

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS
MESOIÔNICOS, CHALCONAS-TIOSSEMICARBAZONAS E
FTALAZINONAS**

IGOR RESENDES BARBOSA

2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS
MESOIÔNICOS, CHALCONAS-TIOSSEMICARBAZONAS E
FTALAZINONAS**

IGOR RESENDES BARBOSA

Sob a orientação da professora
DRa. AUREA ECHEVARRIA

e coorientação do professor
DR. CARLOS MAURICIO RABELLO DE SANT'ANNA

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção de grau de **Doutor em
Química**, no programa de pós-
graduação em química, área de
concentração em Química.

Seropédica, RJ
Outubro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B238s Barbosa, Igor Resendes , 1996-
 Síntese e avaliação biológica de compostos
mesoiônicos, chalconas-tiossemicarbazonas e
ftalazinonas / Igor Resendes Barbosa. - Seropédica,
2025.
 524 f.: il.

 Orientadora: Aurea Echevarria Aznar Neves Lima.
 Coorientador: Carlos Mauricio Rabello de
Sant'Anna.
 Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,
2025.

 1. Mesoiônicos. 2. Sulfonamidas . 3.
Tiossemicarbazonas. 4. Ftalazinonas . 5. Química
medicinal. I. Lima, Aurea Echevarria Aznar Neves ,
1950-, orient. II. Sant'Anna, Carlos Mauricio Rabello
de , 1965-, coorient. III Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química.
IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

IGOR RESENDES BARBOSA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química, no
Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

TESE APROVADA EM 23/10/2025

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Arthur Eugen Kummerle Dr. UFRRJ

Mario Geraldo de Carvalho Dr. UFRRJ

Marcos Vinicius Nora Souza Dr. Fiocruz

Natália Drumond Lopes Dra. UNESA



TERMO Nº 937/2025 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 29/10/2025 11:45)

ARTHUR EUGEN KUMMERLE
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###004#0

(Assinado digitalmente em 28/10/2025 09:51)

AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###71#9

(Assinado digitalmente em 28/10/2025 10:32)

MARIO GERALDO DE CARVALHO
PROFESSOR TITULAR-LIVRE MAG SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###864#1

(Assinado digitalmente em 28/10/2025 16:00)

MARCUS VINICIUS NORA DE SOUZA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.677-##

(Assinado digitalmente em 29/10/2025 14:20)

NATÁLIA DRUMOND LOPES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.277-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **937**, ano: **2025**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **28/10/2025** e o código de verificação: **0826f777f2**

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Luiz e Ruth, por todo suporte, incentivo e muita paciência durante toda minha trajetória acadêmica. Obrigado por acreditarem em minha capacidade e investirem em minha formação. Sem vocês, certamente não teria alcançado todos esses sonhos. Amo vocês mais que tudo nesse mundo!

À professora Aurea Echevarria pela orientação, incentivo a pesquisa e sabedoria transmitida no decorrer de todo o período em que estive no NUSQUIMED. Obrigado também por estar sempre disposta a escutar e considerar minhas propostas, pela paciência e prontidão para sanar minhas dúvidas e ajudar em todas as etapas deste trabalho. Sentirei saudades de nossas conversas e das tardes de café...mas não sumirei, estarei sempre visitando... fora que ainda temos trabalhos a publicar!

Ao meu coorientador Carlos Mauricio pelo valioso auxílio nas etapas de estudos *in silico* realizados neste trabalho.

À professora Ana Paula Pereira da Silva, por todo o suporte e orientação nos ensaios biológicos. Seu apoio foi fundamental para este trabalho. Além disso, saiba que sou muito grato por todas as nossas conversas e por todos os seus conselhos.

Aos meus amigos, Geicy Kelly, Dandara, Beatriz Farias, Lucas Santiago, Mayana, Ana Clara e Clébio Nazário por todo apoio, carinho, paciência e parceria nesses anos de amizade. Vivi com vocês tantos momentos bons, aqueles que dão energia para continuar a vida corrida. Vocês me ajudaram a enfrentar várias situações difíceis... é tanta gratidão, que não cabe em papel. Amo vocês!

Aos meus companheiros de laboratório, em especial Ana Clara, Talyson, Rodolfo, Yuri Pitassi, Isabelly Lourenço, e Meyriane Mira, pelo auxílio, companheirismo e bom humor, que sempre tornaram a rotina de trabalho no laboratório mais agradável!

Ao professor Guilherme Pereira Guedes pelas medidas de DRX realizadas.

À professora Eunice André e seus alunos de pós-graduação, Mayara Alves e Vitor Hélio, que, mesmo diante de um pedido repentino, aceitaram embarcar em um de nossos trabalhos, contribuindo de forma valiosa para esta tese.

À Juliana Echevarria-Lima e a Maria Clara Campos, pela disponibilidade, boa vontade e prontidão para realizarem vários dos ensaios biológicos descritos nesta tese.

À Adriele de Oliveira Batista, mestranda do PPGQ da UFRRJ, pelo valioso auxílio nos experimentos envolvendo a Albumina Sérica Humana.

Ao professor Darí Cesarin, por sempre se mostrar disposto a ajudar nos experimentos e a sanar todas as minhas dúvidas sobre os ensaios com a Albumina Sérica Humana.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite de ler, avaliar e acrescentar neste trabalho.

Ao CNPq, Faperj e Programa de Oncobiologia/ UFRJ/ Fundação do câncer pelo fomento.

A CAPES pela bolsa de incentivo a pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

BARBOSA, Igor Resendes. **Síntese e Avaliação Biológica de Compostos Mesoiónicos, Chalconas-Tiossemicarbazonas e Ftalazinonas**, 2025, 524p. Tese (Doutorado em Química, área de concentração Química Orgânica). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Nesta tese, diferentes classes de compostos foram desenvolvidas, caracterizadas e avaliadas quanto a sua atividade frente a doenças inflamatórias, virais e neoplásicas. No primeiro capítulo, híbridos sulfonamidas-sidnonas foram preparados e investigados quanto à sua atividade anti-inflamatória e antiviral. Foram capazes de reduzir a inflamação em modelo animal de lesão pulmonar aguda e inibiram a replicação do SARS-CoV-2 em células Calu-3, exibindo baixa citotoxicidade contra células não infectadas. A caracterização dos compostos foi conduzida por técnicas espectroscópicas de rotina (IV, RMN de ^1H e ^{13}C), espectrometria de massas de alta resolução, difração de raios-x e CLAE. Estudos *in silico* sugerem que, de maneira geral, a classe possui propriedades farmacocinéticas adequadas e as moléculas podem ser consideradas como bons protótipos de fármacos. Estudos físico-químicos revelaram que essas substâncias interagem fortemente com a albumina sérica humana, o que pode ocasionar longo tempo de retenção na corrente sanguínea. No segundo capítulo, foram investigadas substâncias com potencial atividade antitumoral. Inicialmente, 25 tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e azachalconas foram sintetizadas e oito delas foram testadas contra células derivadas de hepatocarcinoma humano (Huh-7), destacando-se os derivados de azachalconas pela elevada potência – IC_{50} em nanomolar –, associada a complexação com íons cobre no meio celular. Na sequência, um complexo de zinco obtido a partir de uma chalcona-tiossemicarbazona foi preparado e avaliado contra células de leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL), causando apoptose, sem associação aparente com a geração de espécies reativas de oxigênio. Em seguida, uma série de ftalazinonas foi investigada contra células Huh-7. Uma delas, um híbrido ftalazinona-feniltiazol (**A3**), mostrou atividade promissora, afetando a função mitocondrial das células tratadas. Docagem molecular e cálculos semi-empíricos indicam que essa substância é capaz de interagir com a proteína pró-apoptótica Bax, sugerindo um possível mecanismo de ação para a **A3**. Por fim, o sal mesoiônico **MI-D** foi avaliado pela primeira vez em células de glioblastoma humano, tendo apresentado resultados relevantes.

Palavras-chave: câncer, inflamação, SARS-Cov-2

ABSTRACT

BARBOSA, Igor Resendes. **Synthesis and Biological Evaluation of Mesoionic Compounds, Chalcone-Thiosemicarbazones and Phthalazinones**, 2025, 524p. Thesis (Doctorate in Chemistry, with focus in Organic Chemistry). Institute of Chemistry, Department of Organic Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

In this thesis, different classes of compounds were developed, characterized, and evaluated for their activity against inflammatory, viral, and neoplastic diseases. In the first chapter, sulfonamide-sydnone hybrids were prepared and investigated for their anti-inflammatory and antiviral activity. They were able to reduce inflammation in an animal model of acute lung injury and inhibited SARS-CoV-2 replication in Calu-3 cells, exhibiting low cytotoxicity against uninfected cells. The synthesis and characterization of the compounds were conducted through routine spectroscopic techniques (IR, ^1H and ^{13}C NMR), high-resolution mass spectrometry, X-ray diffraction, and HPLC. *In silico* studies suggest that, overall, the class possesses adequate pharmacokinetic properties and can be considered good drug prototypes. Physicochemical studies revealed that these substances interact strongly with human serum albumin, which may result in prolonged retention time in the bloodstream. In the second chapter, substances with potential anticancer activity were investigated. Initially, 25 thiosemicarbazones derived from chalcones and azachalcones were synthesized and eight of them were tested against human hepatocellular carcinoma derived cells (Huh-7). The azachalcone derivatives stood out for their high potency – IC_{50} in the nanomolar range – associated with complexation with copper ions in the cellular medium. Subsequently, a zinc complex obtained from a chalcone-thiosemicarbazone was prepared and evaluated against adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) cells, causing apoptosis without apparent association with the generation of reactive oxygen species. Subsequently, a series of phthalazinones was investigated against Huh-7 cells. One of them, a phthalazinone-phenylthiazole hybrid (**A3**), showed promising activity, affecting the mitochondrial function of the treated cells. Molecular docking and semi-empirical calculations indicate that this substance can interact with the proapoptotic protein Bax, suggesting a possible mechanism of action for **A3**. Finally, the mesoionic salt **MI-D** was evaluated for the first time in human glioblastoma cells, yielding relevant results.

Keywords: cancer, inflammation, SARS-CoV-2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Deslocamentos químicos do RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) para 49a , 49b , 44a-d e 45a-d .	40
Tabela 1.2. Comprimentos de ligação e ângulos selecionados para 45a obtidos por DRX	42
Tabela 1.3. Algumas propriedades físico-químicas e adequação a regras de farmacossimilaridade previstas pela plataforma da web SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017)	45
Tabela 1.4. Toxicidade aguda em roedores prevista pela plataforma GUSAR Online (Lagunin et al., 2011)	45
Tabela 1.5. Resultados da previsão de atividade biológica feita pela plataforma Pass Online	47
Tabela 1.6. Concentração capaz de reduzir a replicação viral do SARS-CoV-2 em 50% (EC ₅₀) e concentração que causa redução ou morte celular em 50% da população de células (CC ₅₀)	51
Tabela 1.7. Parâmetros de Fluorescência em estado estacionário para a interação ASH: 44a em quatro temperaturas diferentes	56
Tabela 1.8. Parâmetros de fluorescência resolvida no tempo para a interação ASH: 44a em diferentes concentrações do híbrido (296 K).	57
Tabela 2.1. Células tumorais e características de mecanismo de reparo do DNA.	111
Tabela 2.2. Rendimentos e pontos de fusão das chalconas e azachalconas preparadas	136
Tabela 2.3. Valores de deslocamentos químicos (ppm) experimentais dos hidrogênios dos grupos NH central e NH ₂ terminal.	145
Tabela 2.4. Deslocamentos químicos (ppm) experimentais e calculados (EDF2/6,31G*) para CT1-2 .	147
Tabela 2.5. Deslocamentos químicos (ppm) experimentais e calculados (EDF2/6,31G*) para HCT1-2	148
Tabela 2.6. Deslocamentos químicos (ppm) experimentais e calculados (EDF2/6,31G*) para CPT1-2	148
Tabela 2.7. Deslocamentos químicos (ppm) experimentais e calculados (EDF2/6,31G*) para HCPT1-2 .	149
Tabela 2.8. Resultados da espectrometria de massas de alta resolução para as CPTs e seus derivados saturados inéditos.	159
Tabela 2.9. Valores de IC ₅₀ calculados para as tiossemicarbazonas, com base nos ensaios de MTT em 48 h de incubação a 37 °C, 5% de CO ₂ e atmosfera úmida.	150
Tabela 2.10. Algumas propriedades físico-químicas e adequação a regras de farmacossimilaridade previstas pela plataforma da web SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017).	156
Tabela 2.11. Resumo dos dados cristalográficos e de refinamento da estrutura do complexo CTCl-Zn .	192
Tabela 2.12. Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de ^{13}C das ftalazinonas A2-A5	217
Tabela 2.13. Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de ^{13}C das ftalazinonas B2-B4 .	224
Tabela 2.14. Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de ^{13}C das ftalazinonas A2-A5 .	232
Tabela 2.15. Coeficientes de similaridade de Tanimoto calculados pela plataforma ChemMine Tools (Backman; Cao; Girke, 2011).	241
Tabela 2.16. Valores de pontuação (adimensional) obtidos pela análise de docking molecular entre BAX (PDB: 2K7W) e as ftalazinonas A1-A5 ou os ativadores conhecidos, BAM-7 e 16 .	245
Tabela 2.17: Valores de entalpia de interação (ΔH_{int}), variação de energia das ligações de hidrogênio ($\Delta E_{\text{lig.H}}$) e variação das energia das forças de dispersão de London (ΔE_{disp}).	247
Tabela 2.18. Parâmetros de fluorescência em estado estacionário para a interação ASH: A3 em quatro temperaturas diferentes	253
Tabela 2.19. Parâmetros de fluorescência resolvida no tempo para a interação ASH: A3 (296 K). Ensaios realizados em PBS (pH 7,4) com a ASH na concentração de 1×10^{-5} M, excitação em 280 nm e emissão em 343.	254

Tabela 2.20. Porcentagem de hélice- α calculada a 209,5 e 220,7 nm para a ASH livre (PBS, pH = 7,4, 310 K) e na presença de A3 na temperatura de 310 K. [ASH] = 10^{-6} M; [A3] = 8×10^{-6} M.	256
Tabela 2.21. Principais interações para a pose de maior pontuação de A3 no sítio I da ASH.....	257
Tabela 2.22. Algumas propriedades físico-químicas e adequação a regras de farmacossimilaridade previstas pela plataforma da web SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017).	258
Tabela 2.23. Valores de rendimentos e pontos de fusão obtidos para os compostos T1 e CIM-NO2 , precursores do MI-D	284
Tabela 2.24. Mudança do meio de cultivo e sua influência na respiração celular.	290

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Glicocorticoides avaliados no tratamento de SRDA.	6
Figura 1.2. Algumas substâncias investigadas em estudos clínicos para o tratamento de SDRA.....	7
Figura 1.3. Antivirais aprovados para o tratamento da COVID-19.	10
Figura 1.4. Inibidor de JAK avaliado clinicamente em pacientes com SDRA associada a COVID-19	12
Figura 1.5. O primeiro antibiótico sintético eficaz desenvolvido na história (Prontosil Rubrum) e a sua forma ativa (sulfanilamida), resultado da metabolização do Prontosil Rubrum.	13
Figura 1.6. Novas sulfonamidas aprovadas em 2022 pela FDA para o tratamento de diversas condições.	13
Figura 1.7. Número de publicações por ano contendo a expressão “(sulfonamides OR sulfonamide) AND (ARDS OR ALI)” no título da publicação, abstract ou palavras-chave. Os dados compreendem a faixa de 1988 até maio de 2025.	14
Figura 1.8. Composto 1 e rota sintética para a sua obtenção. Condições das reações: (a) MeCN, 0°C, 12 h; (b) ácido clorosulfônico, MeCN, 0°C – 75°C, 2 h; (c) piridina, 4 h; (d) cloridrato de hidroxilamina, EtOH, refluxo, 14 h.	15
Figura 1.9. Composto 5 e rota sintética para a sua obtenção. Condições das reações: (a) piridina, refluxo, 4 h; (b) ácido acético glacial, refluxo, 3 h.	16
Figura 1.10. Composto 7 e rota sintética para a sua obtenção. Condições das reações: (a) CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, 0°C – temperatura ambiente; refluxo, 4 h; (b) MeCN, K ₂ CO ₃ , KI, 85°C.	17
Figura 1.11. Número de publicações por ano contendo a expressão “(sulfonamides OR sulfonamide) AND (COVID-19 OR SARS-CoV-2)” no título da publicação, abstract ou palavras-chave. Os dados compreendem a faixa de 2020 até maio de 2025.	18
Figura 1.12. LASSBio-1945 (12), inibidor da M ^{pro} do SARS-CoV-2.	18
Figura 1.13. Híbridos sulfonamida-chalcona (13-15) com atividade anti-SARS-CoV-2.	19
Figura 1.14. Inibidores da PL ^{pro} de SARS-CoV e SARS-CoV-2 e rota sintética para a sua obtenção. Condições das reações: (a) CH ₂ Cl ₂ , H ₂ O, NaHCO ₃ , 23°C, 12 h (b) EtOAc, Pd/C, H ₂ , 23°C, 12 h.....	20
Figura 1.15. Inibidores da nsp14 do SARS-CoV e SARS-CoV-2 e rota sintética para a sua obtenção. Condições das reações: (a) cloreto de benzenossulfonila adequado, Et ₃ N, DMF, 0°C (b) EtOTs, KI, K ₂ CO ₃ , DMF, 50°C, 18 h; (c) HCO ₂ H/H ₂ O (1:1 v/v), 25°C.....	21
Figura 1.16. Estruturas canônicas de ressonância das sidnonas (I-V) e uma representação usual em VI . A numeração dos átomos do heterociclo utilizada ao longo do trabalho é indicada na estrutura I	22
Figura 1.17. Comprimentos e ângulos de ligação da 4,4-dicloro-3,3-etileno-bis(sidnona) determinados por Thiessen e Hope (1967) e efeito anomérico proposto por Oziminski e Ramsden (2015).....	26
Figura 1.18. Derivados de ibuprofeno com atividade anti-inflamatória. Condições das reações: (a) <i>N</i> -metilformanilida, POCl ₃ , < 45°C; (b) aquecimento lento e brando; (c) EtOH, H ₂ SO ₄ , temperatura ambiente; (d) Formaldeído, aminas secundárias, EtOH, DMF, temperatura ambiente.	29
Figura 1.19. Bases de Mannich ativas contra o citomegalovírus (CMV). Condições de reação: (a) paraformaldeído, amina secundária, EtOH, CH ₃ CO ₂ H.	30
Figura 1.20. Estrutura das moléculas planejadas e principais objetivos do trabalho.	31
Figura 1.21. Espectros de IV de 49a e 44a-d (A), e 49b e 45a-d (A). Retângulos cinzas destacam as bandas atribuídas aos principais modos vibracionais.....	37
Figura 1.22. Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de 44a-d e 45a-d . Para facilitar a visualização, os hidrogênios da porção benzenossulfonila foram identificados em cor cinza, enquanto aqueles derivados das amino-fenil-sidnonas foram assinalados em preto.....	39
Figura 1.23. Estrutura cristalina do composto 44a com identificação dos átomos. Código de cores: C (cinza), N (azul), S (amarelo), O (vermelho) e H (branco).	41
Figura 1.24. Detalhes do empacotamento cristalino, exibindo a cadeia supramolecular unidimensional (1D) ao longo do eixo cristalográfico b para o composto 44a . As linhas pretas indicam a ligação de hidrogênio entre os grupos sulfonamida e sidnona de moléculas vizinhas. Códigos de simetria para geração de átomos equivalentes: (i) 1+x, 1+y, +z.....	42
Figura 1.25. Modelo BOIELD-egg para 44a-d e 45a-d . BBB: absorção pela barreira hematoencefálica. HIA: absorção intestinal humana. PGP+: substrato para a P-gp. PGP- : não é substrato para a P-gp. ...	44
Figura 1.26. Redução da resazurina à resorufina em células metabolicamente ativas.....	48

