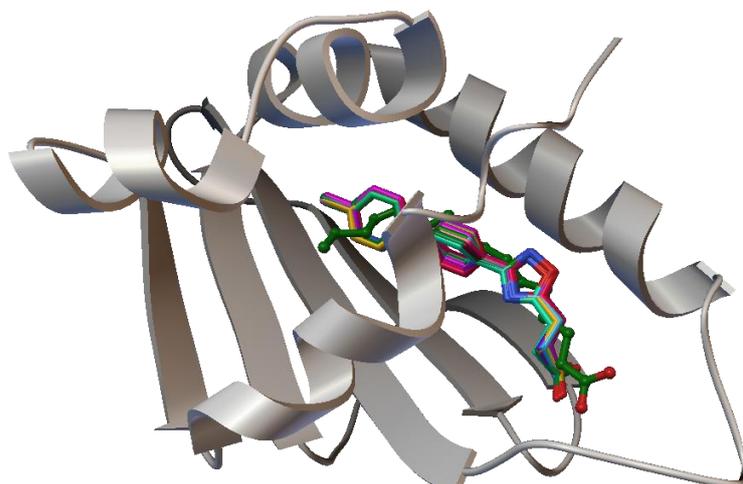
**Derivado 11a**

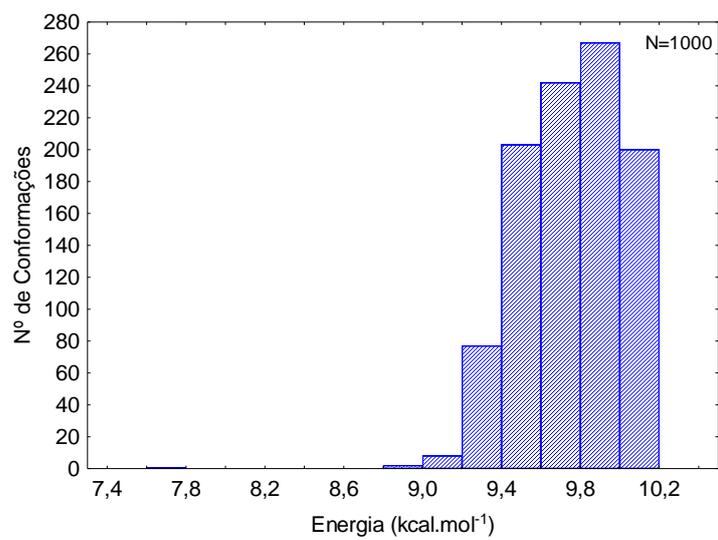
**Mediana = 9,69**



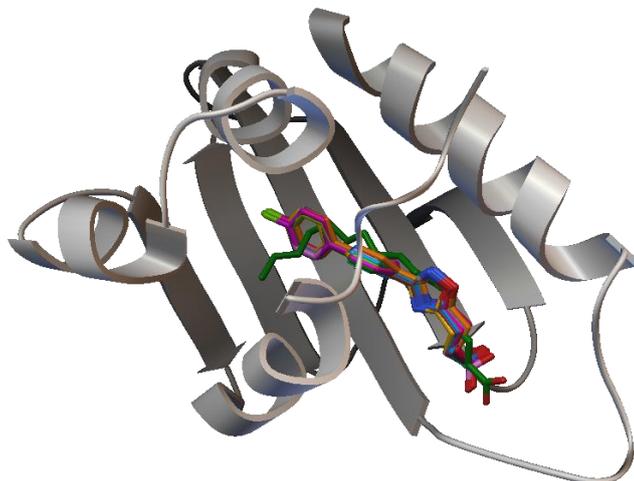
**Derivado 12a**

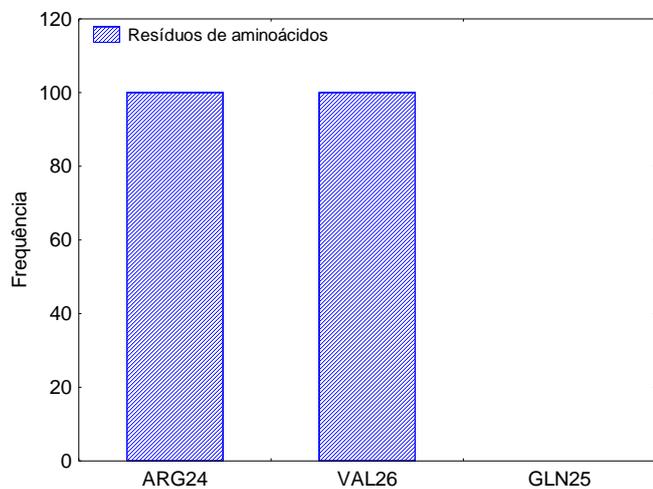
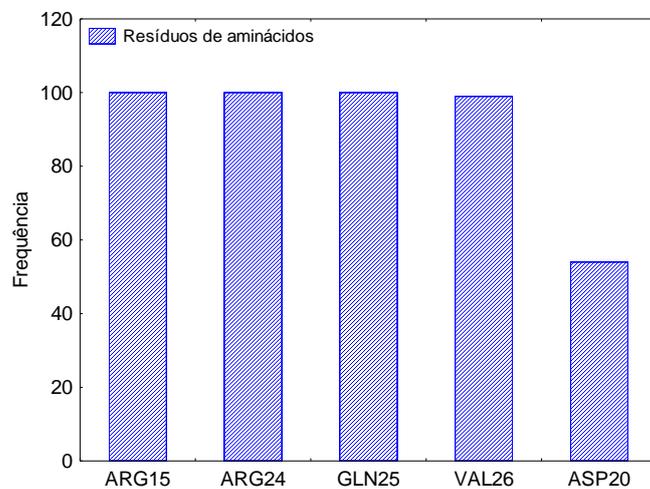
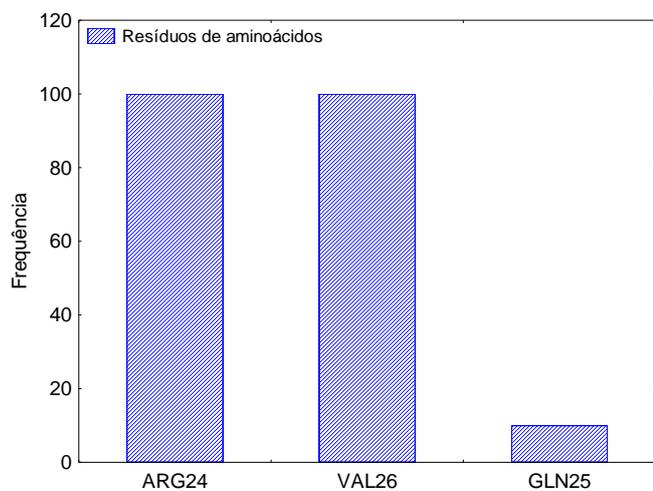
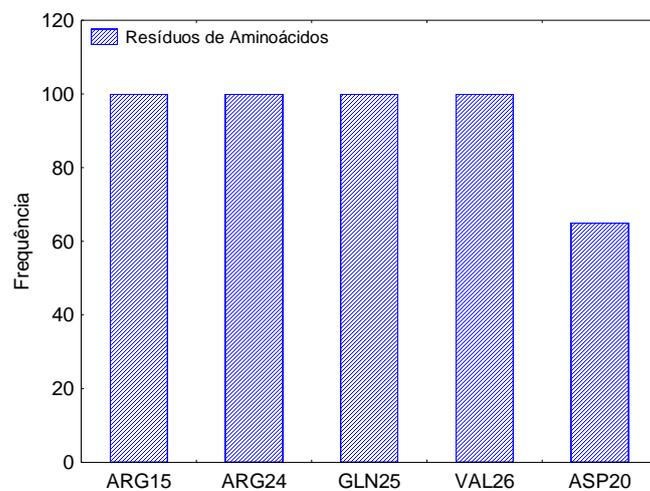
**Mediana = 9,80**

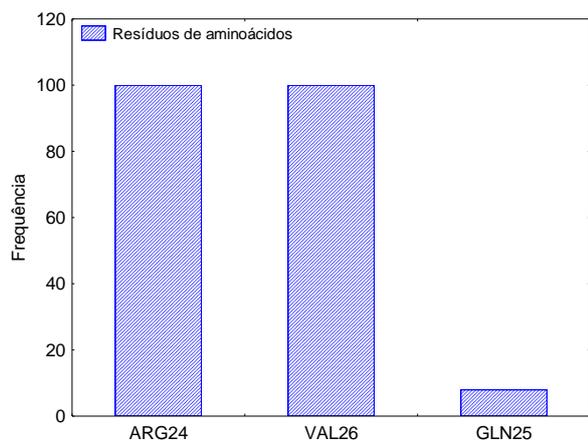
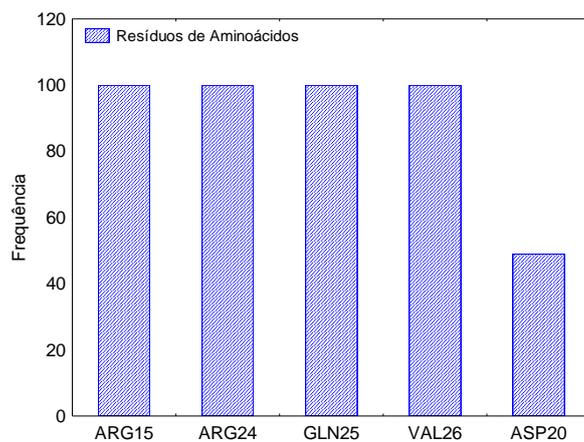
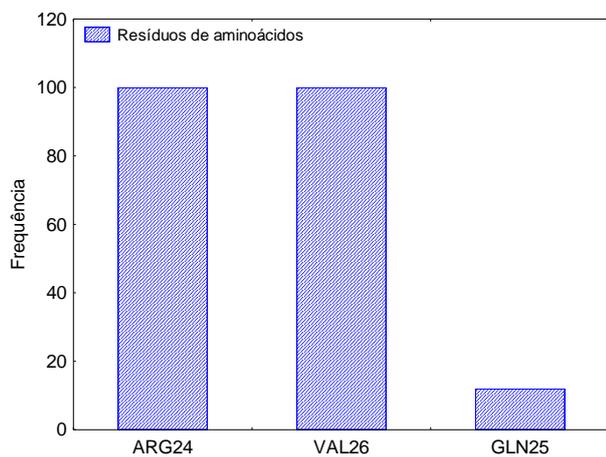
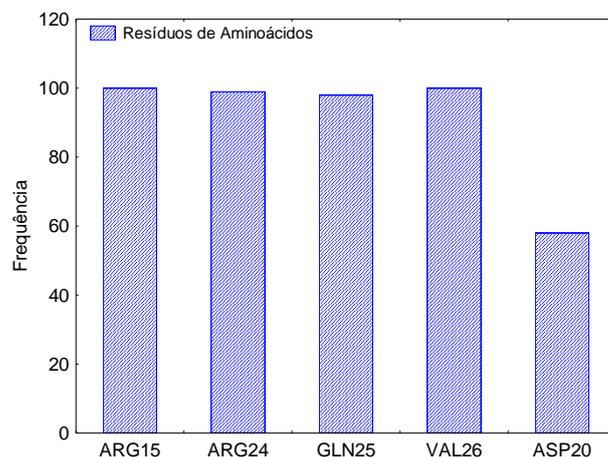
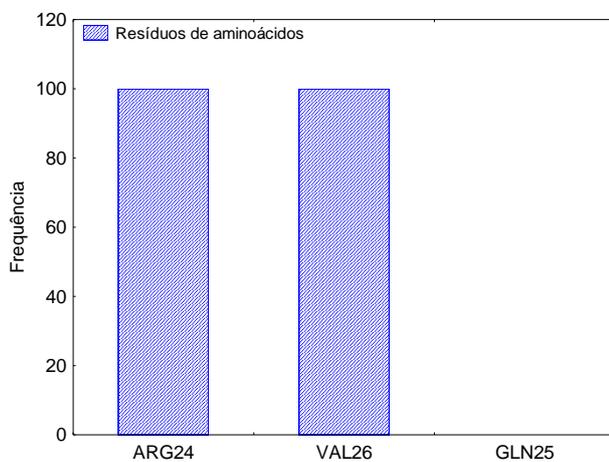
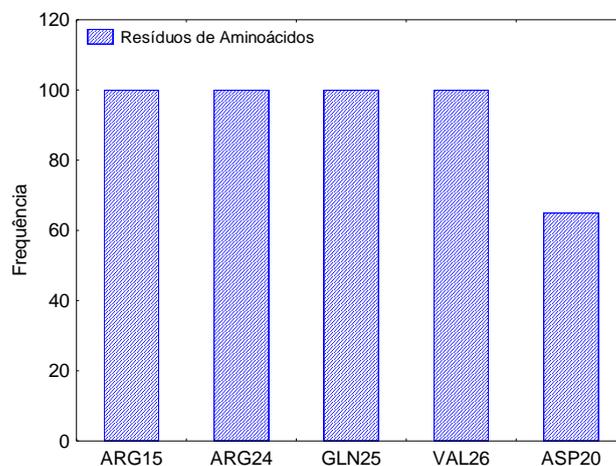


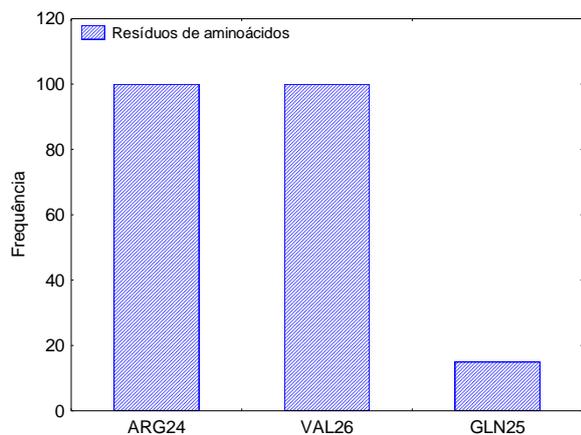
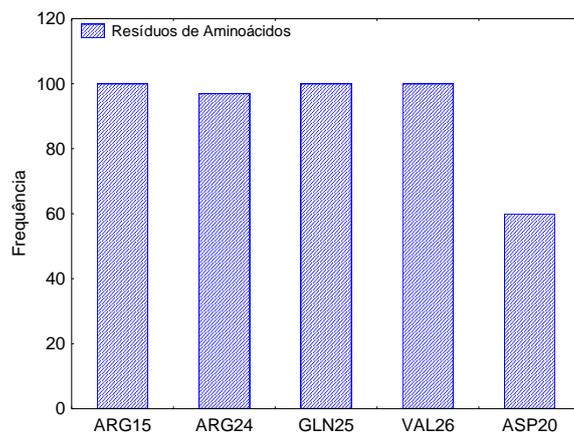
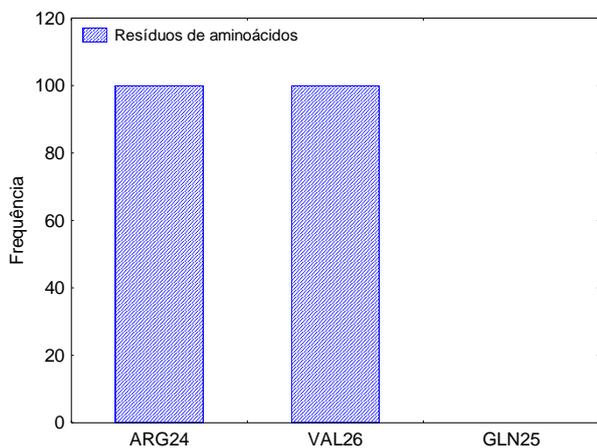
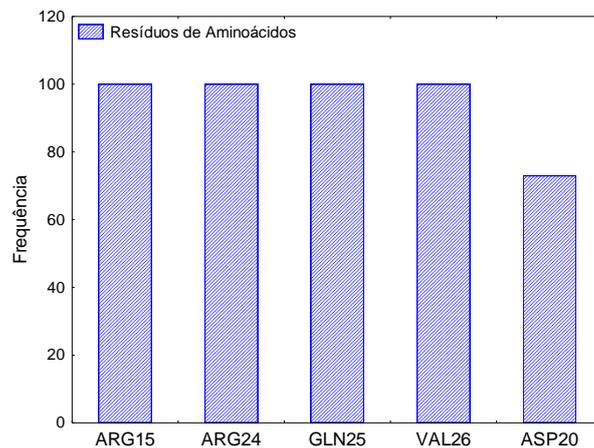
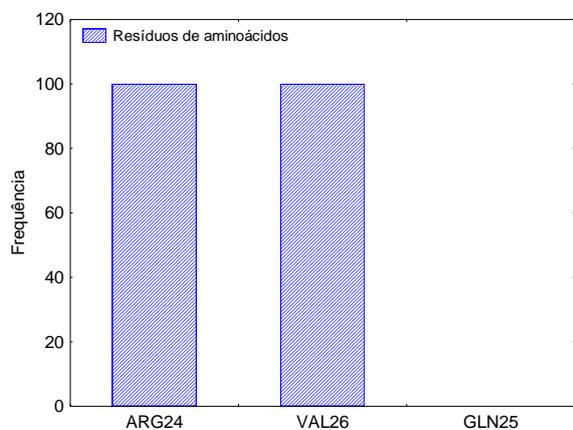
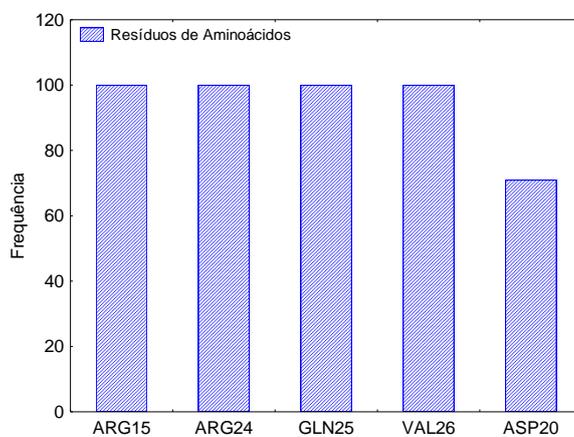
**Derivado 13a**

**Mediana = 9,76**

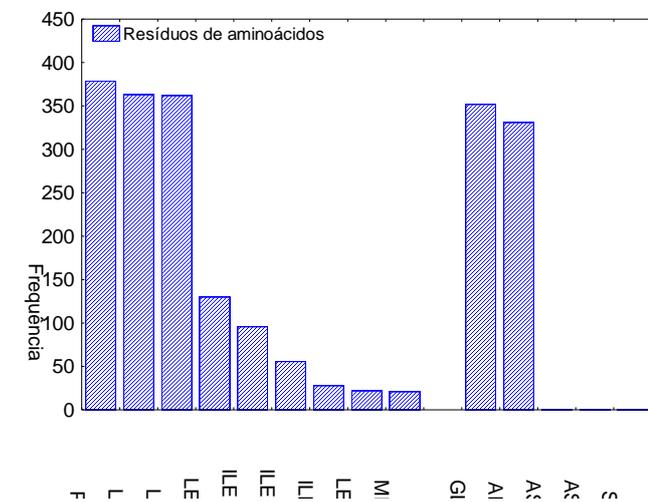


**APÊNDICE G – RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS HIDROFÍLICOS****Derivado 1a****Estruturas Lineares****Estruturas Dobradas****Derivado 2a****Estruturas Lineares****Estruturas Dobradas**

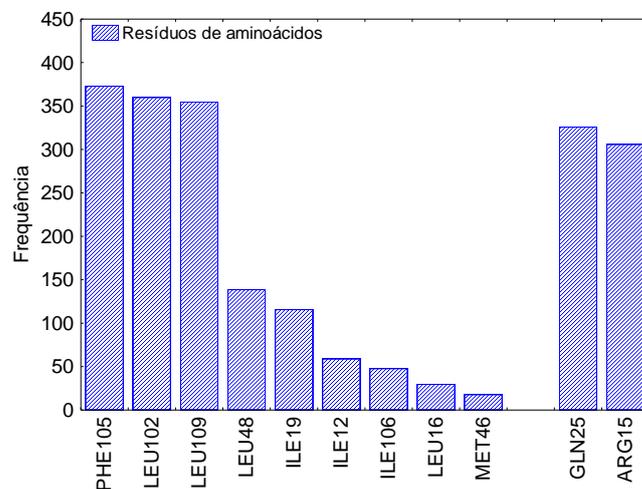
**Derivado 3a****Estruturas Lineares****Estruturas Dobradas****Derivado 4a****Estruturas Lineares****Estruturas Dobradas****Derivado 5a****Estruturas Lineares****Estruturas Dobrada**

**Derivado 6a****Estruturas Lineares****Estruturas Dobradas****Derivado 8a****Estruturas Lineares****Estruturas Dobradas****Derivado 9a****Estruturas Lineares****Estruturas Dobradas**

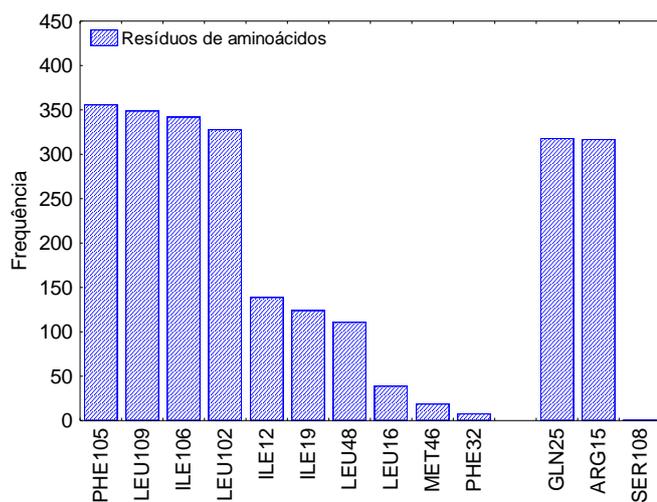
## APÊNDICE H – DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS



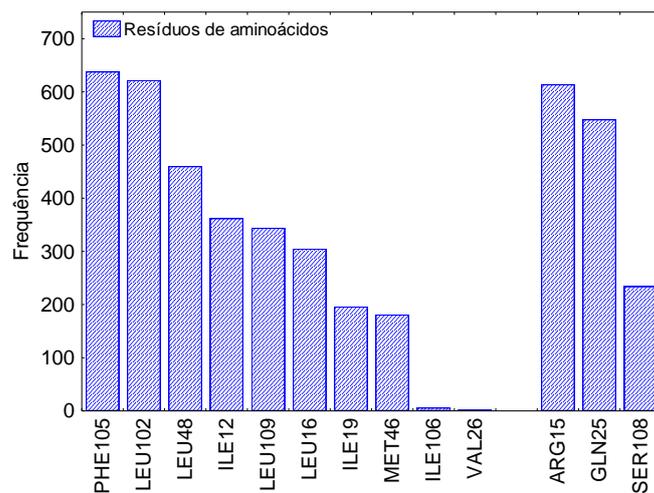
Derivado 1a



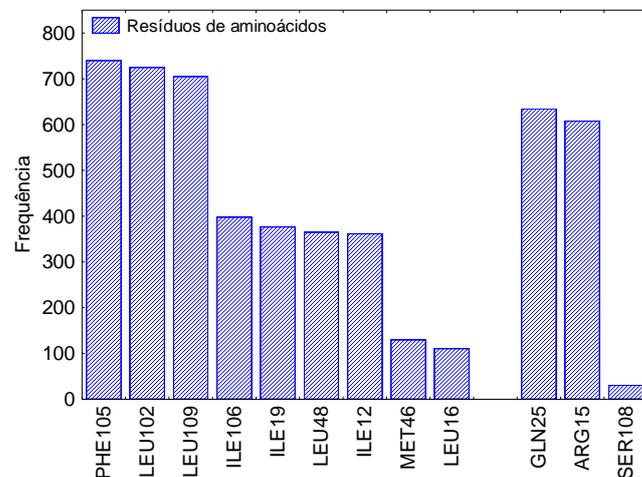
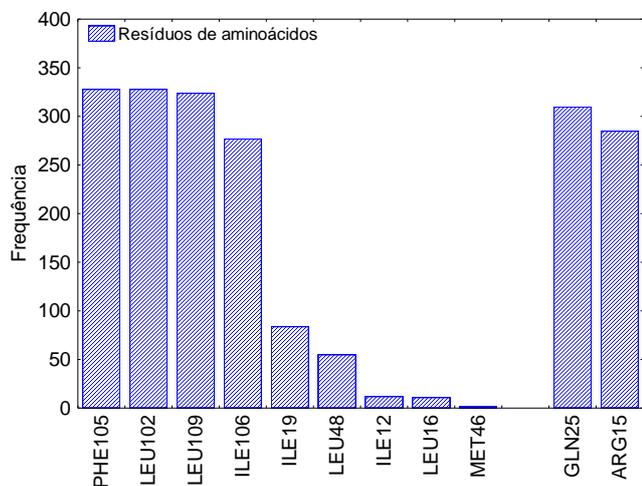
Derivado 2a



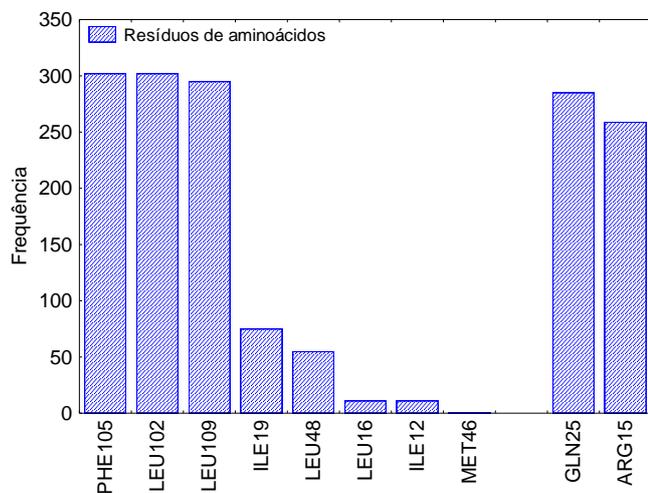
Derivado 3a



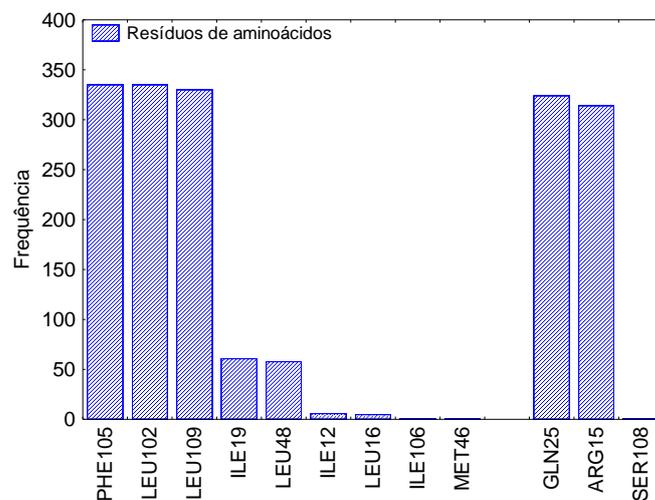
Derivado 4a



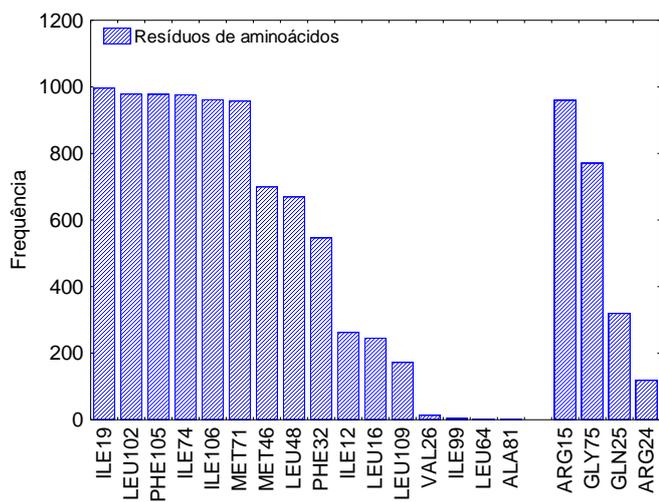
Derivado 5a



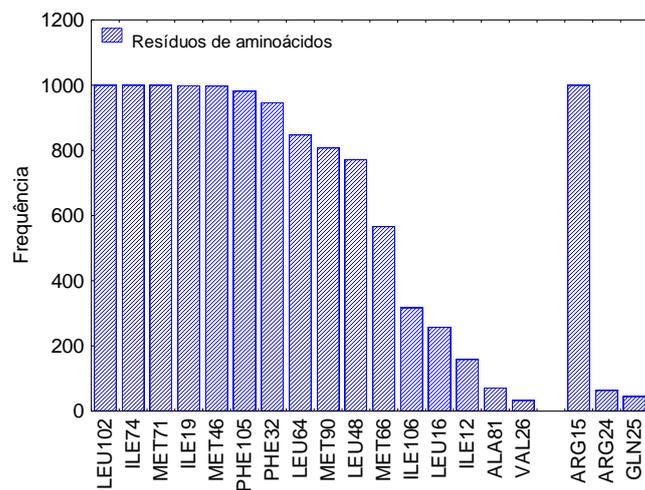
Derivado 6a



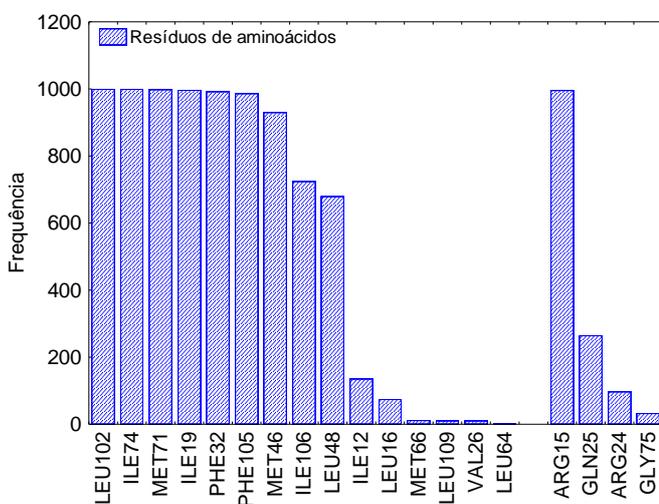
Derivado 8a



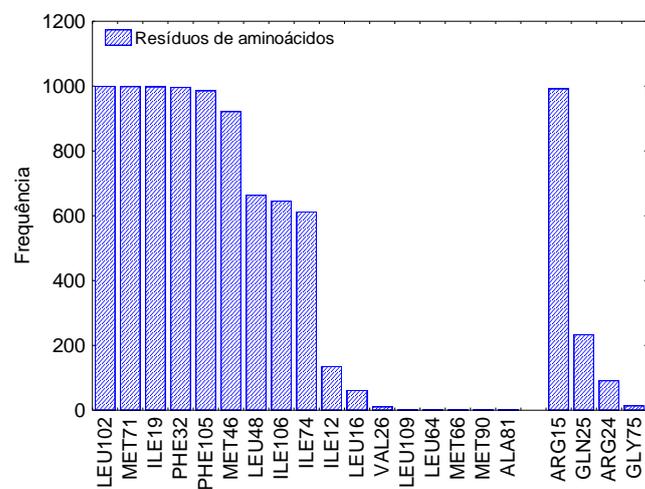
Derivado 9a



Derivado 10a



Derivado 11a



Derivado 12a

Derivado 13a

## ANEXO A – SCORES DE HIDROPATICIDADE DOS AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Simbologia	Score de hidropatia
Isoleucina	Ile	4,5
Valina	Val	4,2
Leucina	Leu	3,8
Fenilalanina	Phe	2,8
Cisteína	Cys	2,5
Metionina	Met	1,9
Alanina	Ala	1,8
Glicina	Gly	-0,4
Treonina	Thr	-0,7
Triptofano	Trp	-0,9
Serina	Ser	-0,8
Tirosina	Tyr	-1,3
Prolina	Pro	-1,6
Histidina	His	-3,2
Ácido Glutâmico	Glu	-3,5
Glutamina	Gln	-3,5
Ácido Aspártico	Asp	-3,5
Asparagina	Asn	-3,5
Lisina	Lys	-3,9
Arginina	Arg	-4,5

<sup>a</sup> Adaptado de (KYTE; DOOLITTLE, 1982).