Figura 1.27. Representação ilustrativa do ensaio do Cristal Violeta utilizado para avaliar a citotoxicidade das sulfonamidas-sidnonas em células Vero E6	48
Figura 1.28. Gráficos de citotoxicidade para (A) 44a-44d e (B) 45a-45d em células Calu-3, obtidos pelo método da resazurina. 2×10^5 células/poço foram incubadas com ou sem as sulfonamidas-sidnonas em concentrações na faixa de 50-800 μM . Após 72 h a 37 °C e atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a viabilidade foi avaliada por meio do ensaio de resazurina (Excitação: 560 nm; Emissão: 590 nm). As barras representam valores de erro padrão da média (SEM); as médias e SEM foram calculados com dados de quatro experimentos independentes, cada um em triplicata. Gráficos de citotoxicidade para (C) 44a-44d e (D) 45a-45d em células Vero E6. 2×10^4 células/poço foram tratadas com diferentes concentrações das sulfonamidas-sidnonas (50-800 μM) por 72h, a 37 °C e atmosfera úmida com 5% de CO_2 . A viabilidade foi avaliada pelo método do Cristal Violeta. As barras representam valores de erro padrão da média (SEM); as médias e SEM foram calculados com dados de um experimento em triplicata.	49
Figura 1.29. Replicação do SARS-CoV-2, medida em PFU/mL, após o tratamento com (A) 44a-44d e (B) 45a-45d . RDV foi utilizado como controle positivo. [44a-44d] = [45a-45d] = 10, 5,0, 2,5, 1,25 e 0,0 μM . [RDV] = 10, 1,0, 0,1, 0,01 e 0,0 μM . Células Calu-3 ($2,0 \times 10^5$ células por poço) foram infectadas com MOI de 0,1 por 1h à 37 °C e 5% de CO_2 . Após remoção do inóculo e adição do meio e das sulfonamidas-sidnonas, as células foram incubadas por 48 h e o vírus quantificado pelo ensaio de redução de placas de lise em células Vero E6 ($2,0 \times 10^4$). Os ensaios foram feitos em quadruplicatas independentes e os resultados apresentados como média \pm SEM.	50
Figura 1.30. Microfotografias de luz e gráficos representativos ilustram os efeitos do pré-tratamento com compostos nas alterações histológicas da SDRA induzida por LPS em camundongos. A análise histológica (A, B) foi avaliada 24 horas após a administração de LPS em camundongos. Cada ponto representa a média (SEM) de 6 camundongos. * $P \leq 0,05$ em comparação com o veículo (Veic) do LPS e # $P \leq 0,05$ em comparação com o veículo dos compostos (Veic1). A ANOVA unidirecional seguida do teste post-hoc de Tukey foi aplicada	52
Figura 1.31. Efeito do pré-tratamento com os compostos sobre a infiltração leucocitária no LBA (A) e o peso pulmonar (B), avaliados 24 horas após a administração de LPS em camundongos. Cada ponto representa a média e erro (SEM) de 6-8 animais. * $P \leq 0,05$ em comparação com o veículo (Veic) do LPS e # $P \leq 0,05$ em comparação com o veículo dos compostos (Veic1). A ANOVA unidirecional seguida pelo teste post-hoc de Tukey foi aplicada	54
Figura 1.32. (A) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) para ASH (4,0 μM) na ausência e na presença de 44a (0,0; 0,2; 0,6; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 μM), a 310 K. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a interação HSA: 44a em PBS a 296, 303, 310 e 317 K. (C) Decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo para HSA (4,0 μM) na ausência e na presença de 44a , na maior concentração da sulfonamida-sidnona empregada na análise de fluorescência em estado estacionário (8,0 μM), a 296 K.	55
Figura 1.33. (A) Gráfico de Van't Hoff baseado nos valores de K_{SV} para ASH: 44a . (B) Valores de K_{SV} para ASH: 44a na ausência e presença das sondas varfarina (WARF), ibuprofeno (IBU) e difitoxina (DIG) a 310 K. (C) Estrutura secundária (%) na albumina livre (4 μM) e ASH: 44a (1:8).	58
Figura 1.34. Poses obtidas no <i>docking</i> molecular dos compostos (A) 44a-44d e (b) 45a-45d no subdomínio IIA da albumina, com a respectiva ampliação e o mapa de potencial eletrostático da proteína. (C) Principais resíduos de aminoácidos e forças de interação envolvidos na interação ASH: 44a no subdomínio IIA. (D) Sobreposição da melhor pose de 44a (em verde) na ASH com os dados cristalográficos do complexo ASH:sulfassalazina (em cinza, código PDB 6R7S) no subdomínio IIA, destacando o principal fluoróforo da proteína (resíduo Trp-214). Átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Átomos de enxofre, nitrogênio, oxigênio e cloro estão representados em amarelo, azul-escuro, vermelho e verde, respectivamente.	60
Figura 2.1. Principais terapias aprovadas para o tratamento de hepatocarcinoma em estágio avançado. Os tratamentos de primeira linha estão destacados em laranja. Os de segunda linha estão destacados em roxo. Tratamentos diferentes aprovados no mesmo ano são separados por uma linha pontilhada	99
Figura 2.2. Estrutura da zidovudina, utilizada em combinação com interferon- α no tratamento de ATLL.	104
Figura 2.3. Um dos regimes quimioterápicos utilizados no tratamento de ATLL.	105

Figura 2.4. Brentuximabe Vedotina. Hidrólise do espaçador pela ação de proteases e liberação de monometil auristatina E mediante clivagem autoimolativa do grupo para-aminobenziloxicarbonil..	106
Figura 2.5. Inibidor da interação entre tax-1 (HTLV-1) e a proteína humana DLG1.	107
Figura 2.6. Mecanismo de ação da temozolomida.	109
Figura 2.7. Ésteres derivados da TMZ, suas citotoxicidades e principais propriedades farmacocinéticas determinadas experimentalmente.	112
Figura 2.8. Novos derivados da TMZ com perfis de lipofilicidade e estabilidade superiores. As setas vermelhas indicam como grupos retiradores (por ressonância) em C8 influenciam a disponibilidade do par de elétrons do N imidazólico. clogP: logP calculado teoricamente	114
Figura 2.9. Novos derivados da TMZ com perfis de lipofilicidade e estabilidade superiores. clogP: logP calculado teoricamente. Estabilidade (2 h): porcentagem do derivado que permanece intacto após 2 horas em PBS (pH 7,4)	115
Figura 2.10. Estrutura de alguns agentes quimioterápicos investigados no tratamento de glioblastoma.	116
Figura 2.11. Estrutura básica das tiossemicarbazonas e de 2-amino-tiadiazóis. Estrutura de uma das tiossemicarbazonas testadas por Domagk e colaboradores (Domagk et al., 1946).	119
Figura 2.12. Tiossemicarbazonas utilizadas no tratamento de tuberculose (tiacetazona e perclozona) ou investigada como agente profilático contra a varíola (metisazona)	120
Figura 2.13. Número de artigos originais encontrados pela plataforma Scopus pela busca com os termos “(thiosemicarbazone OR thiossemicarbazones)”	121
Figura 2.14. Número de artigos originais encontrados pela plataforma Scopus pela busca com os termos [(“thiosemicarbazone OR thiossemicarbazones) AND (cancer OR anticancer)]”	122
Figura 2.15. Esqueleto principal de uma tiossemicarbazona α -(N)-heterocíclica e estrutura geral de complexos formados entre essas moléculas e metais de transição. Os pontos de coordenação desses ligantes encontram-se destacados em amarelo. Estrutura das primeiras tiossemicarbazonas contendo o grupo “N-N-S” (20-22) avaliadas em estudos clínicos para o tratamento de câncer.	123
Figura 2.16. Tiossemicarbazona desenvolvida pela <i>Critical Outcome Technologies Inc</i> como um potente agente anticâncer capaz de ativar a proteína p53.	125
Figura 2.17. Estrutura das moléculas da série DpT (Yuan; Lovejoy; Richardson, 2004).	125
Figura 2.18. Estrutura dos híbridos Chalcona-Tiossemicarbazonas preparados e avaliados pelo grupo NUSQUIMED.	127
Figura 2.19. Estrutura das moléculas planejadas e principais objetivos do trabalho.	128
Figura 2.20. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da mistura obtida na etapa de hidrogenação da chalcona C1.	132
Figura 2.21. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) da mistura obtida na etapa de hidrogenação da chalcona C1.	133
Figura 2.22. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) de HCP1 e HCP2 purificados por cromatografia em coluna	134
Figura 2.23. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz) de HCP1 e HCP2 purificados por cromatografia em coluna	135
Figura 2.24. Espectro de HMBC da dihidro-azachalcona HCP1	135
Figura 2.25. Espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas CT1-2, HCT1-2, CPT1-2, HCPT1-2.	137
Figura 2.26. Isômeros E e Z observados nos espectros de RMN dos híbridos preparados no presente trabalho e ilustração do efeito NOE esperado para o isômero E.	139
Figura 2.27. RMN de ^1H de CT3 (R= p-Cl) imediatamente após dissolução (A) e dias depois (B). RMN de ^1H de HCT1 (R = H) imediatamente após dissolução (C) e dias depois (D). Foram destacados por um retângulo azul alguns dos sinais que surgem ou aumentam em intensidade com o passar do tempo em solução.	140
Figura 2.28. RMN de ^1H de CPT2 (R= p-F) imediatamente após dissolução (A) e dias depois (B). RMN de ^1H de HCPT1 (R = H) imediatamente após dissolução (C) e dias depois (D). Foram destacados por um retângulo azul alguns dos sinais que surgem ou aumentam em intensidade com o passar do tempo em solução.	141

Figura 2.29. Experimentos de NOESY. Espectros das substâncias CT3 (R= <i>p</i> -Cl, A), CPT2 (R= <i>p</i> -F, B), HCT1 (C) e HCPT1 (R= H, D) foram obtidos ao menos um dia após a dissolução em DMSO- <i>d</i> ₆ . Linhas pontilhadas indicam interação a distância entre o N-H central da tiossemicarbazona e algum hidrogênio olefínico ou alifático em isômeros <i>E</i>	142
Figura 2.30. Estrutura dos confôrmers mais estáveis (CT1-2 , HCT1-2) obtidos nos cálculos de distribuição de confôrmers (<i>MMFF corrected</i>) e otimização de geometria (EDF2/6-31G*). Em laranja destaca-se a proximidade de um dos hidrogênios do grupo NH ₂ terminal com o nitrogênio imínico – o que deve possibilitar uma ligação de hidrogênio intramolecular. Em verde destaca a proximidade do hidrogênio do grupo NH central da extremidade do campo de proteção anisotrópico do anel benzênico.	144
Figura 2.31. Estrutura dos confôrmers mais estáveis (CPT1-2 , HCPT1-2) obtidos nos cálculos de distribuição de confôrmers (<i>MMFF corrected</i>) e otimização de geometria (EDF2/6-31G*). Em laranja destaca-se a proximidade de um dos hidrogênios do grupo NH ₂ terminal com o nitrogênio imínico – o que deve possibilitar uma ligação de hidrogênio intramolecular. Em verde destaca a proximidade do hidrogênio do grupo NH central da extremidade do campo de proteção anisotrópico do anel benzênico.	145
Figura 2.32. Ação das tiossemicarbazonas não piridínicas (A) e piridínicas (B) contra células Huh-7. Cerca de 1,3x10 ⁴ células Huh-7 (placa de 48 poços) foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%), CT1-2 ; HCT1-2 (5-75 µM) ou CPT1-2 ; HCPT1-2 (0,01-0,30 µM). Após 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO ₂ , a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT (n ≥ 3). Os resultados representam a média ± erro-padrão da média	150
Figura 2.33. Influência do tetratiomolibdato de amônio (TTM) sob a ação citotóxica das tiossemicarbazonas não piridínicas (A) e piridínicas (B) contra células Huh-7. Cerca de 1,3x10 ⁴ células Huh-7 (placa de 48 poços) foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%), CT1-2 , HCT1-2 (5-75 µM) ou CPT1-2 , HCPT1-2 (0,01-0,30 µM), na ausência ou presença de TTM (5 µM). Após 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO ₂ , a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT (n ≥ 1). Os resultados representam a média ± erro-padrão da média	152
Figura 2.34. Representação dos pontos de coordenação presentes nos híbridos CT1-2 , HCT1-2 , CPT1-2 e HCPT1-2	153
Figura 2.35. Azachalconas-tiossemicarbazonas exploradas pelo grupo de Des R. Richardson (Dharmasivam et al., 2023).....	154
Figura 2.36. Modelo BOIELD-egg para as tiossemicarbazonas. BBB: absorção pela barreira hematoencefálica. HIA: absorção intestinal humana. PGP+: substrato para a P-gp. PGP- : não é substrato para a P-gp. Região amarela indica boa permeabilidade pela barreira hematoencefálica. Região branca indica boa absorção gastrointestinal.....	155
Figura 2.37. Estrutura de complexos metálicos investigados em células infectadas pelo vírus HTLV-1.	175
Figura 2.38. Estrutura de complexos de Zn (II) planejado (CTCl-Zn)	176
Figura 2.39. Sobreposição dos espectros de IV do CTCl-Zn (superior, preto) e CTCl (inferior, vermelho). A expansão da região de estiramento axial C=S é mostrada. Foram destacadas em azul algumas das bandas que sofrem mudanças mediante complexação com o Zn(II).	178
Figura 2.40. Espectros de UV-Vis normalizados e de fluorescência do estado estacionário normalizado do ligante (CTCl) e do complexo de Zn(II) (CTCl-Zn)	179
Figura 2.41. RMN de ¹ H de CTCl e CTCl-Zn em DMSO- <i>d</i> ₆ . (A) RMN de ¹ H de CTCl imediatamente após dissolução: os sinais correspondem ao isômero <i>Z</i> . (B) RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de CTCl dois dias após ser dissolvido: sinais dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i> são observados – para melhor clareza, somente alguns deles foram atribuídos na imagem. (C) RMN de ¹ H do CTCl-Zn (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	180
Figura 2.42. Fatores que devem contribuir para a não equivalência dos hidrogênios do grupo NH ₂ no ligante (A e B)	180
Figura 2.43. RMN de ¹ H (400 MHz) do complexo CTCl-Zn em DMSO- <i>d</i> ₆ na ausência (A) ou presença de gotas de água deuterada (B).	181
Figura 2.44. Mudanças no complexo que devem tornar os hidrogênios do grupo NH ₂ equivalentes.	182

Figura 2.45. Sobreposição dos espectros de RMN de ^{13}C do ligante livre (vermelho) (125 mHz, DMSO- d_6) e do complexo (ciano) (100 mHz, DMSO- d_6), destacando os carbonos 1 e 16.....	182
Figura 2.45. (A) Estrutura cristalográfica de CTCl-Zn : átomos de hidrogênio e DMSO de cristalização foram omitidos para melhor clareza. (B) Comprimentos de ligação (Å) e ângulos ($^\circ$) para o complexo CTCl-Zn . (C) Detalhes do empacotamento cristalino mostrando a cadeia supramolecular 1D. Código de cores: C (cinza), N (azul), S (amarelo), Cl (verde) e Zn (rosa). Linhas pontilhadas verdes indicam ligações de hidrogênio envolvendo o complexo e moléculas de DMSO	184
Figura 2.46. Efeito dos compostos na viabilidade dos náuplios de <i>Artemia Salina</i> . Doze náuplios foram transferidos para cada poço (placa de 24 poços) com ou sem (A) CTCl , CTCl-Zn ou (B) cisplatina (25, 50, 100 e 200 μM). Náuplios mantidos apenas em água salina artificial (CT) ou tratados com DMSO (0,4%) foram usados como controles negativos, e DMSO 10% foi usado como controle positivo de morte dos náuplios. Após 24 h em temperatura ambiente, foi realizada avaliação de sobrevivência usando microscópio estereoscópico, considerando náuplios mortos aqueles que não apresentavam movimentos	185
Figura 2.47. O tratamento com CTCl e seu complexo de Zn reduziu a viabilidade das células MT-2. 2×10^5 células/ml foram incubadas com ou sem (A) DMSO (0,2%), CTCl , CTCl-Zn ou (B) cisplatina em concentrações na faixa de 1,56–50 μM . Após 48 h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT. * $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação aos controles negativos (CT e DMSO). # $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação com CTCl (25–1,56 μM) ou CTCl-Zn (25–1,56 μM).	186
Figura 2.48. (A) Ilustração dos eventos característicos de apoptose e função das sondas fluorescentes. (B) 2×10^5 células/ml foram incubadas com ou sem DMSO (0,1%), CTCl ou CTCl-Zn (50 μM). Após 24 h a 37°C em uma atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a viabilidade celular foi avaliada por meio de uma coloração de Anexina V/7AAD. * $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação aos controles negativos (CT e DMSO).	187
Figura 2.49. (A) Ilustração exemplificando o comportamento fluorogênico da sonda DHR-123 na presença de ROS. (B) 2×10^5 células/ml foram incubadas com ou sem DMSO (0,1%), CTCl ou CTCl-Zn (50 μM) por 1 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Em seguida, as células foram coradas com a sonda DHR-123 (1 μM) por 30 min nas mesmas condições. Células tratadas com 3% de H_2O_2 foram usadas como controle positivo (CT^{pos}). A intensidade de fluorescência (IF) foi determinada por citometria de fluxo e o valor da mudança de fluorescência foi calculado pela razão entre o IF do controle e IF dos tratamentos. (C) Processo de marcação de CD25 pelo anticorpo conjugado à Ficoeritrina. (D) O tratamento com chalcona-tiossemicarbazonas reduziu a expressão de CD25 em células MT-2. 2×10^5 células/ml foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%), CTCl ou CTCl-Zn (50 μM). Após 24 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a expressão de CD25 foi determinada utilizando um anticorpo específico por citometria de fluxo. O valor da variação de fluorescência foi determinado conforme descrito anteriormente, utilizando como valor de referência a fluorescência na presença de DMSO. * $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação com DMSO.	188
Figura 2.50. Estrutura do núcleo piridazínico e seus derivados oxigenados. Estrutura de algumas substâncias aprovadas como fármacos ou que alcançaram alguma etapa em estudos clínicos.....	196
Figura 2.51. Inibidores de quinases 33-34 . Condições das reações: (a) H_2O , refluxo; (b) POCl_3 , refluxo; (c) NH_4OH , 130°C; (d) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$, refluxo; (e) dioxano, NaHCO_3 , H_2O , 120°C, 48 h (Elagawany et al., 2013)	197
Figura 2.52. Síntese da ftalazinona 43 . Condições das reações: (a) NH_2NH_2 , $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, 120 °C (b) POBr_3 , DCE, refluxo; (c) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, 120 °C; (d) NaH , DMF, temperatura ambiente; (e) éster de pinacol do ácido 1-metilpirazol-4-borônico, $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$, Na_2CO_3 , H_2O , dioxano, N_2 , refluxo; (e) dioxano, NaHCO_3 , H_2O , 120°C, 48 h (Wang et al., 2018b).....	198
Figura 2.53. Síntese da ftalazinona 48 . Condições das reações: (a) NaOMe , MeOH , EtOAc , 70°C-refluxo; (b) Hidrazina monohidrato, H_2O , refluxo; (c) MeI , K_2CO_3 , MeCN , 80 °C; (d) HCl , 1,4-dioxano/ CH_2Cl_2 , 0°C-temperatura ambiente; (e) isocianato de clorosulfonila, t-BuOH , NEt_3 , CH_2Cl_2 , 0°C-temperatura ambiente (Cho et al., 2023)	199
Figura 2.54. Estrutura das ftalazinonas preparadas no presente trabalho	200