Valores positivos e negativos de hidropatia estão relacionados a aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, respectivamente.

## ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS

## Article

*J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 23, No. 9, 1747-1755, 2012.  
 Printed in Brazil - ©2012 Sociedade Brasileira de Química  
 0103 - 5053 \$6.00+0.00



### A Multivariate Statistical Analysis of the Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) of 2-(Substituted Phenyl)indan-1,3-diones with Hypolipidemic Activity

Aluizio G. da Silva<sup>\*a</sup> and Mozart N. Ramos<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco,  
 55590-000 Ipojuca-PE, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco,  
 50740-540 Recife-PE, Brazil

Descritores eletrônicos obtidos de cálculos de orbitais moleculares AM1, juntamente com os parâmetros log P e  $\pi$ , foram empregados para obter relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR) para um conjunto de dezesseis derivados de 2-fenil-indan-1,3-dionas possuindo atividade hipolipidêmica. Os descritores AM1 foram obtidos tanto para o modelo da molécula isolada como também para o modelo COSMO (modelo de seleção considerando condutor ideal) visando incluir o efeito do solvente em nossa análise QSAR. Dos dezesseis derivados estudados, três deles foram excluídos do conjunto de treinamento tendo por objetivo servir como conjunto de teste. Em geral, os resultados obtidos deste conjunto de teste validaram nossos modelos quantitativos, os quais foram baseados em análise de regressão linear e de componentes principais (PCA). A partir disso, novos derivados foram previstos para ser agentes hipolipidêmicos mais potentes do que os derivados de 2-fenil-indan-1,3-dionas cujas atividades experimentais foram determinadas. Por exemplo, nossos resultados sugerem que 2-*orto*-hidroxi-fenil-indan-1,3-diona é um potencial candidato para novas triagens de estudos experimentais na redução dos níveis de colesterol e de triglicérides.

Electronic descriptors obtained from AM1 molecular orbital calculations were employed, along with the empirical parameters log P and  $\pi$ , in a multivariate statistical analysis of the quantitative structure-activity relationships (QSAR) in a group of sixteen 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones possessing hypolipidemic activities. AM1 descriptors were obtained both for the isolated molecule model and, to simulate the solvent effect, for the COSMO model (conductor-like screening model) in our QSAR analysis. From sixteen studied derivatives, three were excluded from the set of molecules used in the model building stage in order to serve as a test set. In general, the results obtained from this test set validated our quantitative models, which were based on linear regressions and principal component analysis (PCA). From these results, new derivatives were predicted to be more potent hypolipidemic agents than the indan-1,3-diones for which experimental activities were determined. For instance, our results suggest that 2-(*ortho*-hydroxy-phenyl)indan-1,3-dione is a potential candidate for new experimental screening studies for reducing serum cholesterol and triglyceride levels.

**Keywords:** hypolipidemic activity, multivariate statistical analysis, AM1 calculations

#### Introduction

Cyclic imides are an important family of organic compounds with therapeutic potential. Cechinel Filho *et al.*<sup>1</sup> presented an interesting review on the chemical and biological aspects of several sub-classes of this family, such as maleimides, phthalimides and succinimides. From the

point of view of toxicity of these compounds, few studies are found in current literature. One of these studies, performed by Hall's group from North Carolina at Chapel Hill,<sup>2</sup> showed that phthalimide derivatives have no significant toxicity towards rodents, as well as in their fertility.

Recently, El-Zahabi *et al.*<sup>3</sup> synthesized new nitrogen-substituted derivatives of cyclic imides: phthalimide,

\*e-mail: aluizoufpe@hotmail.com

1,8-naphthalimide and diphenimide. A preliminary evaluation of the hypolipidemic activity of these newly prepared compounds showed that several derivatives significantly decrease serum total cholesterol and triglyceride levels in rats with triton WR-1339-induced hyperlipidemia. The dose used ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  via intraperitoneal) was comparable to Fenofibrate, which is one of the second generation of fibrate drugs.

Some studies investigated the hypolipidemic activity of a set of phthalimide derivatives injected intraperitoneally in  $\text{CF}_1$  male mice.<sup>4</sup> Most of the studied compounds showed potent activity in reducing serum cholesterol and triglyceride levels at the optimum dose of  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  per day.<sup>4</sup> Phthalimide and its derivatives are effective in reducing liver mitochondrial citrate exchange, acetyl-CoA synthetase, acetyl-CoA carboxylase and phosphatidate phosphohydrolase activities, as well as the levels of liver and small intestine lipids at  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  per day. For instance, phthalimide administration to rats was related to elevated excretion of cholesterol in the bile, with reduction of cholesterol and triglyceride contents in the blood lipoprotein fractions, but with an increase in phospholipid content. A sixteen-day treatment with *N*-phenylphthalimide, for example, reduced the serum cholesterol level to 57% of its initial value. The substitution on the phenyl ring drastically affected hypolipidemic activity. When an ethyl group was introduced, the *N*-phenylphthalimide lost its effect. On the other hand, the substitution of an ethoxy group in the *ortho* position increased the hypolipidemic activity, and the cholesterol level fell to 43% after the treatment.

A few years ago,<sup>5</sup> our research group obtained electronic descriptors from AM1 molecular orbital calculations, as well as the empirical descriptors  $\log P$  and  $\pi$ , in order to better understand the quantitative structure-activity relationships (QSAR) for several phthalimide derivatives.<sup>6,7</sup> For the derivatives without the phenyl *N*-substitution,<sup>6</sup> our group found that the LUMO orbital energy and the carbonyl group polarity are important parameters for explaining the dependence of hypolipidemic activity on molecular structure. Likewise, the group successfully explained this dependence in *N*-phenylphthalimide derivatives.<sup>7</sup> Quantitative models based on multiple linear regression and on partial least squares regression allowed us to suggest new derivatives that are expected to be more potent hypolipidemic agents than those employed in the model building stage. For example, the *ortho*-NO-phenylphthalimide was expected to be the most effective of the new compounds.

Murthy *et al.*<sup>8</sup> also investigated the hypolipidemic activity in 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones. It is

interesting to point out that the synthetic methods to prepare these derivatives are largely reported in the literature.<sup>9</sup> For example, 2-methylindan-1,3-dione was prepared according to the procedure of Mosher and Soeder<sup>10</sup> by the condensation of dimethyl phthalate with 3-pentanone in the presence of sodium hydride. All the substituted phenyl analogues were synthesized following the method of Freedman *et al.*<sup>11</sup> Chapman *et al.*<sup>4</sup> reported that the parent compound, 2-phenylindan-1,3-dione (Scheme 1), is significantly active in reducing cholesterol and triglyceride levels by 40% after 16 days of administration in  $\text{CF}_1$  male mice at  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  per day via intraperitoneal. They also studied the influence of the phenyl ring substitution on the hypolipidemic activity of these compounds. The substitution of the phenyl ring provided mixed results. For example, changing the methoxy group at the *para* position in the phenyl ring to ethoxy maintained hypocholesterolemic activity but lowered hypotriglyceridemic activity markedly from 58 to 19%. The substitution of methyl groups in the *ortho* and *meta* positions of the phenyl ring gave rise to compounds that clearly possessed lower hypocholesterolemic activity in mice than 2-phenylindan-1,3-dione, in contrast to what occurs when the methyl group is in the *para* position. On the other hand, the introduction of methyl groups in the *ortho*, *meta* and *para* positions of the phenyl ring increased hypotriglyceridemic activity. They also observed that 2-(4-methoxyphenyl)indan-1,3-dione was one of the more active compounds with 41% reduction of serum cholesterol and 58% reduction of serum triglyceride levels on day 16. A more careful look on the effects of this derivative demonstrated that key enzymes in the *de novo* synthesis of lipids were inhibited by the drug. The levels of lipids in tissues decreased, but those in the feces were raised. These alterations in lipid content on rat lipoprotein fractions by the drug appeared favorable.



Scheme 1. Structure of 2-phenylindan-1,3-dione (I).

In an attempt to discover which structural modifications contribute to these pharmacological changes, it was examined a set of sixteen 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones, in search of a relation between the experimentally

determined hypolipidemic activities and electronic parameters obtained from AM1 molecular orbital calculations. These calculations were performed with or without considering the solvent effect. In this study, it was also included the log P and  $\pi$  empirical parameters.

## Methodology

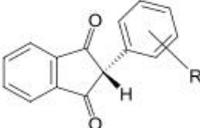
To obtain the electronic properties of the compounds considered in this work, quantum-chemical calculations were performed at AM1 semi-empirical level using the Gaussian program.<sup>12</sup> The molecular geometry of each compound was fully optimized and no imaginary frequency was observed. From the wave-functions thus obtained, it was extracted the frontier orbital energies, Mulliken net atomic charges and molecular dipole moments. These variables, together with the log P (partition coefficient) and  $\pi$  (Hansch's parameter) empirical parameters, form a set of 12 descriptors for each 2-(substituted phenyl)indan-1,3-dione. The octanol-water partition coefficient values were estimated using the Kowwin version 1.67 program.<sup>13</sup>

Hypolipidemic activity is expressed in terms of  $pC_{16}$  and  $pT_{16}$ , which are the logarithms of the reduction in cholesterol and triglyceride levels observed after sixteen-day period of administering the drug in CF<sub>1</sub> male mice, respectively. Thus, the higher the  $pC_{16}$  and  $pT_{16}$  values, the more active the compound is in terms of the reduction in cholesterol and triglyceride levels, respectively. Table 1 shows the sixteen 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones studied in this work with the corresponding figures for reduction in cholesterol and triglyceride levels observed in CF<sub>1</sub> male mice after the drug administration period. From those sixteen compounds, three were excluded from the training set to serve as a test set for validation of the mathematical models here obtained.

Quantitative structure-activity relationship (QSAR) models relating these activity values to the molecular descriptors were investigated by means of two multivariate techniques: traditional multiple linear regression (MLR) and principal component analysis (PCA).<sup>14</sup> The latter was used because some of the twelve electronic descriptors have a high degree of inter-correlation, which could cause statistical instability in the ordinary multiple regression equations, as a result of multicollinearity. Therefore, it was first performed a principal component analysis on them, and regressed the dependent variable, hypolipidemic activity, on the scores obtained from the PCA, rather than on the descriptors themselves.

In a principal component analysis, the original data matrix is projected onto a subspace defined by linear combinations of the original variables with maximum

**Table 1.** Hypolipidemic activities of the sixteen 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones studied in this work



Training set	(%C <sub>16</sub> )	(%T <sub>16</sub> )
H	40 ± 2	40 ± 4
<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	31 ± 3	51 ± 1
<i>m</i> -CH <sub>3</sub>	29 ± 3	49 ± 4
<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	35 ± 3	58 ± 2
<i>o</i> -Cl	44 ± 4	45 ± 3
<i>m</i> -Cl	40 ± 4	30 ± 3
<i>p</i> -Cl	37 ± 3	53 ± 2
<i>o</i> -COOH	22 ± 2	48 ± 4
<i>p</i> -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	41 ± 2	19 ± 4
<i>p</i> -COOH	22 ± 2	5 ± 2
<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	28 ± 2	52 ± 3
<i>m</i> -OCH <sub>3</sub>	33 ± 5	45 ± 4
<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	41 ± 3	58 ± 4
2,4-Dichloro <sup>a</sup>	27 ± 6	13 ± 5
3,4-Dimethoxy <sup>a</sup>	31 ± 3	34 ± 8
3,4-Dichloro <sup>a</sup>	16 ± 5	11 ± 4

<sup>a</sup>Molecules used as the test set in this work.

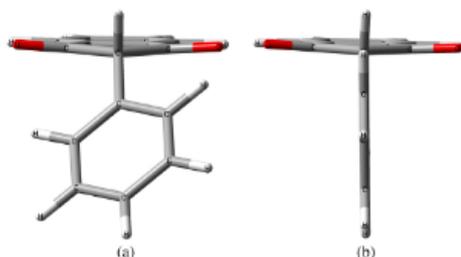
variance (that is, maximum information) and orthogonal to each other.<sup>14</sup> The first principal component (PC1) is the axis describing the maximum possible variance in the original multidimensional space; the second component is orthogonal to PC1 and describes the maximum variance not already described by PC1, and so on. The orthogonality between different PC axes eliminates the regression multicollinearity problem. Each PC is characterized by three mathematical entities: (i) the percentage of explained variance; (ii) a loading vector, whose elements are the cosines of the angles that the PC axis forms with the original variable axes; and (iii) a scores vector, containing the coordinates locating the individual compounds on the PC axis. A regression on the scores of a PCA is called a principal component regression.<sup>15</sup>

In order to obtain the electronic descriptors simulating the solvent effect, it was used the conductor-like screening model (COSMO)<sup>16</sup> in MOPAC 09. This dielectric continuum model<sup>17</sup> was used here to simulate the solvation phenomenon using water as a solvent.

## Results and Discussion

The conformational analysis performed in the parent compound (**I**, Scheme 1) reveals that the C<sub>8</sub>C<sub>13</sub>C<sub>17</sub>C<sub>18</sub>

dihedral angle is  $7.5^\circ$  for its most stable structure (Figure 1a), corresponding to a gauche conformation. In the maximum energy structure that same dihedral angle is  $52.5^\circ$  for an orthogonal conformation (Figure 1b).



**Figure 1.** Structures of the parent compound (I) in the most stable conformation (a) and in the maximum energy conformation (b).

In order to test these AM1 values, it was performed B3LYP/6-31G(d,p) molecular orbital calculations.<sup>18</sup> The  $C_8C_{13}C_{17}C_{18}$  dihedral angles obtained from these calculations for the minimum and maximum energy structures were  $7.1^\circ$  and  $57.1^\circ$ , respectively. Both, therefore, agree very well with the AM1 angles.

For the 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones with substituents in the phenyl ring *meta* and *para* positions, our results reveal a very similar conformation to that in the parent compound, with the  $C_8C_{13}C_{17}C_{18}$  dihedral angle only varying by  $\pm 1^\circ$ . On the other hand, this angle varies substantially when the substituent is located in the *ortho* position, as observed with the *N*-phenylphthalimides.<sup>4</sup> The actual value depends on both the electronic nature and the size of this *ortho* substituent. Thus, the  $C_8C_{13}C_{17}C_{18}$  dihedral angles for the  $-OCH_3$ ,  $-CH_3$ ,  $-Cl$  and  $-COOH$  substituents in the *ortho* position are:  $26.8^\circ$ ,  $42.5^\circ$ ,  $33.8^\circ$  and  $59.4^\circ$ , respectively. Therefore, their minimum energy conformations correspond to orthogonal structures and are thus similar to those found at the maximum points in the *meta* and *para* substituents. The maximum energy points for these substituents in the *ortho* position occur near  $150^\circ$ . As a consequence, the potential surface profile of the latter is very different from that found in the parent compound and for the *meta* and *para* substituents.

Table 2 shows the figures for the most significant descriptors, which have the highest correlation coefficients with  $pC_{16}$  and  $pT_{16}$ . The inclusion of the solvent effect in the AM1 calculations using the COSMO method does not significantly alter such descriptors. The latter are given in parentheses.

**Table 2.** Hypolipidemic activities and most significant descriptors for the thirteen 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones studied in this work. Values of the electronic descriptors obtained from AM1/COSMO calculations are given in parentheses

Compound	-R	$pC_{16}$	$pT_{16}$	$\epsilon_{1,10,10}$ (eV)	$\mu$ (D)	$qH_{14}$ (e)	$qC_{17}$ (e)	$\pi$	log P
1	H	1.602	1.602	-0.981 (-1.037)	2.496 (3.417)	0.153 (0.183)	-0.072 (-0.077)	0.000	2.970
2	<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	1.491	1.708	-0.952 (-1.028)	2.302 (3.220)	0.152 (0.181)	-0.067 (-0.083)	0.560	3.300
3	<i>m</i> -CH <sub>3</sub>	1.462	1.690	-0.965 (-1.036)	2.323 (3.225)	0.153 (0.183)	-0.068 (-0.072)	0.560	3.360
4	<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	1.544	1.763	-0.962 (-1.035)	2.372 (3.285)	0.152 (0.182)	-0.078 (-0.084)	0.560	3.360
5	<i>o</i> -Cl	1.643	1.653	-0.907 (-1.057)	1.327 (4.410)	0.148 (0.182)	-0.048 (-0.069)	0.710	3.520
6	<i>m</i> -Cl	1.602	1.477	-1.067 (-1.059)	3.453 (4.634)	0.155 (0.187)	-0.061 (-0.062)	0.710	3.580
7	<i>p</i> -Cl	1.568	1.724	-1.077 (-1.056)	3.490 (4.648)	0.155 (0.187)	-0.070 (-0.068)	0.710	3.580
8	<i>o</i> -COOH	1.342	1.681	-1.079 (-1.075)	3.310 (4.532)	0.170 (0.195)	-0.013 (-0.012)	-0.320	2.480
9	<i>p</i> -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1.613	1.279	-0.959 (-1.035)	2.877 (4.133)	0.151 (0.181)	-0.111 (-0.112)	0.380	3.320
10	<i>p</i> -COOH	1.342	0.699	-1.156 (-1.070)	4.673 (6.079)	0.158 (0.191)	-0.032 (-0.027)	-0.320	2.630
11	<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	1.447	1.716	-0.843 (-1.019)	1.003 (1.825)	0.169 (0.185)	-0.086 (-0.113)	-0.020	2.840
12	<i>m</i> -OCH <sub>3</sub>	1.519	1.653	-0.956 (-1.044)	2.408 (3.420)	0.155 (0.186)	-0.039 (-0.041)	-0.020	2.900
13	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	1.613	1.763	-0.970 (-1.035)	2.981 (4.187)	0.151 (0.182)	-0.109 (-0.111)	-0.020	2.910

**Table 3.** Matrix of the correlation coefficients of the experimental hypolipidemic activities and most significant descriptors. Correlation coefficients for the AM1/COSMO electronic descriptors are given in parentheses

	$pC_{16}$	$pT_{16}$	$\epsilon_{\text{LUMO}}$	$\mu$	$qH_{14}$	$qC_{17}$	$\pi$	$\log P$
$pC_{16}$	1.00 (1.00)	0.34 (0.34)	0.38 (0.32)	-0.31 (-0.11)	-0.73 (-0.71)	-0.60 (-0.58)	0.60 (0.60)	0.69 (0.69)
$pT_{16}$	0.34 (0.34)	1.00 (1.00)	0.58 (0.43)	-0.64 (-0.66)	-0.02 (-0.34)	-0.22 (-0.33)	0.35 (0.35)	0.27 (0.27)
$\epsilon_{\text{LUMO}}$	0.38 (0.32)	0.58 (0.43)	1.00 (1.00)	-0.95 (-0.84)	-0.13 (-0.78)	-0.49 (-0.84)	0.21 (0.19)	0.19 (0.19)
$\mu$	-0.31 (-0.11)	-0.64 (-0.66)	-0.95 (-0.84)	1.00 (1.00)	0.03 (0.49)	0.27 (0.55)	-0.27 (-0.11)	-0.21 (-0.06)
$qH_{14}$	-0.73 (-0.71)	-0.02 (-0.34)	-0.13 (-0.78)	0.03 (0.49)	1.00 (1.00)	0.40 (0.81)	-0.60 (-0.55)	-0.66 (-0.58)
$qC_{17}$	-0.60 (-0.58)	-0.22 (-0.33)	-0.49 (-0.84)	0.27 (0.55)	0.40 (0.81)	1.00 (1.00)	-0.30 (-0.34)	-0.37 (-0.38)
$\pi$	0.60 (0.60)	0.35 (0.35)	0.21 (0.19)	-0.27 (-0.11)	-0.60 (-0.55)	-0.30 (-0.34)	1.00 (1.00)	0.98 (0.98)
$\log P$	0.69 (0.69)	0.27 (0.27)	0.19 (0.19)	-0.21 (-0.06)	-0.66 (-0.58)	-0.37 (-0.38)	0.98 (0.98)	1.00 (1.00)

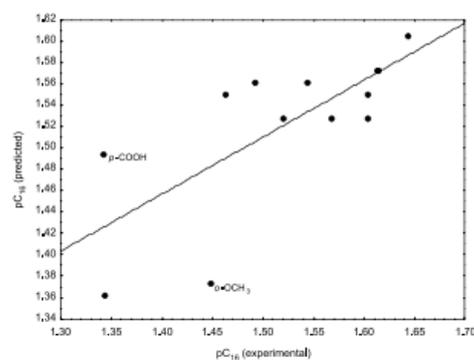
Table 3 shows the matrix of correlation coefficients for both situations, i.e., isolated and solvated compounds of 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones. This matrix shows that there is no linear correlation between hypocholesteremic and hypotriglyceridemic activity, as the correlation coefficient is only 0.34. The activities are therefore treated separately.

#### Hypocholesteremic activity

Table 3 shows that the hydrogen atomic charge bonded to the  $sp^3$  carbon of the indan group (Scheme 1) is the better descriptor for the structure- hypocholesteremic activity relationship in 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones. The correlation coefficients are -0.73 and -0.71 for the isolated and solvated compounds, respectively. This implies that compounds with a less positive hydrogen charge ( $qH_{14}$ ) will tend to be more hypocholesteremic. The regression equation is shown to follow the isolated molecule model:

$$pC_{16} = 2.24(\pm 0.48) - 11.02(\pm 3.11) qH_{14} \quad (1)$$

with  $n = 13$ ,  $R = -0.73$ ,  $R^2 = 0.53$ ,  $F = 12.57$ ,  $s = 0.072$  and  $p = 0.0046$ . The values in parentheses are the standard error estimates of the regression coefficients. Though the  $R^2$  value is not very impressive, both coefficients are statistically significant at the 95% confidence level. Figure 2 plots the experimental  $pC_{16}$  values against those predicted using equation 1. It can be seen that greater linear deviations are found for the  $p$ -COOH and  $o$ -OCH<sub>3</sub> substituents.



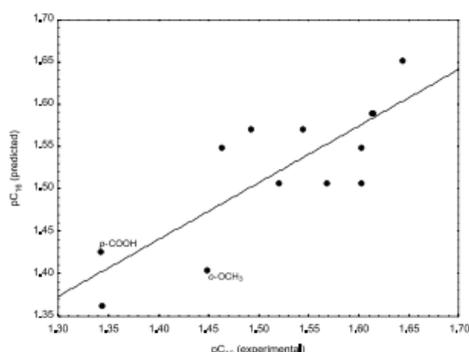
**Figure 2.** Plot of the AM1 predicted hypocholesteremic activities using equation 1 against their corresponding experimental values.

Since the hydrogen charge is influenced by the conformational effect, "optimum" values for this descriptor were analyzed as a function of the  $C_8C_{13}C_{17}C_{18}$  dihedral angle for both substituents. Conformational analysis reveals that these optimum values are 0.159 and 0.160 e for the  $p$ -COOH and  $o$ -OCH<sub>3</sub> substituents, respectively. These values were used to obtain the following regression equation:

$$pC_{16} = 4.71(\pm 0.67) - 20.66(\pm 4.37) qH_{14} \quad (2)$$

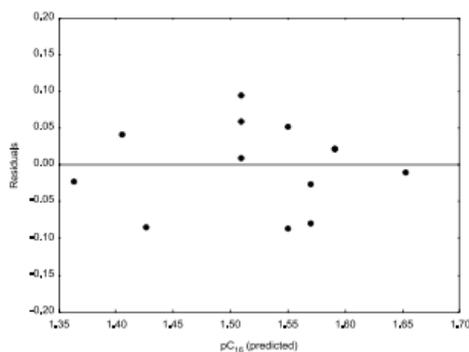
with  $n = 13$ ,  $R = -0.82$ ,  $R^2 = 0.67$ ,  $F = 22.38$ ,  $s = 0.060$  and  $p = 0.00062$ . This equation can explain 67% of the variance in activity at a 95% confidence level. Figure 3 shows the predicted  $pC_{16}$  activities using equation 2 compared with

the experimental  $pC_{16}$  values. As expected, there is a better linear fit.



**Figure 3.** Plot of the AM1 predicted hypcholesteremic activities using equation 2 against their corresponding experimental values.

Neto *et al.*<sup>19</sup> remarked that the examination of the residuals left by mathematical models is as important as the *F*-test. Figure 4 shows that the residuals are randomly distributed. This stresses the existence of a linear relationship between the hypcholesteremic activity and the hydrogen atomic charge bonded to the  $sp^3$  carbon of the indan group, as shown in equation 2.



**Figure 4.** Plot the residuals vs. predicted values obtained from equation 2.

Table 4 shows the percentage reduction in hypcholesteremic activity levels obtained from equation 2 and from experimental results. In general, it is possible to verify that there is a very good agreement between the predicted and the experimental activities in considering both the training and test sets, except for 2-(3,4-dichlorophenyl)indan-1,3-dione.