Figura 2.55. Análise retrossintética completa para a obtenção das ftalazinonas e seus principais precursores.	201
Figura 2.56. Síntese do ácido 2-acetil-benzóico	202
Figura 2.57. Mecanismo de formação do anidrido ftálico	202
Figura 2.58. Mecanismo proposto para a formação de A1 e decomposição do ácido malônico sob aquecimento.	204
Figura 2.59. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do ácido 2-acetilbenzóico. Espectro corresponde majoritariamente a forma cíclica (3-hidroxi-3-metil-ftalida).	205
Figura 2.60. Primeira tentativa de síntese de A2-TAM por irradiação em microondas (M.O.) convencional.	205
Figura 2.61. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de A2 obtido pela reação entre o ácido 2-acetilbenzóico e tiossemicarbazida em microondas.	206
Figura 2.62. RMN de ^{13}C de A2 (125 MHz, DMSO-d_6) obtido pela reação entre o ácido 2-acetilbenzóico e tiossemicarbazida em microondas	206
Figura 2.63. HMBC de A2 (125 MHz, DMSO-d_6) obtido pela reação entre o ácido 2-acetilbenzóico e tiossemicarbazida em micro-ondas. Para maior clareza, somente algumas correlações encontram-se destacadas pelas linhas pontilhadas vermelhas	207
Figura 2.64. Síntese de A2 em etanol sob refluxo, na presença de quantidade catalítica de ácido acético glacial. Aliquotas da reação foram coletadas nos tempos indicados e a CCD foi realizada em Hexano:EtOAc:AcOH (75:24,5:0,5 v/v/v, duas corridas sequenciais). R corresponde à alíquota coletada na reação. Setas e letras brancas indicam os produtos formados durante a reação. O tempo 0 min corresponde a alíquota coletada com 15 minutos de reação à temperatura ambiente, sem qualquer aquecimento; o tempo indicado nas demais placas correspondem ao tempo em que a reação permaneceu em refluxo.	208
Figura 2.65. Análise do sólido isolado na reação entre A1 e tiossemicarbazida. (A) Placa à esquerda: duas corridas sequenciais em Hexano:EtOAc:AcOH (75:24,5:0,5 v/v/v) – nesta placa, ambas as corridas são referentes a mesma mistura, sendo à esquerda mais concentrada e à direita mais diluída; Placa à direita: três corridas sequenciais em clorofórmio. (B) RMN de ^1H de uma amostra pura de A2 (espectro superior) e da mistura isolada na reação (espectro inferior). Os sinais de A2 foram atribuídos em preto e os sinais de A2-TAM em vermelho. (C) Ligação de hidrogênio intramolecular esperada para A2-TAM e ressonâncias do par de elétrons do nitrogênio amídico.	210
Figura 2.66. RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO-d_6) de A2 puro (espectro preto) e da mistura composta por A2 + A2-TAM (espectro ciano).	211
Figura 2.67. Reação entre A1 e tiossemicarbazida em etanol, na presença de quantidade catalítica de ácido acético glacial. A reação foi realizada à temperatura ambiente por 40 horas (CCD fotografada somente até 24 h). Em seguida a reação foi aquecida à 45 °C e a CCD realizada nos tempos de 2 h e 10 h [Hexano:EtOAc:AcOH (75:24,5:0,5 v/v/v), duas corridas sequenciais]. No tempo de 10 h, a CCD foi repetida utilizando CHCl_3 como eluente (três corridas consecutivas)	212
Figura 2.68. (A) Imagem da cromatografia preparativa após 5 corridas em clorofórmio (B) CCD após extração do material presente na mancha atribuída à A2-TAM . Após a última eluição com clorofórmio o material foi mantido na sílica por ~12 h a temperatura ambiente e mais ~60 em -20 °C antes de ser extraído com MeOH:THF	213
Figura 2.69: (A) Mecanismo proposto para a decomposição de A2-TAM . (B) Estrutura das demais moléculas planejadas para a série A.	214
Figura 2.70. Rota para a síntese de A3 , A4 e A5	214
Figura 2.71. Espectros de infravermelho de A2-A5	215
Figura 2.72. Comparação dos espectros de RMN de ^1H de todas as ftalazinonas da série A. A2 , A3 e A4 foram obtidos em DMSO-d_6 (500 MHz) e A5 em CDCl_3 (500 MHz)	216
Figura 2.73. Análise de A3 por espectrometria de massas de alta resolução.	217
Figura 2.74. (A) Unidade assimétrica do cristal obtido em solução de metanol:clorofórmio. Linhas pontilhadas em ciano indicam interações intermoleculares ou intramoleculares. (B) Estrutura cristalina do composto A3 com identificação de alguns átomos e comprimento de algumas ligações. Código de cores: C (cinza), N (azul), S (amarelo), O (vermelho) and H (branco).	219
Figura 2.75. Síntese da chalcona B1 (A) e das ftalazinonas da série B (B).	220

Figura 2.76. Espectros de infravermelho das ftalazinonas da série B .	221
Figura 2.77. RMN de ^1H (500 mHz, DMSO- d_6) de B1 (espectro superior) e RMN de ^{13}C (125 mHz, DMSO- d_6) de B1 .	222
Figura 2.78. Comparação dos espectros de RMN de ^1H (500 mHz, DMSO- d_6) de todas as ftalazinonas da série B .	223
Figura 2.79. Rota de síntese dos compostos da série C .	227
Figura 2.80. Espectros de CG/MS para B4 e C4 .	227
Figura 2.81. Cromatograma (HPLC) de uma alíquota coletada 15 horas após início da hidrogenação.	228
Figura 2.82. Espectro de infravermelho das ftalazinonas C2-C4 .	229
Figura 2.83. Comparação dos espectros de IV de B2-B4 e C2-C4 , destacando a supressão da absorção referente ao dobramento angular C-H de alceno trans-1,2.	230
Figura 2.84. Comparação dos espectros de RMN de ^1H de todas as ftalazinonas da série B . Espectro de C2 obtido em DMSO- d_6 (500 mHz) e de C3 e C4 obtido em CDCl_3 (500 mHz).	231
Figura 2.85. A3 é a ftalazinona mais ativa contra células Huh-7. Cerca de $1,3 \times 10^4$ células (placa de 48 poços) foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%) ou as ftalazinonas à 50 μM (A1-A5 , B1 , B2 , C2 , C4) ou 10 μM (B3 , B4 , C3). Após 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT ($n \geq 3$). Os resultados representam a média \pm erro-padrão da média e *** $P = 0,0001$ e **** $P < 0,0001$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação ao controle de células tratadas com DMSO (0,2%).	233
Figura 2.86. Determinação do IC_{50} de A3 contra células Huh-7 e MT2. (A) Cerca de $1,3 \times 10^4$ células Huh-7 (placa de 48 poços) foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%), ou A3 em concentrações na faixa de 5–50 μM . Após 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT ($n = 7$). (B) Cerca de 4×10^4 células MT2 (placa de 96 poços) foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%), ou A3 em concentrações na faixa de 1–50 μM . Após 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT ($n = 6$). Os resultados representam a média \pm erro-padrão da média e * $P < 0,05$, *** $P = 0,0005$, **** $P < 0,0001$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação ao controle, considerado 100% de viabilidade.	235
Figura 2.87. A3 afeta a função mitocondrial de células Huh-7. (A) Cerca de $6,24 \times 10^5$ células (placa de petri, 60 cm^2) foram incubadas com ou sem A3 (7,5 μM). Após 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , as células foram re-suspensas e $3 \sim 5 \times 10^6$ foram transferidas para o oxígrafo. As colunas representam as taxas de consumo de oxigênio em condições distintas [Basal: sem adição de qualquer substância; respiração em estado leak (OLIGO): adição de oligomicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); respiração máxima (FCCP): adição de FCCP (1 μM)]. Os resultados representam a média \pm erro-padrão da média. ns= diferença não significativa. *** $P < 0,0005$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação ao controle.	238
Figura 2.88. Estruturas do A3 e dos ativadores de BAX 16 e BAM-7 .	239
Figura 2.89. Método dos Pares Atômicos para a Acetona e 2-metilpropeno, de acordo com a publicação original de Carhart e colaboradores (1985). Um ponto (“.”) após o símbolo de um átomo indica a presença de um elétron π ligante. O sufixo Xn após o símbolo de um átomo indica a presença de n átomos diferentes de hidrogênio conectados ao átomo em questão. O número em parênteses, por sua vez, indica a distância entre os átomos do Par Atômico, representada pelo número de átomos que os separam, somados de 2. Por exemplo, na acetona, o carbono da metila está ligado a um átomo diferente de hidrogênio (CX_1) e o carbono da carbonila está ligado a três átomos diferentes de hidrogênio, além de possuir um elétron π ligante ($\text{C} \cdot \text{X}_3$) – não há átomos separando-os, portando o número em parênteses é (0+2 = 2) e o Par atômico entre esses dois átomos é descrito como $\text{CX}_1\text{-(2)-C} \cdot \text{X}_3$. As caixas tracejadas indicam os Pares Atômicos em comum entre a acetona e o 2-metilpropeno.	241
Figura 2.90. (A) Perfil de interação entre A3 (branco) e a proteína BAX (2K7W, verde), analisado via PLIP (Schake et al., 2025). (B) Sobreposição de A3 e α -hélice de BIM (ciano) em sua pose original obtida do PDB. A superfície da proteína BAX é mostrada em verde e os resíduos de aminoácidos do peptídeo BIM estão nomeados em preto. Imagens geradas com o software PyMOL Molecular Graphics (Delano Scientific LLC software, Schrodinger, New York, USA, Yuan; Chan; Hu, 2017). Linha	

tracedada laranja indica interação do tipo cátion- π ; ligação de hidrogênio é indicada por linha azul; interações hidrofóbicas são indicadas por linhas tracejadas cinzas.....	243
Figura 2.91. As ftalazinonas inativas contra Huh-7 (A2 , A4 , A5) assumem uma pose preferencial diferente de A3 . Perfil de interação entre a proteína BAX (PDB: 2K7W, verde), A2 (A, roxo), A4 (B, amarelo) e A5 (C, salmão). (D) Sobreposição das melhores poses de A2-A5 na proteína BAX, com sua superfície em verde. Interações analisadas via PLIP. Imagens geradas com o software PyMOL Molecular Graphics (Delano Scientific LLC software, Schrodinger, New York, USA). Ligações de hidrogênio são indicadas por uma linha azul e interações hidrofóbicas por linhas tracejadas cinzas.	244
Figura 2.92. A3 assume uma pose semelhante à dos ativadores conhecidos da proteína BAX (16 e BAM-7). Perfil de interação entre a proteína BAX (PDB: 2K7W, verde), 16 (A, laranja), BAM-7 (B, azul). (C) Sobreposição das melhores poses de 16 , BAM-7 e A3 na proteína BAX, com a superfície da proteína em verde. Interações analisadas via PLIP. Imagens geradas com o software PyMOL Molecular Graphics (Delano Scientific LLC software, Schrodinger, New York, USA). Ligações de hidrogênio são indicadas por uma linha azul e interações hidrofóbicas por linhas tracejadas cinzas.	245
Figura 2.93. A3 e BAM-7 também podem assumir outra pose na cavidade da BAX. Perfil de interação entre a proteína BAX (PDB: 2K7W, verde), A3 (A, branco), BAM-7 (B, azul). (C) Sobreposição de A3 e BAM-7 em suas poses secundárias, com a superfície da proteína em verde. (D) Sobreposição de A3 em suas poses principal e secundária. (E) Sobreposição de BAM-7 em suas poses principal e secundária. (F) Sobreposição de A3 e BAM7 em suas poses secundárias com o peptídeo de BIM. Interações analisadas via PLIP. Imagens geradas com o software PyMOL Molecular Graphics (Delano Scientific LLC software, Schrodinger, New York, USA). Ligações de hidrogênio são indicadas por uma linha azul e interações hidrofóbicas por linhas tracejadas cinzas.	246
Figura 2.94. Espectros de absorção (A) e emissão (B, ex. 295nm) de A3 (1,7 μ M-13,2 μ M) em tampão fosfato (pH 7,4). Os espectros em vermelho estão dentro da faixa de linearidade da relação concentração vs absorbância (conforme gráfico inserido). As concentrações em que o comportamento linear não é mais observado são apresentadas por espectros em preto. Seta azul indica aumento na leitura de absorbância devido à dispersão do feixe luminoso pela amostra precipitada.	250
Figura 2.95. Espectros de absorção (A) e fluorescência (B) da albumina em tampão fosfato (pH 7,4) na presença de diferentes concentrações de A3 (0,0 μ M – 13,2 μ M).....	251
Figura 2.96. (A) Gráficos de Stern-Volmer para a interação ASH(10^{-5} M): A3 em PBS (pH 7,4) a 300, 305, 310 e 315 K. (B) Gráfico do $\log [(F_0-F)/F]$ vs. $\log [A3]$ para ASB: A3 a 300, 305, 310 e 315 K. (C) Gráfico de Van't Hoff baseado nos valores de K_{SV} para ASH: A3 . (D) Decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo a 298 K para a ASH (10^{-5} M) na ausência (cinza) e na presença de A3 (13,2 μ M, vermelho); a curva em laranja corresponde à resposta temporal do equipamento ao pulso de excitação em 280 nm (IRF, <i>Instrument Response Function</i>).....	254
Figura 2.97. (A) Gráfico de Stern-Volmer para a interação ASH (1×10^{-5} M): A3 em PBS (pH 7,4) a 310K na ausência (A3) ou presença de 1×10^{-5} M de ibuprofeno (IBU), digitoxina (DIG) ou varfarina (VAR). (B) Constantes de Stern-Volmer obtidas nos ensaios de competição na ausência (A3) ou presença de ibuprofeno (IBU), digitoxina (DIG) ou varfarina (VAR). (C) Espectro de dicroísmo circular da albumina (10^{-6} M, 310 K) na ausência ou presença de A3 (8×10^{-6} , proporção 1:8 de ASH: A3).	256
Figura 2.98. Docking do híbrido-feniltiazol no sítio I (subdomínio IIA) da albumina sérica humana (PDB: 1N5U). Interações analisadas via PLIP. Imagens geradas com o programa PyMOL Molecular Graphics (Delano Scientific LLC software, Schrodinger, New York, USA). Ligações de hidrogênio são indicadas por uma linha azul e interações hidrofóbicas por linhas tracejadas cinzas.	257
Figura 2.99. Modelo BOILED-egg para A3 . BBB: absorção pela barreira hematoencefálica. HIA: absorção intestinal humana. PGP+: substrato para a P-gp. PGP- : não é substrato para a P-gp.	258
Figura 2.100. Rota de síntese dos compostos de Busch. 63 , 62a e 62a correspondem às estruturas corretas dos mesoiônicos 55 e 56 , conforme proposto por Schönberg, Baker e Ollis (Baker; Ollis, 1957; Baker; Ollis; Poole, 1949; Schönberg, 1938).....	274
Figura 2.101. Rota de síntese das 1,3,4-tiadiazólio-2-amidinas e seus cloridratos proposta por David Ollis e Christopher A. Ramsden (Ollis; Ramsden, 1971).....	275
Figura 2.102. Algumas metodologias utilizadas por Grashey et al. para a síntese de sais de 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas (Grashey; Baumann; Hamprecht, 1972).	276

Figura 2.103. Síntese de sais de 1,3,4-tiadiazólio-2-benzilideno-hidrazinídeos (Cawkill et al., 1976, 1979).	277
Figura 2.104. Rota sintética para a preparação do composto mesoiônico tipo 61b e condições de rearranjo para o sistema 1,3,4-triazólio-2-tiolato (61a) (Echevarria et al., 1995; Montanari et al., 1994; Sandali, 1993).	278
Figura 2.105. Estruturas cristalinas do cloridrato de 4-fenil-5-(4-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (esquerda) e 1,4,5-trifenil-1,3,4-triazólio-2-tiolato (direita) (Cheung et al., 1992, 1993).....	278
Figura 2.106. Novos métodos sintéticos descritos por Kappel et al. para a preparação de cloretos de 1,3,4-tiadiazólio (Kappel; Yokum; Barany, 2004).....	279
Figura 2.107. Síntese de sais mesoiônicos assistida por micro-ondas e ultrassom.	280
Figura 2.108. Análise retrosintética para o preparo do MI-D .	282
Figura 2.109. RMN de ^1H do MI-D (500 MHz, DMSO- d_6).	285
Figura 2.110. RMN de ^{13}C do MI-D (125 MHz, DMSO- d_6)	285
Figura 2.111. Efeito do MI-D na viabilidade de células A172. (A) Ensaio de MTT feito com 24 h de incubação e em meio DMEM-HG; (B) Ensaio de MTT feito com 48 h de incubação e em meio DMEM-HG; (C) IC_{50} determinado em linhagem A172, com 24 h de tratamento. Os valores representam a média \pm SD de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$ significativamente diferente do controle (DMSO 0,1%). Efeito do MI-D na viabilidade de células T98G. (D) Ensaio de MTT feito com 24 h de incubação; (B) Ensaio de MTT feito com 48 h de incubação; (C) IC_{50} determinado em linhagem T98G, com 24 h de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão (D.P.) de quatro experimentos independentes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ significativamente diferente do controle.	287
Figura 2.112. (A-D) Análise de respirometria de alta resolução para avaliar a função mitocondrial em células A172 cultivadas em DMEM-HG e tratadas com MI-D . Resultados expressos em porcentagem em relação ao controle, considerado como 100%. Os valores de consumo de oxigênio das células controle (pmol/(s \times 10^6 células)) foram: basal: $72,8 \pm 14,11$; leak: $22,5 \pm 4,91$; desacoplado: $175,4 \pm 35,53$; capacidade respiratória de reserva: $105,7 \pm 14,03$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (D.P.) de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, significativamente diferente do controle. (E) Níveis de lactato e em células A172 na presença ou ausência de MI-D . Para o ensaio de lactato: controle 100%: $232,9 \pm 60,5$ nmol de lactato/mg de proteína. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (D.P.) de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$, significativamente diferente do controle.	288
Figura 2.113. (A-D) Respiração de células A172 sob mudança metabólica (dependente de OxPhos) na presença ou ausência de MI-D . Resultados expressos como valores de consumo de oxigênio (pmol/(s \times 10^6 células)) em relação ao controle, considerado como 100%. Valores de consumo de oxigênio das células controle (pmol/(s \times 10^6 células)) – basal: $97,1 \pm 31,25$; vazamento: $25,7 \pm 6,34$; desacoplado: $177,5 \pm 27,60$; capacidade respiratória reserva: $88,5 \pm 11,70$. Resultados expressos como média \pm desvio padrão (D.P.) de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, significativamente diferente do controle. (E-F) Efeitos de MI-D sobre os níveis de metabólitos em células A172 submetidas a uma mudança metabólica. (E) Níveis de lactato (Controle 100%: $253,4 \pm 54,2$ nmol de lactato/mg de proteína); (E) Níveis de ATP (Controle 100%: $2,5 \pm 0,61$ nmol de ATP/mg de proteína). Resultados expressos como média \pm desvio padrão (D.P.) de três ensaios independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, significativamente diferente do controle.	289
Figura 2.114. Efeito do MI-D sobre a respiração de células T98G intactas. Os valores de consumo de oxigênio foram expressos em pmol/(s \times 10^6 células) em relação ao controle, considerado como 100%. (A-C) Análise quantitativa do efeito do MI-D sobre a respiração de células T98G no estado basal (A), estado desacoplado (B) e capacidade respiratória de reserva (C). Resultados expressos como média \pm desvio padrão (D.P.). ** $p < 0,01$, significativamente diferente do respectivo controle. (D-E) Efeito do MI-D sobre os níveis de lactato (D) e ATP (E) em células T98G. Resultados expressos como média \pm desvio padrão (D.P.). * $p < 0,05$, significativamente diferente do controle. # $p < 0,05$, comparação entre os meios DMEM HG e GAL.....	291
Figura 2.115. Efeito do tratamento com MI-D sobre os níveis de caspase-3 ativa em células A172 (A-B) e T98G (C-D). As células foram incubadas por 24 horas com 5 μM de camptotecina (controle positivo), 15 μM de MI-D ou 0,1% de DMSO em DMEM HG ou DMEM GAL (controle). A análise	

quantitativa dos dados de citometria de fluxo obtidos para cada meio está apresentada nos gráficos. Os valores representam a média \pm desvio padrão (D.P.) de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata (n = 8). ***p < 0,001, indicando diferença significativa em relação ao controle.....292