For the solvated molecules, the regression equation is similar to equation 1 obtained for the isolated molecules

**Table 4.** Reduction percents of hypcholesteremic activity levels obtained from equation 2 and from experimental results

Training set	(% $C_{16}$ ) <sub>exp</sub>	(% $C_{16}$ ) <sub>pred</sub>
H	40 ± 2	35
<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	31 ± 3	37
<i>m</i> -CH <sub>3</sub>	29 ± 3	35
<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	35 ± 3	37
<i>o</i> -Cl	44 ± 4	45
<i>m</i> -Cl	40 ± 4	32
<i>p</i> -Cl	37 ± 3	32
<i>o</i> -COOH	22 ± 2	23
<i>p</i> -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	41 ± 2	39
<i>p</i> -COOH	22 ± 2	27
<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	28 ± 2	25
<i>m</i> -OCH <sub>3</sub>	33 ± 5	32
<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	41 ± 3	35
Test set	(% $C_{16}$ ) <sub>exp</sub>	(% $C_{16}$ ) <sub>pred</sub>
2,4-Dichloro	27 ± 6	21
3,4-Dimethoxy	31 ± 3	29
3,4-Dichloro	16 ± 5	34

using the most stable conformation for each compound, as seen from the following equation:

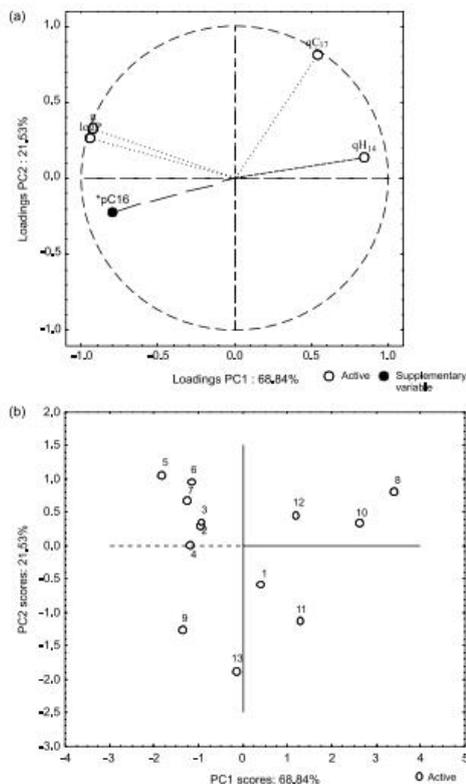
$$pC_{16} = 4.68(\pm 0.94) - 17.04(\pm 5.07) qH_{14} \quad (3)$$

with  $n = 13$ ,  $R = -0.71$ ,  $R^2 = 0.51$ ,  $F = 11.28$ ,  $s = 0.074$  and  $p = 0.0064$ . Again, the values in parentheses are the standard error estimates for the regression coefficients. Though the  $R^2$  value is not very impressive, both coefficients are statistically significant at a 95% confidence level.

#### Principal component analysis (PCA)

Table 3 shows that  $qC_{17}$ ,  $\log P$  and  $\pi$  are also reasonably well correlated with  $pC_{16}$ . However, they are also reasonably well correlated with  $qH_{14}$ . These descriptors could thus cause statistical instability in the ordinary multiple regression equation as a result of multicollinearity. In order to resolve this question, a principal component analysis was performed, and the dependent variable ( $pC_{16}$ ) regressed on the scores obtained from the PCA, rather than the descriptors themselves. A PCA based on the correlation matrix of the four descriptors ( $qH_{14}$ ,  $qC_{17}$ ,  $\log P$  and  $\pi$ ) was carried out, using the AM1 values obtained from the most stable conformations for the isolated molecules. The loading plot for the first two components (PC1 and PC2), which together account for 90% of the total information,

is shown in Figure 5a. PC1 retains 69% of this information whereas PC2 retains 21%. Hypocholesteremic activity is also projected on this plot, but was not used in the PCA calculations.



**Figure 5.** Results of the principal component analysis performed on the  $qH_{14}$ ,  $qC_{17}$ ,  $\log P$  and  $\pi$  descriptors: (a) loading plot and (b) score plot. The percent information reproduced by each component is given in the respective axis title.

This plot shows that hypocholesteremic activity is on the same side as the  $\log P$  and  $\pi$  descriptors with negative loadings, whereas  $qH_{14}$  and  $qC_{17}$  show positive loadings in PC1. This means that the compounds that are more active in reducing cholesterol levels are expected to be associated with high  $\log P$  and  $\pi$  values and with low  $qH_{14}$  and  $qC_{17}$  values. It is worth noting that  $qH_{14}$  is the most important descriptor for the hypocholesteremic activity since it practically coincides with the positive side of the PC1 axis and is the exact opposite of  $pC_{16}$ . The corresponding score plot is shown in Figure 5b.

Overall, the more active compounds have more negative scores on PC1. The least active compound **8** with the *o*-COOH substituent has the most positive PC1 score, whereas the most active is compound **5** with the *o*-Cl substituent, which has the most negative PC1 score. The score in the first component can thus be interpreted as a composite theoretical measure of hypocholesteremic activity.

A regression of the  $pC_{16}$  values on the PC1 scores yields equation 4:

$$pC_{16} = 1.52(\pm 0.02) - 0.04(\pm 0.01) t_1 \quad (4)$$

with  $n = 13$ ,  $R = -0.78$ ,  $R^2 = 0.61$ ,  $F = 17.44$ ,  $s = 0.065$  and  $p = 0.0016$ , where  $t_1$  stands for the score on the PC1 axis. This equation can explain 61% of the activity variance at a 95% confidence level. Table 5 shows the percentage reduction in hypocholesteremic activity levels obtained from equation 4 and the experimental values. In general, it is possible to verify that there is a very good agreement between them, especially for the molecules employed for the training set. Again, it was verified a large discrepancy between the values for the 2-(3,4-dichlorophenyl)indan-1,3-dione used in the testing set. Furthermore, it is important to point out that the agreement to the 2-(3,4-dichlorophenyl)indan-1,3-dione is not as good as that verified above using the equation 2.

**Table 5.** Reduction percents of hypocholesteremic activity levels obtained from equation 4 and from experimental results

Training set	(% $C_{16}$ ) <sub>exp</sub>	(% $C_{16}$ ) <sub>pred</sub>
H	40 ± 2	32
<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	31 ± 3	36
<i>m</i> -CH <sub>3</sub>	29 ± 3	36
<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	35 ± 3	37
<i>o</i> -Cl	44 ± 4	39
<i>m</i> -Cl	40 ± 4	37
<i>p</i> -Cl	37 ± 3	37
<i>o</i> -COOH	22 ± 2	24
<i>p</i> -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	41 ± 2	38
<i>p</i> -COOH	22 ± 2	26
<i>o</i> -OCH <sub>3</sub>	28 ± 2	29
<i>m</i> -OCH <sub>3</sub>	33 ± 5	30
<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	41 ± 3	34
Test set	( $C_{16}$ ) / %	( $T_{16}$ ) / %
2,4-Dichloro	27 ± 6	39
3,4-Fimethoxy	31 ± 3	43
3,4-Ficlolo	16 ± 5	30

## Hypotriglyceridemic activity

Table 3 shows that the dipole moment ( $\mu$ ) is the best descriptor ( $R = -0.64$ ) for the structure-hypotriglyceridemic activity relationship in 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones. The second best descriptor is the LUMO energy ( $R = 0.58$ ). Unfortunately, these descriptors cannot be used together in a classical multiple regression equation since they are highly correlated with  $R = -0.95$ . The best regression equation to describe  $pT_{16}$  is thus:

$$pT_{16} = 2.10(\pm 0.20) - 0.20(\pm 0.07) \mu \quad (5)$$

with  $n = 13$ ;  $R = -0.64$ ,  $R^2 = 0.41$ ,  $F = 7.74$ ,  $s = 0.23$  and  $p = 0.018$ . The values in parentheses are the standard error estimates for the regression coefficients. Though the  $R^2$  value is not very impressive, both coefficients are statistically significant at a 95% confidence level. According to this regression equation, 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones possessing lower dipole moments should exhibit better hypotriglyceridemic activity. It was also evaluated how this descriptor is influenced by the conformational effect as it was done for  $pC_{16}$ , although in this case there were no statistically significant results.

The use of AM1 descriptors considering the solvent effect simulated by the COSMO method only slightly altered the correlation matrix with respect to the matrix obtained for isolated molecules, as shown in Table 3. As a consequence, the regression equation is similar to equation 5, which was obtained for the isolated molecules using the most stable conformation for each compound. As can be seen below, the correlation coefficient is slightly increased to 0.66:

$$pT_{16} = 2.31(\pm 0.26) - 0.19(\pm 0.06) \mu \quad (6)$$

with  $n = 13$ ;  $R = -0.66$ ,  $R^2 = 0.44$ ;  $F = 8.66$ ,  $s = 0.23$  and  $p = 0.013$ . The  $R^2$  value is still not very impressive, but both coefficients are statistically significant at a 95% confidence level. Table 6 shows the percentage reduction in hypotriglyceridemic activity levels obtained from equation 6 and the experimental values for the testing set.

**Table 6.** Reduction percents of hypotriglyceridemic activity levels obtained from equation 6 and from experimental results

Test set	(%T <sub>16</sub> ) <sub>exp</sub>	(%T <sub>16</sub> ) <sub>pred</sub>
2,4-Dichloro	13 ± 5	20
3,4-Dimethoxy	11 ± 4	15
3,4-Dichloro	34 ± 8	17

In general, there is a good fit between them. On the other hand, it is also possible to notice that the agreement for the 3,4-dichloro derivative is not as good.

In addition to the dipole moment and LUMO energy, it was used three other descriptors ( $qC_{17}$ ,  $\log P$  and HOMO energy) to perform a PCA for  $pT_{16}$ . However, there was no significant improvement in the results compared to those obtained from equations 5 and 6.

## A new hypolipidemic agent

Our results reveal that more active compounds in reducing cholesterol levels are expected to be associated with high  $\log P$  and  $\pi$  values and with low  $qH_{14}$  and  $qC_{17}$  values, especially the hydrogen atomic charge bonded to the  $sp^3$  carbon of the indan group, as shown by equations 1 to 3. Our results also reveal that molecules having lower dipole moments should be better at reducing serum triglyceride levels. It was found that the hydroxyl group in the *ortho* position on the phenyl group possesses such characteristics. It was thus performed AM1 calculations on 2-(*o*-hydroxy-phenyl)indan-1,3-dione in order to obtain its  $qH_{14}$ ,  $qC_{17}$  and  $\mu$  values. The calculated values are 0.143 [e<sup>-</sup>], -0.085 e<sup>-</sup> and 1.828 D, respectively, for the isolated molecule. It was also obtained the values of  $\log P$  (3.01) and  $\pi$  (-0.67) for the molecule.

Table 7 shows the  $pC_{16}$  values for 2-(*o*-hydroxy-phenyl)indan-1,3-dione using equations 2 and 4, as well as its  $pT_{16}$  value using equation 5. The table also lists the experimental and calculated  $pC_{16}$  and  $pT_{16}$  values for the parent compound, 2-phenylindan-1,3-dione (**I**). Compound **I** reduces cholesterol and triglyceride levels by 35 and 40%, while the corresponding reduction values for 2-(*o*-hydroxy-phenyl)indan-1,3-dione are 57 and 54%. Hence, it is concluded that 2-(*o*-hydroxy-phenyl)indan-1,3-dione should be considered for new experimental screening studies on compounds to reduce serum cholesterol and triglyceride levels.

**Table 7.** Reduction percents of hypolipidemic activity levels for both 2-(*o*-hydroxy-phenyl)indan-1,3-dione and 2-phenylindan-1,3-dione using equations 2 and 4 for hypocholesteremic activities and equations 5 and 6 for hypotriglyceridemic activities. Experimental values of 2-phenylindan-1,3-dione are also given in brackets<sup>a</sup>

Compound	(%C <sub>16</sub> )	(%T <sub>16</sub> )
2-( <i>o</i> -Hydroxy-phenyl)indan-1,3-dione	57 (32)	54 (62)
2-Phenylindan-1,3-dione	35 (32) [40 ± 2]	40 (46) [40 ± 4]

<sup>a</sup>Values obtained from equations 4 and 6 for  $pC_{16}$  and  $pT_{16}$ , respectively, are given in parentheses.

## Conclusions

AMI electronic descriptors allowed us to build molecular models in order to obtain structure-activity relationships in a group of sixteen 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones possessing hypolipidemic activities. Two different linear models were built, one to describe the hypocholesteremic activity and the other to describe the hypotriglyceridemic activity, since there is not a linear correlation between them. Thus, the hypocholesteremic activity of 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones showed a reasonable linear correlation with the hydrogen atomic charge bonded to the carbon atom of the indan ring, whereas the dipole moment was the most significant descriptor for explaining hypotriglyceridemic activity changes. The statistical analysis supporting such relationships was performed, considering the molecular environment with and without solvent effect. Although the  $R^2$  values were not very impressive, the linear coefficients were statistically significant at the 95% confidence level. Furthermore, the residual analysis also supported this behavior.

From these models, it was proposed new compounds that may be more active than any of the molecules employed in the training and test sets. As a consequence, such compounds may be viewed as potential candidates for new experimental screening studies. From a theoretical point of view, it would be now interesting to employ molecular orbital calculations using a density functional such as B3LYP with an extended basis set including both polarization and diffuse functions in order to test our AMI molecular modeling.

## Acknowledgments

This work is dedicated to Professor Benício de Barros Neto, who introduced the chemometric techniques in the Departamento de Química Fundamental of the Universidade Federal de Pernambuco. We are also grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for a fellowship granted to A. G. S.

## References

- Cechinel Filho, V.; Campos, F.; Corrêa, R.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 230.
- Reynolds, D. J.; Wong, O. T.; Simlot, R.; Chang, J. J.; Hall, I. H.; *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **1994**, *327*, 237.
- El-Zahabi, M. A.; Gad, L. M.; Bamanie, F. H.; Al-Marzooki, Z.; *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 75.
- Chapman, J. M.; Cocolas, G. H.; Hall, I. H.; *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1399; Wyrick, S. D.; Voorstad, P. J.; Cocolas, G. H.; Hall, I. H.; *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 768; Hall, I. H.; Williams, W. L.; Wyrick, S. D.; Voorstad, P. J.; *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73*, 1482; Chapman, J. M.; Voorstad, P. J.; Cocolas, G. H.; Hall, I. H.; *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 237.
- Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Eamonn, F. H.; Stewart, J. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.
- Ramos, M. N.; Neto, B. B.; *J. Comp. Chem.* **1990**, *11*, 569.
- Coutinho-Neto, M. D.; Pinheiro Filho, W. C.; Neto, B. B.; Ramos, M. N.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1993**, *4*, 139.
- Murthy, A. R.; Wyrick, S. D.; Hall, I. H.; *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1591.
- Koelsch, C. C. F.; Byers, D. J.; *J. Org. Chem.* **1940**, *62*, 560; Koelsch, C. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1331.
- Mosher, W. A.; Soeder, R. W.; *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 1561.
- Shapiro, S. L.; Geiger, K.; Freedman, L.; *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1860.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Head-Gordon, M.; Gill, P. M. W.; Wong, M. W.; Foresman, J. B.; Johnson, B. G.; Schlegel, H. B.; Robb, M. A.; Replogle, E. S.; Gomperts, R.; Andres, J. L.; Raghavachari, K.; Binkley, J. S.; Gonzalez, C.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Defrees, D. J.; Baker, J.; Stewart, J. P.; Pople, J.; *Gaussian 98W (revision A11.2)*; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 2001.
- Kowwin™, v. 1.67; US Environmental Protection Agency, 2000.
- Jolliffe, I. T.; *Principal Component Analysis*, 2<sup>nd</sup> ed.; Springer: New York, 2002.
- Naes, T.; Isaksson, T.; Fearn, T.; Davies, T.; *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*; NIR Publications: Chichester, UK, 2002.
- Klamt, A.; Schüürmann, G.; *J. Chem. Soc.* **1993**, *2*, 799.
- Barone, V.; Cossi, M.; Tomasi, J.; *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3210.
- Becke, A. D.; *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.

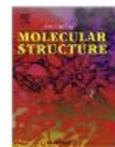
Submitted: June 19, 2012

Published online: September 21, 2012



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/molstruc](http://www.elsevier.com/locate/molstruc)

## Intermolecular interaction of thiosemicarbazone derivatives to solvents and a potential *Aedes aegypti* target



João Bosco P. da Silva<sup>a,\*</sup>, Fernando Hallwass<sup>a</sup>, Aluizio G. da Silva<sup>a</sup>, Diogo Rodrigo Moreira<sup>a,1</sup>, Mozart N. Ramos<sup>a</sup>, José Wanderlan P. Espíndola<sup>b</sup>, Ana Daura T. de Oliveira<sup>b</sup>, Dalci José Brondani<sup>b</sup>, Ana Cristina L. Leite<sup>b</sup>, Kenneth M. Merz Jr.<sup>c,2</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

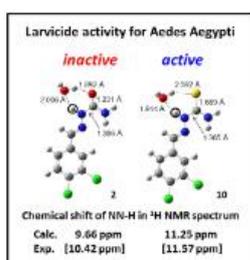
<sup>b</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521 Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup>Quantum Theory Project, University of Florida, 2234 New Physics Building, PO Box 118435, Gainesville, FL, USA

### HIGHLIGHTS

- Thiosemicarbazones (TSCZ) derivatives exhibit large *A. aegypti* larvicide activity.
- Semicarbazone (SCZ) derivatives exhibit low *A. aegypti* larvicide activity.
- The high <sup>1</sup>H NMR δ of NNH in TSCZ was in the literature credited to H-bond to DMSO.
- Our NMR experiments and theoretical calculations shown NNH interactions with water.
- TSCZ and SCZ make distinct H-bond interaction to AeSCP-2's residues.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 January 2015

Received in revised form 5 March 2015

Accepted 6 March 2015

Available online 20 March 2015

#### Keywords:

Thiosemicarbazone  
Intermolecular interaction  
Solvent  
*Aedes aegypti*  
AeSCP-2  
DFT

### ABSTRACT

DFT calculations were used to access information about structure, energy and electronic properties of series of phenyl- and phenoxyethyl-(thio)semicarbazone derivatives with demonstrated activity against the larvae of *Aedes aegypti* in stage L4. The way as the thiosemicarbazone derivatives can interact with solvents like DMSO and water were analyzed from the comparison between calculated and experimental <sup>1</sup>H NMR chemical shifts. The evidences of thiosemicarbazone derivatives making H-bond interaction to solvent have provide us insights on how they can interact with a potential *A. aegypti*'s biological target, the Sterol Carrier Protein-2.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 7419; fax: +55 81 2126 8442.

E-mail addresses: [paraiso@ufpe.br](mailto:paraiso@ufpe.br), [paraiso100@yahoo.com.br](mailto:paraiso100@yahoo.com.br) (J.B.P. da Silva).

<sup>1</sup> Present address: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710 Salvador, BA, Brazil.

<sup>2</sup> Present address: Institute for Cyber Enabled Research, Department of Chemistry and the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, 578 S. Shaw Lane, East Lansing, MI 48824, USA.

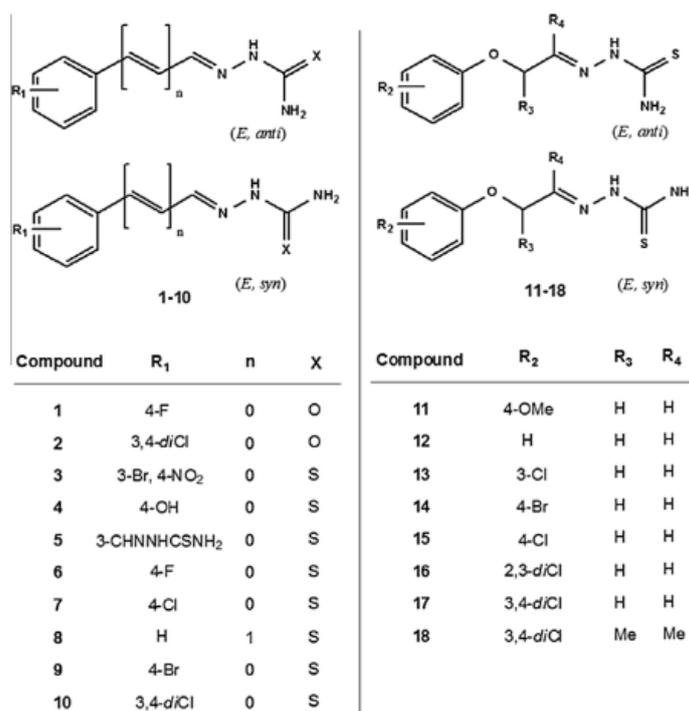
## Introduction

Dengue Fever (DF) is a serious disease caused by at least four virus serotypes (1–4) transmitted by *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) mosquito [1,2]. Recently, a fifth serotype has been reported [3]. DF is principally related but not limited to tropical and subtropical regions of the world [4–9]. One strategy for the *A. aegypti* mosquito control is the use of chemical larvicides [10,11].

As part of a systematic program for searching new larvicide agents against the *A. aegypti* larvae, recently our group has developed the synthesis of a series of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives (see Scheme 1) and test them against the larvae of *A. aegypti* in their fourth larvae stage (L4) [12,13]. The results point out for the improved larvicide activity of the thiosemicarbazone derivatives compared to the corresponding semicarbazone derivatives. For the thiosemicarbazones series, in particular, the phenoxyethyl derivatives have exhibited a higher larvicide performance than the corresponding aryl derivatives [13]. Nowadays, there is no thiosemicarbazone-based medicine already in use in humans. However, the anticancer thiosemicarbazone Triapine is under clinical trial investigation phase III [14].

In order to design the new generation of thiosemicarbazone derivatives with improved larvicide activity in Ref. 13 we used a Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) approach [15]. It is known that the successful of such approach is heavily depending on the quality of the response function (in our case the larvicide activity) and the selected descriptors. Since experimental

descriptors tables are frequently incomplete for some substituents, many times these descriptors come from theoretical calculations. Because of that, in this work electronic structure calculations were developed in order to access structural (configurational and conformational aspects), energetic and electronic information for the synthesized (thio)semicarbazone derivatives. Parallel, NOESY <sup>1</sup>H NMR experiments for these compounds in DMSO-*d*<sub>6</sub> were conducted in order to strength the theoretical finds. The ability of the thiosemicarbazone's NN–H moiety to make intermolecular interactions was evaluated from the NMR analysis. Specifically, it was done by the comparison between theoretical predictions of the chemical shifts of (thio)semicarbazones-solvent hydrogen bonded complexes (H-complexes) and the corresponding experimental data. The comprehension on how these compounds interact to the solvent can provide us insights on how they can interact with a potential biological target of the mosquito *A. aegypti*, the Sterol Carrier Protein-2 (AeSCP-2). Lan and co-workers have reported the X-ray structure of palmitic acid co-crystallized into AeSCP-2 [16]. These authors have proposed that the polar head of palmitic acid binds to the SCP-2's residues Arg24 and Glu25 through H-bonds. Because of that, the palmitic acid contact residues in SCP-2 were used as template to test the ability of the polar head (–HC=N–NH–(C=X)–NH<sub>2</sub>, X=O or S) of (thio)semicarbazone derivatives to form H-bonds interaction as well. In order to check this hypothesis, formaldehyde-thiosemicarbazone and the protonated tripeptide CH<sub>3</sub>CO–Arg24(H<sup>+</sup>)–Gln25–Val26–NHCH<sub>3</sub> were employed as interacting model systems.



**Scheme 1.** General representation of the possible configurations and conformations of the (thio)semicarbazone derivatives investigated in this work.

## Methodology

### Computational

Electronic structure calculations of the isolated molecules **1–18** (for numbering see Scheme 1 or Fig. 1 in Ref. 13) and the H-bonded complexes between (thio)semicarbazone compounds and the solvent (DMSO or water) were performed with the density functional theory (DFT) method using the B3LYP [17] hybrid functional and the 6-311++G(d,p) basis set [18,19]. This basis set was selected because extended basis sets containing diffuse functions have been showed to be important for describing intermolecular interactions and in minimizing basis set superposition errors in systems making hydrogen bonds [20]. B3LYP/6-311++G(d,p) calculations were also used to calculate the H-bonded complex between and the model system formaldehyde-thiosemicarbazone and the tripeptide Arg24–Gln25–Val26. Harmonic infrared frequency calculations were developed to check the nature of the stationary points in the potential energy surface for those cases where the molecular geometry was optimized. The thermochemistry calculations were performed using standard procedures as described elsewhere [21]. The experimental geometry of the heavy atoms in the tripeptide Arg24–Gln25–Val26 was obtained from the PDB structure of AeSCP-2 co-crystallized with palmitic acid (1PZ4). The extreme peptide bonds of the tripeptide Arg24–Gln25–Val26 were

completed with methyl groups. The methyl group was added using standard bond distances, bond angles and dihedral angles as defined in the GaussView 5 program [22]. Since the reported experimental structure of AeSCP-2 [16] was obtained at pH = 7.4, the Arg24 residue was considered protonated on the calculations. Thus, the domain of AeSCP-2 for interacting with our ligands was represented by CH<sub>3</sub>CO–Arg24(H<sup>+</sup>)–Gln25–Val26–NHCH<sub>3</sub>. All atoms in the CH<sub>3</sub>CO–Arg24(H<sup>+</sup>)–Gln25–Val26–NHCH<sub>3</sub> were maintained frozen whereas the geometry of the model system (formaldehyde-thiosemicarbazone) representing the thiosemicarbazone derivatives was fully optimized during the intermolecular interaction. The <sup>1</sup>H NMR chemical shifts were calculated using the GIAO method [23]. All calculations were performed with the Gaussian09 program [24] using its default convergence criteria.

### NMR

The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR were performed for **1–18** in DMSO-*d*<sub>6</sub> at 298 K, using Agilent spectrometer (400 MHz for <sup>1</sup>H, 100 MHz for <sup>13</sup>C) or Bruker AMX (300 MHz for <sup>1</sup>H, 75.5 MHz for <sup>13</sup>C). DEPT analysis was carried out to assigning carbon chemical shift unambiguously, as well as the addition of D<sub>2</sub>O for assigning NH signals in the <sup>1</sup>H NMR spectra. Tetramethylsilane was used as internal Ref. [13]. In this work NOESY spectra were acquired using a spectral width of 4.4 kHz, acquisition time 0.93 s, 2048 × 128 data points

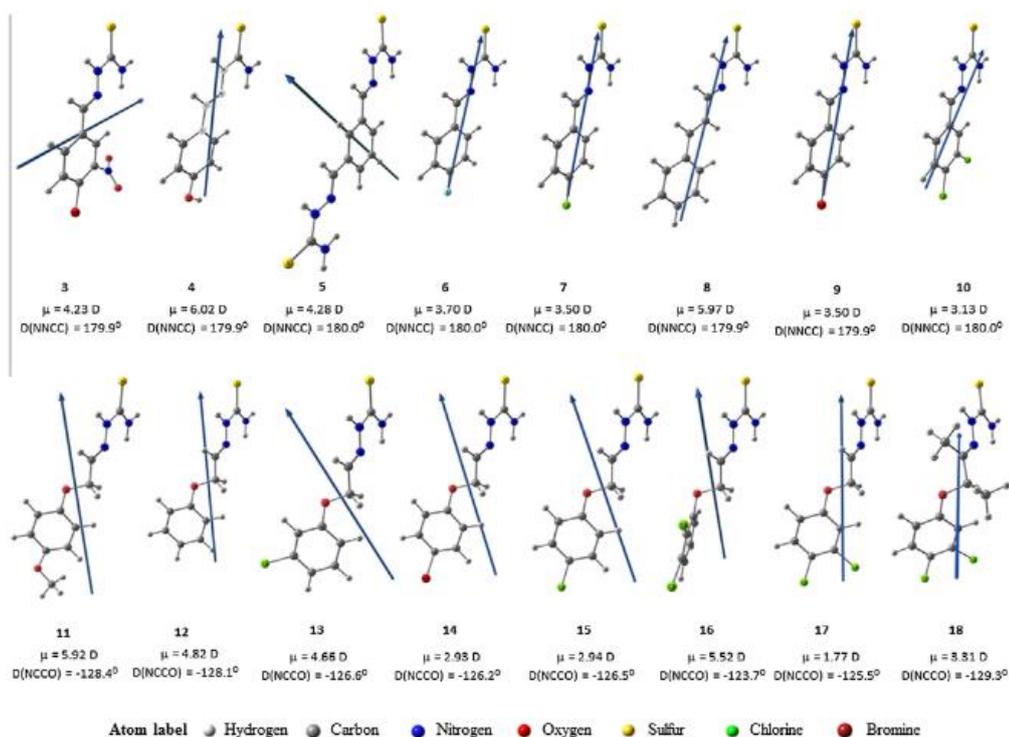


Fig. 1. Magnitude and orientation of the calculated B3LYP/6-311++G(d,p) electric dipole moment for the *E/anti* conformer of the thiosemicarbazone derivatives **3–18** in gas phase. Dihedral angle between the aryl-/phenoxy- and thiosemicarbazone chemical moieties, in degrees.

in F1 and F2 dimensions, respectively, 32 scans and mixing time 1.5 s.