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1. Síntese da sidnona e sua estrutura bicíclica proposta por Earl e Mackney.	23
Esquema 1.2. Mudança de hibridização do carbono assimétrico e consequente perda de atividade óptica com a formação das sidnonas.	23
Esquema 1.3. Reação de substituição eletrofílica aromática (A) (Kenner; Mackay, 1946). Reação de substituição nucleofílica aromática (B) (Tin-Lok; Miller; Stansfield, 1964).	25
Esquema 1.4. Rota sintética clássica para obtenção das sidnonas.	27
Esquema 1.5. SYD-1 e sua rota de síntese. Condições de reação: (a) i: NaOH, H ₂ O, 0°C; ii: 4-cloro-3-nitro-anilina, EtOH, Refluxo; (b) NaNO ₂ , H ₂ O, 0-5°C; (c), anidrido trifluoracético.	28
Esquema 1.6. Análise retrossintética das sulfonamidas-sidnonas planejadas neste trabalho.	32
Esquema 1.7. Síntese das sulfonamidas-sidnonas. Condições de reação: (Ia) NaOH, H ₂ O, 0°C; (Ib) <i>p</i> -nitroanilina ou <i>m</i> -nitroanilina, H ₂ O, EtOH, refluxo; (II) NaNO ₂ , H ₂ O, HCl, 0°C; (III) anidrido trifluoracético, temperatura ambiente; (IV) SnCl ₂ , HCl, EtOH/H ₂ O/THF, refluxo; (V) SiO ₂ , Na ₂ CO ₃ , maceração.	34
Esquema 1.8. Mecanismos das reações envolvidas na formação do núcleo sidnona.	36
Esquema 1.9. Mecanismo proposto para a formação das sulfonamidas-sidnonas.	37
Esquema 2.1. Análise retrossintética das chalconas-tiossemicarbazonas e seus análogos estruturais.	129
Esquema 2.2. Síntese dos híbridos chalconas- e azachalconas-tiossemicarbazonas. Reagentes e condições: (a) NaOH, EtOH, H ₂ O, temperatura ambiente; (b) tiossemicarbazida, EtOH, HCl, Refluxo; (c) H ₂ , Pd/C, CH ₂ Cl ₂ , temperatura ambiente.	130
Esquema 2.3. Mecanismos propostos para a formação das chalconas e azachalconas (A) e das tiossemicarbazonas. X corresponde à CH ou N.	131
Esquema 2.4. Síntese do complexo de Zinco a partir da chalcona-tiossemicarbazona CTCl (ou CT3). Numeração utilizada para as atribuições nos espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C.	177
Esquema 2.5. Mecanismo proposto para a formação da ftalazinona.	225
Esquema 2.6. Formação do anel tiazol pela reação de Hantzsch.	226
Esquema 2.7. Síntese do cloridrato mesoiônico MI-D	283

LISTA DE ABREVIATURAS

7AAD – 7-amino-actinomicina D
ACE2 – *Angiotensin-converting enzyme 2*
ACN – acetonitrila
AcOH – ácido acético
ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolismo Excreção e Toxicidade
AMP – Monofosfato de adenosina
ASH – Albumina Sérica Humana
ATLL – *Adult T-cell leukemia/lymphoma* (leucemia/linfoma de células T do adulto)
ATR – *Attenuated Total Reflectance*
BAL – Lavado Broncoalveolar
BOILED-egg – *Brain Or IntestinaL Estimated permeation*
CC – Colangiocarcinoma
CC50 - 50% Cytotoxic Concentration (concentração citotóxica 50%)
CCD – Cromatografia em camada delgada
CD – Dicroísmo Circular
CH₂Cl₂ – diclorometano
CHCl₃ – clorofórmio
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMV – Citomegalovírus
DAA – Antivirais de ação direta
DAD – Detector de Arranho de Diodos
DFT – *Density functional theory*
DHA – doença hepática alcoólica
DHR-123 – Di-hidrorodamina
DMF – Dimetilformamida
DMSO – Dimetilsulfóxido
DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido deuterado
EASL – *European Association for the Study of Liver*
EBV – Vírus Epstein-Barr
ENH – Elastase de Neutrófilos Humanos
ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
EtOAc – Acetato de etila
EtOH – Etanol
EtOTs – p-Toluenossulfonato de etila
FDA – *Food and Drug Administration*
GCDL – *Global Change Data Lab*
GCO – *Global Cancer Observatory*
HAM/TSP – Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical
HBV – Vírus da Hepatite B
HCC – Hepatocarcinoma
HCV – Vírus da hepatite C
HEL – Células pulmonares embrionárias
HPV – Vírus do papiloma humano
HRMS – *High-Resolution Mass Spectroscopy*
HTLV-1 – *Human T cell-leukemia Virus 1*
Hz – Hertz
IC₅₀ – *50% Inhibitory Concentration* (concentração inibitória 50%)

IDH – Índice de desenvolvimento humano
 IFN – Interferon
 IV – Infravermelho
J – Constante de acoplamento
 JAK – Janus Kinase
 KSV – Constante de extinção de Stern-Volmer
 Log PO/W - Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água
 LPA – Lesão Pulmonar Aguda
 LPS – Lipopolissacarídeo
 mL – mililitro
 MMP – Metaloproteinase de matriz
 MMR – *Mismatch Repair*
 Mpro – *Main protease* (protease principal do SARS-CoV-2)
 PLpro – *Papain-like protease* (protease semelhante à papaína do SARS-CoV-2)
 MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
 NASH – Non-alcoholic Steatohepatitis (esteatohepatite não alcoólica)
 NICS – Nucleus Independent Chemical Shift
 NUSQUIMED – Núcleo de Síntese e Química Medicinal
 OMS – Organização Mundial da Saúde
 PARP – poli-(ADP-ribose) polimerase
 PDB – *Protein Data Bank*
 PF – Ponto de fusão
 PFU – *Plaque-forming units*/ mL
 P-gp – Glicoproteína-P
 Ppm – partes por milhão
 Pr3 – proteinase 3
 RMN – Ressonância Magnética Nuclear
 RMSD – *Root Mean Square Deviation*
 RNA – Ácido desoxirribonucleico
 ROS – *Reactive Oxygen Species*
 RVS – resposta virológica sustentada
 SARS-CoV-2 – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*
 SDRA – Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
 Sn2- Substituição nucleofílica bimolecular
 SNC – Sistema nervoso Central
 SUS – Sistema Único de Saúde
 TMS – tetrametilsilano
 TMZ – Temozolomida
 TPSA – Área de Superfície Polar
 TRF – *Time-resolved fluorescence* (fluorescência resolvida no tempo)
 TTM – Tetratiomolibdato de amônio
 UTI – Unidade de terapia Intensiva
 UV – Espectroscopia de absorção no ultravioleta
 VZV – Vírus da Varicela-Zóster
 ΔG° - Variação da Energia Livre de Gibbs Padrão
 ΔH° - Variação de Entalpia Padrão
 ΔS° - Variação de Entropia Padrão
 μM – micromolar

SUMÁRIO

Capítulo I: Obtenção e avaliação biológica de novas Sulfonamidas-Sidnonas	1
Resumo	2
Abstract	2
1.1. Introdução	3
1.1.1. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)	3
1.1.2. Estudos clínicos para o tratamento de SDRA não associada à COVID-19	5
1.1.3. COVID-19	8
1.1.4. Estudos clínicos para o tratamento de SDRA associada à COVID-19	10
1.1.5. Sulfonamidas: breve histórico, síntese e atividades anti-inflamatória e antiviral.....	12
1.1.6. Sidnonas: breve histórico, estrutura, síntese e atividades anti-inflamatória e antiviral	21
1.1.7. Albumina Sérica Humana	30
1.2. Objetivos e Justificativa	31
1.3. Resultados e discussão	33
1.3.1. Síntese das sulfonamidas-sidnonas	33
1.3.2. Previsão de parâmetros de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e toxicidade	43
1.3.3. Previsão da atividade biológica	46
1.3.4. Atividade anti-SARS-CoV-2 e citotoxicidade	47
1.3.5. Efeito das sulfonamidas-sidnonas em modelo animal de SDRA induzida por LPS.....	51
1.3.6. Interação entre Albumina Sérica Humana e 44a.....	54
1.4. Conclusões e perspectivas	60
1.5. Materiais e métodos	61
1.5.1. Procedimentos sintéticos e caracterização.....	61
1.5.1.1. Síntese de 46a e 46b	62
1.5.1.2. Síntese de 47a e 47b	62
1.5.1.3. Procedimento para a síntese de 48a e 48b	63
1.5.1.4. Procedimento para a síntese de 49a e 49b	64
1.5.1.5. Procedimento para a síntese dos híbridos sulfonamidas-sidnonas	64
1.5.2. Difração de raio-X de monocristal.....	67
1.5.3. Predição de ADMET e atividades biológicas	68
1.5.4. Análises Biológicas	68
1.5.4.1. Animais	68

1.5.4.2.	Reagentes e formulações para os ensaios	69
1.5.4.3.	Efeito das sulfonamidas-sidnonas em modelo de LPA/SDRA em camundongos.....	69
1.5.4.4.	Análise histológica do pulmão dos camundongos.....	70
1.5.4.5.	Quantificação de leucócitos totais no BAL	70
1.5.4.6.	Medida da proporção pulmão úmido/seco.....	70
1.5.4.7.	Materiais para ensaio antiviral e estudos com a ASH.....	71
1.5.4.8.	Células e vírus.....	71
1.5.4.9.	Ensaio de citotoxicidade	72
1.5.4.10.	Ensaio de redução de título viral e titulação do vírus	72
1.5.5.	Análises espectroscópicas da interação ASH:44a.....	73
1.5.6.	Interação <i>in silico</i> ASH:44a	74
1.6.	Referências	75
2.1.	Introdução	92
2.1.1.	Hepatocarcinoma	94
2.1.2.	Prevenção e Tratamento clínico do Hepatocarcinoma.....	97
2.1.3.	Leucemia/linfoma de células T do adulto – ATLL	101
2.1.4.	ATLL: Sintomas e tratamentos disponíveis.....	103
2.1.5.	Glioblastoma: classificação, dados estatísticos, tratamento clínico e busca por novas terapias.....	107
2.2.	Revisão literária das classes bioativas de interesse e apresentação das justificativas e resultados.....	118
2.3.	Tiossemicarbazonas: breve histórico, atividades biológicas e estudos clínicos	118
2.3.1.	Justificativas e Objetivos	127
2.3.2.	Resultados e discussão.....	129
2.3.2.1.	Síntese dos híbridos chalconas-tiossemicarbazonas e seus análogos estruturais	130
2.3.2.2.	RMN: experimental vs teórico (EDF2/6-31G*)	143
2.3.2.3.	Espectrometria de massas de alta resolução.	149
2.3.2.4.	Avaliação biológica das tiossemicarbazonas.	150
2.3.2.5.	Previsão de parâmetros de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção dos híbridos CT1-2, HCT1-2, CPT1-2 e HCPT1-2	155
2.3.3.	Conclusões e perspectivas	157
2.3.4.	Materiais e métodos.....	157
2.3.4.1.	Procedimentos sintéticos e caracterização.....	158
2.3.4.2.	Síntese das chalconas e azachalconas.....	158

2.3.4.3.	Síntese das di-hidrochalconas (HC1-2) e di-hidroazachalconas (HCP1-2).....	159
2.3.4.4.	Síntese das tiossemicarbazonas finais	159
2.3.4.5.	Cultivo das células.....	172
2.3.4.6.	Solução estoque das substâncias testadas	173
2.3.4.7.	Avaliação biológica das tiossemicarbazonas contra células Huh-7.....	173
2.3.4.8.	Predição de ADMET.....	174
2.3.4.9.	Previsão do RMN de ^{13}C por DFT	174
2.4.	Complexo de zinco com uma chalcona-tiossemicarbazona	175
2.4.1.	Justificativas e Objetivos	175
2.4.2.	Resultados e discussão.....	176
2.4.2.1.	Síntese do complexo de Zinco (II).....	176
2.4.2.2.	Avaliação biológica do complexo de zinco CTCl-Zn e de seu ligante CTCl.....	184
2.4.3.	Conclusões e perspectivas.	189
2.4.4.	Materiais e métodos.....	189
2.4.4.1.	Procedimentos sintéticos e caracterização.....	190
2.4.4.2.	Síntese do complexo CTCl-Zn	190
2.4.4.3.	Difração de raio-X de monocristal	191
2.4.4.4.	Ensaio Biológicos.....	192
2.4.4.5.	Ensaio de toxidez em <i>Artêmia salina</i>	192
2.4.4.6.	Cultura de células	193
2.4.4.7.	Ensaio de citotoxicidade	193
2.4.4.8.	Detecção de espécies reativas de oxigênio	194
2.4.4.9.	Análise de expressão de CD25	194
2.5.	Piridazinonas e compostos relacionados - foco nas ftalazinonas: atividades biológicas	195
2.5.1.	Justificativas e objetivos	199
2.5.2.	Resultados e discussão.....	202
2.5.2.1.	Síntese das ftalazinonas	202
2.5.2.2.	Avaliação biológica das ftalazinonas	232
2.5.2.3.	Estudo <i>in silico</i> : investigando o mecanismo de ação do híbrido A3	239
2.5.2.4.	Interação de A3 com a Albumina Sérica Humana	249
2.5.2.5.	Previsão de Parâmetros de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção do híbrido A3	257

2.5.3.	Conclusões e perspectivas	259
2.5.4.	Materiais e métodos	260
2.5.4.1.	Procedimentos sintéticos e caracterização	261
2.5.4.3.	Síntese do A2	261
2.5.4.4.	Síntese do A3	262
2.5.4.5.	Síntese do A4	263
2.5.4.6.	Síntese do A5	263
2.5.4.7.	Síntese do B1	264
2.5.4.8.	Síntese do B2	265
2.5.4.9.	Síntese do B3	265
2.5.4.10.	Síntese do B4	266
2.5.4.11.	Síntese de C2-C4.	266
2.5.4.12.	Difração de raio-X de monocristal	267
2.5.4.13.	Cultivo das células	268
2.5.4.14.	Solução estoque das substâncias testadas	269
2.5.4.15.	Avaliação biológica das ftalazinonas e seus precursores contra células Huh-7 ..	269
2.5.4.16.	Análise do consumo de oxigênio por células Huh-7 intactas	269
2.5.4.17.	Avaliação estatística	270
2.5.4.18.	Análises espectroscópicas da interação ASH:A3	270
2.5.4.19.	Docking molecular	272
2.5.4.20.	Predição de ADMET	273
2.6.	Cloridratos mesoiônicos - 1,3,4-Tiadiazólio-2-fenilaminas: breve histórico e síntese	274
2.6.1.	1,3,4-Tiadiazólio-2-fenilaminas: atividade anticâncer	280
2.6.2.	Justificativa e objetivos	281
2.6.3.	Resultados e discussão	283
2.6.3.1.	Síntese do MI-D	283
2.6.3.2.	Análises Biológicas	286
2.6.4.	Conclusões e perspectivas	292
2.6.5.	Materiais e métodos	293
2.6.5.1.	Síntese do MI-D	293
2.6.5.2.	Síntese da 1,4-difeniltiossemicarbazida	293
2.6.5.3.	Síntese do ácido <i>p</i> -nitrocinâmico	294

2.6.5.4.	Formação do cloridrato mesoiônico	294
2.6.5.5.	Análises biológicas	295
2.6.5.6.	Ensaio de viabilidade	295
2.6.5.7.	Consumo de oxigênio em células intactas	295
2.6.5.8.	Dosagem de lactato e ATP	296
2.6.5.9.	Dosagem de caspase-3 ativa	296
2.7.	Referências bibliográficas	297
3.1.	Anexos – Capítulo 1	321
3.2.	Anexos – Capítulo 2	359

***Capítulo I: Obtenção e avaliação biológica de novas
Sulfonamidas-Sidnonas***

Resumo

Neste capítulo, os híbridos sulfonamidas-sidnonas são apresentados. Essas substâncias exibiram atividade anti-inflamatória em modelo animal de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e foram capazes de inibir a replicação do SARS-CoV-2 em células Calu-3. Inicialmente, uma breve introdução aborda as problemáticas associadas à LPA e à COVID-19. Em seguida, são descritas duas classes de substâncias bioativas – as sulfonamidas e as sidnonas – que apresentam potencial terapêutico frente a essas condições, incluindo exemplos de moléculas com atividades já descritas na literatura. Conforme esses exemplos são apresentados, as rotas sintéticas utilizadas para a obtenção das moléculas são descritas com o intuito de fornecer um breve panorama à cerca das metodologias comumente empregadas na literatura para a obtenção de sulfonamidas e sidnonas biologicamente ativas. Então, os objetivos do trabalho e as justificativas que fundamentam a sua realização são apresentados. No tópico posterior, todos os resultados obtidos – síntese, caracterização (infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C , espectrometria massas de alta resolução e difração de raio-X), pureza (CLAE), análises *in silico* e avaliação biológica – são discutidos em detalhe. Por fim, as conclusões do trabalho são delineadas e as metodologias empregadas são fornecidas.

Abstract

In this chapter, sulfonamide-sydnone hybrids are presented. These compounds exhibited anti-inflammatory activity in an animal model of Acute Lung Injury (ALI) and were able to inhibit the replication of SARS-CoV-2 in Calu-3 cells. Initially, a brief introduction addresses the issues associated with ALI and COVID-19. Next, two classes of bioactive substances – sulfonamides and sydnones – are described, both of which show therapeutic potential against these conditions, including examples of molecules with previously reported biological activities. As these examples are presented, the synthetic routes employed for the preparation of the molecules are described with the aim of providing a brief overview of the methodologies commonly used in the literature for the synthesis of biologically active sulfonamides and sydnones. Then, the objectives of the study and the justifications supporting its development are presented. In the subsequent section, all results obtained — synthesis, characterization (infrared, ^1H and ^{13}C NMR, high-resolution mass spectrometry, and X-ray diffraction), purity (HPLC), purity (HPLC), *in silico* analysis and biological evaluation — are discussed in detail. Finally, the conclusions of the study are outlined and the experimental methodologies employed are provided.

1.1. Introdução

1.1.1. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)

A inflamação é uma resposta natural complexa iniciada pelo sistema imune do organismo a estímulos nocivos de natureza diversa, como agentes infecciosos, lesões físicas, células danificadas e exposição a substâncias tóxicas. Seu principal objeto consiste em eliminar a causa da lesão, remover as células danificadas, e dar início ao processo de reparação tecidual (Tu et al., 2022). A inflamação é, portanto, um mecanismo de defesa vital à saúde. Apesar disso, uma inflamação desregulada – que ocorre de forma excessiva, prolongada ou até mesmo de maneira inadequada frente a estímulos normalmente inertes – pode causar danos aos tecidos saudáveis, contribuindo para o desenvolvimento ou agravamento de certas doenças, como alergias, doenças autoimunes (psoríase, artrite reumatóide, entre outras) (Ramirez et al., 2025), sepse (Giamarellos-Bourboulis et al., 2024), e Lesão Pulmonar Aguda (LPA) (Bos; Ware, 2022).