## Results and discussions

### Molecular modeling of the isolated (thio)semicarbazone derivatives

The first step for modeling these (thio)semicarbazone derivatives was to investigate their configurational (*E* or *Z* at the aryl-C=N double bond) and conformational (*syn* or *anti* around the partial NH–CX double bond, X=O or S) isomers (see Scheme 1).

Since the compounds studied in this work have three chemical domains, namely the thio- or semicarbazone group (X), the substituent at the aryl ( $R_1$ ) or phenoxy ring ( $R_2$ ), and the spacer unit –CH= or –OCH<sub>2</sub>CH=(SU) between the X and R-Ar groups, then each compound will be represented by the triad (R;SU;X) whereas the corresponding H-complex with the solvent by [R;SU;X]-solvent, where solvent = H<sub>2</sub>O or DMSO.

A review in the literature about the X-ray structures of *p*-fluorobenzaldehyde thiosemicarbazones [25], 3- and 4-R-pyridine thiosemicarbazones (with R = formyl and acetyl) [26], 4-R-pyridine N(4)-methyl and 4-R-pyridine N(4)-ethylthiosemicarbazones (with R = formyl and acetyl) [27] and 2-acetylthiophene thiosemicarbazones [28], indicate only the *E* isomer for the C=N moiety. It is confirmed by our NOESY spectra (see NMR section). The correlations of NN–H/C–H have indicated that these protons are located on the same side of the molecule. Because of that, we have assumed the *E* configuration for the C=N moiety (as depicted at the Scheme 1) in all cases. On the other hand, the *anti/syn* conformational stability around the partial HNCS double bond was evaluated through the calculation of the standard Gibbs free energy for both (*syn* and *anti*) conformers as one can see in Table 1. The electric dipole moment and the lowest harmonic vibrational frequency are also showed in this table in order to check the polarity and the nature for each conformer in the potential energy surface, respectively.

From this table it is possible to see that both *syn* and *anti* conformers represent minima in the potential energy surface. The *anti*

conformer is predicted to be the most stable one in average for ca. 7.3 kcal mol<sup>-1</sup> and 9.3 kcal mol<sup>-1</sup> for the semicarbazone (1–2) and thiosemicarbazone (3–18) derivatives, respectively. It is also possible to note that this energy difference do not depend on both the nature of the substituent (R) at the aromatic ring or even on the nature of the spacer unit (SU, i.e., –CH=, –O–CH<sub>2</sub>–CH= or –O–CH(CH<sub>3</sub>)–CCH<sub>3</sub>=) between the aromatic ring and the (thio)semicarbazone moieties.

In order to help the polarity data analysis (Table 1), we have additionally developed B3LYP/6-311++G(d,p) calculations to obtain the electric dipole moment ( $\mu$ ) for urea ( $\mu$  = 3.88 D), thiourea ( $\mu$  = 5.00 D), formaldehyde-thiosemicarbazone ( $\mu$  = 4.50 D), and phenyl-thiosemicarbazone ( $\mu$  = 5.46 D). See the structure of these four compounds in the Supplementary Data. In comparison for the last three compounds one can conclude that the hydrazone or the phenyl-hydrazone moieties do not modify too much the magnitude and the orientation of the electric dipole moment. From Table 1 some aspects about the electric dipole moment can be stressed. First, the thiosemicarbazones are predicted to exhibit higher electric dipole moment than the corresponding semicarbazone derivatives. In fact the difference of electric dipole moment between thiourea and urea, 1.1 D is approximately maintained between the most stable forms of 6 and 1, 1.3 D, and between 10 and 2, 1.5 D. Second and mainly for those with substituents at *para* position, the most stable *anti* conformer has a lower electric dipole moment than the corresponding *syn* conformer. The exceptions are the compounds non-substituted at the *para* position, 8 and 12, whereas the electric dipole moments are almost the same for both conformers and the compounds which the substituents may exhibit different orientation relative the C=S bond, e.g. 4 (R = 4-OH) and 11 (R = 4-OCH<sub>3</sub>) and 16 (R = 3,4-DiCl) where their dipole bond for the minima structures leads to higher total dipole moment in the *anti* conformer. Of course, low electric dipole moment value for the most stable (*anti*) form of the thiosemicarbazone derivatives can be an advantageous aspect for promoting hydrophobic interaction in the biological environment. As any vector descriptor, besides the magnitude, the electric dipole moment vector has also a direction. Because of that, in Fig. 1 the direction of the electric

**Table 1**

Standard Gibbs free energy ( $G^0$ ), their variations between the *syn* and *anti* conformers ( $\Delta G^0$ ), the electric dipole moment ( $\mu$ ) and the lowest harmonic vibrational frequency for compounds 1–18 evaluated at B3LYP/6-311++G(d,p) level in the gas phase approach. All values were computed at 298.15 K and 1 bar.<sup>a</sup>

Number	Compound (R;SU;X)	<i>Syn</i>			<i>Anti</i>			$\Delta G^{0a}$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
		$G^0$ (e <sub>h</sub> )	$\mu$ (D)	$\nu_1$ (cm <sup>-1</sup> )	$G^0$ (e <sub>h</sub> )	$\mu$ (D)	$\nu_1$ (cm <sup>-1</sup> )	
1	(4-F;CH;O)	-649.045519	5.61	42.0	-649.057077	2.38	33.4	-7.25
2	(3,4-DiCl;CH;O)	-1469.031055	5.37	32.5	-1469.042708	1.65	26.8	-7.31
3	(3-NO <sub>2</sub> ;4-Br;CH;S)	-3650.829505	5.34	24.7	-3650.843120	4.26	24.3	-8.54
4	(4-OH;CH;S)	-947.968453	4.35	34.1	-947.983487	6.02	37.2	-9.43
5	(5-FTSC;CH;S) <sup>c</sup>	-1513.220541	4.63	16.3	-1513.234814	4.28	15.1	-8.96
6	(4-F;CH;S)	-972.000578	6.06	33.8	-972.015363	3.70	37.0	-9.28
7	(4-Cl;CH;S)	-1332.356854	6.11	35.4	-1332.371675	3.50	35.0	-9.30
8	(H;CH=CH=CH;S)	-950.118099	5.96	26.1	-950.134200	5.97	31.0	-10.10
9	(4-Br;CH;S)	-3446.278182	6.11	35.6	-3446.293100	3.50	32.1	-9.36
10	(3,4-DiCl;CH;S)	-1791.985694	5.43	25.5	-1792.000329	3.13	29.4	-9.18
11	(4-OCH <sub>3</sub> ;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-1101.768777	4.03	19.4	-1101.783947	5.92	17.4	-9.52
12	(H;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-987.243034	4.88	24.0	-987.258250	4.82	22.4	-9.54
13	(3-Cl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-1446.877531	4.20	16.9	-1446.892287	4.66	18.7	-9.26
14	(4-Br;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-3560.798445	5.57	17.5	-3560.813237	2.93	15.9	-9.28
15	(4-Cl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-1446.876855	5.58	19.5	-1446.891718	2.94	17.4	-9.32
16	(2,3-DiCl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-1906.501534	3.30	13.3	-1906.515805	5.52	15.9	-8.96
17	(3,4-DiCl;OCH <sub>2</sub> CH;S)	-1906.505957	5.27	15.3	-1906.520747	1.77	18.3	-9.28
18	(3,4-diCl;OCH(CH <sub>3</sub> )CCH <sub>3</sub> ;S)	-1985.111237	7.57	15.1	-1985.126804	3.31 <sup>d</sup>	14.7	-9.77

<sup>a</sup> The optimized geometries are available in the Supplementary Data.

<sup>b</sup>  $\Delta G^0 = G^0(anti) - G^0(syn)$ .

<sup>c</sup> FTSC means formaldehyde-thiosemicarbazone (*E*, *anti*).

<sup>d</sup> Ref. [13].

dipole moment for the *E/anti* conformer minima structures of **3–18** are shown. The pictures of  $\mu$  for compounds **1** and **2** were not included because their directions are quite similar to **6** and **10**, respectively.

Fig. 1 confirms the chemical feeling that, except by the effect of the nitro and the formyl-thiosemicarbazone groups in **3** and **5**, respectively, the electric dipole moment is mainly orientated toward the C=S chemical bond for all the systems investigated. It is interesting to note that the compounds with large dipole moments **3–5**, **11** and **12** did not also show good larvicide activity [13]. The introduction of a halogen substituent at the *para* position (therefore in the opposite direction to the C=S dipole bond) decreases the electric dipole moment in 1.8–2.0 D but maintains its orientation for the *para*-R<sub>1</sub>-aryl-thiosemicarbazone derivatives (**6**, **7** and **9**) relative to the non-substituted phenyl-thiosemicarbazone ( $\mu = 5.46$  D). The same decreasing effect due to halogen atoms in the *para* position is observed for the *para*-R<sub>2</sub>-phenoxyethyl-thiosemicarbazone derivatives (**14** and **15**) relative **12**, however with a clear change of the electric dipole moment orientation out the C=S bond toward the oxygen atom on the phenoxyethyl moiety. This change is clearly related to the –O–CH<sub>2</sub>–CH= spacer which have created a torsion (in the range of  $-123.7^\circ$  to  $-129.3^\circ$ ) between the thiosemicarbazide and phenoxyethyl fragments. Furthermore, the introduction of a second chlorine atom at the *meta* position decrease even more the electric dipole moment. It goes from 3.50 D in **7** (X = 4-Cl) to 3.13 D in **10** (X = 3,4-DiCl) and from 2.94 D in **15** (X = 4-Cl) to 1.77 D in **17** (X = 3,4-DiCl).

#### (Thio)semicarbazones-solvent interaction

The ability to make intermolecular hydrogen bond (H-bond) interactions in solid state to both hydrogen donor (NN–H) and hydrogen acceptor (C=O or C=S) sites have been reported in the literature to the semicarbazones (e.g. for (*E*)-1-(4-fluorophenyl)ethan-1-one semicarbazone [29]) and thiosemicarbazone (e.g. 2-acetylpyridine thiosemicarbazones [30]) compounds which are structurally similar to those investigated in this work. Besides, the ability to form H-bonds in solution, in particular to the solvent,

have been claimed as the responsible for increasing the chemical shift of NN–H in <sup>1</sup>H NMR spectrum of 4-R-pyridineN(4)-methyl and 4-R-pyridineN(4)-ethylthiosemicarbazones (with R = formyl and acetyl) [27] and for 2-, 3- and 4-R-pyridine thiosemicarbazones (with R = formyl and acetyl) in DMSO-*d*<sub>6</sub> [31,32]. However, since DMSO is a compound capable of hydration [33] the contribution of trace water molecules for the high NN–H <sup>1</sup>H NMR chemical shift of our synthesized (thio)semicarbazone derivatives needs to be better investigated. Naturally, probing the H-complexes formed between (thio)semicarbazone derivatives and DMSO or water may give us insights about how they can form H-bond interaction to other relevant systems like amino acid residues in proteins. Thus, in Fig. 2 the experimental and calculated NN–H <sup>1</sup>H NMR chemical shift for the (thio)semicarbazones (**1–18**) are showed.

From this figure some aspects are worth to be stressed. First of all, the range of experimental NN–H <sup>1</sup>H NMR chemical shift values for our synthesized compounds 10.24–11.65 ppm (in DMSO-*d*<sub>6</sub>) are in complete agreement with previously published values for *p*-fluorobenzaldehyde (thio)semicarbazones (in DMSO-*d*<sub>6</sub> – between 10.92 ppm and 11.80 ppm, being 11.40 ppm for **1**) [25], 4-R-pyridineN(4)-methyl and 4-R-pyridineN(4)-ethylthiosemicarbazones (with R = formyl and acetyl) (in DMSO-*d*<sub>6</sub> – between 10.48 ppm to 11.93 ppm) [27] and for 2-, 3- and 4-R-pyridine thiosemicarbazones (with R = formyl and acetyl) (in DMSO-*d*<sub>6</sub> – between 10.45 ppm and 11.67 ppm) [31,32]. Second, still for the experimental values one can see that the two semicarbazone (X=O) derivatives **1** and **2** have lower NN–H <sup>1</sup>H NMR chemical shifts (10.24 and 10.42 ppm, respectively) than any of the thiosemicarbazone (X=S) derivative **3–18** (11.25–11.65 ppm). Third, for the thiosemicarbazone derivatives there are two levels of chemical shifts, the first eight one (**3–10**) and the following next seven one (**11–17**) that show R dependent (with SU = –CH=, which allows a larger delocalization) and R independent (with SU = phenoxyethyl, which represents an obstacle for the electron delocalization) chemical shift values, respectively. Curiously, the compound **18** (the methylated form of **17**) exhibits a much lower experimental NN–H chemical shift value (10.19 ppm) when compared to the previous thiosemicarbazone derivatives (**3–17**).

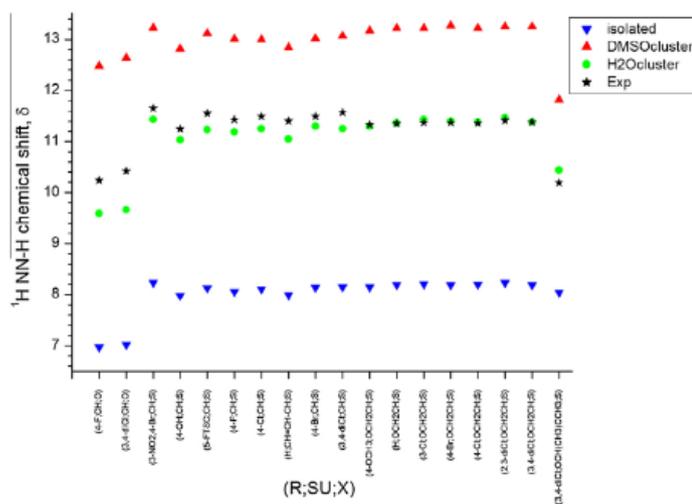


Fig. 2. Experimental (in DMSO-*d*<sub>6</sub>) and calculated B3LYP/6-311++G(d,p) <sup>1</sup>H NN–H chemical shift of (thio)semicarbazone derivatives (**1–18**).

Fourth, it is possible to observe that the isolated molecule model is not useful to predict the NN–H  $^1\text{H}$  NMR chemical shift since it underestimates the experimental values. Nevertheless, the isolated molecule model works in describing the chemical shifts of NN–H in semicarbazones as being more deshielded than in the thiosemicarbazone derivatives. However, it does not succeed for predicting the chemical shift for **18** since its value is essentially the same for **3–17**. On the other hand, the NN–H chemical shift prediction is much more close to the experimental values when the H-complex (thio)semicarbazone-solvent model is used. Concerning the H-complex model, it is interesting to observe that water perform better than DMSO as solvent for correlating calculated and experimental chemical shift values. In fact, the rms deviation between calculated and experimental NN–H chemical shifts for the (thio)semicarbazone derivatives- $\text{H}_2\text{O}$  complexes is 0.30 ppm whereas it is 1.76 ppm for the (thio)semicarbazone derivatives-DMSO complexes. Moreover, the remarkable difference on the experimental NN–H  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts of semicarbazones and thiosemicarbazones derivatives can be better understood based on the structure of the (thio)semicarbazone derivatives- $\text{H}_2\text{O}$  complexes (see Fig. 3).

Since the CS bond distance (ca. 1.69 Å) is larger than the CO bond distance (ca. 1.23 Å) it is waited that the weight of the  $\text{C}^+=\text{S}^-$  structure being larger than the  $\text{C}^+=\text{O}^-$  one. As consequence, it is also waited that the behavior of the adjacent partial double bond and the acidity of NN–H is larger in the thiopeptidic environment than in the peptidic counterpart. This can by itself justify the larger experimental NN–H chemical shift of thiosemicarbazone compared to semicarbazone derivatives. However and even much more interesting, it suggests that water molecules interact in a different way in semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. From Fig. 3 it is clear that the replacement of carbonyl in **2** by thio-carbonyl bond in **10** leads to a strengthening of NN–H– $\text{OH}_2$  and a weakening of HOH– $\text{X}=\text{C}$  H-bonds. That is the reason why the calculated or experimental NN–H  $^1\text{H}$  NMR chemical shift is larger for thiosemicarbazone than for semicarbazone derivatives (see Fig. 3). Note that these two H-bond distances are essentially the same no matter the nature of SU (compare **10** and **17**). Finally, taking in account both Figs. 2 and 3 it is also clear that the presence of methyl groups in **18** decreases the NN–H chemical shift principally by a steric effect. Observe that the NN–H– $\text{OH}_2$  bond distance values 1.907 Å in **17** whereas it values 1.951 Å in **18**. This hypothesis can be supported by NMR experiments. The NOESY spectrum for

thiosemicarbazone shows correlation peaks for NN–H/water signals (Fig. 4). These correlations are due to chemical exchange processes that are taken place, indicating H-bonds formation. These correlations peaks were observed when the thiosemicarbazone derivative **10** was analyzed (dotted circles in Fig. 4b). On the other hand, these correlations were not observed when the same experiment is performed with the semicarbazone derivative **2** (Fig. 4a).

The different ways as thiosemicarbazone and semicarbazone interact with the solvent can be of relevance for their biological activity. This is so if the differences that feature the way as thiosemicarbazone and semicarbazone interact with the solvent are assumed to be the same in a protein environment. In fact, the higher larvicidal activity observed for thiosemicarbazone derivatives [13] can be nicely rationalized in terms of the larger ability its NNH group to form H-bond interaction to protein residues compared to semicarbazone derivatives. In a such scenario, amino acid residues that can form H-bond interaction, in particular those that resemble the (thio)semicarbazone moiety (e.g. Asp, Gln, Arg) became natural candidates for intermolecular interactions as will be discussed in the next section.

#### Hydrogen bond interaction to AeSCP-2

It has been proposed that the polar head of palmitic acid binds to SCP-2's residues Arg24 and Glu25 through H-bonds whereas to methylenic tail to the residues Val26, Leu45, Met46, Leu102, Ile99, Leu64, Met90, Met66, Ile74, Phe32, Met71, Ile12, Ile106, Phe105, Ser108 and Leu16 through hydrophobic interactions [16]. Because in the previous section we have theoretically and experimentally proved that the polar head of (thio)semicarbazone derivatives has the ability to form H-bonds to solvents like DMSO or water, we have used the palmitic acid's contact residues in SCP-2 as template for our compounds. Fig. 5 shows the B3LYP/6-311++G(d,p) optimized structures representing the four different ways on which the simplified model system formaldehyde-thiosemicarbazone can form H-bonds to the protonated tripeptide system  $\text{CH}_3\text{CO}-\text{Arg24}(\text{H}^+)-\text{Gln25}-\text{Val26}-\text{NHCH}_3$ .

From Fig. 5 one can observe that formaldehyde-thiosemicarbazone can make H-bond interaction with the protonated tripeptide model system  $\text{CH}_3\text{CO}-\text{Arg24}(\text{H}^+)-\text{Gln25}-\text{Val26}-\text{NHCH}_3$  through four different ways. In each case the sulfur atom points toward a set of N–H bonds (two of them related to the protonated Arg24( $\text{H}^+$ ) side chain and two related to the peptide bond of Gln25

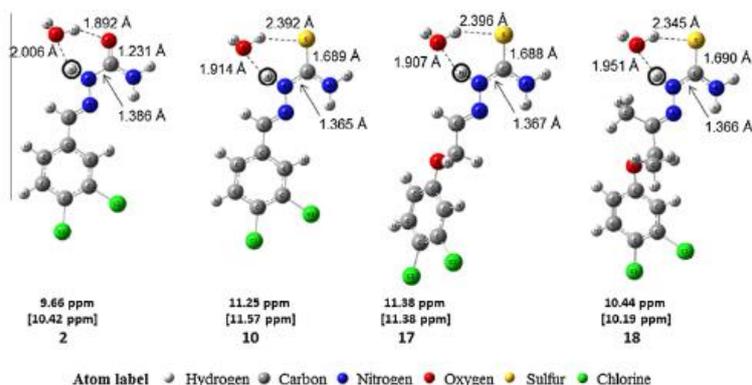


Fig. 3. Calculated B3LYP/6-311++G(d,p) bond distances and  $^1\text{H}$  NN–H chemical shifts of the H-complexes (thio)semicarbazones derivatives- $\text{H}_2\text{O}$ . Experimental value in brackets.

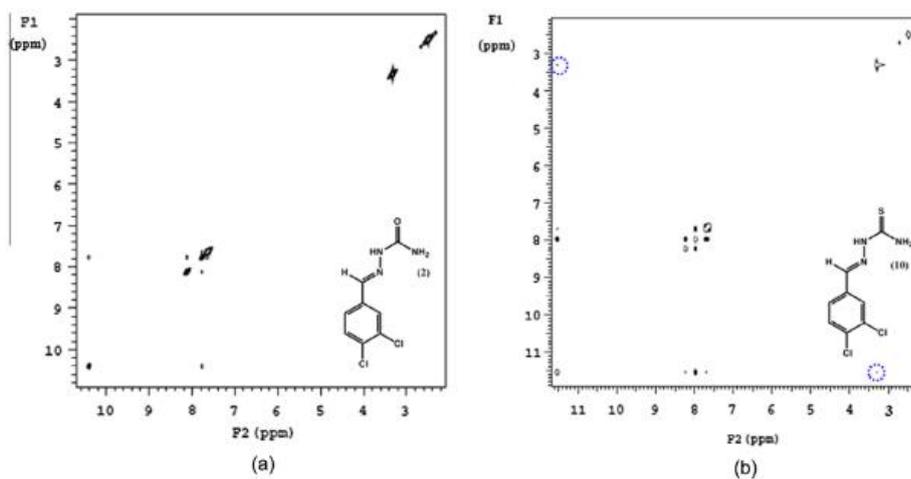


Fig. 4. NOESY spectra (400 MHz) in DMSO- $d_6$  of: (a) **2** and (b) **10**.

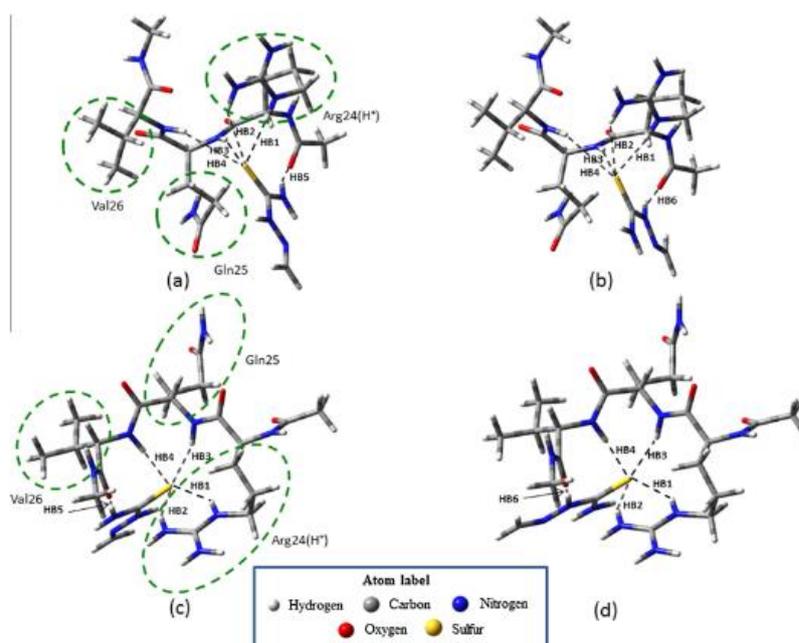


Fig. 5. H-bond interaction between the amine (a, c) and imine (b, d) groups of formaldehyde-thiosemicarbazone and the C=O of Arg24 (a, b) or the C=O of Val26 (c, d) of the protonated tripeptide model  $\text{CH}_3\text{CO-Arg24(H}^+\text{)-Gln25-Val26-NHCH}_3$ .

and Val26, as indicated in Fig. 5. by HB1–HB4), whereas the (underlined) hydrogen atoms in  $\text{NH}_2$  or  $\text{NH}_2\text{NCH}_2$  groups can interact with the peptide C=O group of the aminoacids Arg24 or Val26.

The mode of interaction for formaldehyde-semicarbazone is not shown in Fig. 5 because it is similar to that for formaldehyde-thiosemicarbazone, except by the absence of interaction with the

**Table 2**  
B3LYP/6-311++G(d,p) bind energy, bond distances and bond angles in the H-bond complexes<sup>a</sup> between formaldehyde-thiosemicarbazone and the protonated tripeptide model CH<sub>3</sub>CO–Arg24(H<sup>+</sup>)–Gln25–Val26–NHCH<sub>3</sub>.<sup>b</sup>

Parameter	(Res) <u>NH</u> ··· Ligand ··· O=C(Arg24) <sup>c</sup>		(Res) <u>NH</u> ··· Ligand ··· O=C(Val26) <sup>c</sup>	
	··· S=C(NHNCH <sub>2</sub> )NH <sub>2</sub> ··· Fig. 5a	··· S=C(NHNCH <sub>2</sub> )NH <sub>2</sub> ··· Fig. 5b	··· S=C(NHNCH <sub>2</sub> )NH <sub>2</sub> ··· Fig. 5c	··· S=C(NHNCH <sub>2</sub> )NH <sub>2</sub> ··· Fig. 5d
ΔE <sub>H-bond</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )	-29.86	-30.55	-24.71	-23.41
R <sub>H-bond</sub> (Å); A <sub>H-bond</sub> (degree)				
HB1(Arg24)N11H44 ··· S70	<b>2.298<sup>d</sup></b>	<b>2.266<sup>d</sup></b>	2.663	2.666
HB2 (Arg24)N14H47 ··· S70	<b>167.6<sup>d</sup></b>	<b>167.5<sup>d</sup></b>	148.2	147.8
HB3 (Gln25)N15H58 ··· S70	2.895	2.856	<b>2.378<sup>d</sup></b>	<b>2.360<sup>d</sup></b>
HB4 (Val26)N24H67 ··· S70	140.3	140.2	<b>158.9<sup>d</sup></b>	<b>159.2<sup>d</sup></b>
HB5 (Val26)N24H67 ··· S70	<b>2.519<sup>d</sup></b>	<b>2.484<sup>d</sup></b>	2.770	2.761
HB6 (Val26)N24H67 ··· S70	<b>156.5<sup>d</sup></b>	<b>157.2<sup>d</sup></b>	157.5	157.4
HB7 (Val26)N24H67 ··· S70	3.221	3.181	2.729	2.701
HB8 (Val26)N24H67 ··· S70	158.0	158.4	157.6	157.6
HB5 N72H73 ··· O=C(Res <sub>1</sub> )	1.938		1.942	
HB6 N75H76 ··· O=C(Res <sub>1</sub> )	154.2		173.9	
HB6 N75H76 ··· O=C(Res <sub>1</sub> )		2.103		1.963
C78H80 ··· O=C(Res <sub>1</sub> )		153.0		172.2
C78H80 ··· O=C(Res <sub>1</sub> )		2.314		2.916
C78H80 ··· O=C(Res <sub>1</sub> )		140.8		129.6

<sup>a</sup> Hydrogen atom involved in the H-bond is underlined.

<sup>b</sup> The H-complexes structures are available in the Supplementary data.

<sup>c</sup> Ligand = formaldehyde-thiosemicarbazone.

<sup>d</sup> Donohue's criteria for classifying N–H ··· S=C as H-bond.

carbonyl group of Val26. Indeed, for the formaldehyde-semicarbazone system, two initial geometries where the hydrogen atoms in the NH<sub>2</sub> or in the NHNCH<sub>2</sub> groups were initially making H-bond interaction with the C=O of Val26 have moved during the optimization procedure toward a final structure where these hydrogen atoms make H-bond interaction with the C=O group of Arg24. It is interesting to note that in a similar way for the formaldehyde-semicarbazone, the carbonyl moiety in the palmitic acid is reported to interact only with the C=O group of Arg24 [16]. In Table 2 we show geometric and energetic parameters related to the model system formaldehyde-thiosemicarbazone H-bonded to the protonated tripeptide model CH<sub>3</sub>CO–Arg24(H<sup>+</sup>)–Gln25–Val26–NHCH<sub>3</sub>.