A LPA é uma doença complexa caracterizada clinicamente por falta de ar súbita e progressiva, taquipneia, taquicardia, hipoxemia e edema pulmonar, sendo, em seu estágio mais grave, tratada como Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) (Matthay et al., 2019; Wick; Ware; Matthay, 2024). Apesar da definição de Berling de 2012 ter proposto que somente o termo SDRA seja empregado, categorizando-o em leve, moderado e grave (Ranieri et al., 2012), o termo LPA continua a ser amplamente utilizado em publicações. As causas mais comuns de LPA/SDRA são pneumonia (viral, bacteriana e fúngica), aspiração de conteúdo gástrico, trauma torácico (Matthay et al., 2019), transfusões sanguíneas maciças (Vlaar; Juffermans, 2013) e sepse não-pulmonar, oriunda de outros sistemas do organismo, como o trato urinário (Lin et al., 2024). Inclusive, a SDRA foi uma das principais causas de morte em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 durante a pandemia da COVID-19 (Xia et al., 2021). De acordo com um estudo amplo que incluiu 459 Unidades de Terapia Intensiva (UTI) em mais de 50 países, a SDRA, não relacionada à COVID-19, representou cerca de 10,4% dos pacientes admitidos e 23,4% dos pacientes que necessitaram de ventilação mecânica. Ainda, de acordo com este estudo, a mortalidade no grupo de indivíduos diagnosticados com SDRA foi muito alta, aproximadamente 40% (Bellani et al., 2016). Além disso, inúmeros sobreviventes apresentam sequelas devido à doença, envolvendo problemas relacionados a saúde física (dificuldade para respirar, tosse, produção de escarro), cognitiva (prejuízos na função executiva,

raciocínio verbal, memória e atenção) e mental (estresse pós-traumático, ansiedade e depressão) (Gorman; O’Kane; McAuley, 2022; Herridge, 2011). Foi demonstrado que o uso de recursos dos planos de saúde é aumentado entre os sobreviventes de SDRA, havendo readmissões hospitalares em cerca de 40% dos sobreviventes em um período de apenas 12 meses após sua alta hospitalar inicial. Outro estudo acompanhou pacientes que estavam empregados antes da hospitalização por SDRA, e relatou que, um ano após a alta, 44 % dos sobreviventes encontravam-se desempregados (Kamdar et al., 2017). Um dado mais preocupante foi levantado em um estudo mais recente, que acompanhou os pacientes por um período mais longo: mesmo 5 anos após a alta hospitalar, 31% dos pacientes nunca retornaram ao trabalho (Kamdar et al., 2018).

O tratamento de LPA/SDRA é principalmente de suporte – não trata diretamente a causa da doença e busca manter as funções vitais do paciente enquanto a doença é combatida pelo próprio organismo, ou por outros tratamentos. A terapia de suporte tem como objetivos melhorar a oxigenação e impedir que novas lesões pulmonares ocorram (Al-Husinat et al., 2025). Gorman e colaboradores resumem em sua revisão algumas diretrizes para o tratamento dessa condição, publicados por faculdades ou sociedades como, Faculdade de Medicina Intensiva do Reino Unido, Sociedade Francesa de Terapia Intensiva, e pelo grupo conjunto entre a Sociedade Torácica Americana, Sociedade Europeia de Medicina Intensiva e Sociedade de Medicina de Cuidados Críticos. Os tratamentos envolvem, a exemplo, ventilação protetora pulmonar, posição de prona (ou decúbito ventral), e manobras de recrutamento alveolar, todos com o objetivo de aumentar a oxigenação pulmonar (Gorman; O’Kane; McAuley, 2022).

Os mecanismos pelos quais a LPA/SDRA se desenvolve são complexos. Envolvem a ativação e desregulação de múltiplas vias associadas à inflamação e à coagulação. Apesar do papel fundamental na resposta a lesões e infecções, a ativação desregulada desses mecanismos causa sérios danos teciduais. O grau em que cada um desses mecanismos está envolvido no processo danoso é muito variável entre os pacientes, contribuindo para as diferenças clínicas observadas (Bos; Ware, 2022). Nos pulmões, o alvéolo pulmonar é a menor unidade funcional do órgão, responsável pelas trocas gasosas entre o sangue e o ar. Possui forma arredondada e é revestido internamente pelo epitélio alveolar, composto por pneumócitos do tipo I e II, e externamente pelo endotélio que compõe os capilares sanguíneos (Bos; Ware, 2022). As camadas de epitélio e endotélio são separadas entre si por uma fina membrana basal que auxilia a troca gasosa. Danos à barreira alvéolo-capilar, formada por essas estruturas, são típicos da LPA/SDRA (Bos; Ware, 2022). Esses danos levam a ativação endotelial e epitelial – processo

no qual as células mudam seu comportamento em resposta a estímulos potencialmente danosos. Isso leva à expressão de moléculas de adesão, que favorecem a adesão e migração de leucócitos para o tecido pulmonar, além da produção de citocinas e quimiocinas, aumento da permeabilidade e ativação da coagulação (Bos; Ware, 2022). Como consequência, ocorre a inundação alveolar – acúmulo anormal de líquido nos alvéolos – com fluido inflamatório, e a formação de depósitos de membrana hialina, composta em parte por fibrina e restos celulares. Danos aos pneumócitos do tipo II afetam a produção de surfactante, que é responsável por reduzir a tensão superficial na interface líquido-ar e oferecer uma barreira protetora contra agentes infecciosos. Quantidades reduzidas de surfactante, causam aumento da tensão superficial, o que ocasiona o fechamento do alvéolo pulmonar e impossibilita a troca gasosa (Autilio; Pérez-Gil, 2019). Todos esses eventos caracterizam a LPA/SDRA (Bos; Ware, 2022).

1.1.2. Estudos clínicos para o tratamento de SDRA não associada à COVID-19

A LPA/SDRA é marcada pela produção e liberação de citosinas, serina-proteases, metaloproteinasas, espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), produção reduzida de surfactante, deposição de fibrina e agregação de plaquetas. Assim, a regulação da expressão, liberação ou até mesmo a inibição da atividade dessas espécies e eventos tem se tornado a base para a procura de tratamentos farmacológicos (Aribindi et al., 2024; Chen et al., 2020; Davey; McAuley; O’kane, 2011; Deng; Standiford, 2011; Tsai et al., 2023). Apesar dos esforços contínuos para encontrar melhores tratamentos para a LPA/SDRA, uma terapia farmacológica específica capaz de reduzir a mortalidade de maneira significativa não foi alcançada em casos não relacionados a COVID-19 (Aribindi et al., 2024).

Os glicocorticoides – como a dexametasona, metilprednisolona e hidrocortisona (Figura 1.1) – têm sido investigados há anos no tratamento de LPA/SDRA, devido a sua potente ação anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora (Zhao et al., 2024). Seus benefícios ainda são debatidos, havendo resultados controversos na literatura. A dose, momento em que o tratamento será iniciado, o fármaco escolhido, a duração do tratamento e as características individuais de cada LPA/SDRA precisam ser levadas em conta para otimização do tratamento. Estudos recentes demonstram que o uso de glicocorticoides é benéfico por reduzirem o tempo de ventilação mecânica, tempo de internação em UTI (Meduri et al., 2007) e até mesmo a mortalidade (Villar et al., 2020). No entanto, uma revisão sistemática e meta-análise baseada em ensaios clínicos randomizados indicou que os glicocorticoides podem aumentar a

mortalidade, a necessidade de ventilação mecânica e a incidência de infecção hospitalar (Tang et al., 2022).

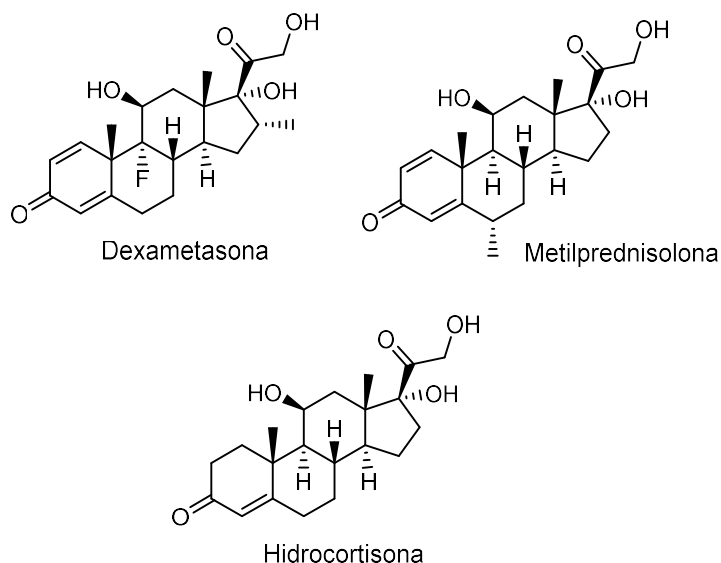


Figura 1.1. Glicocorticoides avaliados no tratamento de SRDA.

Um dos eventos característicos da SDRA é o extravasamento vascular – aumento anormal da permeabilidade dos vasos sanguíneos, permitindo que líquidos, células e proteínas acumulem nos alvéolos. Na SDRA, o extravasamento vascular tem sido associado a redução da concentração de adenosina na barreira endotelial. Interferons, como o Interferon (IFN) β -1a, parecem ter um papel importante na expressão de CD73 (enzima presente na superfície celular, também conhecida como ecto-5'-nucleotidase), que, por sua vez, converte o monofosfato de adenosina (AMP, do inglês *adenosine monophosphate*) em adenosina, essencial para manter a função da barreira endotelial (Bellingan et al., 2017). Neste contexto, estudos clínicos envolvendo a administração de IFN- β -1a recombinante foram conduzidos. Na fase III, 301 pacientes com SDRA moderada ou grave receberam 10 mg da enzima ou placebo por 6 dias. Não foi observado diferença significativa na sobrevida, tempo de ventilação e outros parâmetros clínicos, não justificando, portanto, o uso do IFN- β -1a para o tratamento de SDRA (Ranieri et al., 2020).

A vitamina C (Figura 1.2), conhecido antioxidante e imunomodulador, tem sido avaliado em casos de SDRA por seu potencial em reduzir a ativação de neutrófilos, aumentar a remoção de fluido alveolar e prevenir lesões causadas por armadilhas extracelulares de neutrófilos. No entanto, os resultados são inconclusivos e exigem mais estudos para entender os reais efeitos da vitamina C na SDRA (Aribindi et al., 2024).

Neutrófilos ativados desempenham um papel importante na progressão de SDRA pela liberação de diversas espécies inflamatórias, incluindo elastases de neutrófilos (*Neutrophil elastases*) – enzimas proteolíticas do grupo de serino-proteases. Em condições normais, essas enzimas ajudam a combater agentes infecciosos, a remover restos celulares e iniciar o processo de reparação tecidual. Contudo, a elastase em ambiente extracelular pode degradar não só proteínas exógenas, mas também proteínas nativas como colágeno, surfactantes e imunoglobinas. Dessa maneira, inibidores de elastases tem recebido grande foco. Um deles, o sivelestat (Figura 1.2), já passou por alguns estudos clínicos que demonstraram sua capacidade em reduzir a persistência de SDRA. Mais investigações são necessárias, já que em uma avaliação clínica randomizada a substância foi incapaz de promover redução significativa de morte comparado ao grupo placebo (Aribindi et al., 2024). Um estudo de fase IV registrado na base de dados internacional Clinicaltrials.gov sob o número NCT04909697 tem recrutado pacientes na China para avaliar a eficácia clínica do sivelestat.

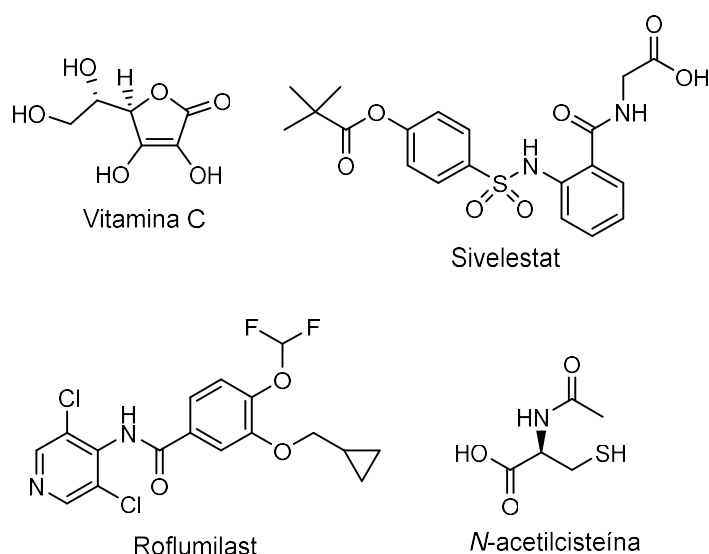


Figura 1.2. Algumas substâncias investigadas em estudos clínicos para o tratamento de SDRA.

O inibidor de fosfodiesterase-4, Roflumilast (Figura 1.2), já aprovado em alguns territórios para o tratamento de outra condição pulmonar (doença pulmonar obstrutiva crônica, foi avaliado em um estudo clínico (NCT04744090) para o tratamento de SDRA, mas os resultados ainda não foram divulgados. Inúmeras outras substâncias têm sido investigadas, como surfactantes, N-acetilcisteína (Figura 1.2), estatinas e beta-agonistas. Os resultados, no entanto, são insuficientes para indicar sua eficácia na redução da mortalidade em pessoas com SDRA, na duração da ventilação mecânica, ou no aumento dos dias sem ventilação (Lewis et

al., 2019). A revisão de Lewis e colaboradores descreve em detalhes os demais agentes farmacológicos que têm sido investigados em casos de ADRS.

1.1.3. COVID-19

Um surto de casos de pneumonia atípica foi relatado no final de 2019 na cidade de Wuhan, China. Investigações etiológicas identificaram um novo coronavírus, o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2, do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), como o patógeno responsável pela doença (Zhu et al., 2020). Esta infecção viral, que logo ficou conhecida como COVID-19, espalhou-se rapidamente por vários países e, em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarou uma pandemia, alertando todo o mundo sobre a sua gravidade (Cucinotta; Vanelli, 2020; WHO, 2020). Até 10 de maio de 2025 resultou em mais de 777 milhões de casos e 7,09 milhões de mortes em todo o mundo (WHO, 2025). Ao contrário do que ocorreu nas ameaças anteriores de coronavírus em 2002 (SARS-CoV) e 2012 (MERS-CoV), desta vez um esforço sem precedentes resultou no rápido desenvolvimento de vacinas e antivirais contra o SARS-CoV-2, o que reduziu significativamente as taxas de mortes, hospitalizações e admissões em UTI a tal ponto que, em 5 de maio de 2023, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o fim da designação de Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional referente à COVID-19 (Torner, 2023; Watson et al., 2022; Yamana et al., 2023).

A partícula viral do SARS-CoV-2 possui uma estrutura esférica envolta por um envelope lipídico derivado da membrana do hospedeiro. Neste envelope, 3 proteínas estruturais se encontram inseridas: a glicoproteína spike (S), a proteína de membrana (M) e a proteína de envelope (E). No interior do envelope, encontra-se o material genético do vírus envolto por um capsídeo: uma fita simples de RNA de sentido positivo. Trímeros da proteína S formam projeções similares a espinhos na superfície do envelope e são divididos em duas subunidades: S1 e S2. A subunidade S1 é responsável pela ligação inicial da partícula viral à célula do hospedeiro por meio de sua interação com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2, do inglês *angiotensin-converting enzyme*). A proteína S é então clivada pela serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) do hospedeiro, possibilitando que a subunidade S2 dê início ao processo de fusão das bicamadas lipídicas do hospedeiro e do vírus (Lamers; Haagmans, 2022) e levando à liberação do material genético na célula. O RNA viral atua como RNA mensageiro e é diretamente traduzido pelo maquinário celular. A tradução direta do RNA genômico de

sentido positivo produz duas poliproteínas, pp1a e pp1ab, que consistem nas proteínas não-estruturais (nsp1-nsp16) conectadas em sequência. Essas poliproteínas são separadas pela ação proteolítica da nsP3 (PL^{pro}, do inglês *papein-like protease*: protease tipo papaína) e nsp5 (3CL^{pro} ou M^{pro}, do inglês *3C-like protease* ou *main protease*: protease principal) durante e após o processo de tradução. O processamento dessas poliproteínas dá origem ao complexo de replicação e transcrição viral composto pelas proteínas não-estruturais 2 a 16, responsável pela produção de uma cadeia complementar negativa do RNA e pela fabricação de múltiplas cópias de RNA de cadeia positiva, genômico e subgenômico, utilizando a cadeia negativa como molde. As cadeias de RNA subgenômico são então traduzidas pelo ribossomo para a síntese das proteínas estruturais (proteína do nucleocapsídeo, S, M e E) e das proteínas acessórias (V'kovski et al., 2021). As proteínas acessórias parecem estar envolvidas na modulação da resposta imune do hospedeiro à infecção (Lamers; Haagmans, 2022).

Atualmente, dois antivirais com registro definitivo aprovados pela Anvisa estão disponíveis para o tratamento da infecção por Sars-CoV-2 (Figura 1.3): Remdesivir (Veklury, Gilead Sciences), um inibidor da RNA polimerase dependente de RNA viral; e o nirmatrelvir, um inibidor peptidomimético da protease principal do vírus (M^{pro}), usado em combinação com o ritonavir – inibidor do citocromo P450-3A4 – comercializado sob o nome Paxlovid pela Pfizer. Além disso, a Anvisa aprovou o uso emergencial e venda em farmácias do Molnupiravir (Lagevrio, Merck Sharp & Dohme), um pró-fármaco que atua como análogo de nucleosídeo, sendo incorporado pela RNA polimerase viral, causando mutações e perda da viabilidade do SARS-CoV-2 (Aboul-Fotouh et al., 2023; Andrews; Herman; Gandhi, 2024). No entanto, cada um desses três medicamentos tem suas desvantagens e preocupações particulares (Andrews; Herman; Gandhi, 2024). O Remdesivir, a exemplo, requer administração por via intravenosa, muitas vezes inconveniente, e pode ocasionar uma série de efeitos adversos como sintomas gastrointestinais (náusea, vômitos e anorexia) e comprometimento do fígado, observado pela elevação nos níveis de aminotransferases e bilirrubina (Mehta et al., 2020; Wang et al., 2020). O medicamento Paxlovid, por sua vez, possui algumas limitações devido à potenciais interações medicamentosas, já que um de seus componentes, o ritonavir, é um potente inibidor do citocromo P450-3A4 – por esse motivo, pode aumentar a concentração de outros medicamentos que são coadministrados e causar sérios riscos à saúde dos pacientes (Prikis; Cameron, 2022). Por fim, devido ao seu mecanismo de ação, o molnupiravir levanta preocupações quanto ao seu potencial mutagênico no hospedeiro. Ainda, há preocupações quanto a possibilidade que o medicamento induza mutações no genoma viral que resultem em variantes viáveis do SARS-

CoV-2, mais resistentes, infecciosas ou letais (Gruber et al., 2024; Zhou et al., 2020). Na literatura também há relatos de resistência aos fármacos Remdesivir e ao Nirmatrelvir (Gandhi et al., 2022; Yamamoto et al., 2024).

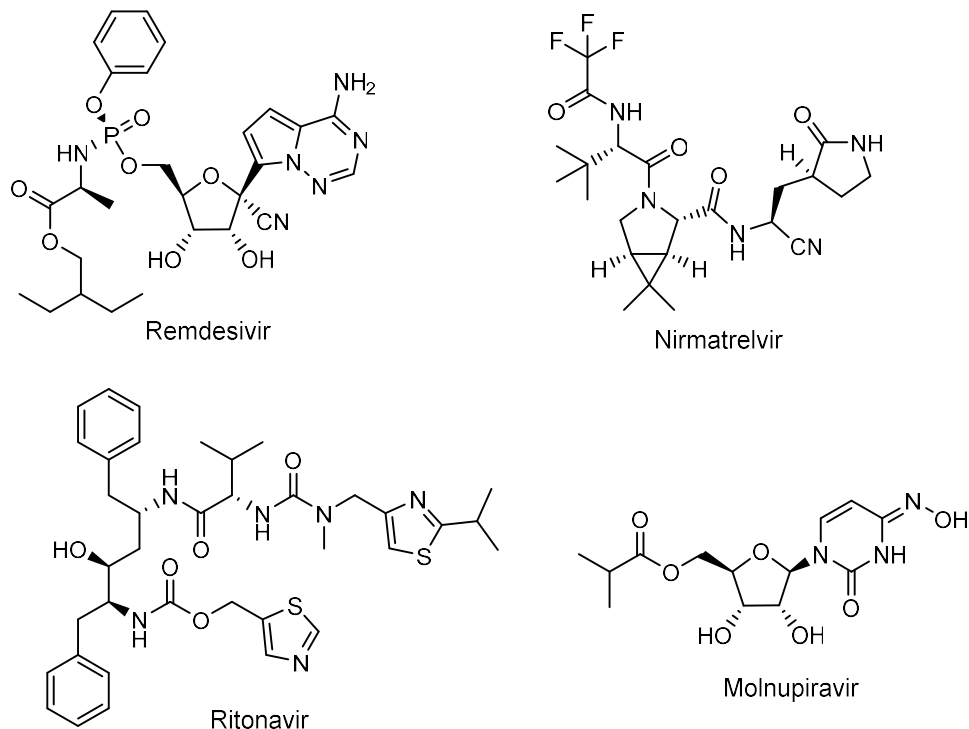


Figura 1.3. Antivirais aprovados para o tratamento da COVID-19.

Dessa forma, apesar do progresso significativo feito contra a COVID-19, a erradicação do vírus ainda está longe da realidade, e o surgimento de novas variantes levanta preocupações sobre a eficácia da vacina e da terapia com medicamentos antivirais nos próximos anos (Pelly; Liotta, 2021). Por esse motivo, há uma necessidade contínua de desenvolver novos agentes antivirais eficazes contra a COVID-19, que, idealmente, também promovam efeitos anti-inflamatórios e reduzam a gravidade da LPA/SDRA, uma das principais causas de morte em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2.

1.1.4. Estudos clínicos para o tratamento de SDRA associada à COVID-19

Comparada a SDRA “clássica”, a SDRA causada pela COVID-19 normalmente é mais grave, requer mais dias de ventilação mecânica e possui taxas de mortalidade mais elevadas. Oud e Garza relatam em seu estudo que a pandemia da COVID-19 elevou em cinco vezes o número de mortes relacionadas à SDRA nos Estados Unidos durante o ano de 2020, e que houve

o diagnóstico de COVID-19 em mais de 80% dos óbitos por SDRA naquele ano (Oud; Garza, 2023). No início da pandemia, a mortalidade entre pacientes com COVID-19 que necessitavam de ventilação mecânica variava entre 65,7 e 94% (Gibson; Qin; Puah, 2020). No Brasil, em 2021, foram registrados cerca de 1.775.816 casos de SDRA secundária à COVID-19, com uma taxa de mortalidade de $\approx 32,2\%$ (Baggio et al., 2021).

Diversos estudos favorecem o uso de corticosteroides no tratamento de SDRA relacionada à COVID-19, demonstrando melhora em vários aspectos clínicos, bem como redução de internação e mortalidade (Aribindi et al., 2024). Além disso, no início da pandemia, a terapia com anticorpos passivos foi um dos grandes focos de investigação: o plasma convalescente (PC) de indivíduos que sobreviveram à infecção e se livraram do vírus era administrado em pacientes ainda infectados, com o intuito de fornecer proteção pela neutralização do vírus pelos anticorpos presentes no plasma. Inicialmente, os estudos envolvendo o uso de PC mostravam resultados conflitantes, em sua maioria sem melhoras evidentes. Um estudo mais recente, no entanto, revelou que quando administrado precocemente, houve redução significativa da mortalidade (de 45% para 35,4%) – esse estudo foi bem diferente dos anteriores: envolveu pacientes em estado mais grave, utilizou PC com maior título de anticorpos neutralizantes e os pacientes receberam o plasma em até 5 dias após o início da ventilação mecânica (Misset et al., 2023).

Os inibidores da via JAK (do inglês, *Janus Kinase*), como o baricitinibe (Figura 1.4), foram investigados por sua capacidade de bloquear vias inflamatórias intracelulares e demonstraram resultados promissores, com melhora clínica e redução da mortalidade em pacientes com COVID-19 grave (Abani et al., 2022). Além disso, anticorpos monoclonais capazes de interferir em processos inflamatórios também têm sido investigados, alguns deles apresentando resultados favoráveis. O Itolizumab, um anticorpo monoclonal humanizado do tipo IgG1 que atua contra o CD6, apresentou resultados promissores na redução da mortalidade em pacientes com SDRA moderada associada a COVID-19. No entanto, os dados são preliminares e ainda limitados devido ao pequeno número de pacientes avaliados e à falta de grupo controle em alguns estudos (Kumari et al., 2021).

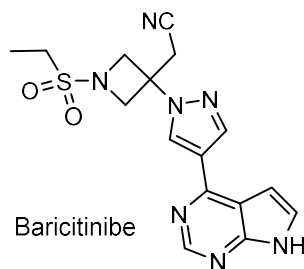


Figura 1.4. Inibidor de JAK avaliado clinicamente em pacientes com SDRA associada a COVID-19

1.1.5. Sulfonamidas: breve histórico, síntese e atividades anti-inflamatória e antiviral

As sulfonamidas representam uma classe estrutural de grande relevância para a Química Medicinal, amplamente explorada no desenvolvimento de fármacos. Sua estrutura básica é composta pelo grupo funcional $R-SO_2-NR_1R_2$, onde R_1 e R_2 geralmente correspondem a átomos de hidrogênio, grupos alquila, arila ou heteroarila. Esse grupo apresenta alta resistência à hidrólise, polaridade elevada, além de capacidade para atuar como aceptor e doador em ligações de hidrogênio (quando R_1 ou R_2 é hidrogênio). Adicionalmente, é resistente a oxidação e redução (Liu; Chen; Su, 2024). Todas essas características contribuem para a sua ampla utilização no desenvolvimento de novos fármacos.

As sulfonamidas estão presentes em uma variedade de moléculas bioativas com propriedades antimicrobiana, anticâncer, antiviral, antiparasitária, anti-inflamatória, diurética, entre tantas outras (Mondal; Malakar, 2020), sendo por isso consideradas um grupo farmacofórico privilegiado. O interesse por essa classe foi impulsionado, em grande parte, pela descoberta e desenvolvimento do Prontosil Rubrum (Figura 1.5), o primeiro agente quimioterápico sintético eficaz contra infecções bacterianas. Por volta de 1931, Gerhard Domagk iniciou testes com diversas substâncias pertencentes a classe dos corantes azo e, em 1935, relatou os excelentes resultados do Prontosil Rubrum no tratamento de infecções por *Streptococcus* em animais. Posteriormente, estudos clínicos comprovaram a sua eficácia para o tratamento de infecções em humanos, sendo, não muito tempo depois, introduzida no mercado farmacêutico (Sneader, 2005).

Descobriu-se então que o Prontosil era, na verdade, um pró-fármaco, sendo metabolizado no organismo para gerar a forma que de fato possui atividade contra bactérias: a sulfanilamida (Figura 1.5). Essa substância, por sua vez, atua como inibidor competitivo da enzima di-hidropteroato sintase, devido à sua semelhança com o ácido *p*-aminobenzoico, o substrato natural da enzima. A inibição dessa enzima compromete a síntese de ácido fólico

bacteriano, essencial para a replicação do DNA, e, portanto, resulta na interrupção do crescimento bacteriano (Ovung; Bhattacharyya, 2021). Pela grande relevância do Prontosil, Domagk recebeu o prêmio Nobel de medicina em 1939 (Sneider, 2005).

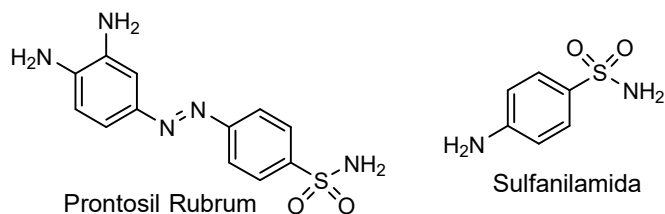


Figura 1.5. O primeiro antibiótico sintético eficaz desenvolvido na história (Prontosil Rubrum) e a sua forma ativa (sulfanilamida), resultado da metabolização do Prontosil Rubrum.

Em 2016, as sulfonamidas representaram 15% dos 100 medicamentos mais prescritos, o que reflete a sua importância clínica contínua (Mondal; Malakar, 2020). Essa classe segue em evidência, sendo investigada e introduzida em moléculas que constantemente são aprovadas como fármacos - apenas em 2022, por exemplo, quatro novas sulfonamidas foram aprovadas pela FDA (Figura 1.6): abrocitinibe (inibidor da Janus quinase); mitapivat (ativador da enzima piruvato quinase); fumarato de vonoprazana (um bloqueador ácido competitivo de potássio); e omidenepag isopropílico (um agonista seletivo do receptor de prostaglandina E2) (Benedetto Tiz et al., 2022). Esses exemplos demonstram o interesse contínuo pelas sulfonamidas, que apresentam grande versatilidade no desenvolvimento de medicamentos efetivos para uma variedade de condições.

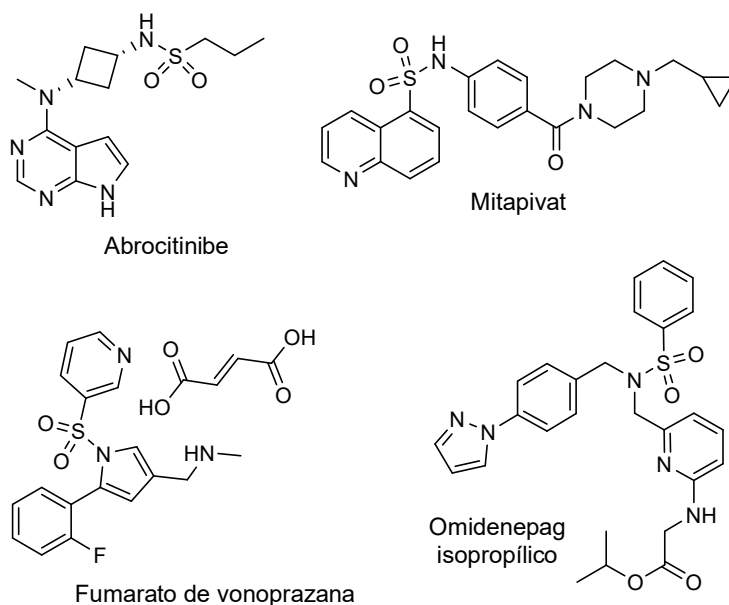


Figura 1.6. Novas sulfonamidas aprovadas em 2022 pela FDA para o tratamento de diversas condições.

Foi realizada uma busca na base de dados Scopus utilizando a expressão “(sulfonamides OR sulfonamide) AND (ARDS OR ALI)”, com o objetivo de estimar e analisar o número de publicações que abordam o uso de sulfonamidas em estudos relacionados à LPA/SDRA. A pesquisa resultou em 135 publicações no período de 1988-2025 (Figura 1.7), das quais 121 são artigos originais, 9 revisões, 3 cartas ao editor, 1 nota científica e 1 trabalho apresentado em conferência. Dentre essas publicações, 61 possuem alguma relação com o fármaco sivelestat, enquanto 23 abordam a COVID-19 em algum aspecto.

Observa-se que, até o ano de 2003, havia pouquíssimas publicações sobre o tema. A partir de 2004, o número de publicações teve aumento, impulsionado principalmente pelo interesse crescente no sivelestat. No ano em questão, os três artigos publicados investigaram a eficácia do sivelestat em pacientes com SDRA. A seguir, serão apresentados e discutidos os resultados de alguns dos estudos identificados, com preferência para os trabalhos que investigaram sulfonamidas distintas do sivelestat nos últimos 10 anos. Além disso, será descrita a metodologia empregada para a síntese das sulfonamidas abordadas nesses trabalhos.

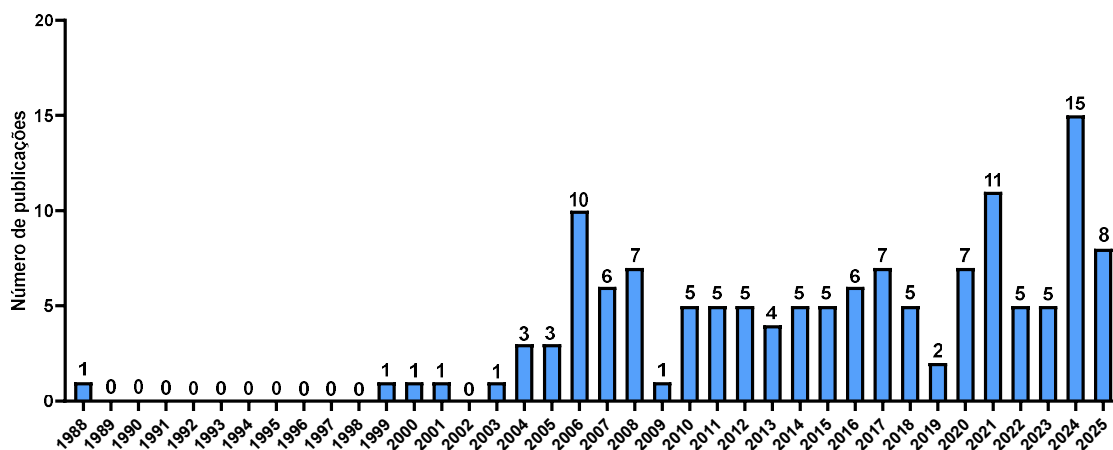


Figura 1.7. Número de publicações por ano contendo a expressão “(sulfonamides OR sulfonamide) AND (ARDS OR ALI)” no título da publicação, abstract ou palavras-chave. Os dados compreendem a faixa de 1988 até maio de 2025.

Uma sulfonamida contendo o grupo oxima derivado da 2-aminoacetofenona (**1**, Figura 1.8), desenvolvida como um análogo estrutural do sivelestat, demonstrou potente atividade inibitória in vitro sobre a proteinase 3 (Pr3) e a elastase de neutrófilos humanos (ENH) – duas importantes serino proteases neutrofílicas – com valores de IC_{50} de 211,56 nM e 51,26 nM,

respectivamente (Hwang et al., 2015). O composto, ao ser administrado por via intraperitoneal em uma dose única de 100 mg/kg, reduziu a lesão pulmonar aguda em ratos desafiados com LPS. O composto **1** foi preparado pelos autores através de uma rota sintética de 6 etapas, iniciando pela reação de substituição acílica entre o fenol e o cloreto de pivaloíla, em acetonitrila. O éster formado (**2**) foi tratado com ácido clorosulfônico para a obtenção do cloreto de sulfonila correspondente (**3**), por meio de uma substituição eletrofílica aromática. Então, a reação de substituição nucleofílica bimolecular (Sn2) entre este cloreto de sulfonila e a 2-aminoacetofenona gerou a sulfonamida **4**, que, por fim, foi reagida com cloridrato de hidroxilamina para a formação do produto final **1** (Hwang et al., 2015).

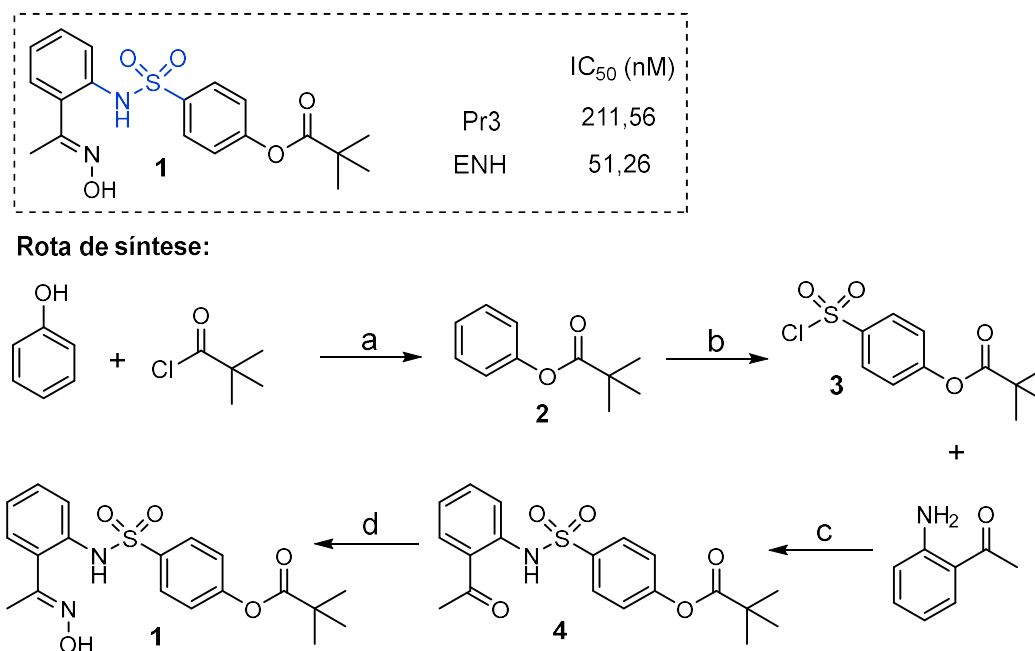


Figura 1.8. Composto **1** e rota sintética para a sua obtenção. Condições das reações: (a) MeCN, 0°C, 12 h; (b) ácido clorosulfônico, MeCN, 0°C – 75°C, 2 h; (c) piridina, 4 h; (d) cloridrato de hidroxilamina, EtOH, refluxo, 14 h.

Sulfonamidas com o núcleo pirimidina-2,4,6-triona inibiram a atividade das metaloproteinases de matriz (MMP) 2 e 9 *in vitro* (IC₅₀ de 2,35 nM e 8,24 nM, respectivamente) – essas enzimas são proteinases extracelulares contendo o zinco como cofator e são responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular: quando em excesso contribuem para processos patológicos como a LPA/SDRA (He et al., 2016). Estudos anteriores demonstraram que o núcleo pirimidina-2,4,6-triona é capaz de atuar como quelante de zinco, conferindo aos compostos que o contêm a capacidade de inibir metaloproteinases (Grams et al., 2001), sendo esta, a provável razão para a sua introdução nas sulfonamidas avaliadas. O inibidor

das MMPs mais potente avaliado pelo grupo (**5**, Figura 1.9), foi testado em modelo animal de SDRA induzida por LPS. Foi administrado por via intraperitoneal nas doses de 0,01, 0,1 e 1 mg/kg, tendo reduzido de forma dose-dependente a concentração de proteínas no fluido de lavagem broncoalveolar, a infiltração de leucócitos nos pulmões e efeitos histológicos negativos (He et al., 2016). A síntese dessa substância foi realizada em apenas duas etapas (Figura 1.9). Inicialmente, a 4-amino-acetofenona foi reagida com o cloreto de benzenosulfonila em piridina, formando a sulfonamida **6** por uma reação do tipo Sn2. O produto final foi obtido pela reação entre **6** e monohidrato de aloxana (He et al., 2016).

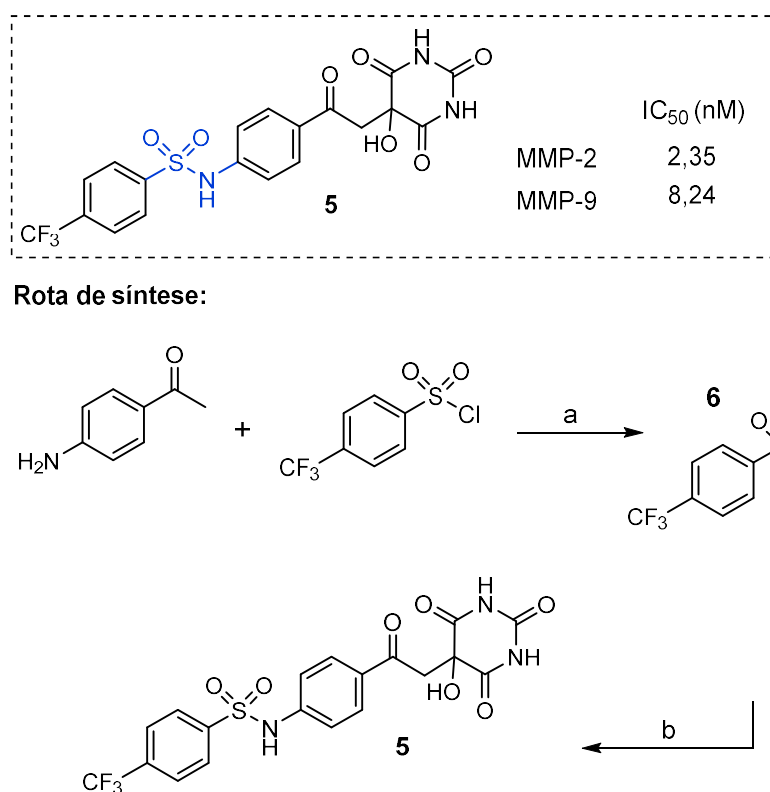


Figura 1.9. Composto **5** e rota sintética para a sua obtenção. Condições das reações: (a) piridina, refluxo, 4 h; (b) ácido acético glacial, refluxo, 3 h.