Considering the Donohue's criteria for classifying N–H ··· S=C as a H-bond, i.e., H ··· S distance lower than 2.75 Å and N–H ··· S planar angle larger than 155° [34], one can observe in Table 2 (see values in bold) that, although four N–H bonds pointing to the sulfur atom of formaldehyde-thiosemicarbazone, only one N–H bond satisfy these criteria when it interacts to the C=O group of Val26 (namely the (Arg24)N14H47), whereas two of them satisfy these criteria when it interacts with the C=O group of Arg24 (namely (Arg24)N11H44 and (Gln25)N15H58). It can explain why the H-complexes involving the C=O group in Val26 are 6–7 kcal mol<sup>-1</sup> less stable than the corresponding C=O group in Arg24. In the last case, i.e., when formaldehyde-thiosemicarbazone interacts with the C=O group of Arg24 through the hydrogen atom of NHNCH<sub>2</sub> there are two compatible H-bond interactions: N75H76 ··· O=C(Arg24) = 2.103 Å [35] and C78H80 ··· O=C(Arg24) = 2.314 Å [36,37], whereas with the NH<sub>2</sub> group there is only one: N72H73 ··· O=C(Arg24) = 1.938 Å. Besides, in this comparison the H-bond distances (Arg24)N11H44 ··· S70 and (Gln25)N15H58 ··· S70 are lightly shorter than for the hydrogen donor specie NH<sub>2</sub>. It probably explain the light preference of NHNCH<sub>2</sub> than to NH<sub>2</sub> group for interacting with the C=O group of Arg24. For the most stable H-complex, the predicted (Arg24)N11H44 ··· S70 H-bonds, 2.266 Å, is lower than the experimentally observed NH ··· S distances in crystals of thiocyanuric acids (c.a. 2.5 Å) [38] and also lower than the average experimental N–H ··· S=C bond distance, 2.56 Å obtained from seven thio containing crystals [39].

## Conclusion

A set of phenyl- and phenoxyethyl-(thio)semicarbazone derivatives with activity against the larvae of *A. aegypti* in L4 was studied theoretically and by NMR experiments. The electronic structure calculations at B3LYP/6-311++G(d,p) level of theory showed that the partial CN double bond in the *anti* is more stable and exhibits low dipole moment than in the *syn* conformation. The value and orientation of the dipole moment change from the phenyl- to the phenoxyethyl-thiosemicarbazone derivatives as well as with the presence of halogen atoms at *para* position of the aromatic ring. Such changes in the dipole moment are probably related to the improved larvicidal activity of the phenoxyethyl-thiosemicarbazone over the phenyl-thiosemicarbazone. From the comparison between experimental and calculated NN–H <sup>1</sup>H chemical shift of (thio)semicarbazone derivatives in DMSO-*d*<sub>6</sub> it is possible to establish that the characteristic unshielded NN–H sign is mainly due to its H-bond interaction with residual water contained in DMSO samples. Water is theoretically predicted to interact with semicarbazone derivatives mainly as hydrogen donor whereas with thiosemicarbazone derivatives mainly as hydrogen acceptor. This prediction is supported by bidimensional <sup>1</sup>H NMR experiments. The hypothesis of thiosemicarbazone derivatives interact to turn residues of AeSCP-2 (as palmitic acid do) was corroborated by the H-complexes formed between the representative model systems formaldehyde-thiosemicarbazone and the protonated tripeptidic system CH<sub>3</sub>CO–Arg24(H<sup>+</sup>)–Gln25–Val26–NHCH<sub>3</sub>.

## Author contributions

MNR coordinated the first electronic structure calculations and advised AGS on the analysis of the results. JWPE synthesized compounds 1–4, 6–17 and wrote part of the manuscript. ADTO synthesized compound 18. DRM revised the synthetic experimental methodology. ACLL and DJB coordinated the synthesis and spectroscopic characterization of all compounds. FH developed, analyzed, interpreted the NMR spectra and revised the manuscript. KMMJR discussed the electronic structure results and revised the manuscript and JBPS was involved in the electronic structure calculations, comparison between calculated and experimental results

and wrote the manuscript. All authors read and agreed with the final version of this manuscript.

#### Acknowledgments

The authors thank FACEPE/CNPq/PRONEX, FACEPE/PPSUS-2008 and Dengue Institute/CNPq for supporting this work. J.B.P. da Silva thanks CNPq a scholarship for developing part of the computational work in the Prof. Kenneth Merz Jr group at the University of Florida. A.G. da Silva thanks CAPES and J.W.P. Espindola and A.D.T. de Oliveira thank FACEPE for their Ph.D. scholarships.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.03.011>. These data include MOL files and InChIKeys of the most important compounds described in this article.

#### References

- M.B. Nathan, R. Dayal-Drager, M. Guzman, Chapter 1: Epidemiology, Burden of Disease and Transmission, New ed., World Health Organization, *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, 2009, pp. 3–17.
- D.J. Gubler, *Trends in Microbiol.* 10 (2002) 100–103, [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02288-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02288-0).
- D. Normile, *Science* 342 (2013) 415, <http://dx.doi.org/10.1126/science.342.6157.415>.
- J.G. Rigau-Perez, M.K. Lauffer, *Clin. Infect. Dis.* 42 (2006) 1241–1246, <http://dx.doi.org/10.1086/501355>.
- P.V. Effler, L. Pang, P. Kitsutani, V. Vorndam, M. Nakata, T. Ayers, J. Elm, T. Tom, P. Reiter, J.G. Rigau-Perez, J.M. Hayes, K. Mills, M. Napier, G.G. Clark, D.J. Gubler, *Emerg. Infect. Dis.* 11 (2005) 742–749, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1105.041063>.
- J.L. Kyle, E. Harris, *Annu. Rev. Microbiol.* 62 (2008) 71–92, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163005>.
- N.W. Beebe, R.D. Cooper, P. Mottram, A.W. Sweeney, *PLOS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000429>.
- M.J.P. Delgado, J.M. Gutierrez, L.B. Radic, T. Maretic, S. Zekan, T. Avsič-Zupanc, E.S. Aymar, A. Trilla, J.G. Brustenga, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 1329–1330, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.080068>.
- R. Allwinn, *Med. Microbiol. Immunol.* 200 (2011) 155–159, <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-011-0185-2>.
- M.A.V. Melo-Santos, J.J.M. Varjal-Melo, A.P. Araújo, T.C.S. Gomes, M.H.S. Paiva, L.N. Regis, A.F. Furtado, T. Magalhaes, M.L.G. Macoris, M.T.M. Andrighetti, C.F.J. Ayres, *Acta Trop.* 113 (2010) 180–189, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.015>.
- J.A. Suya, D.S. Shepard, M.-S. Chang, M. Caram, S. Hoyer, D. Socheat, N. Chantha, M.B. Nathan, *Trop. Med. Int. Health* 12 (2007) 1026–1036, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01889.x>.
- J.W.P. Espindola, Master Dissertation in Pharmacy Science, Universidade Federal de Pernambuco, 2010.
- J.B.P. da Silva, D.M.A. F. Navarro, A.G. da Silva, G.K.N. Santos, K.A. Dutra, D. R. Moreira, M.N. Ramos, J.W. P. Espindola, A.D.T. de Oliveira, D.J. Brondani, A.C.L. Leite, M.Z. Hernandez, V.R.A. Pereira, L.F. da Rocha, M.C.A.B. de Castro, B.C. de Oliveira, Q. Lan, K.M. Merz Jr., *Eur. J. Med. Chem.*, 2015 (in press).
- C.A. Kunos, T.M. Sherertz, *Front. Oncol.* 4 (2014) 1–5, <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2014.00184>, article 184.
- C. Hansch, P.P. Maloney, T. Fujita, R.M. Muir, *Nature* 194 (1962) 178–180, <http://dx.doi.org/10.1038/194178b0>.
- D.H. Dyer, S. Lovell, J.B. Thoden, H.M. Holden, I. Rayment, Q. Lan, J. Biol. Chem. 278 (2003) 39085–39091, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M306214200>.
- A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652, <http://dx.doi.org/10.1063/1.464913>.
- T. Clark, J. Chandrasekhar, G.W. Spitznagel, P.V.R. Schleyer, *J. Comp. Chem.* 4 (1983) 294–301, <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.540040303>.
- M.J. Frisch, J.A. Pople, J.S. Binkley, *J. Chem. Phys.* 80 (1984) 3265–3269, <http://dx.doi.org/10.1063/1.447079>.
- A. Halkier, W. Klopper, T. Helgaker, P. Jørgensen, P.R. Taylor, *J. Chem. Phys.* 111 (1999) 9157–9167, <http://dx.doi.org/10.1063/1.479830>.
- D.A. McQuarrie, *Statistical Mechanics*, University Science Books, Sausalito, CA, 2000.
- GaussView, Version 5, R. Dennington, T. Keith, J. Millam, Semichem Inc., Shawnee Mission KS, 2009.
- K. Wolinski, J.F. Hilton, P. Pulay, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 8251–8260, <http://dx.doi.org/10.1021/ja00179a005>.
- M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian Inc, Wallingford CT, 2009.
- M.B. Ferrari, S. Capacchi, G. Reffo, G. Pelosi, P. Tarasconi, R. Albertini, S. Pinelli, P. Lungli, *J. Inorg. Biochem.* 81 (2000) 89–97, [http://dx.doi.org/10.1016/S0162-0134\(00\)00087-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0162-0134(00)00087-8).
- I.C. Mendes, L.R. Teixeira, R. Lima, H. Beraldo, N.L. Speziali, D.X. West, *J. Mol. Struct.* 559 (2001) 355–360, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2860\(00\)00729-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2860(00)00729-8).
- H. Beraldo, R. Lima, L.R. Teixeira, A.A. Moura, D.X. West, *J. Mol. Struct.* 559 (2001) 99–106, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2860\(00\)00690-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2860(00)00690-6).
- G.M. Lima, J.L. Neto, H. Beraldo, H.G.L. Siebold, D.J. Duncalf, *J. Mol. Struct.* 604 (2002) 287–291, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2860\(01\)00664-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2860(01)00664-0).
- H.-K. Fun, C.S. Yeap, M. Padaki, S. Malladi, A.M. Isloor, *Acta Cryst. E65* (2009) o1619–o1620, <http://dx.doi.org/10.1107/S1600536809022521>.
- J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. da Silva, M.A. Soares, R.G. dos Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5671–5677, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.021>.
- R.L. Lima, L.R.S. Teixeira, T.M.G. Carneiro, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 10 (1999) 184–188, <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50531999000300005>.
- I.C. Mendes, L.R. Teixeira, R. Lima, T.G. Carneiro, H. Beraldo, *Trans. Met. Chem.* 24 (1999) 655–658, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006918604467>.
- R. Elison, R. Stearns, M. Mutz, C. Brown, B. Browning, D. Harris, S. Qureshi, J. Shieh, *D. World. Com. Chem. High T. Scr.* 8 (2005) 489–498, <http://dx.doi.org/10.2174/1386207054867382>.
- J. Donohue, *J. Mol. Biol.* 45 (1969) 231–235, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90102-8](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(69)90102-8).
- I.Y. Torshin, I.T. Weber, R.W. Harrison, *Protein Eng.* 15 (2002) 359–363, <http://dx.doi.org/10.1093/protein/15.5.359>.
- T. Steiner, W. Saenger, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10146–10154, <http://dx.doi.org/10.1021/ja00052a009>.
- Y. Gu, T. Kar, S. Scheiner, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 9411–9422, <http://dx.doi.org/10.1021/ja991795g>.
- V.R. Pediredi, S. Chatterjee, A. Ranganathan, C.N.R. Rao, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 10867–10868, <http://dx.doi.org/10.1021/ja972289z>.
- T.T. Tran, A.W. Burgess, H. Treutlein, J. Perich, *J. Peptide Res.* 58 (2001) 67–78, <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3011.2001.00898.x>.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicial

João Bosco P. da Silva <sup>a,\*</sup>, Daniela Maria do A.F. Navarro <sup>a,\*</sup>, Aluizio G. da Silva <sup>a</sup>, Geanne K.N. Santos <sup>a</sup>, Kamilla A. Dutra <sup>a</sup>, Diogo Rodrigo Moreira <sup>a,1</sup>, Mozart N. Ramos <sup>a</sup>, José Wanderlan P. Espíndola <sup>b</sup>, Ana Daura T. de Oliveira <sup>b</sup>, Dalci José Brondani <sup>b</sup>, Ana Cristina L. Leite <sup>b</sup>, Marcelo Zaldini Hernandez <sup>b</sup>, Valéria R.A. Pereira <sup>c</sup>, Lucas F. da Rocha <sup>c</sup>, Maria Carolina A.B. de Castro <sup>c</sup>, Beatriz C. de Oliveira <sup>c</sup>, Que Lan <sup>d,3</sup>, Kenneth M. Merz Jr. <sup>e,2</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521, Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 50670-420, Recife, PE, Brazil

<sup>d</sup> Department of Entomology, University of Wisconsin – Madison, 1630 Linden Drive, Madison, WI 53706, USA

<sup>e</sup> Quantum Theory Project, University of Florida, 2234 New Physics Building, Gainesville, PO Box 118435, Florida, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 November 2014

Received in revised form

28 April 2015

Accepted 29 April 2015

Available online 28 May 2015

## Keywords:

*Aedes aegypti*

Larvicide

Thiosemicarbazones

Sterol carrier protein-2

QSAR

Docking

## ABSTRACT

A set of aryl- and phenoxyethyl-(thio)semicarbazones were synthesized, characterized and biologically evaluated against the larvae of *Aedes aegypti* (*A. aegypti*), the vector responsible for diseases like Dengue and Yellow Fever. (QSAR studies were useful for predicting the activities of the compounds not included to create the QSAR model as well as to predict the features of a new compound with improved activity. Docking studies corroborated experimental evidence of AeSCP-2 as a potential target able to explain the larvicidal properties of its compounds. The trend observed between the *in silico* Docking scores and the *in vitro* pLC50 (equals  $-\log$  LC50, at molar concentration) data indicated that the highest larvicidal compounds, or the compounds with the highest values for pLC50, are usually those with the higher docking scores (i.e., greater *in silico* affinity for the AeSCP-2 target). Determination of cytotoxicity for these compounds in mammal cells demonstrated that the top larvicidal compounds are non-toxic.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

A large number of diseases are transmitted by mosquito vectors such as filariasis (*Culex quinquefasciatus*) [1], malaria (*Anopheles gambiae*) [2], West Nile fever (*Aedes albopictus*) [3] and dengue, Chikungunya and yellow fever (*Aedes aegypti*) [4]. These four last diseases are transmitted by a virus.

Nowadays, Dengue Fever (DF) is considered one of the most

rapidly spreading diseases, being disseminated mainly but not limited to tropical and subtropical regions [5]. Since DF correlates with the vector expansion [6], the possibility of occurrence of DF in non-disease-endemic areas like the continental United State (US) cannot be neglected. The epidemics in Puerto Rico in the 1990's [7] and in Hawaii in 2001 [8] support this possibility. The large international mobility throughout the US territory (the so called imported cases) may partially be responsible but the occurrence of DF was related mainly due to the presence of two principal vectors (*A. albopictus* and *A. aegypti*) in southern and central US [9]. For some of the reasons above mentioned, Australia [10], Spain [11] and Germany [12] may also be considered areas of potential risk for DF infection.

Recent estimates of the World Health Organization (WHO) indicate *c.a.* 50–100 million people worldwide are annually infected with dengue and 2.5 billion people (40% of the world population) are at risk in more than 100 countries [13]. Although many

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [paraiso@ufpe.br](mailto:paraiso@ufpe.br) (J.B.P. da Silva), [dmafn@ufpe.br](mailto:dmafn@ufpe.br) (D.M.A.F. Navarro).<sup>1</sup> Present address: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710, Salvador, BA, Brazil.<sup>2</sup> Present address: Institute for Cyber Enabled Research, Department of Chemistry and the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, 578 S. Shaw Lane, East Lansing, MI 48824, USA.<sup>3</sup> In Memoriam.

efforts have been envisaged for developing a vaccine simultaneously for the four dengue virus serotypes (1–4), none are available at the moment [14]. Recently a fifth serotype was reported [15]. This complicates the situation further. Likewise, there are no specific medicines available for treating Dengue-infected patients. The current standard medical treatment is limited to controlling the symptoms of the disease [16,17]. DF has a strong economic impact. For instance, those affected frequently stay out of the productive and/or educational systems for week(s). Sectors like tourism are extremely impacted as well [18,19]. Besides this, during epidemics both public and private health systems are frequently exhausted to the extreme. For instance, according to WHO, 500,000 people are hospitalized annually with a mortality rate c.a. 2.5% [13].

To control Dengue transmission, tools for vector control are necessary, including larvicide use, entomological monitoring, biological control as well as public information campaigns [20,21].

Currently, among the most employed larvicides are the organophosphate temephos and the toxins of the *Bacillus thuringiensis* (*Bti*) var. *israelensis* [22]. Recent studies, have pointed out that the long-term use of temephos is producing *A. aegypti* resistant populations [23–25]. Likewise, new alternatives for low cost production of *Bti* on a large scale [26,27] and the possibility of a mosquito resistant to the *Bti* toxin [28] are relevant concerns that demand further research to discover better larvicides for *A. aegypti*.

An increasing number of publications have recently reported new natural and synthetic larvicides for *A. aegypti*. For instance, in 2011 Neto and co-workers [29] published a review about natural products as larvicides for *A. aegypti*, covering 21 different plants with  $LC_{50}$  values ranging from 0.04 ppm to 100 ppm. Since then, other papers researching chemicals derived from natural products have been published [30–33], but with a range of activity like that of [ref. 29]. On the other hand, studies on a smaller number (in comparison with the number of natural products) of synthetic compounds against *A. aegypti* have appeared in the literature. In this case both Structure-Activity Relationships (SAR) [34] and Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) [35] based on the ligand approach have been developed. Concerning SAR studies, Cavalcanti and co-workers [36–38] reported on the importance of hydrophobicity for improving larvicide activity for *A. aegypti* for a series of monoterpenic and benzoquinonic derivatives. Similar to this, Cantrell and co-workers observed a clear relationship between the larvicide activity against *A. aegypti* and the number of methylenic units in the linear amine substituents attached to both alantolactone and isoalantolactone [39]. In the 2000's, Eng and co-workers reported studies on four different classes of triorganotin complexes as larvicide activity against *A. aegypti* [40–43]. In 2009, Hansch and Verma [44] revisited the Eng's larvicide activities results for three of these triorganotin complexes [41–43] and proposed QSAR models with the hydrophobic ( $\pi_x$ ) and volume ( $MR - molar refractivity$  or  $E_s - Taft's steric$ ) parameters as the most important for describing larvicide activity.

At this point it is important to stress that it is possible to find in the literature other SAR and QSAR studies on the larvicide activity for other mosquitos (e.g. *C. quinquefasciatus* [45–47]) or about the repellence for adult *A. aegypti* [48–51]. They will not be discussed here, however, since they are out of the scope of the present work.

In 2002, Park and co-workers [52] reported on  $LC_{50}$  larvicide activity against *A. aegypti* among four structurally related compounds obtained from the fruits of *Piper nigrum*: pellitorine (0.92 ppm), guineensine (0.89 ppm), pipericide (0.1 ppm), retrofractamide A (0.04 ppm) and the commercial insecticidal piperine (5.10 ppm). The structural comparison of these compounds made it clear that larvicide activity is inversely related to the distance between the 3,4-methylenedioxyphenyl and the isobutylamide groups. Besides, the ability of the isobutylamide moiety to make

hydrogen-bond interactions, probably with some polar amino acid residue in a biological target, may explain the expressive decrease in the larvicide activity in piperine when the isobutylamide is changed by a six-member cyclic amide.

In an attempt to synthesize some amidic compounds, our research group discovered that the corresponding carboxylic acid precursors had a higher larvicide activity against *A. aegypti* than the corresponding amides [53]. As consequence, in 2009, our group reported for the first time on the larvicidal activity against *A. aegypti* larvae of 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl) propionic acids (AOPA) where the presence of electron-withdrawing substituents in the *para* position of the phenyl ring was shown to be important for the larvicide activity [54]. Similar observations about the electronic substituent effect on the phenyl ring were explored through QSAR equations on 1-(2,6-halogenbenzoyl)-5-(4-halogen-phenyl) biuret compounds by Bordas and co-workers for larvicidal activities ( $LC_{50}$ ) against *A. aegypti* larvae [55].

In this work we report our research on the synthesis, characterization, and evaluation of larvicide activity against *A. aegypti* of aryl-semicarbazones (**12**), aryl-thiosemicarbazones (**3–10**) and phenoxy thiosemicarbazones (**12–18**) (Fig. 1).

The choice of these compounds was based on a compromise among four aspects. The first was to recover through the molecular structure two parameters previously reported in the literature as important for larvicide activity against *A. aegypti*, namely hydrophobicity and the ability to form hydrogen bonds with polar head fragments. The second was to use hydrazones, a well-established class of compounds employed in pest control in both agriculture and horticulture [56,57]. Third was to use (thio)semicarbazones, which are hydrazone structural analogs with broad spectra of biological activities [58–62], easily prepared and can be used as intermediates in the synthesis of further heterocyclic compounds with pharmacological potential [63–66]. Fourth, the presence of the spacer unit  $-O-CH_2-CH=$  in the phenoxy-compounds was used to introduce some degree of rotational freedom on the phenyl substituted moiety, improving (as was the case for other biological activities [67]) the chances to modify the larvicide activity.

Another aspect investigated about these compounds was how safe they are for other living systems. Therefore, in a first approach, toxicological tests were developed for a mammal model.

Electronic structure and lipophilicity calculations were used to create a QSAR model for the ligands with a double objective: to analyze the importance of the parameters used to explain the larvicide activity against *A. aegypti* for a training set of molecules; and to explore the predictability of the model. In fact, from this QSAR study, the larvicide activities of three compounds were predicted and evaluated.

After that, in order to improve understanding of how these compounds act on the *A. aegypti*, the affinity profile of two synthesized compounds were evaluated on the *A. aegypti* Sterol Carrier Protein-2 (AeSCP-2, a system believed to be involved in the intracellular transport of cholesterol [68]). These were then compared with the affinity profile of a previous tested inhibitor [69]. Finally, docking studies were performed in order to increase the evidence of this target as the potential receptor for these compounds.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Synthesis

Fig. 1 shows the chemical structure of all compounds investigated in this work. The synthetic procedures employed in preparation of compounds (**1–18**) are shown in Scheme 1 of the experimental section.

Compounds (**1–10**) were prepared by reacting commercially

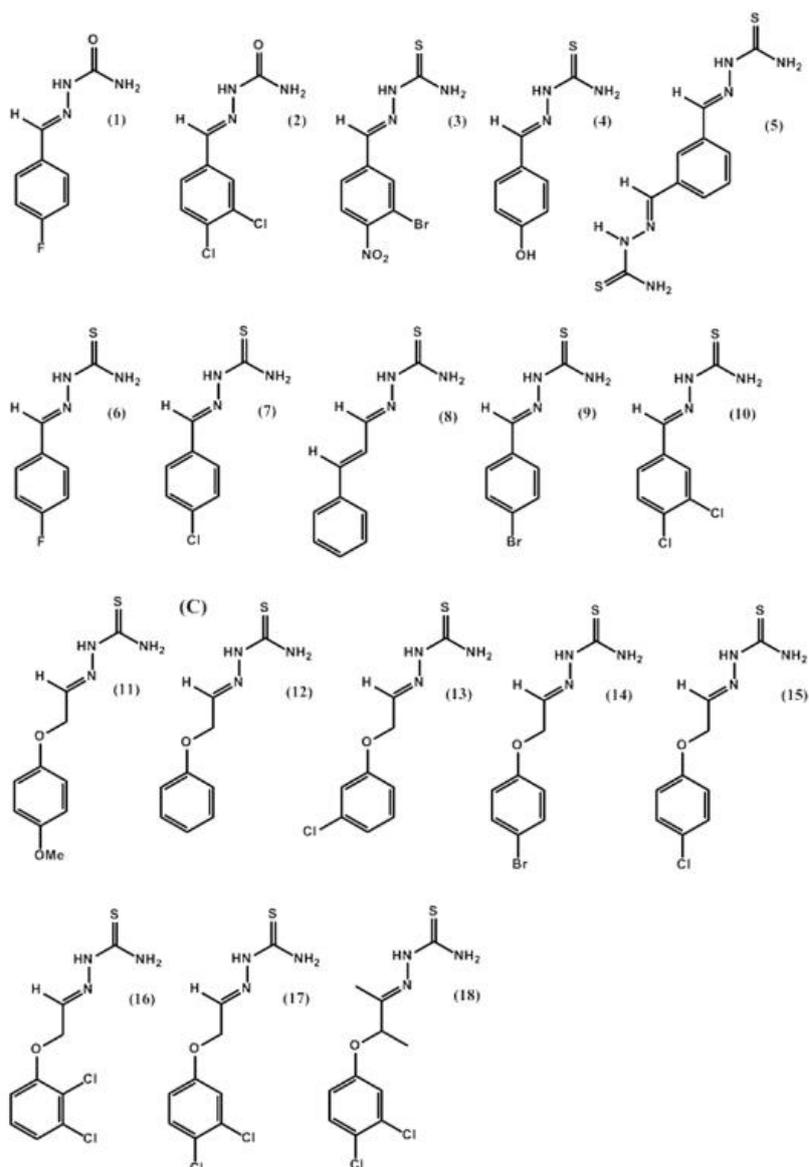
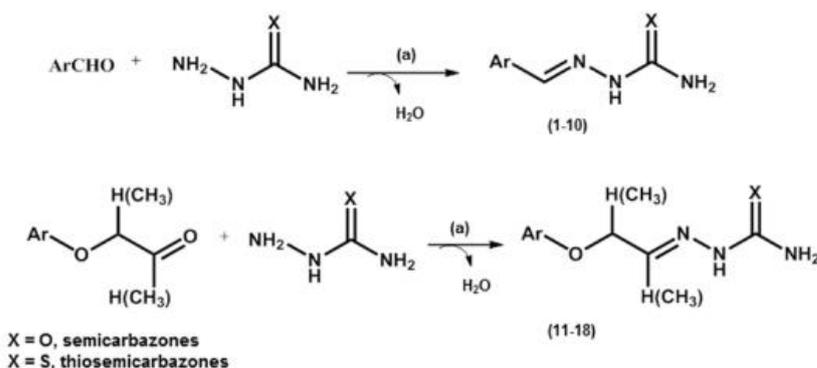


Fig. 1. Structure of the compounds (1–18) tested as larvicide against the L4 stage of *A. aegypti*.

available aryl aldehydes with semicarbazide or thiosemicarbazide. For the synthesis of phenoxymethyl thiosemicarbazones (11–17), the substituted phenolic compound reacted with bromoacetaldehyde diethyl acetal under basic conditions. After hydrolysis of acetal in aldehyde, the respective aldehyde was then reacted with thiosemicarbazide and catalytic HCl in an ultrasound bath at room

temperature. For the synthesis of 18, the substituted phenolic compound reacted with 3-chloro-2-butanone. The resulting  $\beta$ -ketoether was then reacted with thiosemicarbazide, to produce the compound 18.

All compounds (1–18, see Fig. 1) were purified by recrystallization and obtained at an acceptable purity (>95%) in yields



Scheme 1. Synthesis of compounds (1–18). Reagents and conditions: (a) HCl or H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ethanol, room temperature, 2–3 h.

ranging from 40 to 97 %. The structures were determined by NMR, infrared spectroscopy, and high-resolution mass spectrometry.

The compounds investigated were represented as (R; SU; X), where (X) stands for the thio- or semicarbazone group, (R) the substituent at the aryl or phenoxy ring, and (SU) the spacer unit –CH= or –OCH<sub>2</sub>CH= between the X and R groups.

## 2.2. Larvicide activity

The compounds synthesized 1–17 were tested as larvicides against the L4 stage of *A. aegypti*. Tween-80 was selected as the co-solvent because it had the best results for dissolving the compounds in water and because of its low toxicity to larvae, according to the classification of Kramer, Schnell and Nickerson (1983) (LC<sub>50</sub> > 1%) [70]. The obtained LC<sub>50</sub> values for 1–17 are shown in Table 1.

According Chang and co-workers (2003) essential oils or vegetal extracts showing LC<sub>50</sub> between 50 and 100 ppm in larvicide bioassays must be considered as active, while those exhibiting LC<sub>50</sub>

lower than 50 ppm may be considered as highly active [71]. If one uses this reference, compounds 1–5, 11 and 12 should be considered inactive, compounds 6 (LC<sub>50</sub> = 310.8 μmol L<sup>-1</sup>) and 13 (LC<sub>50</sub> = 287.2 μmol L<sup>-1</sup>) should be considered active and compounds 7–10 (LC<sub>50</sub> = 134.8, 138.3, 122.8 and 69.7 μmol L<sup>-1</sup>) and 14–17 (LC<sub>50</sub> = 92.0, 89.9, 70.1 and 20.9 μmol L<sup>-1</sup>) should be considered highly active.