Recentemente, Chen e colaboradores avaliaram diversas sulfonamidas em células J77A4.1 estimuladas com LPS e observaram que várias delas exerceram um efeito anti-inflamatório, reduzindo a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α . Um dos compostos mais promissores (**7**, Figura 1.10) apresentou valores de IC_{50} de 0,61 μ M e 4,34 μ M para a redução de IL-6 e TNF- α , respectivamente (Chen et al., 2023). Essa substância foi administrada oralmente a camundongos na dose de 20 mg/kg e aliviou a lesão pulmonar aguda

induzida por LPS. As substâncias avaliadas neste trabalho foram planejadas com base na estrutura da amida **8**, que anteriormente havia demonstrado boa atividade anti-inflamatória em modelo animal de LPA induzida por LPS. Chegou-se na estrutura **7** (e seus análogos) após a: substituição da porção feniltiazol por piridina; troca bioisostérica da amida por sulfonamida; e uso da ferramenta *scaffold hopping* para substituir a cadeia alquílica flexível pelo anel benzênico (Chen et al., 2023). Para a obtenção de **7**, o cloreto de benzenossulfonila substituído **9** foi reagido com a 2-(aminometil)piridina para formar a sulfonamida **10**, que então reagiu com a piperazina **11** por meio de uma substituição nucleofílica aromática.

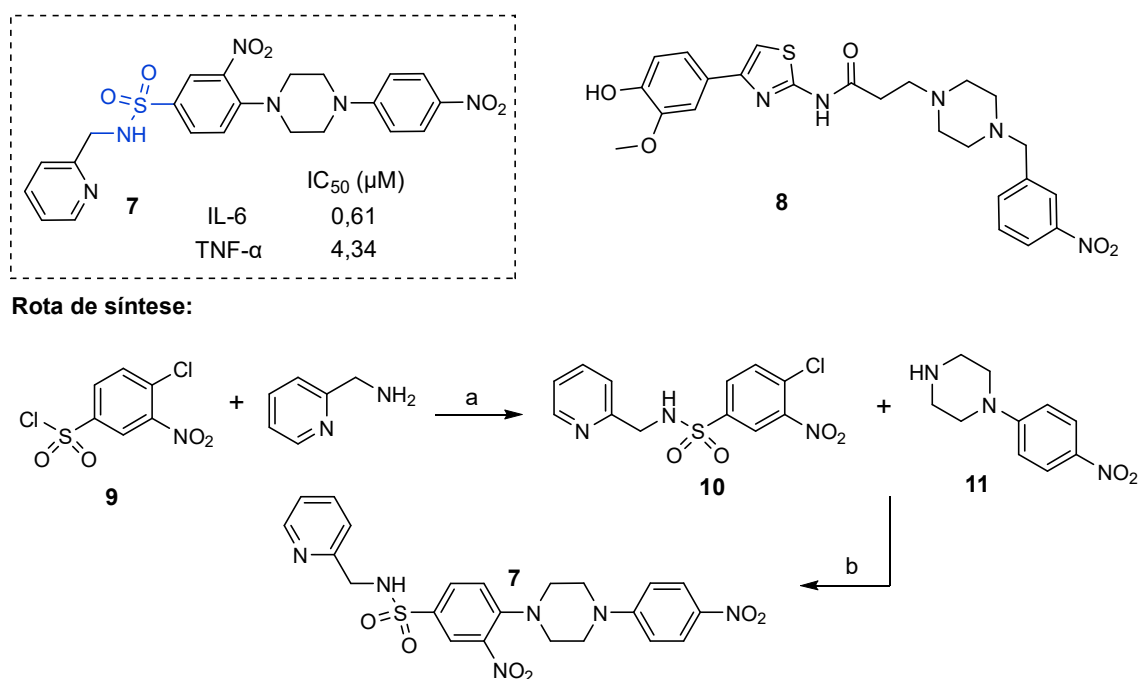


Figura 1.10. Composto **7** e rota sintética para a sua obtenção. Condições das reações: (a) CH_2Cl_2 , Et_3N , 0°C – temperatura ambiente; refluxo, 4 h; (b) MeCN , K_2CO_3 , KI , 85°C .

Uma nova busca na base de dados Scopus foi realizada, utilizando desta vez a combinação de palavras-chave “(sulfonamides OR sulfonamide) AND (COVID-19 OR SARS-CoV-2)”, com o objetivo de estimar e analisar o número de publicações que abordam o uso de sulfonamidas em estudos relacionados à COVID-19. Supreendentemente, a pesquisa resultou em 408 publicações no curto período de 2020-2025 (Figura 1.11), das quais 298 são artigos originais, 50 revisões, 30 cartas ao editor, 20 notas científicas e 8 artigos editoriais. Vale ressaltar que a pesquisa foi realizada somente até o maio de 2025, o que pode justificar o número mais reduzido de artigos neste ano. Ao restringir a pesquisa pelas subáreas “Chemistry”, “Biochemistry, Genetics and Molecular Biology” e “Pharmacology, Toxicology and

Pharmaceutics” restaram 142 artigos originais, dos quais, alguns serão discutidos a seguir. Não serão apresentados os trabalhos que envolvem planejamento, síntese e avaliação biológica de peptídeo miméticos ou de inibidores covalentes das proteínas virais.

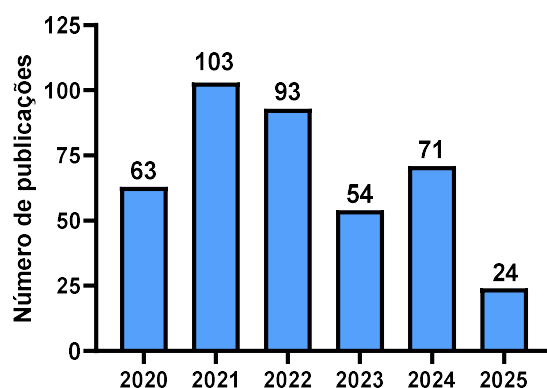


Figura 1.11. Número de publicações por ano contendo a expressão “(sulfonamides OR sulfonamide) AND (COVID-19 OR SARS-CoV-2)” no título da publicação, abstract ou palavras-chave. Os dados compreendem a faixa de 2020 até maio de 2025.

Franco e colaboradores utilizaram uma abordagem de docking molecular e um modelo farmacofórico baseado em fragmentos, que possibilitaram a identificação de uma sulfonamida, denominada LASSBio-1945 (**12**, Figura 1.12), como inibidora da M^{pro} do SARS-CoV-2. O ensaio de inibição da M^{pro} revelou um valor de IC_{50} de 15,97 μM . Os autores, no entanto, não avaliaram essa substância em células infectadas e, portanto, não se sabe se é capaz inibir a replicação do vírus. Além disso, não é informado nenhum dado de citotoxicidade, e a rota de síntese da molécula também não é descrita (Franco; Maia; Barreiro, 2021).

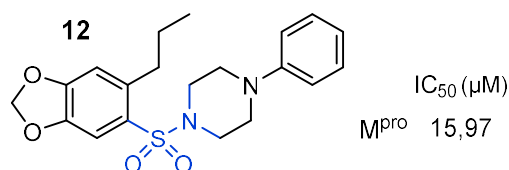


Figura 1.12. LASSBio-1945 (**12**), inibidor da M^{pro} do SARS-CoV-2.

Em um artigo recente, uma abordagem de triagem virtual baseada em estrutura (do inglês, *structure-based virtual screening*) foi empregada para encontrar novos potenciais inibidores da enzima M^{pro} do SARS-CoV-2 (Pojtanadithee et al., 2023). Os autores utilizaram uma quimioteca própria contendo 1052 moléculas baseadas em produtos naturais. Dessas

substâncias, três híbridos sulfonamida-chalcona se destacaram (Figura 1.13). As moléculas então foram testadas em células Vero E6 infectadas, tendo sido capazes de inibir a replicação viral com valores de EC_{50} na faixa de 0,89 a 1,08 μM . Além disso, apresentaram baixa citotoxicidade em células Vero E6 não infectadas (CC_{50} : 13,82 - > 50 μM). Os três híbridos inibiram a atividade da M^{pro} isolada quando testados nas concentrações de 10 μM e 100 μM , e o K_i para um deles foi determinado (**14**, $K_i = 10,0 \mu\text{M}$). Essa publicação não descreve a rota de síntese das substâncias.

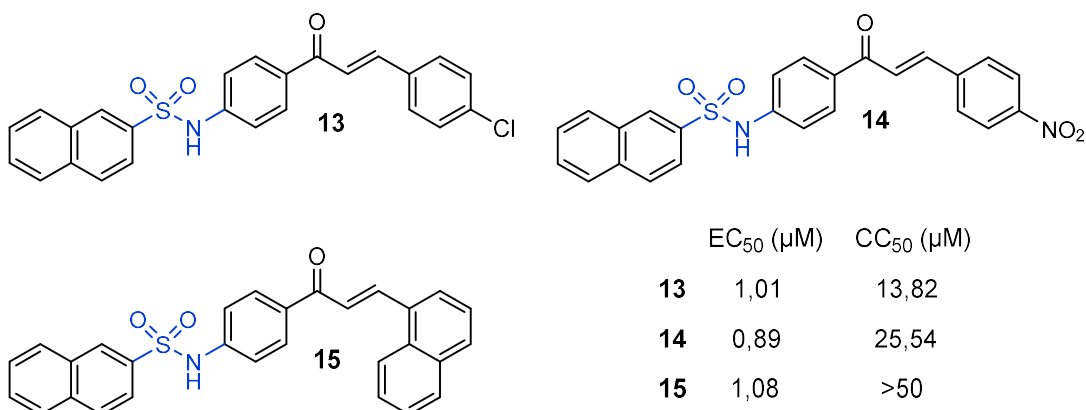


Figura 1.13. Híbridos sulfonamida-chalcona (**13-15**) com atividade anti-SARS-CoV-2.

Antes da pandemia da COVID-19, diversos inibidores não covalentes de proteínas do SARS-CoV já haviam sido identificados. Entre eles, destaca-se a amida **16** (Figura 1.14), que apresentou excelente atividade inibitória contra a PL^{pro} desse vírus, com um IC_{50} de 0,6 μM e atividade antiviral moderada (EC_{50} em célula Vero E6 = 14,5 μM) (Ratia et al., 2008). Em uma publicação mais recente, essa e outras amidas também demonstraram atividade frente ao SARS-CoV-2 e à sua respectiva PL^{pro} (Ghosh et al., 2023). Os autores avaliaram também as sulfonamidas correspondentes (**17-20**), cujos valores de IC_{50} variaram entre 1,3 e >100 μM . Apesar da sulfonamida **19** ter exibido uma potente atividade *in vitro* contra a PL^{pro} , seu efeito sobre a replicação viral foi consideravelmente inferior, tendo apresentado EC_{50} de 64 μM . Os autores não apresentam uma explicação para a discrepância entre a inibição enzimática e a inibição da replicação viral. As sulfonamidas foram preparadas em uma ou duas etapas. Inicialmente, a amina opticamente ativa **21** foi reagida com o cloreto de 4-nitro-benzenossulfonila ou cloreto de 3-nitro-benzenossulfonila, formando as substâncias **17** e **18**. O grupo nitro foi então reduzido por hidrogenação catalítica com Pd/C em acetato de etila, resultando nos produtos **19** e **20** (Ghosh et al., 2023).

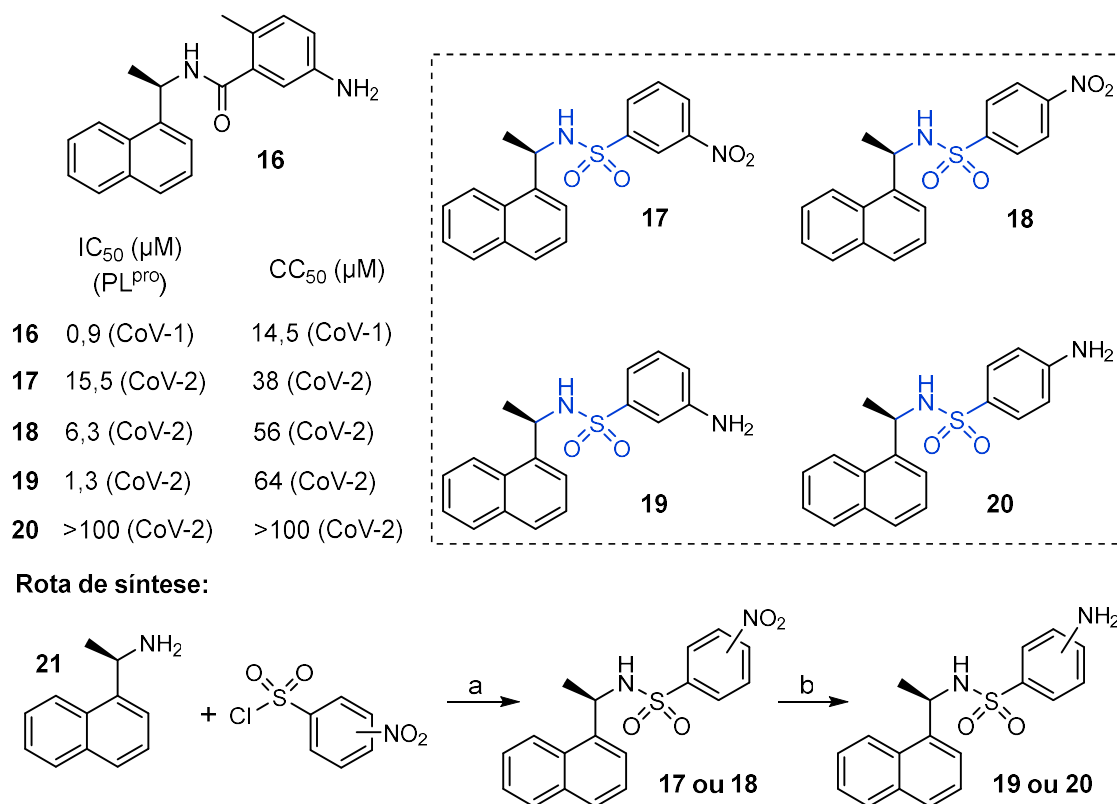


Figura 1.14. Inibidores da PL^{pro} de SARS-CoV e SARS-CoV-2 e rota sintética para a sua obtenção. Condições das reações: (a) CH₂Cl₂, H₂O, NaHCO₃, 23°C, 12 h (b) EtOAc, Pd/C, H₂, 23°C, 12 h.

Em 2020, Ahmed-Belkacem e colaboradores reportaram uma série de inibidores da nsp14 [(N7-guanina)-metiltransferase, N7-MTase) do SARS-CoV. As substâncias foram planejadas como competidores dos dois substratos da enzima – a S-adenosil-L-metionina (SAM) e o cap do RNA – ocupando então duas cavidades adjacentes (Ahmed-Belkacem et al., 2020). Apesar da excelente inibição enzimática (**22**, Figura 1.15), não exibiram atividade antiviral em células Vero E6 infectadas. Os autores sugeriram que a falta de atividade poderia ser devido ao alto peso molecular e a grande tamanho das moléculas, fatores que podem dificultar a internalização celular dessas substâncias (Ahmed-Belkacem et al., 2022). Por esse motivo, desenvolveram análogos menores para serem testados contra a nsp14 do SARS-CoV-2. Sete das 39 moléculas avaliadas mostraram notável atividade nanomolar de dois dígitos frente a nsp14 e o melhor inibidor (**23**, Figura 1.15) apresentou alta seletividade em relação a N7-MTase humana. Apesar desse resultado promissor, as substâncias não tiveram a atividade antiviral avaliada em modelo celular. A síntese inicia-se pela reação entre a adenosina aminada 24, protegida na forma de cetal, e o cloreto de benzenossulfonila adequado. A reação foi feita

em DMF, a 0°C e na presença de trietilamina. A sulfonamida foi então alquilada com o *p*-toluenossulfonato de etila (EtOTs) em DMF, na presença de KI e K₂CO₃. Por fim, para desproteger a adenosina, o cetal foi hidrolisado em meio ácido (Ahmed-Belkacem et al., 2022).

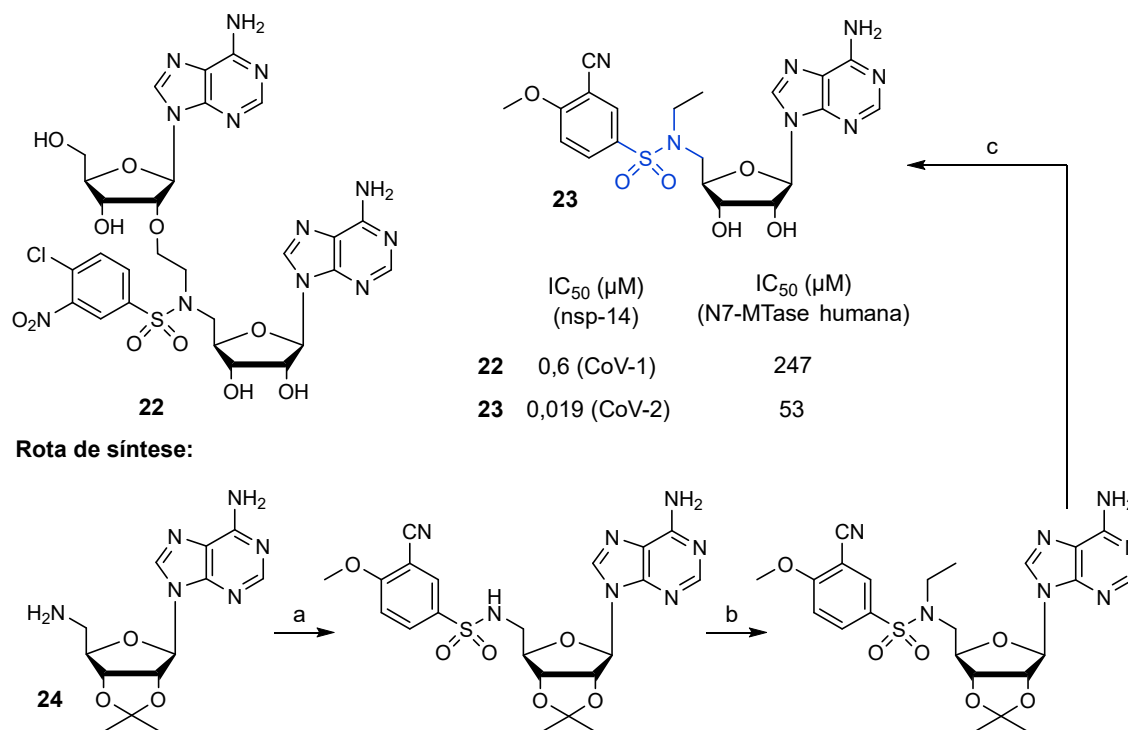


Figura 1.15. Inibidores da nsp14 do SARS-CoV e SARS-CoV-2 e rota sintética para a sua obtenção. Condições das reações: (a) cloreto de benzenossulfonila adequado, Et₃N, DMF, 0°C (b) EtOTs, KI, K₂CO₃, DMF, 50°C, 18 h; (c) HCO₂H/H₂O (1:1 v/v), 25°C.