## 2.3. Structure-active relationship (SAR)

The semicarbazone compounds tested (1 and 2) showed low activity (LC<sub>50</sub> > 861.8 μmol L<sup>-1</sup>). When the carbonyl (C=O) was replaced by the thiocarbonyl (C=S) bond, this led to the corresponding bioisoster compounds (6 and 10) to exhibit an improved result LC<sub>50</sub> = 310.8 μmol L<sup>-1</sup> and LC<sub>50</sub> = 69.7 μmol L<sup>-1</sup>, respectively. According to Beraldo, this pattern was previously observed for other pharmacological activities of (thio)semicarbazones [72,73]. This change in larvicide activity indicates a possible change in the magnitude of the intermolecular interactions (e.g. H-bond) with a

Table 1  
Larvicide activity (LC<sub>50</sub>) and cytotoxicity for the synthetic (thio)semicarbazones derivatives (1–17).

Compound (R; SU; X) <sup>a</sup>	Numbering	Conc. range <sup>b</sup> (ppm)	LC <sub>50</sub> (ppm)	LC <sub>50</sub> (μmolL <sup>-1</sup> )	Log(1/LC <sub>50</sub> )	Cytotoxicity <sup>c</sup> (μmolL <sup>-1</sup> )
<i>Aryl-(thio)semicarbazones</i>						
(4-F; CH; O)	1	>200	>200	>1103.9		>55.1
(3,4-diCl; CH; O)	2	>200	>200	>861.8		>431
(3-NO <sub>2</sub> ,4-Br; CH; S)	3	>200	>200	>659.8		>3.29
(4-OH; CH; S)	4	>200	>200	>1024.4		5.12
(5-thiosemicarbazone; CH; S)	5 <sup>d</sup>	>200	>200	>200		N.T. <sup>e</sup>
(4-F; CH; S)	6	50–90	61.3	310.8	3.507	25.4
(4-Cl; CH; S)	7	20–60	28.8	134.8	3.873	23.3
(H; CH=CH; CH; S)	8	28–50	28.4	138.3	3.860	<4.87
(4-Br; CH; S)	9	20–50	31.7	122.8	3.910	<3.87
(3,4-diCl; CH; S)	10	16–20	17.3	69.7	4.157	20.2
<i>Phenoxyethyl-thiosemicarbazones</i>						
(4-OCH <sub>2</sub> ,OCH <sub>2</sub> CH; S)	11	80–160	120.4	503.1	3.298	20.9
(H; OCH <sub>2</sub> CH; S)	12	80–160	112.7	538.5	3.268	119
(3-Cl; OCH <sub>2</sub> CH; S)	13	50–80	70.0	287.2	3.542	103
(4-Br; OCH <sub>2</sub> CH; S)	14	20–40	26.5	92.0	4.036	>347
(4-Cl; OCH <sub>2</sub> CH; S)	15	20–30	21.9	89.9	4.046	103
(2,3-diCl; OCH <sub>2</sub> CH; S)	16	10–30	19.5	70.1	4.154	17.9
(3,4-diCl; OCH <sub>2</sub> CH; S)	17	5–9	5.8	20.9	4.680	89.8

<sup>a</sup> SU means spacer unit, see the text.

<sup>b</sup> The concentration values in ppm are shown just for comparison with previous results published in the literature.

<sup>c</sup> The highest non-toxic concentration on spleen cell of BALB/c mice, saponin (<1.0 μg mL<sup>-1</sup>).

<sup>d</sup> See Fig. 1.

<sup>e</sup> N.T. means not tested.

biological target owing to the chemical change C=O for C=S in the above-mentioned compound. Another plausible hypothesis for explaining this change in the larvicide activity may be related to the higher stability of the thiopeptidic compared to the peptidic environment under attack by proteolytic enzymes [74].

Interesting results come from the comparison of the larvicide activities in compounds containing different spacer units (SU) between the aryl-substituted and the thiosemicarbazone moieties. For instance, the phenoxymethyl-thiosemicarbazone derivatives **15**, **14** and **17** ( $LC_{50} = 89.9$ ,  $92.0$  and  $20.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively) where  $SU = -O-CH_2-CH=$  have a higher activity than the corresponding aryl-thiosemicarbazone derivatives **7**, **9**, and **10** ( $LC_{50} = 134.8$ ,  $122.8$  and  $69.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively) where  $SU = -CH=$ . These results demonstrate the importance of the spacer unit  $-O-CH_2-CH=$  for the compounds with larvicide activity for *A. aegypti*.

The satisfactory results for the activity of the thiosemicarbazones **7**, **9**, **14**, and **15** ( $LC_{50} = 134.8$ ,  $122.8$ ,  $92.0$  and  $89.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively) points out the importance of polarizable halogen substituents at the *para* position for the larvicide activity. On the other hand the thiosemicarbazones with substituents 4-F (**6**,  $LC_{50} = 310.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) and 3-Cl (**13**,  $LC_{50} = 287.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) performed slightly worse. According Hernandez and co-workers [75], bulk and polarizable halogen atoms both may occupy available pockets and interact via a halogen bond at the binding site of biological targets. Thus, the relative smaller activity of **6** may be explained in terms of the smaller atomic radius and polarizability of the substituent fluorine. Introduction of bulk halogen atoms in the *ortho* and *meta* positions tends to create steric hindrances and conformational changes. Perhaps, this also may explain the relatively low activity of **13**. It is interesting to observe that the order of activity for the *para*-substituents in **6**, **7** and **9**, i.e.,  $F < Cl < Br$ , was the same observed for AOPA by Neves Filho and co-workers [54].

The presence of two atoms of chlorine at the *meta* and *para* positions of the aromatic ring led to a significant increase in the larvicide activity (compounds **10** and **17** with  $LC_{50} = 69.7$  and  $20.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively) in comparison to their corresponding mono-chlorine compounds (**7** and **15** with  $LC_{50} = 134.8$  and  $89.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively). In fact, these double-chlorine compounds are the most active thiosemicarbazone derivatives synthesized in this work. Corroborating our results, Bordas and co-worker, studying larvicide activity in a series of biurets, also observed the highest activities for the compound chlorine di-

aldehyde improves larvicide activity [76]. Because of this, a closely related system **8** was synthesized. In fact, this activity was among the most successful ( $LC_{50} = 138.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). However, it is important to note that in **8** the aromatic ring is conjugated not to a carbonyl group, but to an imine function through an allylic system. Since this allylic system favors electron delocalization, an increase in the electronic density is expected to occur on the nitrogen and sulfur atoms with implications for the ability of these atoms to bind with enzyme metallic ions or to interact via H-bond with residues in a biological target [72]. Nitro-compounds are well established bioactive compounds used as antimicrobial, antiparasitic and antitumor agents [77]. The presence of the nitro group ( $-NO_2$ ), however, seems not have contributed to the mortality of *A. aegypti*'s larvae since compound **3** showed a  $LC_{50} > 659.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , whereas compound **9** (that does not contain the nitro group) showed a high activity with  $LC_{50} = 122.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ . One possibility that cannot be neglected is that the nitro group could be bio-reduced to one amino group [78] which, as an electron-donor group, is thought to lessen larvicide activity.

#### 2.4. Cytotoxicity analysis

The evaluation of eventual side effects on non-target organisms from a newly synthesized compound developed for larvicide purposes is essential, even in the beginning steps of the research. In this work the synthesized thiosemicarbazone derivatives were submitted to cytotoxicity assays using BALB/c mice splenocytes (as described in the experimental section) as the model mammal. In the last column of Table 1, the highest non-toxic concentrations against the tested cells are shown. Fortunately, when compared with saponin (the positive control), the 4-Cl-, 4-Br- and 3,4-diCl-phenoxymethyl-thiosemicarbazones (top larvicide compounds) are non-toxic.

#### 2.5. QSAR

B3LYP/6-311++G(d,p) calculations to access geometric, energetic and electronic properties for compounds (**1**–**18**) have been reported by us elsewhere [79]. Table 2 shows the data matrix used to obtain the quantitative structure-activity larvicide relationship (QSAR).

The QSAR model obtained (multiple linear regression) is shown in Eq. (1).

$$\text{Log} \left( \frac{1}{LC_{50}} \right) = 2.490(\pm 0.335) - 0.112(\pm 0.0356)\mu + 0.671(\pm 0.0912)\log P \quad (1)$$

$$n = 10; R = 0.97; R^2 = 0.94; F = 54.61; s = 0.12; p = 0.00005$$

substituted in the *meta*- and *-para* positions [55].

On the other hand, the presence of the electron donor groups *para*-OH (**4**,  $LC_{50} > 1024.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) and *para*-OCH<sub>3</sub> (**11**,  $LC_{50} = 503.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) decreased larvicide activity. This effect is in agreement with results of Simas and co-workers who reported less active phenylpropanoide containing hydroxyl and methoxyl groups in the *para* position on the aromatic ring [76]. The presence of a methoxyl group attached to the *para* position on the aromatic ring did not seem to contribute to the larvicide activity in the works of Neves Filho and co-workers [54] and Bordas and co-workers [55].

It has been reported that the presence of a phenylic ring conjugated to the  $\alpha$  and  $\beta$  unsaturated carbonyl groups in a cyanic

Using this equation, Fig. 2a shows a comparison between predicted and observed larvicide activities. The quality of the adjustment (Eq. (1)) can be visualized in the residue plot as shown in Fig. 2b. As one can see, the predicted and the observed activity values are highly correlated. The quality of this regression can be appreciated, considering the equation parameter deviation, the statistics parameters  $R^2$  and  $F$  as well as the distribution of the points around the zero in the residue plot.

From Equation-1, one can see that the electric dipole moment ( $\mu$ ) and the decimal logarithm of the octanol–water partition coefficient ( $\log P$ ), with negative and positive coefficients,

**Table 2**  
Experimental larvicide activity, gas phase B3LYP/6-311++G(d,p) electronic and lipophilic descriptors for the aryl- and phenoxy-methyl-thiosemicarbazone derivatives.

Numbering	log(1/LC <sub>50</sub> )	μ <sup>a</sup> (D)	ε <sub>HOMO</sub> <sup>a</sup> (eV)	ε <sub>LUMO</sub> <sup>a</sup> (eV)	Δε <sup>a</sup> (eV)	Σq <sub>atoms</sub> <sup>a</sup> (e)	qC <sub>1</sub> <sup>a</sup> (e)	qN <sub>1</sub> <sup>a</sup> (e)	qN <sub>2</sub> <sup>a</sup> (e)	logP <sup>b</sup>	(logP) <sup>2b</sup>
6	3.507	3.702	-6.045	-2.224	3.821	-0.370	0.778	0.192	-0.033	2.180	4.752
7	3.873	3.503	-6.078	-2.336	3.742	-1.050	0.522	0.179	-0.035	2.630	6.917
9	3.910	3.502	-6.084	-2.357	3.727	0.043	1.054	0.227	-0.047	2.870	8.237
10	4.157	3.133	-6.185	-2.507	3.678	-1.681	-0.006	0.179	-0.035	3.270	10.693
11	3.298	5.915	-5.968	-1.589	4.379	-0.565	-0.187	0.082	-0.020	2.090	4.368
12	3.268	4.816	-6.088	-1.634	4.454	-0.675	0.037	0.078	-0.018	2.010	4.040
13	3.542	4.665	-6.159	-1.746	4.413	-0.989	-0.534	0.082	-0.023	2.650	7.023
14	4.036	2.932	-6.168	-1.753	4.414	-0.495	-0.049	0.082	-0.019	2.900	8.410
15	4.046	2.936	-6.164	-1.748	4.417	-1.000	-0.349	0.081	-0.019	2.650	7.023
16	4.154	5.516	-6.108	-1.713	4.395	-1.377	-1.465	0.090	-0.011	3.300	10.890
17	4.680	1.774	-6.212	-1.825	4.387	-1.571	-0.849	0.088	-0.023	3.300	10.890

<sup>a</sup> [Ref.79].

<sup>b</sup> This work.

respectively, are the most important descriptors related to larvicide activity. This linear model indicates that substituents that decrease μ (since it is always ≥0) and/or increase logP will improve the larvicide activity. These equation features match the importance, previously in the literature, of both hydrophobic and electronic parameters for describing larvicide activity against *A. aegypti*.

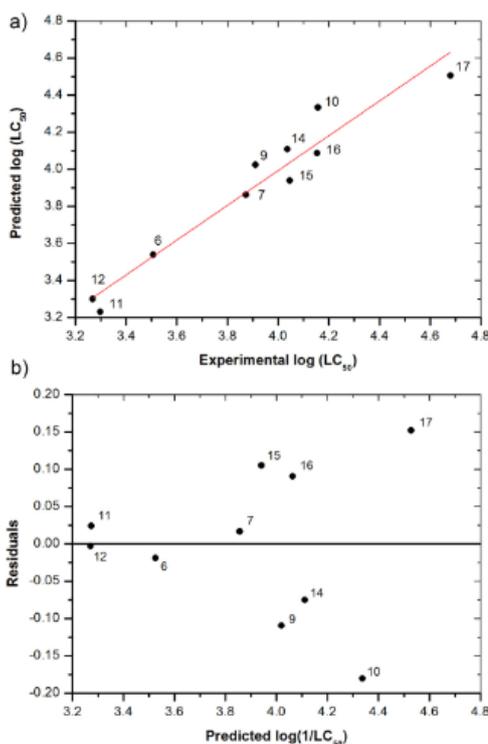
In order to check the QSAR model (Eq. (1)) a compound exhibiting a better activity was predicted. Besides, some compounds

showing intermediate activity and also one of the worst activities (the model must work inside and outside the training set as well as in both directions) were analyzed. The compound with the higher activity, **18**, was purchased from our particular collection of compounds and tested after Equation-1 was obtained. The compound with intermediate activity, **13**, was synthesized and tested at the same time as those used in the training set. However this compound was not used to build the model because it is the only one mono-substituted at the *meta* position. Finally, compound **4**, showing one of the worst results among the compounds shown in Table 1, was analyzed in light of that QSAR equation. The calculated electric dipole moment, logP, and the predicted and observed LC<sub>50</sub> values of these compounds are shown in Table 3.

The data in this table show that Equation-1 succeeded in predicting correctly the best larvicide activity for **18** and the intermediate larvicide activity for **13**. The cytotoxicity of **18** was evaluated in 16.33 μmol L<sup>-1</sup>, leading to a ratio (Cytotoxicity/LC<sub>50</sub>) equal to 4.1. It is interesting to stress that we stopped determining the experimental LC<sub>50</sub> for compound **4** after the concentration of 1024 μmol L<sup>-1</sup>. That decision is adequately supported by Equation-1 since the LC<sub>50</sub> for the compound **4** is predicted at 6434 μmol L<sup>-1</sup>.

## 2.6. Action mode

In the attempt to improve our comprehension about how the synthesized compounds lead to larvae death in the L4 stage, the *A. aegypti* sterol carrier protein-2 (AeSCP-2) inhibition was tested. Since mosquitoes depend on exogenous sources of cholesterol for biosynthesis of steroid derivatives, it is not surprising to find the high expression of AeSCP-2 in the larvae midgut during the feeding stage [80]. Therefore, compounds that can inhibit this protein have a high potential for becoming useful tool for vector control. In 2003, Lan and co-workers published a high resolution X-ray structure of palmitic acid (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>COOH) co-crystallized into AeSCP-2 [81]. These authors found that the polar head of the palmitic acid makes an H-bond interaction with the side chain of the Arg24 residue, whereas the methylene moiety is in a bent conformation inside a hydrophobic pocket. Taking into account the structural features of palmitic acid for binding AeSCP-2, two aspects require attention. First, the side chain of Arg (-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>) has an imidurea group at the end portion which is functionally very similar to the (thio)semicarbazone portion of compounds **1–17**. Second, the twisted disposition of the phenoxy-methyl group relative to the thiosemicarbazone moiety resembles the bent conformation of the fatty portion relative to the carboxylic head of the palmitic acid co-crystallized into AeSCP-2. Because of this, we tested two synthesized thiosemicarbazone derivatives, **4** and **11**, as AeSCP-2 inhibitors (SCPIs) and compared them to a previous tested



**Fig. 2.** QSAR plots: a) Predicted versus experimental activities and b) residual predicted activity.

**Table 3**

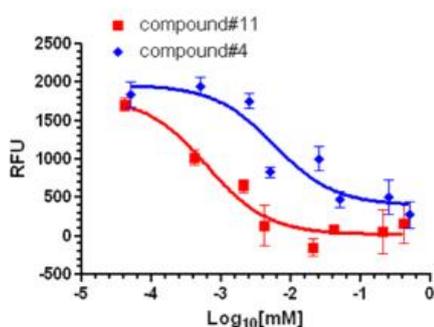
Calculated B3LYP/6-311++G(d,p) electric dipole moment and Log P values and predicted (using equation-1) and experimental  $\text{Log}(1/\text{LC}_{50})$  for the thiosemicarbazone derivatives **4**, **13** and **18**.

Compound (R; SU; X)	Numbering	$\mu^e$ (D)	logP	$\text{LC}_{50}$ (pred.) ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$\text{LC}_{50}$ (exp.) ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
(3,4-diCl; OCH(CH <sub>3</sub> )CCH <sub>3</sub> ;S)	<b>18</b>	3.31	4.87	4.10	3.95
(3-Cl; OCH <sub>2</sub> CH; S)	<b>13</b>	4.66	2.650	179.38	287.2
(4-OH; CH; S)	<b>4</b>	6.02	0.56	6434.0	>1024.4

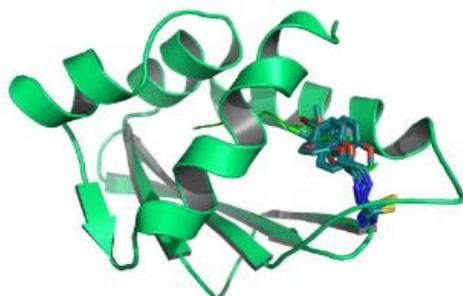
<sup>a</sup> [Ref.79].

compound, SCPI-1 [69] (see Fig. 3).

Fig. 3 shows that the competitive binding of compounds **4** and **11** to rAeSCP-2 had a similar dose–response curve as that of the SCPI-1 [69]. The 50% effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) of inhibiting NBD-cholesterol binding to AeSCP-2 was 5.0 (95% Confidence Interval = 2.0–17.0) and 0.6 (95% Confidence Interval = 0.3–1.4)  $\mu\text{M}$  for compounds **4** and **11**, respectively. The  $\text{EC}_{50}$  of compounds **4** and **11** are within the range of identified SCPIs [69]. SCPIs have been shown to suppress dietary cholesterol uptake in both *A. aegypti* [82] and in the tobacco hornworm [83]. Therefore, the likely mode of action of compounds **4** and **11** was the suppression of dietary cholesterol uptake in treated *A. aegypti* larvae. Although Fig. 3 was fitted to the inhibition of SCP-2 whereas the response function on



**Fig. 3.** Dose-response curve of inhibition of NBD-cholesterol binding to rAeSCP-2 protein for the thiosemicarbazones tested (4 and 11). RFU = Relative Fluorescent Unit; Fluorescent intensity of (NBD-cholesterol/SCP-2)/compound fluorescent intensity of (NBD-cholesterol/compound). Vertical Bar stands for one standard deviation.

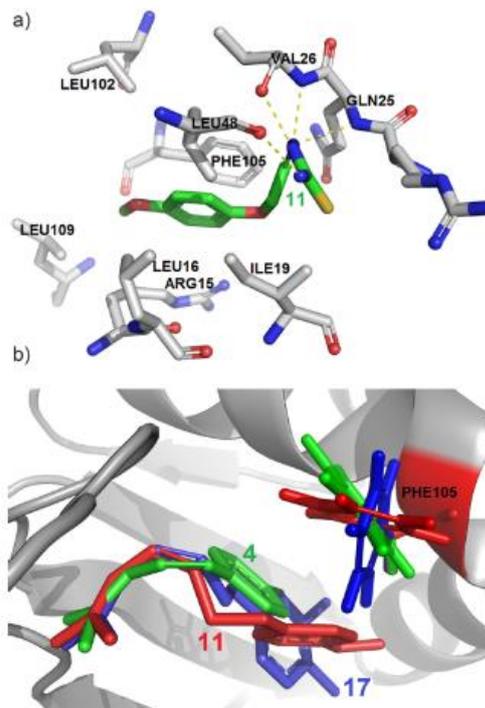


**Fig. 4.** Palmitic acid (green) and thiosemicarbazone superimposed structures docked on the AeSCP-2 target. (PDB: 1PZ4 <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1pz4/pdb>). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the QSAR model measured the capacity of whole larvae to die (therefore they are conceptually different things), the higher hydrophobicity of **11** ( $\text{logP}_{\text{calc}} = 2.09$ , Table 2) compared to **4** ( $\text{logP}_{\text{calc}} = 0.56$ , Table 3) matches the higher inhibitory activity of **11** compared to **4**.

## 2.7. Docking studies

In order to improve our comprehension about how the (thio) semicarbazone derivatives interact with SCP-2, we conducted a docking study using as a binding site the palmitic acid contact residues in SCP-2. Fig. 4 shows the superimposition of the best docking solutions obtained for compounds **4**, **11**, **14**, **15**, **16**, **17** on the



**Fig. 5.** Intermolecular interactions between: a) **11** and hydrophilic and hydrophobic residues of AeSCP-2 and b) aromatic rings of **4**, **11** and **17** and the hydrophobic residue Phe105 of AeSCP-2. Dashed lines represent polar interactions, particularly hydrogen bonds with the ligand. The other residues are involved in hydrophobic interactions with the ligand (**11**), and the residue PHE105 seems to engage in a  $\pi$ – $\pi$  stacking interaction with the aromatic ring of the ligand. Other parts of the target are not shown for clarity reasons.

structure of the AeSCP-2 target. The Docking score values for molecules **4**, **11**, **14**, **15**, **16** and **17** are, respectively, 63.5, 64.9, 67.0, 65.3, 69.0 and 70.8.

In order to elucidate the binding mode of these molecules into AeSCP-2, an investigation of the intermolecular interactions was conducted. One can see in Fig. 5a the important residues mainly involved in the interactions between AeSCP-2 and molecule **11**. Fig. 5a provides a clear illustration of the binding pattern.

It is important to emphasize an important  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction that was found between the side-chain ring of the PHE105 residue and practically all the ligands investigated. Three examples can be seen in Fig. 5b, particularly for molecules **4**, **11** and **17**. The Docking protocol considered the active flexibility of residue PHE105 and other nine residues during the calculations. Fig. 5b shows the alternative conformations adopted by PHE105 in order to establish and stabilize the  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction with the respective ligand, searching for a maximum of planarity between the two aromatic rings (PHE105 and ligand). Every other molecule studied binds to AeSCP-2 in a very similar way, in comparison to molecule **11**, as one can see in the panoramic view of all the Docking solutions presented in Fig. 4. Furthermore, the important residues of AeSCP-2 involved in interactions (polar and hydrophobic) with the docked ligands are practically the same residues involved in the interaction with palmitic acid (ARG24, GLN25, LEU102 and PHE105) in the X-Ray structure, demonstrating that the choice of the flexible side chains for the Docking calculations was pertinent.

Finally, in order to compare the *in silico* results against larvicidal activities, the LC50 values were first converted into pLC50 (equals  $-\log$  LC50, at molar concentration). The plot on Fig. 6 shows the trend observed between the *in silico* Docking scores and the pLC50 data. This indicates that most of the larvicidal compounds (those with the highest values for pLC50) are usually those with the higher docking scores, demonstrating that the molecules with more stable or positive Docking scores (i.e., greater *in silico* affinity for the AeSCP-2 target) are also the most active larvicidal compounds (i.e., greater pLC50 values). This kind of trend between *in vitro* and *in silico* data, showing the corroboration among experimental and theoretical results, was also found in other studies undertaken by our group [84–86].

Additionally, the *in vitro* values (EC50) for the inhibition of NBD-cholesterol binding to rAeSCP-2 protein (see Fig. 3), available for molecules **4** and **11**, are  $5.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $0.6 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively. These results also corroborate with the Docking score values for the same two molecules in the AeSCP-2 target, which are 63.5 e 64.9, respectively. Between these two compounds, molecule **11** presents the highest *in vitro* inhibition potency, and has also the greater *in*

*in silico* affinity (high Docking score) for the AeSCP-2 target, by showing a trend among *in silico* and *in vitro* results, indicating that the molecules with more stable or positive Docking scores (i.e., greater *in silico* affinity for the AeSCP-2 target) are also the most active larvicidal compounds (i.e., greater *in vitro* pLC50 values).

### 3. Conclusion

Seventeen compounds belonging to the two classes of aryl-(thio)semicarbazone and phenoxy-methyl-thiosemicarbazones derivatives were synthesized and tested against the L4 stage for *A. aegypti*. In general thiosemicarbazone exhibited an improved larvicide activity compared to the corresponding semicarbazone compounds. For the thiosemicarbazones, those with the phenoxy-methyl group showed a higher larvicide activity. As desirable, the subset formed by eleven aryl- and phenoxy-methyl-thiosemicarbazone derivatives showed a large variance of larvicide activity, with the LC<sub>50</sub> ranging from  $21 \mu\text{mol L}^{-1}$  to  $311 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A QSAR equation from the LC<sub>50</sub> against the electric dipole moment ( $\mu$ ) and the logarithm of the partition coefficient ( $\log P$ ) was obtained using the multiple linear regression technique. Using this equation we were doubly successful. First, in predicting the larvicide activity of two compounds not used to create the model, with the more active one, **18**, at  $4.1 \mu\text{M}$ . Second, it was possible to explain why deciding to stop the analysis on the experimental LC<sub>50</sub> for the compound **4** was correct - the predicted LC<sub>50</sub>  $6434 \mu\text{mol L}^{-1}$ , is too high. The dose-response profile observed for the compounds **4** and **11** on the inhibition of AeSCP-2 are supported by the QSAR model. The docking calculations corroborate the hypothesis of the (thio)semicarbazone derivatives acting through the inhibition of the AeSCP-2 target.

### 4. Experimental

#### 4.1. General chemistry

The arylhydrazones (**1–10**) were prepared essentially as reported previously [87,88] from commercially available aldehydes. Only compound (**3**) a nitro aryl-thiosemicarbazone, the corresponding start aldehyde was obtained by reaction between 4-bromobenzaldehyde and nitric acid. Compound (**5**), bis-thiosemicarbazone derivative, was prepared using 2 mols of thiosemicarbazide for the 1,3-dicarbonyl aldehyde. These reactions proceeded well upon refluxing (3–5 h) with ethanol as a solvent, a rate of 65–97% being observed overall.

For the synthesis of phenoxy-methyl-thiosemicarbazones derivatives (**11–17**), the aldehydes were obtained from different phenols. The step process involved ether formation and acid hydrolysis of the acetal intermediary with moderate yields (36–56%). To accomplish the synthesis of 3-phenoxybutan-2-ones derivatives (**18–20**), start 3-phenoxybutan-2-ones intermediates were obtained by a reaction between 4-*tert*-butylphenol and 3-chloro-2-butanone using potassium carbonate and potassium iodide (Scheme 1).

Reagents were purchased from Acros Organics, Fluka, Sigma-Aldrich or Vetec and solvents from Vetec or Dinâmica. The deuterated solvents (DMSO-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O) were supplied from CIL (Tédia Brazil). The reactions were monitored in thin layer chromatography (TLC) using silica gel 60 containing a fluorescent indicator F254. The chromatographic plates were visualized under UV light (at dual wavelength 365 or 254 nm). Melting points were measured using a Thomas Hoover capillary instrument and the values were not subsequently corrected. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR were performed for all compounds, DEPT analysis as well as the addition of D<sub>2</sub>O for locating NH signals in the <sup>1</sup>H NMR were determined. The

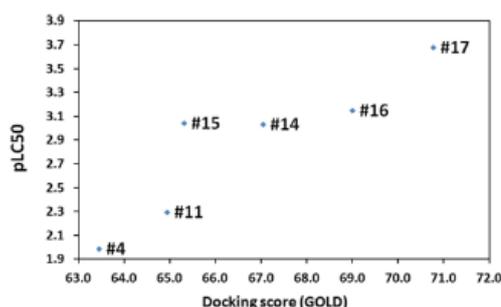


Fig. 6. Experimental (*in vitro*) larvicidal activity of thiosemicarbazone derivatives versus the Docking score (*in silico*) for these compounds in AeSCP-2.

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were obtained using Unity Plus model Varian instruments (400 MHz for  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  for 100 MHz) or Bruker AMX (300 MHz–75.5 MHz for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ), using tetramethylsilane as the internal standard. The number of signals in the  $^1\text{H}$  NMR spectra was designated as follows: s/singlet; d doublet, t/triplet, dd/double doublet, q/quartet, m/multiplet. Infrared spectroscopy was performed with a Bruker instrument (model IFS 66) using KBr pellets. The Elemental Analysis was performed with a Carlo Erba instrument model E-1110 or Perkin Elmer 2400 seriesii. High-resolution electrospray ionization mass spectra (HRESIMS) were acquired on a nanoUPLC-Xevo G2 Tof (Waters) in the positive ionization mode.

#### 4.2. Synthesis of compounds (1–10). Example for compound (1)

In a round bottom flask for 100 mL, 4-fluorobenzaldehyde (2.5 mmol) was dissolved in ethanol (15 mL), then HCl (03 drops) were added to the reaction at room temperature. Semicarbazide hydrochloride (2.5 mmol) was added and the mixture was maintained under magnetic stirring for 3 h at room temperature. After this time, the mixture was cooled at 0 °C and the precipitate was filtered in a Büchner funnel with a sintered disc filter, washed with cold water, *n*-hexane and then dried over  $\text{SiO}_2$ . Compounds were recrystallized in hot ethanol, to provide compounds with acceptable purity.

##### 4.2.1. 4-Fluorobenzaldehyde semicarbazone (1)

Colorless crystals, yield = 84%; mp (°C): 230–232; IR (KBr): 3463 and 3275 ( $\text{NH}_2$ ), 3064 (NH), 1708 (C=O), 1591 (C=N)  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  6.51 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.20 (m, 2H, Ar–H), 7.77 (m, 2H, Ar–H), 7.82 (s, 1H, CH=N), 10.24 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz, ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  164.1 (C Ar), 156.8 (C=O), 138.1 (CH=N), 131.4 (C Ar), 128.6 (CH Ar), 115.5 (CH Ar). Anal. Calcd for  $\text{C}_8\text{H}_8\text{FN}_3\text{O}$ : C, 53.04; H, 4.45; N, 23.19; Found: C, 53.06; H 4.56; N 22.39. HRESIMS  $m/z$ : 180.0590 [M–H] $^+$ .

##### 4.2.2. 3,4-Dichlorobenzaldehyde semicarbazone (2)

Colorless crystals, yield = 88%; mp (°C): 246–249; IR (KBr): 3465 and 3279 ( $\text{NH}_2$ ), 3155 (NH), 1700 (C=O), 1588 (C=N)  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  6.66 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.61 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Ar–H), 7.66 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Ar–H), 7.78 (s, 1H, Ar–H), 8.12 (s, 1H, CH=N), 10.42 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz, ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  156.6 (C=O), 136.4 (CH=N), 135.7 (C Ar), 131.6 (C Ar), 130.9 (C Ar), 130.6 (CH Ar), 127.6 (CH Ar), 126.8 (CH Ar). Anal. Calcd for  $\text{C}_8\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$ : C, 41.41; H, 3.04; N, 18.11; Found: C, 41.61; H, 3.23; N, 17.48. HRESIMS  $m/z$ : 231.9981 [M] $^+$ .

##### 4.2.3. 4-Bromo-3-nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone (3)

Yellowish crystals, yield = 83%; mp (°C): 238–240; IR (KBr): 3417 and 3258 ( $\text{NH}_2$ ), 3156 (NH), 1519 (C=N)  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7.91 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, Ar–H), 7.93 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, Ar–H), 8.04 (s, 1H, CH=N), 8.28 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 8.34 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 8.56 (s, 1H, Ar–H), 11.65 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz, ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  178.3 (C=S), 150.4 (C Ar), 138.5 (CH=N), 135.6 (C Ar), 134.6 (CH Ar), 131.9 (CH Ar), 122.4 (CH Ar), 112.9 (C Ar). Anal. Calcd for  $\text{C}_8\text{H}_7\text{BrN}_4\text{O}_2\text{S}$ : C, 31.70; H, 2.33; N, 18.48; Found: C, 30.29; H, 2.30; N, 16.76. HRESIMS  $m/z$ : 303.9576 [M+H] $^+$ .

##### 4.2.4. 4-Hydroxybenzaldehyde thiosemicarbazone (4)

Brownish crystal, yield = 84%; mp (°C): 221–223; IR (KBr): 3467 and 3359 ( $\text{NH}_2$ ), 3129 (NH), 1509 (C=N)  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  6.77 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, Ar–H), 7.60 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, Ar–H), 7.84 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 7.94 (s, 1H, CH=N), 8.07 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 9.90 (s, 1H, OH), 11.25 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz, ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  177.4 (C=S), 159.2 (C Ar), 142.7 (CH=N), 129.0 (CH Ar), 125.1 (C

Ar), 115.5 (CH Ar). Anal. Calcd for  $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{OS}$ : C, 49.22; H, 4.65; N, 21.52; Found: C, 49.20; H, 4.68; N, 20.61. HRESIMS  $m/z$ : 194.0405 [M–H] $^+$ .

##### 4.2.5. 2,2'-(1,3-Phenylenebis(methanylylidene)) bis(thiosemicarbazide) (5)

Colorless crystals, yield = 65%; mp (°C): 255–258; IR (KBr): 3423 and 3235 ( $\text{NH}_2$ ), 3148 (NH), 1524 (C=N)  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7.42 (t, 1H,  $J = 7.7$  Hz, Ar–H), 7.79 (d, 2H,  $J = 7.7$  Hz, Ar–H), 8.05 (s, 2H, CH=N), 8.10 (s broad, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 8.22 (s, 1H, Ar–H), 8.26 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 11.55 (s, 2H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz, ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  178.0 (C=S), 141.6 (CH=N), 134.7 (C Ar), 128.9 (CH Ar), 128.6 (CH Ar), 125.4 (CH Ar). Anal. Calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{S}_2$ : C, 42.84; H, 4.31; N, 29.98; Found: C, 36.38; H, 5.11; N, 23.68. HRESIMS  $m/z$ : 281.0589 [M+H] $^+$ .

##### 4.2.6. 4-Fluorobenzaldehyde thiosemicarbazone (6)

Beige crystals, yield = 97%; mp (°C): 189–191; IR (KBr): 3391 and 3235 ( $\text{NH}_2$ ), 3156 (NH), 1533 (C=N)  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7.23 (m, 2H, Ar–H), 7.87 (m, 2H, Ar–H), 8.02 (s, 1H, CH=N), 8.03 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 8.20 (s d, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 11.43 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz, ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  177.9 (C=S), 164.6 (C Ar), 141.0 (CH=N), 130.8 (C Ar), 129.4 (CH Ar), 115.7 (CH Ar). Anal. Calcd for  $\text{C}_8\text{H}_8\text{FN}_3\text{S}$ : C, 48.72; H, 4.09; N, 21.31; Found: C, 47.90; H, 4.21; N, 20.08. HRESIMS  $m/z$ : 198.0450 [M+H] $^+$ .

##### 4.2.7. 4-Chlorobenzaldehyde thiosemicarbazone (7)

Colorless crystals, yield: 77%; mp (°C): 217–220; IR (KBr): 3435 and 3279 ( $\text{NH}_2$ ), 3164 (NH), 1523 (C=N)  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7.45 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, Ar–H), 7.83 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, Ar–H), 8.01 (s, 1H, CH=N), 8.08 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 8.25 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 11.49 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz, ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  178.0 (C=S), 140.8 (CH=N), 134.2 (C Ar), 133.1 (C Ar), 128.9 (CH Ar), 128.6 (CH Ar). Anal. Calcd for  $\text{C}_8\text{H}_8\text{ClN}_3\text{S}$ : C, 44.97; H, 3.77; N, 19.67; Found: C, 45.30; H, 3.96; N, 19.12. HRESIMS  $m/z$ : 214.0140 [M+H] $^+$ .

##### 4.2.8. 2-(3-Phenylallylidene)thiosemicarbazide (8)

Yellowish crystals, yield = 90%; mp (°C): 110–113. IR (KBr): 3418 and 3260 ( $\text{NH}_2$ ), 3155 (NH), 1537 (C=N)  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  6.86 (dd, 1H,  $J = 8.9$  Hz;  $J = 15.8$  Hz, CH=CH), 7.02 (d, 1H,  $J = 15.89$  Hz, CH=CH), 7.43–7.24 (m, 3H, Ar–H), 7.55 (d, 2H,  $J = 7.79$  Hz, Ar–H), 7.61 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 7.89 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, CH=N), 8.17 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 11.40 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz, ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  177.6 (C=S), 144.7 (CH=N), 138.8 (CH=N), 135.8 (C Ar), 128.8 (CH Ar), 126.9 (CH Ar), 125.0 (CH Ar). Anal. Calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$ : C, 58.51; H, 5.40; N, 20.47; Found: C, 53.93; H, 6.20; N, 17.65. HRESIMS  $m/z$ : 206.0749 [M+H] $^+$ .

##### 4.2.9. 4-Bromobenzaldehyde thiosemicarbazone (9)

Beige crystals, yield = 82%; mp (°C): 209–211. IR (KBr): 3436 and 3287 ( $\text{NH}_2$ ), 3165 (NH), 1522 (C=N)  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7.58 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, Ar–H), 7.76 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz, Ar–H), 8.00 (s, 1H, CH=N), 8.08 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 8.24 (s broad, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 11.49 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz, ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  178.1 (C=S), 140.9 (CH=N), 134.5 (C Ar), 131.5 (CH Ar), 129.1 (CH Ar), 122.9 (C Ar). Anal. Calcd for  $\text{C}_8\text{H}_8\text{BrN}_3\text{S}$ : C, 37.22; H, 3.12; N, 16.28; Found: C, 37.32; H, 3.24; N, 15.78. HRESIMS  $m/z$ : 259.9630 [M+H] $^+$ .

##### 4.2.10. 3,4-Dichlorobenzaldehyde thiosemicarbazone (10)

White crystals, yield = 62%; mp (°C): 212–215. IR (KBr): 3396 and 3255 ( $\text{NH}_2$ ), 3154 (NH), 1539 (C=N)  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7.63 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz, Ar–H), 7.71 (dd, 1H,  $J = 1.7$  Hz,  $J = 8.3$  Hz, Ar–H), 7.98 (s, 1H, CH=N), 8.24 (d, 1H,  $J = 1.7$  Hz, Ar–H), 8.27 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 8.30 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 11.57 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz, ppm,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  178.2 (C=S), 139.3 (CH=N), 135.0 (C

Ar), 131.8 (C Ar), 131.7 (C Ar), 130.7 (CH Ar), 128.1 (CH Ar), 127.7 (CH Ar). Anal. Calcd for  $C_9H_7Cl_2N_3S$ : C, 38.73; H, 2.84; N, 16.94; Found: C, 39.09; H, 3.03; N, 16.41. HRESIMS  $m/z$ : 247.9636  $[M-H]^+$ .

#### 4.3. Synthesis of compounds (11–17). Example for compound (11)

In a round bottom flask, phenol (3.1 mmol), 5 mL DMF and  $K_2CO_3$  (7.8 mmol) were added together. The reaction mixture was maintained under magnetic stirring at room temperature for 30 min. Then, bromoacetaldehyde diethylacetal (9.3 mmol) was added in portions and the reaction mixture was heated under reflux for 72 h. After that, the product was extracted with dichloromethane and the solvent was removed under reduced pressure and dried in  $SiO_2$ . The hydrolysis of acetal in aldehyde was achieved by adding acetone (5 mL),  $H_2SO_4$  (7 drops) and 10 mL water. The reaction mixture was stirred under reflux heating for 4 h. The product was extracted with ethyl acetate and the solvent was removed under reduced pressure and then dried in  $SiO_2$ . The aldehyde obtained was reacted with thiosemicarbazide as described above. Products were purified by recrystallization using ethanol/water (1:1).

##### 4.3.1. 2-(4-Methoxyphenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (11)

Brownish crystals, yield = 56%; mp (°C): 145–147; IR (KBr): 3372 and 3279 ( $NH_2$ ), 3174 (NH), 1509 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  3.68 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 4.59 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.88 (m, 4H, Ar–H), 7.51 (s, 1H,  $CH=N$ ), 7.68 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.17 (s, 1H,  $NH_2$ ), 11.33 (s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  55.3 ( $CH_3$ ), 67.3 ( $CH_2$ ), 114.6 (CH Ar), 115.7 (CH Ar), 141.4 ( $CH=N$ ), 151.8 (C Ar), 153.73 (C Ar), 178.3 ( $C=S$ ). Anal. Calcd. For  $C_{10}H_{13}N_3O_2S$ : C, 50.19; H, 5.48; N, 17.56; Found: C, 50.03; H, 5.28; N, 17.34. HRESIMS  $m/z$ : 240.3020  $[M+H]^+$ .

##### 4.3.2. 2-Phenoxyacetaldehyde thiosemicarbazone (12)

White crystals, yield = 40%; mp (°C): 142–143; IR (KBr): 3449 and 3323 ( $NH_2$ ), 3158 (NH), 1536 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  4.67 (d, 2H,  $J = 5.2$  Hz,  $CH_2$ ), 6.95 (t, 1H,  $J = 7.5$  Hz, Ar–H), 6.98 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz, Ar–H), 7.29 (dd, 2H,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 8.4$  Hz, Ar–H), 7.53 (t, 1H,  $J = 5.2$  Hz  $CH=N$ ), 7.68 (s broad, 1H,  $NH_2$ ), 8.18 (s broad, 1H,  $NH_2$ ), 11.35 (s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  66.7 ( $CH_2$ ), 114.6 (CH Ar), 121.0 (CH Ar), 129.5 (CH Ar), 141.0 ( $CH=N$ ), 157.8 (C Ar), 178.3 ( $C=S$ ). Anal. Calcd. For  $C_9H_9N_3OS$ : C, 51.66; H, 5.30; N, 20.08; Found: C, 51.58; H, 5.08; N, 19.76. HRESIMS  $m/z$ : 210.0621  $[M+H]^+$ .

##### 4.3.3. 2-(3-Chlorophenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (13)

Beige crystals, yield = 40%; mp (°C): 147–149; IR (KBr): 3406 and 3239 ( $NH_2$ ), 3156 (NH), 1513 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  4.69 (s, 2H,  $CH_2$ ), 7.08–6.85 (m, 3H, Ar–H), 7.31 (s, 1H, Ar–H), 7.50 (s, 1H,  $CH=N$ ), 7.69 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.20 (s, 1H,  $NH_2$ ), 11.37 (s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  67.1 ( $CH_2$ ), 113.7 (CH Ar), 114.8 (CH Ar), 121.0 (CH Ar), 130.9 (CH Ar), 133.7 (C Ar), 140.4 ( $CH=N$ ), 158.8 (C Ar), 178.4 ( $C=S$ ). Anal. Calcd. For  $C_9H_9ClN_3OS$ : C, 44.36; H, 4.14; N, 17.24; Found: C, 43.99; H, 4.04; N, 16.82. HRESIMS  $m/z$ : 244.0229  $[M+H]^+$ .

##### 4.3.4. 2-(4-Bromophenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (14)

White crystals, yield = 45%; mp (°C): 166–168; IR (KBr): 3388 and 3261 ( $NH_2$ ), 3154 (NH), 1536 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  4.66 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.97 (s, 2H, Ar–H), 7.46 (s, 2H, Ar–H), 7.50 (s, 1H,  $CH=N$ ), 7.69 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.21 (s, 1H,  $NH_2$ ), 11.37 (s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  67.0 ( $CH_2$ ), 112.4 (C Ar), 117.0 (CH Ar), 132.1 (CH Ar), 140.4 ( $CH=N$ ), 157.1 (C Ar), 178.3 ( $C=S$ ). Anal. Calcd. For  $C_9H_9BrN_3OS$ : C, 37.51; H, 3.50; N, 14.58; Found: C, 37.22; H, 3.76; N, 14.23. HRESIMS  $m/z$ : 288.2792  $[M]^+$ .

##### 4.3.5. 2-(4-Chlorophenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (15)

Beige crystals, yield = 52%; mp (°C): 178–181; IR (KBr): 3402 and 3273 ( $NH_2$ ), 3152 (NH), 1532 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  4.59 (s broad, 2H,  $CH_2$ ), 7.01 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz, Ar–H), 7.33 (d, 2H,  $J = 8.7$  Hz, Ar–H), 7.50 (s, 1H,  $CH=N$ ), 7.69 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.19 (s, 1H,  $NH_2$ ), 11.36 (s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  67.1 ( $CH_2$ ), 116.5 (CH Ar), 124.8 (C Ar), 129.3 (CH Ar), 140.5 ( $CH=N$ ), 156.7 (C Ar), 178.4 ( $C=S$ ). Anal. Calcd. For  $C_9H_9ClN_3OS$ : C, 44.36; H, 4.14; N, 17.24; Found: C, 44.26; H, 3.98; N, 16.71. HRESIMS  $m/z$ : 244.0230  $[M+H]^+$ .

##### 4.3.6. 2-(2,3-Dichlorophenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (16)

Beige crystals, yield = 40%; mp (°C): 189–192; IR (KBr): 3430 and 3251 ( $NH_2$ ), 3156 (NH), 1545 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  4.80 (s, 2H,  $CH_2$ ), 7.45–7.00 (m, 3H, Ar–H), 7.53 (s, 1H,  $CH=N$ ), 7.71 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.23 (s, 1H,  $NH_2$ ), 11.41 (s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  68.3 ( $CH_2$ ), 112.8 (CH Ar), 120.1 (C Ar), 122.6 (CH Ar), 128.5 (CH Ar), 132.4 (C Ar), 139.7 ( $CH=N$ ), 154.7 (C Ar), 178.5 ( $C=S$ ). Anal. Calcd. For  $C_9H_8Cl_2N_3OS$ : C, 38.86; H, 3.26; N, 15.11; Found: C, 38.49; H, 3.44; N, 14.83. HRESIMS  $m/z$ : 277.9840  $[M]^+$ .

##### 4.3.7. 2-(3,4-Dichlorophenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (17)

White crystals, yield = 56%; mp (°C): 169–172; IR (KBr): 3408 and 3264 ( $NH_2$ ), 3155 (NH), 1534 ( $C=N$ )  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  4.70 (d, 1H,  $J = 4.7$  Hz,  $CH_2$ ), 7.02 (dd, 1H,  $J = 2.3$  Hz, Ar–H,  $J = 9.1$  Hz, Ar–H), 7.31 (d, 1H,  $J = 2.3$  Hz, Ar–H), 7.49 (t, 1H,  $J = 4.7$  Hz,  $CH=N$ ), 7.52 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, Ar–H), 7.68 (s, 1H,  $NH_2$ ), 8.22 (s, 1H,  $NH_2$ ), 11.38 (s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  67.4 ( $CH_2$ ), 115.6 (CH Ar), 116.7 (CH Ar), 122.9 (C Ar), 131.0 (CH Ar), 131.6 (C Ar), 139.9 ( $CH=N$ ), 157.3 (C Ar), 178.4 ( $C=S$ ). Anal. Calcd. For  $C_9H_8Cl_2N_3OS$ : C, 38.86; H, 3.26; N, 15.11; Found: C, 38.55; H, 3.52; N, 14.91. HRESIMS  $m/z$ : 277.9822  $[M]^+$ .

#### 4.4. Synthesis of compounds (18)

3-((3,4-dichloro)phenoxy)butan-2-one was obtained by reacting 3,4-dichlorophenol (6.4 mmol, 1.0 g) with 3-chloro-2-butanone (6.66 mmol, 0.71 g) in potassium carbonate (9.98 mmol, 1.38 g), potassium iodide (0.66 mmol, 0.11 g) and 15 mL of acetone. This mixture was maintained under magnetic stirring at room temperature for 12 h. The precipitate was filtered in a Büchner funnel with a sintered disc filter and discarded. The solvent was completely evaporated and then was extracted first into diethyl ether and water and subsequently in diethyl ether and sodium hydroxide to 0.1 M. The compound was then dried in a  $SiO_2$  glass dissector under vacuum. The 3-(3,4-dichloro)phenoxy-butan-2-one (6.16 mmol, 1.36 g) obtained was reacted with thiosemicarbazide (6.16 mmol, 0.56 g), 4 drops of hydrochloric acid and 10 mL of ethanol in a 150 mL round bottom flask under magnetic stirring for 2 h. A yellowish solid was obtained, filtered in Büchner funnel with a sintered disc filter, washed with cold water, and then dried in  $SiO_2$ . The products were purified by crystallization using ethanol as solvent.

##### 4.4.1. 3-(3,4-Dichlorophenoxy)butan-2-one thiosemicarbazone (18)

Yellowish crystals yield = 1.37 g, 74.41%. mp (°C): 154–156. IR (KBr): 3420 (N–H), 3259 and 3155 ( $NH_2$ ), 1593 ( $C=N$ ), 1282 (C–O), 1084 ( $C=S$ )  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  1.42 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $CH_3$ ), 1.82 (s, 3H,  $CH_3$ ), 5.00 (q, 1H,  $J = 6.6$  Hz, H–C), 7.00 (dd, 1H,  $J = 3.0$  Hz,  $J = 9.0$  Hz, Ar–H), 7.27 (d, 1H,  $J = 3.0$  Hz, Ar–H), 7.47 (d, 1H,  $J = 9.0$  Hz, Ar–H), 7.85 (s largo, 1H,  $NH_2$ ), 8.24 (s

largo, 1H, NH<sub>2</sub>), 10.19 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.08 (CH<sub>3</sub>-C=N), 18.48 (CH<sub>3</sub>-C-O), 77.12 (CH-O), 116.52 (CH, Ar), 117.75 (CH, Ar), 122.94 (C-Cl, Ar), 130.99 (CH, Ar), 131.55 (C-Cl, Ar), 150.58 (C=N), 156.71 (C-O, Ar), 179.30 (S=C-NH<sub>2</sub>). Anal. Calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>OSeCl<sub>2</sub>: C, 43.15; H, 4.28; N, 13.72; Found: C, 43.39; H, 4.09; N, 13.69. HRESIMS *m/z*: 306.0320 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 4.5. Synthesis of diethyl acetal intermediate

In a round bottom flask, phenol (3.12 mmol) was added to dry DMF and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.8 mmol). The mixture was kept under magnetic stirring at room temperature for 30 min. Then bromoacetaldehyde diethyl acetal (9.36 mmol) was added and the brownish mixture was kept under reflux heating for 72 h. The reactions were monitored by thin-layer chromatographic plate (TLC). After that, the product was extracted with dichloromethane and solvent was removed under reduced pressure and then dried in SiO<sub>2</sub>.

#### 4.6. Synthesis of aldehydes

In a round bottom flask, acetal intermediate was mixed with acetone (5 mL), after an acid solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 drops and water 10 mL) had been slowly added. The mixture was kept under reflux heating (100 °C) for 4 h. The reaction was monitored using a thin-layer chromatographic plate (TLC). At the end, the product was extracted with ethyl acetate and the solvent was removed under reduced pressure and then dried in SiO<sub>2</sub>.

#### 4.7. Synthesis of intermediated compounds 3-phenoxybutan-2-ones intermediates to afford compound 18

**3-((4-*tert*-butyl)phenoxy)butan-2-one**: 4-*tert*-butylphenol (6.66 mmol, 1.0 g), 3-chloro-2-butanone (6.66 mmol, 0.71 g), potassium carbonate (9.98 mmol, 1.38 g), potassium iodide (0.66 mmol, 0.11 g) and 15 mL of acetone were mixed in a 150 mL round bottom flask and placed under magnetic stirring for 12 h. The precipitate was filtered in a Büchner funnel with a sintered disc filter and discarded. The solvent was completely evaporated and then was extracted first into diethyl ether and water and subsequently in diethyl ether and sodium hydroxide to 0.1 M. Compound was then dried in SiO<sub>2</sub> glass dissector under vacuum.

#### 4.8. QSAR

In this work we opted to employ a set of QSAR descriptors, named electronic and hydrophobic descriptors, that our review of the literature (see introduction section) had pointed out as being important for representing the larvicide activity of *A. aegypti*. In particular, we selected descriptors of easy chemical interpretation and at the same time belonging to the ligand, such as: i) atomic charge or sum of atomic charge, ii) the electric dipole moment, iii) HOMO, LUMO and HOMO-LUMO energy difference, iv) Log P and its square value, LogP<sup>2</sup>.

In order to obtain the QSAR model, Multiple Linear Regressions (MLR) [89] between the ligand descriptors and the larvicide activity for *A. aegypti* were used due to the simplicity of their interpretation. To avoid collinearity problems between descriptors in MLR [90], before obtaining the QSAR equation, the correlation coefficient matrix (related to the information contained in Table 2) was determined. Only those descriptors that correlated to the larvicide activity above 0.7 and at the same time did not correlate with each other over 0.5 were used in the MLR. In order to check the quality of the MLR the cross-validation method was employed [91]. In all cases the Statistica program [92] was employed.

#### 4.9. Docking studies for *A. aegypti* sterol carrier protein-2 (AeSCP-2)

The *in vitro* inhibition of AeSCP-2 was measured for molecules 4 and 11, and the other molecules (14–17), shown in Table 1 and discussed above as highly active in larvicide bioassays, provided a base for the selection of compounds (ligands) 4, 11, 14, 15, 16 and 17 for docking calculations. The optimized structures of all the ligands were obtained by application of the RM1 method [93], available as part of the SPARTAN 08' program [94], using internal default settings for convergence criteria. The target structure for docking calculations and analysis was taken from Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) under the PDB code 1PZ4 for *A. aegypti* sterol carrier protein-2 (AeSCP-2) [81]. The active site was defined as all atoms within a radius of 6.0 Å from the co-crystallized ligand (palmitic acid, labeled as PLM in PDB). The concern to take into account the Induced Fit effects led us to treat the side chains of ten residues as flexible during the docking calculations, following current trends in this area. Residues ARG15, LEU16, ILE19, ASP20, ASN23, ARG24, GLN25, LEU48, LEU102 and PHE105 were selected for the AeSCP-2 target. The CHEMPLP score function [95] of the GOLD 5.1 program [96] was used for docking calculations, followed by the Binana program [97], which was used to analyze the molecular interactions present in the best docking solutions, using a default setting, except for H-bond distance, which was changed to a maximum of 3.5 Å. The figures were generated with Pymol [98].

#### 4.10. Larvicidal bioassay

The larvicidal activity of the thiosemicarbazones and semicarbazones was evaluated using an adaptation [54,32] of the method recommended by the World Health Organization [99]. Stock solutions were prepared by solubilizing 5 mg of the compounds with the appropriated co-solvents (Tween80); the resulting solution was then dissolved in 50 mL of distilled water. Dilution of the stock solutions allowed the preparation of suitable concentrations to be tested. Fourth larvae stage *A. aegypti* were added to beakers (20 larvae per beaker) containing these solutions (20 mL). Four replicate assays were carried out for every sample concentration, and for each assay a negative control was included and prepared as described without the active compounds. Mortality of the larvae was determined after 48 h incubation at 28 ± 2 °C, 70 ± 10 relative humidity. Larvae were considered dead when they did not respond to stimulus or did not rise to the surface of the solution. The lethal concentration value LC<sub>50</sub> was calculated by probit analysis using StatusPlus2006 software [32,33].

#### 4.11. Cytotoxicity to mouse splenocytes

BALB/c mouse splenocytes were placed into 96-well plates at a cell density of 6 × 10<sup>5</sup> cells/well in an RPMI-1640 medium supplemented with 10% of FBS and 50 µg mL<sup>-1</sup> of gentamycin. Each test inhibitor was evaluated in six concentrations (1, 5, 10, 25, 50 and 100 µg mL<sup>-1</sup>) in triplicate. To each well, an aliquot of test inhibitor suspended in DMSO was added. Controls included wells only containing either solvent (untreated cells) or saponin (positive control). The plate was incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, 1.0 µCi of <sup>3</sup>H-thymidine (Perkin Elmer, Waltham, USA) was added to each well, and the plate was returned to the incubator. The plate was then transferred to a beta-radiation counter (Multilabel Reader, Finland), and the percent of <sup>3</sup>H-thymidine was determined. Cell viability was measured as the percent of <sup>3</sup>H-thymidine incorporation for treated-cells in comparison to untreated cells. Highest non-toxic concentration for each compound was estimated.

#### 4.12. Inhibitory cholesterol binding test

Recombinant AeSCP-2 protein was purified and an NBD-cholesterol (Molecular probes, Eugene, OR, USA)/rAeSCP-2/compound competition assay was performed as described [69]. A separate set of tests were performed using NBD cholesterol with increasing concentration of a SCPI to assess whether the SCPI interfered with NBD cholesterol fluorescence. If a compound interfered with NBD cholesterol fluorescence, the background control was NBD cholesterol along with the SCPI. The net change in NBD cholesterol fluorescence intensity was calculated by subtracting the fluorescence of background controls from the NBD cholesterol/AeSCP-2 complex in the presence of a compound. The data were plotted with the relative NBD cholesterol intensity (bound NBD cholesterol) as the Y-axis and molarity of inhibitor as the X-axis using GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

#### Authors' contributions

DMAFN coordinated the larvicidal bioassay, wrote the first draft and revised the manuscript. MNR coordinated the first electronic structure calculations and advised AGS on the analysis of the results and development of the QSAR model. GKNS and KAD developed the larvicidal bioassays. DRM made the compound synthesis and revised the synthetic experimental methodology. JWPE worked on the compound synthesis and wrote part of the manuscript. ADTO synthesized compound **18**. ACLL coordinated the synthesis and spectroscopic characterization of all compounds. DJB orientated the synthesis. MZH developed the docking studies. VRAP coordinated and analyzed the cytotoxicity assays in BALB/c mice splenocytes developed by LFR, MCABC and BCO. QL developed the experiments of mode-of-action on AeSCP-2. KMMJr discussed the electronic structure results and JBPS was involved in the electronic structure calculations, QSAR model, comparison between calculated and experimental results and wrote the manuscript. All authors read and agreed with the final version of this manuscript.

#### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### Acknowledgments

The authors thank FACEPE/CNPq/PRONEX, FACEPE/PPSUS-2008 and Dengue Institute/CNPq for supporting this work. J. B. P. da Silva thanks CNPq a scholarship for developing part of the computational work in the Prof. Kenneth Merz Jr group at the University of Florida. A.G da Silva thanks CAPES for his Ph.D. scholarship. This article is dedicated to the memory of Prof. Que Lan (1959–2014). During the preparation of this article Prof. Lan asked to thank the MSN123516 fund from the Graduate School, University of Wisconsin–Madison, for the support of developing novel insecticides.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.061>.

#### References

- [1] L. Régis, A.F. Furtado, C.M.F. de Oliveira, C.B. Bezerra, L.R.F. da Silva, J. Araújo, A. Maciel, M.H. Silva-Filha, S.B. Silva, Integrated control of the filariasis vector with community participation in an urban area of Recife, Pernambuco, Brazil, *Cad. Saúde Públ.* 12 (1996) 473–482, <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1996000400005>.
- [2] R. N'Guessan, P. Boko, A. Odjio, J. Chabi, M. Akogbeto, M. Rowland, Control of pyrethroid and DDT-resistant *Anopheles gambiae* by application of indoor residual spraying or mosquito nets treated with a long-lasting organophosphate insecticide, chlorpyrifos-methyl, *Malar. J.* 9 (2010) 44, [http://www.malariajournal.com/content/9/1/44](http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-9-44).
- [3] T. Mizutani, M. Kobayashi, Y. Eshita, K. Shirato, T. Kimura, Y. Aki, H. Miyoshi, T. Takasaki, I. Kurane, H. Kariwa, T. Umemura, I. Takashima, Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus, *Insect Mol. Biol.* 12 (2003) 491–499, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2583.2003.00435.x>.
- [4] G. Pialoux, B.-A. Gaüzère, S. Jaureguierry, M. Strobel, Chikungunya, an epidemic arbovirolosis, *Lancet Infect. Dis.* 7 (2007) 319–327, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70107-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X).
- [5] M.B. Nathan, R. Dayal-Drager, M. Guzman, Chapter 1: epidemiology, burden of disease and transmission, in: World Health Organization (Ed.), *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*, New Edition, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, 2009, pp. 3–17.
- [6] D.M. Morens, A.S. Fauci, Dengue and hemorrhagic fever: a potential threat to public health in United States, *J. Am. Med. Assoc.* 299 (2008) 214–216, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2007.31-a>.
- [7] J.G. Rigau-Perez, M.K. Laufer, Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992–1996: diagnosis and clinical alarm signals, *Clin. Infect. Dis.* 42 (2006) 1241–1246, <http://dx.doi.org/10.1086/501355>.
- [8] P.V. Effler, L. Pang, P. Kitsutani, V. Vorndam, M. Nakata, T. Ayers, J. Elm, T. Tom, P. Reiter, J.G. Rigau-Perez, J.M. Hayes, K. Mills, M. Napier, G.G. Clark, D.J. Gubler, Dengue fever, Hawaii, 2001–2002, *Emerg. Infect. Dis.* 11 (2005) 742–749, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1105.041063>.
- [9] J.L. Kyle, E. Harris, Global spread and persistence of dengue, *Annu. Rev. Microbiol.* 62 (2008) 71–92, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163005>.
- [10] N.W. Beebe, R.D. Cooper, P. Mottram, A.W. Sweeney, Australia's dengue risk driven by human adaptation to climate change, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000429>.
- [11] M.J.P. Delgado, J.M. Gutierrez, L.B. Radic, T. Maretic, S. Zekani, T. Avsic-Zupanc, E.S. Aymar, A. Trilla, J.G. Brustenga, Imported dengue hemorrhagic fever, Europe, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 1329–1330, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.080068>.
- [12] R. Allwinn, Significant increase in travel-associated dengue fever in Germany, *Med. Microbiol. Immunol.* 200 (2011) 155–159, <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-011-0185-2>.
- [13] WHO, Fact Sheet N 117, January, 2012, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>, August 23, 2014.
- [14] S.B. Halstead, J. Deen, The future of dengue vaccines, *Lancet* 360 (2002) 1243–1245, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11276-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11276-1).
- [15] D. Normile, Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts, *Science* 342 (2013) 415, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1242617>.
- [16] T.M. Ross, Dengue virus, *Clin. Lab. Med.* 30 (2010) 149–160, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.007>.
- [17] A.J. Stevens, M.E. Gahan, S. Mahalingam, P.A. Keller, The medicinal chemistry of dengue fever, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 7911–7926, <http://dx.doi.org/10.1021/jm900652e>.
- [18] D.J. Gubler, Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century, *Trends Microbiol.* 10 (2002) 100–103, [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02288-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02288-0).
- [19] D.J. Gubler, The economic burden of dengue, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86 (2012) 743–744, <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0157>.
- [20] R.I. Rose, Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management, *Emerg. Infect. Dis.* 7 (2001) 17–23, <http://dx.doi.org/10.3201/eid0701.700017>.
- [21] J.A. Suya, D.S. Shepard, M.-S. Chang, M. Caram, S. Hoyer, D. Socheat, N. Chantha, M.B. Nathan, Cost-effectiveness of annual targeted larviciding campaigns in Cambodia against the dengue vector *Aedes aegypti*, *Trop. Med. Int. Health* 12 (2007) 1026–1036, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01889.x>.
- [22] C.F.S. Andrade, M. Modolo, Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control, *Rev. Saúde Publ.* 25 (1991) 184–187, <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101991000300004>.
- [23] I.A. Braga, J.B.P. Lima, S.S. Soares, D. Valle, *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil, *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz* 99 (2004) 199–203, <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000200015>.
- [24] A.J. Martins, C.D.M. Ribeiro, D.F. Bellinato, A.A. Peixoto, D. Valle, J.B.P. Lima, Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations, *PLoS One* 7 (2012) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0031889>.
- [25] M.A.V. Melo-Santos, J.J.M. Varjal-Melo, A.P. Araújo, T.C.S. Gomes, M.H.S. Paiva, L.N. Regis, A.F. Furtado, T. Magalhaes, M.L.G. Macoris, M.T.M. Andrighetti, C.F. Ayres, Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil, *Acta Trop.* 113 (2010) 180–189, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.015>.
- [26] M. da Silva, A. Furigo Jr., S.A. Furlan, O. Souza, Production of bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in semicontinuous processes combined with batch processes for sporulation, *Braz. Arch. Biol. Tech.* 54 (2011) 45–52.

- <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132011000100006>.
- [27] P. Subbiah, B. Archana, Optimization of medium composition for the production of mosquitocidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*, *Indian J. Exp. Biol.* 50 (2012) 65–71.
  - [28] M. Paris, C. Melodelima, E. Coissac, G. Tetreau, S. Reynaud, J.-P. David, L. Despres, Transcription profiling of resistance to Bti toxins in the mosquito *Aedes aegypti* using next-generation sequencing, *J. Invertebr. Pathol.* 109 (2012) 201–208, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.11.004>.
  - [29] A.M. Pohlitz, A.R. Rezende, E.L.L. Baldin, N.P. Lopes, V.F.A. Neto, Plant extracts, isolated phytochemicals, and plant-derived agents which are lethal to arthropod vectors of human tropical diseases – a review, *Planta Med.* 77 (2011) 618–630, <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1270949>.
  - [30] S. Rajkumar, A. Jebanesan, Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd.) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae), *J. Asia-Pacific Entomol.* 13 (2010) 107–109, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2010.02.001>.
  - [31] S.S. Cheng, C.G. Huang, Y.J. Chen, J.J. Yu, W.J. Chen, S.T. Chang, Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 452–456, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.038>.
  - [32] G.K.N. Santos, K.A. Dutra, R.A. Barros, C.A.G. Câmara, D.D. Lira, N.B. Gusmão, D.M.A.F. Navarro, Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity, *Ind. Crop. Prod.* 40 (2012) 254–260, <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.020>.
  - [33] E.M. Bianco, L. Pires, G.K.N. Santos, K.A. Dutra, T.N.V. Reis, E.R.T.P.P. Vasconcelos, A.L.M. Coentino, D.M.A.F. Navarro, Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*), *Ind. Crop. Prod.* 43 (2013) 270–275, <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.032>.
  - [34] A. Leo, C. Hansch, C. Church, Comparison of parameters currently used in the study of structure-activity relationships, *J. Med. Chem.* 12 (1969) 766–771, <http://dx.doi.org/10.1021/jm00305a010>.
  - [35] C. Hansch, P.P. Maloney, T. Fujita, R.M. Muir, Correlation of biological activity of phenoxycetic acids with hammett substituent constants and partition coefficients, *Nature* 194 (1962) 178–180, <http://dx.doi.org/10.1038/194178b0>.
  - [36] S.R.L. Santos, V.B. Silva, M.A. Melo, J.D.F. Barbosa, R.L.C. Santos, D.P. Sousa, S.C.H. Cavalcanti, Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae, *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10 (2010) 1049–1054, <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0158>.
  - [37] D.P. de Sousa, Y.W. Vieira, M.P. Uliana, M.A. Melo, T.J. Brocksom, S.C.H. Cavalcanti, Larvicidal activity of *para*-Benzoquinones, *Parasitol. Res.* 107 (2010) 741–745, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1942-7>.
  - [38] S.R.L. Santos, M.A. Melo, A.V. Cardoso, R.L.C. Santos, D.P. de Sousa, S.C.H. Cavalcanti, Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn., *Chemosphere* 84 (2011) 150–153, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.010>.
  - [39] C.L. Cantrell, J.W. Pridgeon, F.R. Fronczek, J.J. Becnel, Structure-activity relationship studies on derivatives of eudesmanolides from *Inula helenium* as toxicants against *Aedes aegypti* larvae and adults, *Chem. Biodivers.* 7 (2010) 1681–1697, <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201000031>.
  - [40] G. Eng, X. Song, Q. Duong, D. Strickman, J. Glass, L. May, Synthesis, structure characterization and insecticidal activity of some triorganotin di-thiocarbamates, *Appl. Organomet. Chem.* 17 (2003) 218–225, <http://dx.doi.org/10.1002/aoc.423>.
  - [41] X. Song, Q. Duong, E. Mitroorgji, A. Zapata, N. Nguyen, D. Strickman, J. Glass, G. Eng, Synthesis, structure characterization and larvicidal activity of some *tris*-*para*-substitutedphenyl)tins, *Appl. Organomet. Chem.* 18 (2004) 363–368, <http://dx.doi.org/10.1002/aoc.660>.
  - [42] Q. Duong, X. Song, E. Mitroorgji, S. Gordon, G. Eng, Larvicidal and structural studies of some triphenyl- and tricyclohexyltin *para*-substituted benzoates, *J. Organomet. Chem.* 691 (2006) 1775–1779, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jorganchem.2005.12.005>.
  - [43] X. Song, A. Zapata, J. Hoener, A.C. Dios, L. Casabianca, G. Eng, Synthesis larvicidal QSAR and structural studies of some triorganotin 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarboxylates, *Appl. Organomet. Chem.* 21 (2007) 545–550, <http://dx.doi.org/10.1002/aoc.1241>.
  - [44] C. Hansch, R.P. Verma, Larvicidal activities of some organotin compounds on mosquito larvae: a QSAR study, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 260–273, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.02.040>.
  - [45] Z. Huang, Q. Cui, L. Xiong, Z. Wang, K. Wang, Q. Zhao, F. Bi, Q. Wang, Synthesis and insecticidal activities and SAR studies of novel benzoheterocyclic diacylhydrazine derivatives, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 2447–2456, <http://dx.doi.org/10.1021/jf8036193>.
  - [46] N.A. Begum, N. Roy, R.A. Laskar, K. Roy, Mosquito larvicidal studies of some chalcone analogues and their derived products: structure-activity relationship analysis, *Med. Chem. Res.* 20 (2011) 184–191, <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-010-9305-6>.
  - [47] G. Pasquale, G.P. Romanelli, J.C. Autino, J. García, E.V. Ortiz, P.R. Duchowicz, Quantitative structure-activity relationships of mosquito larvicidal chalcone derivatives, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 692–697, <http://dx.doi.org/10.1021/jf203374r>.
  - [48] M. Deboun, J. Wagman, In vitro repellency of *N,N*-diethyl-3-methylbenzamide and *N,N*-diethylphenylacetamide analogs against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae), *J. Med. Entomol.* 41 (2004) 430–434, <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.430>.
  - [49] A.R. Katritzky, D.A. Dobchev, I. Tulp, M. Karelson, D.A. Carlson, QSAR study of mosquito repellents using Codessa Pro, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 2306–2311, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.11.113>.
  - [50] G. Paluch, J. Grodnitzky, L. Bartholomay, J. Coast, Quantitative structure-activity relationship of botanical sesquiterpenes: spatial and contact repellency to the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 7618–7625, <http://dx.doi.org/10.1021/jf900964e>.
  - [51] S.C. Basak, R. Natarajan, W. Novak, P. Miszta, J.A. Klun, Three dimensional structure-activity relationships (3D-QSAR) for insect repellency of diastereoisomeric compounds: a hierarchical molecular overlay approach, *Sar. QSAR Environ. Res.* 18 (2007) 237–250, <http://dx.doi.org/10.1080/10629360701303784>.
  - [52] I.K. Park, S.G. Lee, S.G. Shin, J.D. Park, Y.J. Ahn, Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1866–1870, <http://dx.doi.org/10.1021/jf011457a>.
  - [53] Bluntritt, A., Master Dissertation, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.
  - [54] R.A.W. Neves Filho, C.A. Silva, C.S.B. Silva, V.P. Brunstein, D.M.A.F. Navarro, F.A.B. Santos, L.C. Alves, M.G.S. Cavalcanti, R.M. Srivastava, M.G. Carneiro-da-Cunha, Improved microwave-mediated synthesis of 3-(3-Aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)propionic acids and their larvicidal and fungal growth inhibitory properties, *Chem. Pharm. Bull.* 57 (2009), <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.57.819>.
  - [55] B. Bordas, A.B. Demilo, A. Lopata, S.B. Haught, Insecticides-mechanisms of action and resistance tagungbericht, *Tag.Ber. Akad. Landwirtschaft. Wiss. DDR, Berlin* 274 (1989) 157–165.
  - [56] Tomokazu, H. I., Nobuharu, A. O., Hiroshi, H. K., Atsushi, K. K., United States Patent 5304573, 1994.
  - [57] J. Wu, B.A. Song, D.Y. Hu, M. Yue, S. Yang, Design, synthesis and insecticidal activities of novel pyrazole amides containing hydrazone substructures, *Pest Manag. Sci.* 68 (2012) 801–810, <http://dx.doi.org/10.1002/ps.2320>.
  - [58] Z. Afrasiabi, E. Sinn, J. Chen, Y. Ma, A.L. Rheingold, L.N. Zakharov, N. Rath, S. Padhye, Appended 1,2-naphthoquinones as anticancer agents 1: synthesis, structural, spectral and antitumor activities of ortho-naphthoquinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes, *Inorg. Chim. Acta* 357 (2004) 271–278, [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00484-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00484-5).
  - [59] D. Kovala-Demertzi, M.A. Demertzi, E. Filioi, A.A. Pantazaki, P.N. Yadav, J.R. Miller, Y. Zheng, D.A. Kyriakidis, Platinum(II) and palladium(II) complexes with 2-Acetyl pyridine 4*N*-ethyl thiosemicarbazone able to overcome the cis-Platin resistance. Structure, antibacterial activity and DNA strand breakage, *BioMetals* 16 (2003) 411–418, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022543718598>.
  - [60] T.R. Bal, B. Anand, P. Yogeewari, D. Sriram, Synthesis and evaluation of anti-HIV activity of isatin  $\beta$ -thiosemicarbazone derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 4451–4455, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.07.046>.
  - [61] N. Bharti, K. Husain, M.T.G. Garza, D.E. Cruz-Vega, J. Castro-Garza, B.D. Mata-Cardenas, F. Naqvi, A. Azam, Synthesis and in vitro antiproliferative activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 3475–3478, [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00703-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00703-5).
  - [62] N. Karali, Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-2,3-dione derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 37 (2002) 909–918, [http://dx.doi.org/10.1016/S0223-5234\(02\)01416-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0223-5234(02)01416-2).
  - [63] P.C. Unangst, D.T. Connor, Synthesis and transformations of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-[2-(thiazolyl)ethenyl]phenols, *J. Heterocycl. Chem.* 29 (1992) 1097–1100, <http://dx.doi.org/10.1002/jhet.5570290511>.
  - [64] N. Ergenç, G. Çapan, N.S. Gunay, S. Özkişirli, M. Gungor, S. Özbey, E. Kendi, Synthesis and hypnotic activity of new 4-thiazolidinone and 2-thioxo-4,5-imidazolidinedione derivatives, *Arch. Pharm.* 332 (1999) 343–347, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4184\(199910\)332:10<343::AID-ARDP343>3.0.CO;2-O](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-4184(199910)332:10<343::AID-ARDP343>3.0.CO;2-O).
  - [65] A. Verma, S.K. Saraf, 4-thiazolidinone – a biologically active scaffold, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 897–905, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.07.017>.
  - [66] M. Behrouzi-Fardmoghdam, F. Poorrajab, S.K. Ardestani, S. Emami, A. Shafiee, A. Foroumadi, Synthesis and in vitro anti-leishmanial activity of 1-[5-(5-nitrofuranyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]- and 1-[5-(5-nitrothiophen-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-4-arylpiperazines, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 4509–4515, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.02.052>.
  - [67] H.J.C. Bezerra-Netto, D.I. Lacerda, A.L.P. Miranda, H.M. Alves, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, Design and synthesis of 3,4-methylenedioxy-6-nitrophenoxycetylhydrazone derivatives obtained from natural safrole: new lead-agents with analgesic and antipyretic properties, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 7924–7935, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2006.07.046>.
  - [68] K.C. Krebs, Q. Lan, Isolation and expression of a sterol carrier protein-2 gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, *Insect. Mol. Biol.* 12 (2003) 51–60, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2583.2003.00386.x>.
  - [69] M. Kim, V. Wessely, Q. Lan, Identification of mosquito sterol carrier protein-2 inhibitors, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 650–657, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M400389-JLR200>.
  - [70] V.C. Kramer, D.J. Schnell, K.W. Nickerson, Relative toxicity of organic solvents to *Aedes aegypti* larvae, *J. Invertebr. Pathol.* 42 (1983) 285–287, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90076-9](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(83)90076-9).

- [71] S.S. Cheng, H.T. Chang, S.T. Chang, K.H. Tsai, W.J. Chen, Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae, *Bioresour. Technol.* 89 (2003) 99–102, [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00008-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00008-7).
- [72] H. Beraldo, Semicarbazones and thiosemicarbazones: their wide pharmacological profile and clinical applications, *Quím. Nova* 27 (2004) 461–471, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000300017>.
- [73] H. Beraldo, D. Gambino, The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes, *Mini-Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31–39, <http://dx.doi.org/10.2174/1389557043487484>.
- [74] B. Zacharie, M. Lagraoui, M. Dimarco, C.L. Penney, L. Gagnon, Thioamides: synthesis, stability, and immunological activities of thioanalogues of imreg, preparation of new thioacylating agents using fluorobenzimidazolone derivatives, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 2046–2052, <http://dx.doi.org/10.1021/jm9900467>.
- [75] M.Z. Hernandez, S.M.T. Cavalcanti, D.R.M. Moreira, W.F. Azevedo Junior, A.C.L. Leite, Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design, *Curr. Drug Targets* 11 (2010) 303–314, <http://dx.doi.org/10.2174/138945010790711996>.
- [76] N.K. Simas, E.C. Lima, S.R. Conceição, R.M. Kuster, A.M. Oliveira Filho, Natural products for dengue transmission control: larvicidal activity of *Myroxylon balsamum* (red oil) and of terpenoids and phenylpropanoids, *Quím. Nova* 27 (2004) 46–49, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000100009>.
- [77] F.R. Paula, S.H.P. Serrano, L.C. Tavares, Aspects of bioactivity and toxicity of nitrocompounds, *Quím. Nova* 32 (2009) 1013–1020, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000400032>.
- [78] B.H. Min, W.A. Garland, Determination of clonazepam and its 7-amino metabolite in plasma and blood by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 139 (1977) 121–133, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)84132-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)84132-7).
- [79] J.B.P. da Silva, F. Hallwass, A.G. da Silva, D.R. Moreira, M.N. Ramos, J.W.P. Espindola, A.D.T. de Oliveira, D.J. Brondani, A.C.L. Leite, K.M. Merz Jr., *J. Mol. Struct.* 1093 (2015) 219–227, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.03.011>.
- [80] T. Kitamura, S. Kobayashi, M. Okada, Regional expression of the transcript encoding sterol carrier protein x related thiolase and its regulation by homeotic genes in the midgut of *Drosophila* embryos, *Dev. Growth Differ.* 38 (1996) 373–381, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-169X.1996.101-3-00005.x>.
- [81] D.H. Dyer, S. Lovell, J.B. Thoden, H.M. Holden, I. Rayment, Q. Lan, The structural determination of an insect sterol carrier protein-2 with a ligand-bound C16 fatty acid at 1.35-Å resolution, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 39085–39091, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M306214200>.
- [82] R.T. Larson, V. Wessely, Z. Jiang, Q. Lan, Larvicidal activity of sterol carrier protein-2 inhibitor in four species of mosquitoes, *J. Med. Entomol.* 45 (2008) 439–444, <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/45.3.439>.
- [83] M. S. Kim, Q. Lan, Sterol carrier protein-x gene and effects of sterol carrier protein-2 inhibitors on lipid uptake in *Manduca sexta*, *BMC-Physiol.* 10 (2010) 9, <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6793-10-9>.
- [84] D.R.M. Moreira, S.P.M. Costa, M.Z. Hernandez, M.M. Rabello, G.B. de Oliveira Filho, C.M.L. de Melo, L.F. da Rocha, C.A. de Simone, R.S. Ferreira, J.R.B. Fradico, C.S. Meira, E.T. Guimaraes, R.M. Srivastava, V.R.A. Pereira, M.B.P. Soares, A.C.L. Leite, Structural investigation of anti-trypanosoma cruzi 2-iminothiazolidin-4-ones allows the identification of agents with efficacy in infected mice, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 10918–10936, <http://dx.doi.org/10.1021/jm301518v>.
- [85] M.V.O. Cardoso, L.R.P. de Siqueira, E.B. da Silva, L.B. Costa, M.Z. Hernandez, M.M. Rabello, R.S. Ferreira, L.F. da Cruz, D.R.M. Moreira, V.R.A. Pereira, M.C.A.B. de Castro, P.V. Bernhardt, A.C.L. Leite, 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: structural design, synthesis and pharmacological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 86 (2014) 48–59, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.012>.
- [86] C.D. Barros, A.A. Amato, T.B. de Oliveira, K.B.R. Iannini, A.L. da Silva, T.G. da Silva, E.S. Leite, M.Z. Hernandez, M.C.A. de Lima, S.L. Galdino, F.A.R. Neves, I.R. Pitta, Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR $\gamma$  ligands, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 3805–3811, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.04.045>.
- [87] B.S. Holla, K.V. Malini, B.S. Rao, B.K. Sarojini, N.S. Kumari, Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents, *Eur. J. Med. Chem.* 38 (2003) 313–318, [http://dx.doi.org/10.1016/S0223-5234\(02\)01447-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0223-5234(02)01447-2).
- [88] L. Somogyi, Reactions of flavonoid thiosemicarbazones under acetyllating conditions, *Tetrahedron* 47 (1991) 9305–9316, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)96219-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(01)96219-2).
- [89] R.E. Bruns, L.S. Scarmínio, B. de Barros Neto, *Statistical Design, Chemometrics, Elsevier, Amsterdam*, 2006.
- [90] L. Eriksson, E. Johansson, *Multivariate design and modeling in QSAR, Chemom. Intell. Lab.* 34 (1996) 1–19, [http://dx.doi.org/10.1016/0196-7439\(96\)00023-8](http://dx.doi.org/10.1016/0196-7439(96)00023-8).
- [91] K.R. Beebe, R.J. Pell, M.B. Seasholtz, *Chemometrics: a Practical Guide, Wiley&Sons Interscience, New York*, 1998.
- [92] STATISTICA (Data Analysis Software System), Version 6.1, StatSoft, Inc, 2004, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- [93] G.B. Rocha, R.O. Freire, A.M. Simas, J.J.P. Stewart, RM1: a reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I, *J. Comput. Chem.* 27 (2006) 1101–1111, <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20425>.
- [94] Spartan '08 Tutorial and User's Guide, Wavefunction, Irvine, CA, 2008, <http://www.wavefun.com/products/spartan.html>.
- [95] O. Korb, T. Stutzle, T.E. Exner, Empirical scoring functions for advanced protein–ligand docking with PLANTS, *J. Chem. Inf. Model* 49 (2009) 84–96, <http://dx.doi.org/10.1021/ci800298z>.
- [96] Gold Software, Version 5.1, Cambridge Crystallographic Data Centre, <http://www.ccdc.cam.ac.uk>.
- [97] J.D. Durrant, J.A. Mccammon, BINANA: a novel algorithm for ligand-binding characterization, *J. Mol. Graph. Model* 29 (2011) 888–893, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2011.01.004>.
- [98] W.L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, CA, 2002, <http://www.pymol.org>.
- [99] World Health Organization, Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides, World Health Organization, Geneva, 2005.

## ANEXO C – CERTIFICADOS DE CONGRESSOS



XVI Simpósio Brasileiro de Química Teórica – SBQT 2011  
20 a 23 de novembro de 2011  
Centro de Convenções Parque Metalúrgico da UFOP  
Ouro Preto – MG, Brasil

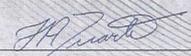
### CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho abaixo foi apresentado na sessão de pôster:

Título: **QSAR studies of compounds which oxadiazole larvicidal activity against the mosquito *Aedes aegypti*.**

Autores: *Silva, AG; Ramos, MN; Silva, JBP; Navarro, DMAF.*

23 de novembro de 2011

  
Prof. Hélio Anderson Duarte  
Presidente da Comissão Organizadora

Realização:  UFMG

Colaboração:   

Apoio:   



7<sup>th</sup> Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry

**BrazMedChem2014**

*Facing the turning point in medicinal chemistry*

November, 9-12, 2014

Campos do Jordão – SP, Brazil

We hereby certify that

**Aluizio Galdino Silva**

presented the poster entitled

***“QSAR studies of thiosemicarbazones derivatives with larvicidal activity for *Aedes aegypti* mosquito.”***

From the authors:

Silva, A. G.<sup>1</sup>; Ramos, M. N.<sup>1</sup>; Silva, J. B. P.<sup>1</sup>; Navarro, D. M. A. F.<sup>1</sup>; Leite, A. C. L. L.<sup>2</sup>

(1) Departamento de Química Fundamental, UFPE (2) Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE

during the Cheminformatics and Bioinformatics session.

  
Prof. Andrei Letão  
Chair of BrazMedChem2014

  
Prof. Antonia T. do Amaral  
Chair of the Scientific Committee



2 0 1 5

XVIII  
Simpósio Brasileiro  
de Química Teórica  
22 a 25 de Novembro de 2015  
sbqt-2015.net.br



Pirenópolis – (GO) - Brasil

## CERTIFICADO

Certificamos que **Aluizio Galdino da Silva** apresentou o trabalho intitulado **1,2,4-Oxadiazole Esters as *Aedes aegypti* Larvicides**, na forma de pôster, no XVIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica realizado no período de 22 a 25 de novembro de 2015 em Pirenópolis – Goiás.

Kleber C. Mundim  
Coordenador – SBQT 2015