1.1.6. Sidonas: breve histórico, estrutura, síntese e atividades anti-inflamatória e antiviral

As sidonas são compostos heterocíclicos de cinco membros, formados por um núcleo de 1,2,3-oxadiazol com um átomo de oxigênio exocíclico conectado à posição 5 do anel heterocíclico, sendo comumente representados na literatura pelas estruturas **I** e **VI** (Figura 1.16). São, possivelmente, os representantes mais estudados da classe dos compostos mesoiônicos, tendo atraído a atenção de pesquisadores desde a sua descoberta em 1935 (Earl; Mackney, 1935) devido, em parte, a sua estrutura molecular incomum (Baker; Ollis; Poole, 1949). A utilidade sintética desses compostos, que podem atuar como precursores de outros heterociclos por meio de reações de cicloadição 1,3-dipolar com alcinos ou alcenos, consiste em um dos maiores motivos pelo seu interesse atual. Essas reações têm sido bastante exploradas

no âmbito da Química Bioortogonal – um campo recente e inovador da química que desenvolve reações altamente seletivas, rápidas e compatíveis com sistemas biológicos vivos, sem interferir nas funções naturais das células ou do organismo (Decuypère et al., 2017). Essa área da química é tão impactante, que Carolyn Bertozzi, Morten Meldal e K. Barry Sharpless receberam o Prêmio Nobel de Química em 2022 por suas grandes contribuições nesta área. Os aspectos que destacam as sidnonas como importantes *síntons* em síntese orgânica são amplamente discutidos em revisões recentes (Decuypère et al., 2017; Il'ya; Moiseev, 2020; Khan et al., 2025; Lepori et al., 2024).

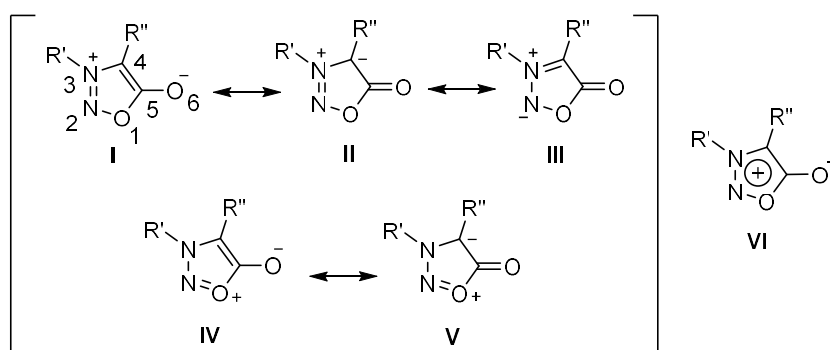
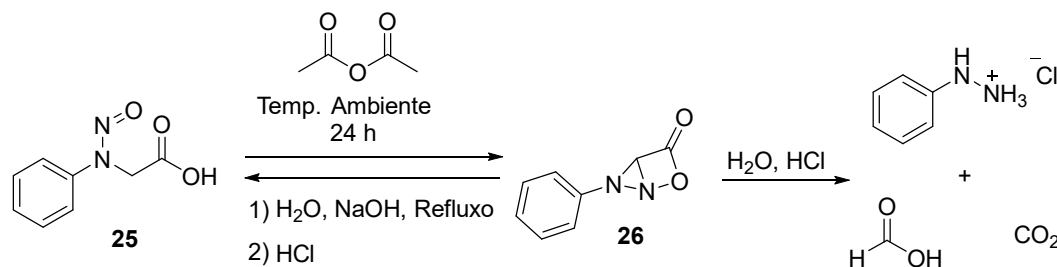


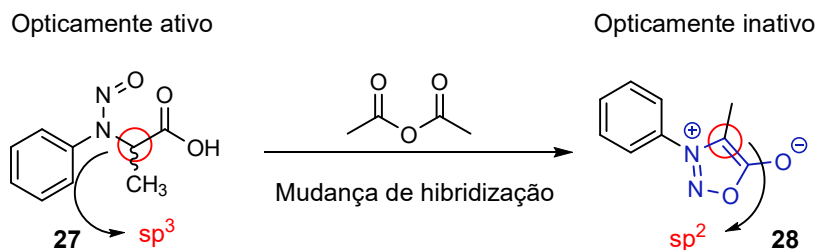
Figura 1.16. Estruturas canônicas de ressonância das sidnonas (I-V) e uma representação usual em VI. A numeração dos átomos do heterociclo utilizada ao longo do trabalho é indicada na estrutura I.

Earl e Mackney descreveram em um artigo publicado em 1935, que ao tratar a *N*-nitroso-*N*-fenil-glicina (**25**) com anidrido acético, à temperatura ambiente, uma reação ocorreu com a formação de um composto ao qual foi atribuída a estrutura bicíclica **26**, conforme o Esquema 1.1 (Earl; Mackney, 1935). Os autores também avaliaram a estabilidade desse produto em meio ácido e básico. Ao aquecer em meio de ácido clorídrico, **26** foi decomposto em fenil-hidrazina, CO₂ e ácido fórmico, enquanto em uma solução aquosa de hidróxido de sódio 5%, em refluxo, o precursor **25** foi regenerado. Em homenagem à Universidade de Sydney, Austrália, local em que esse primeiro estudo foi realizado, foi proposto referir-se a substâncias deste tipo como sidnonas, sendo **26** a 3-fenil-sidnona, ou *N*-fenil-sidnona (Eade; Earl, 1946).



Esquema 1.1. Síntese da sidnona e sua estrutura bicíclica proposta por Earl e Mackney.

A estrutura bicíclica inicialmente proposta, contendo os anéis de 3 e 4 membros fusionados, foi questionada em inúmeros trabalhos subsequentes, tendo sido considerada inconsistente com as propriedades desses compostos (Baker; Ollis, 1946; Earl, 1946; Earl; Leake; Le Fèvre, 1948; Kenner; Mackay, 1946). Primeiramente, uma molécula como **26** provavelmente seria instável devido a estrutura altamente tensionada, no entanto, as sidnonas mostravam ser estáveis, não decompondo apreciavelmente quando aquecidas e podendo ser recristalizadas em água, etanol e outros solventes (Baker; Ollis, 1946). Ainda, uma estrutura como **26** implicaria na existência de isômeros opticamente ativos, devido a presença de um carbono assimétrico no anel heterocíclico. Contudo, alguns trabalhos demonstraram que nitroso-glicinas opticamente ativas, como a forma destro-rotatória da *N*-nitroso-*N*-fenil-alanina (**27**) era convertida na sidnona opticamente inativa (**28**) (Baker; Ollis, 1946; Eade; Earl, 1948), provavelmente devido a mudança de hibridização do carbono assimétrico sp^3 para um carbono sp^2 (Esquema 2.2). Com base nessas e em outras evidências, Baker *et al.* (Baker; Ollis; Poole, 1949) sugeriram em 1949 uma estrutura modificada, que consistia em um anel de cinco membros, o qual só poderia ser representado por um híbrido de ressonância de muitos contribuintes dipolares e tetrapolares, alguns dos quais se encontram representados na Figura 16 (I-V). Segundo os autores, as sidnonas teriam caráter aromático, o que explicaria a sua estabilidade. Ainda, de acordo com a nova estrutura, o anel seria planar, sem carbono assimétrico e não poderia possuir atividade óptica (Esquema 2.2).



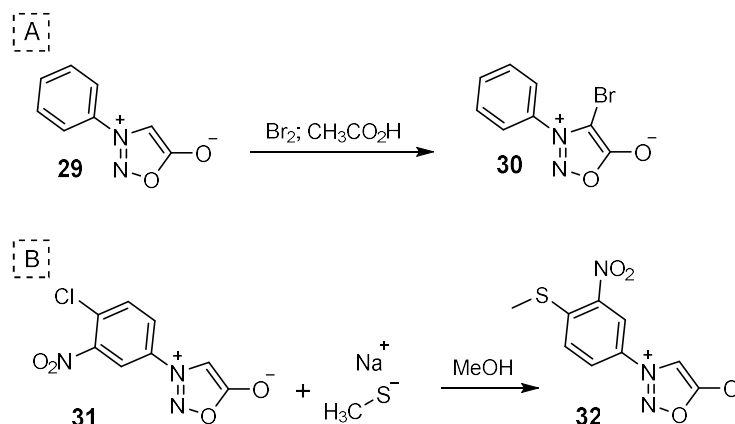
Esquema 2.2. Mudança de hibridização do carbono assimétrico e consequente perda de atividade óptica com a formação das sidnonas.

O termo mesoiônico (de “mesomérico” e “iônico”) foi então proposto por Baker e colaboradores para descrever compostos que, assim como as sidnonas, possuísem estruturas heterocíclicas dipolares híbridas de diversas formas iônicas contribuintes (Baker; Ollis; Poole, 1949). Embora esses autores não tenham sido os primeiros a sugerirem moléculas com essas características estruturais, seu trabalho representou um marco importante para o desenvolvimento da química dos compostos heterocíclicos, principalmente por terem reconhecido de forma mais ampla esse tipo de molécula e por terem proposto o uso do termo mesoiônico, que passou a agrupar moléculas como as sidnonas, as sidnonas-iminas e diversas outras em uma numerosa família de compostos (Ogilvie; Corwin, 1961; Schönberg, 1938). Desde então, novos compostos mesoiônicos têm sido obtidos e estudados. Inicialmente, a definição de compostos mesoiônicos incluía anéis de seis membros (Baker; Ollis, 1957), porém, de acordo com definições posteriores, seu uso deveria ser restrito a anéis de cinco membros.

Quando a estrutura mesoiônica das sidnonas foi proposta, foram sugeridas algumas simbologias para a sua representação, como a **VI** (Figura 1.16), que passou a ser muito utilizada. Nesta, a carga negativa é localizada no átomo exocíclico, deixando uma carga positiva e um sexteto de elétrons π conjugados no anel, representados pelo sinal (+) em um círculo. **VI** é similar a **I**, porém, o uso do círculo claramente sugere certo caráter aromático (Baker; Ollis, 1957). No entanto, esta fórmula pode induzir, erroneamente, à ideia de que tanto a carga positiva quanto os elétrons π estão distribuídos igualmente por todos os átomos do anel e que a carga negativa se encontra associada somente ao átomo exocíclico. Para evitar essa interpretação e simplificar a representação desses compostos, a estrutura **I** foi escolhida para ser usada ao longo desta tese.

Os primeiros cálculos moleculares realizados para as sidnonas indicavam que a carga negativa estaria localizada, em sua maior parte, no oxigênio exocíclico e que a ligação C5-O6 teria pouco caráter carbonílico. Outros cálculos teóricos, por sua vez, além de terem revelado uma grande assimetria na distribuição de carga entre todos os átomos, implicaram em uma densidade de carga negativa em C4 (Barber et al., 1972), o que foi corroborado por estudo de RMN de carbono-13 (Hearn; Potts, 1974), observando-se a maior blindagem do C4 e maior desblindagem do C5-O6 em comparação com outros heterocíclis não substituídos e cetonas, respectivamente. Esses cálculos, também se mostraram de acordo com a capacidade desse anel mesoiônico para participar de reações de substituição eletrofílica, sendo a posição C4 considerada nucleofílica (Esquema 1.3, A) (Kenner; Mackay, 1946). Além disso, alguns estudos

experimentais e teóricos mostraram que o anel heterocíclico da sidnona atua como um grupo retirador de elétrons por indução e, possivelmente, por ressonância, para grupos ligados a N3, se comportando como desativador em reações de substituição eletrofílica aromática (Kenner; Mackay, 1946) e ativador em reações de substituição nucleofílica aromática (Esquema 1.3, B). A constante σ_p de Hammett para o anel da sidnona foi calculada como sendo 0,71, valor próximo ao do grupo nitro (Tin-Lok; Miller; Stansfield, 1964).



Esquema 1.3. Reação de substituição eletrofílica aromática (A) (Kenner; Mackay, 1946). Reação de substituição nucleofílica aromática (B) (Tin-Lok; Miller; Stansfield, 1964).

No entanto, a banda de estiramento da ligação exocíclica C5-O6 nos espectros de infravermelho das sidnonas, observada em cerca de 1730 cm^{-1} , é consistente com uma ligação carbonílica ($\text{C}=\text{O}$) (Fugger; Tien; Hunsberger, 1955; Il'ya; Moiseev, 2020). O comprimento desta ligação ($\sim 1,21\text{ \AA}$), obtido por estudos de difração de raios-X, também indica que trata-se de uma ligação essencialmente dupla (Bärnighausen et al., 1963; Fan; Wang; Ueng, 1993; Morley, 1995). A ligação C5-O1, por sua vez, é longa ($\sim 1,42\text{ \AA}$), maior, inclusive, que a ligação C-O do furano ($\sim 1,37\text{ \AA}$) e de algumas lactonas α , β -insaturadas (Sun et al., 2019; Thiessen; Hope, 1967). Thiessen e Hope (1967), em 1967, forneceram uma explicação dessas características estruturais ao analisarem a estrutura cristalina da 4,4'-dicloro-3,3'-etileno-bis(sidnona) e, em 2015, Oziminski e Ramsden (2015) reinterpretaram essa explicação em termos de interações análogas ao efeito anomérico (Figura 1.17). De acordo com essa interpretação o par de elétrons livre do oxigênio exocíclico, situado no mesmo plano do heterociclo, é doado ao orbital anti-ligante associado a ligação do oxigênio endocíclico com o carbono carbonílico ($\sigma^*\text{C5-O1}$). Esse efeito, segundo os autores, não só racionaliza o longo comprimento da ligação C5-O1 e o caráter carbonílico da ligação C5=O6, como também explica a distorção dos ângulos de ligação (O1-C5=O6 e C4-C5=O6) observada nas estruturas

cristalinas. Todas essas evidências indicavam que as sidnonas teriam, provavelmente, baixa aromaticidade.

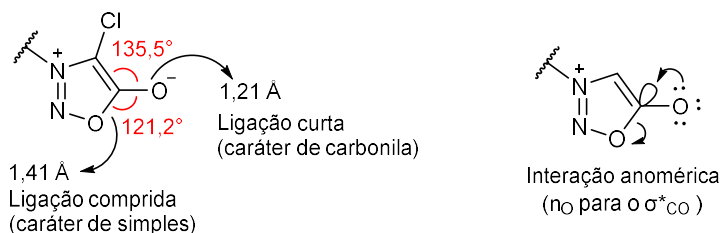


Figura 1.17. Comprimentos e ângulos de ligação da 4,4-dicloro-3,3-etileno-bis(sidnona) determinados por Thiessen e Hope (1967) e efeito anomérico proposto por Oziminski e Ramsden (2015).

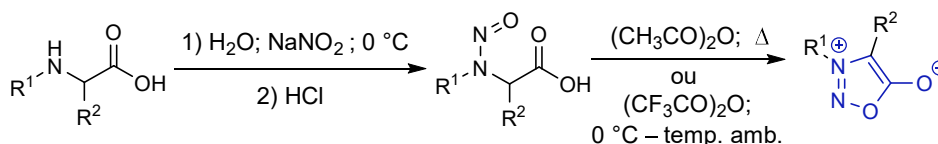
Oziminski e Ramsden (2015) também investigaram outras propriedades de mesoiônicos do tipo A e do tipo B e seus resultados sugerem que os mesoiônicos do tipo A, subclasse a qual as sidnonas fazem parte, não possuem aromaticidade clássica apreciável. Outros autores também já haviam questionado a aromaticidade dos compostos mesoiônicos. Simas *et al.* (1998) reuniram em seu artigo inúmeras evidências que apontam para a existência de uma larga separação de cargas nos anéis mesoiônicos. A deslocalização ocorreria em duas regiões do anel, separadas por ligações essencialmente simples.

O caráter aromático do anel das sidnonas também foi avaliado por meio de dois índices de aromaticidade distintos: índice de Bird (I_5) e NICS (*Nucleus Independent Chemical Shift*). O índice de Bird é baseado em uma avaliação estatística da variação das ordens de ligação entre os átomos de um anel. O valor de I_5 calculado para a sidnona, 42, é considerado relativamente baixo e indica pouca aromaticidade (Bird, 1985). O NICS corresponde ao valor negativo da blindagem magnética absoluta calculada no centro geométrico do anel. Quanto mais negativo for, maior será a aromaticidade (em relação ao seu aspecto magnético). O valor calculado para a 3-fenil-sidnona foi de -6,8 (Oziminski; Ramsden, 2015). Esse valor indica apenas uma baixa aromaticidade, se comparado com aqueles calculados para o *ânion* ciclopentadienil (-12,3 – aromático) e para o ciclopentano (-2 – não aromático).

Com base nas informações apresentadas observa-se que nenhuma das estruturas apresentadas na Figura 1.16 pode, isoladamente, representar as sidnonas. Além disso, a estabilidade apreciável desses compostos pode não ter como único fator, ou até mesmo fator principal, sua aromaticidade, uma vez que tem sido avaliada como baixa.

O principal método para a obtenção das sidnonas ainda consiste na rota sintética clássica, composta por duas etapas: uma reação de *N*-nitrosação dos aminoácidos *N*-

substituídos, seguida por uma reação de ciclização (Esquema 1.4). Os agentes ciclizantes mais usados são o anidrido acético e o anidrido trifluoracético. Este último fornece as sidnonas em menores tempos de reação (poucos segundos ou minutos) e com ótimos rendimentos, mesmo a baixas temperaturas (Baker; Ollis; Poole, 1950). Contudo, a ciclização pode durar vários dias ao ser realizada com o anidrido acético à temperatura ambiente e, por isso, quando este agente ciclizante é utilizado, o meio reacional é normalmente aquecido com o intuito de acelerar a formação da sidnona (Baker; Ollis; Poole, 1950; Eade; Earl, 1946). O anidrido acético é usado em excesso, muitas vezes atuando também como solvente da reação. No entanto, quando o anidrido trifluoracético é usado, a reação normalmente é realizada em solventes orgânicos anidros como o éter etílico, diclorometano e tetraidrofurano (Eade; Earl, 1946).

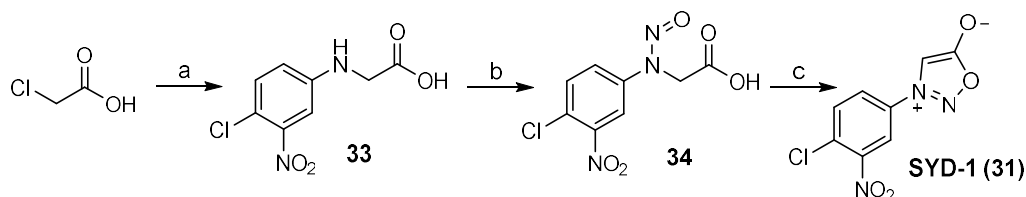


Esquema 1.4. Rota sintética clássica para obtenção das sidnonas.

Uma busca na base de dados Scopus pela combinação de palavras-chave “(sydnone OR sydnones) AND (ALI OR ARDS)”, foi realizada, no entanto, nenhuma publicação foi encontrada. Nem mesmo a combinação “(sydnone OR sydnones) AND (COVID-19 OR SARS-CoV-2)” retornou algum trabalho. Os termos utilizados na busca foram então alterados com o intuito de encontrar trabalhos que envolvessem a atividade anti-inflamatória [“(sydnone OR sydnones) AND (anti-inflammatory OR inflammation)”]. Foram encontrados somente 26 artigos originais, publicados no período de 1965 a 2017. Ao pesquisar por “(sydnone OR sydnones) AND (antiviral OR virus)”, 5 artigos originais foram encontrados entre 2003 e 2016. O número reduzido de trabalhos reflete o quão inexplorada essa classe de substâncias ainda é na Química Medicinal. Apesar das sidnonas corresponderem aos mesoiônicos mais estudados, há muito o que ser explorado com esses heterociclos.

Nosso grupo, demonstrou anteriormente que a SYD-1 (**31**, Esquema 1.5), um composto mesoiônico com propriedades anticancerígenas, reduz a atividade fagocítica de macrófagos, diminui a produção de óxido nítrico (NO) e suprime a liberação de IL-6 em macrófagos estimulados com LPS (Bizetto et al., 2012). Essa molécula tem sido preparada em nosso laboratório pela rota clássica, que envolve a obtenção inicial da glicina-*N*-substituída **33**, por meio da reação entre a 4-cloro-3-nitro-anilina e o ácido 2-cloroacético previamente

neutralizado. A glicina é então nitrosada em meio aquoso na presença de nitrito de sódio. Por fim, o anel da sidnona é formado ao tratar a *N*-nitroso-glicina (**34**) com anidrido acético a temperatura ambiente por alguns dias (Tin-Lok; Miller; Stansfield, 1964), ou ao tratá-la com anidrido trifluoroacético por alguns minutos.



Esquema 1.5. SYD-1 e sua rota de síntese. Condições de reação: (a) i: NaOH, H_2O , 0°C ; ii: 4-cloro-3-nitro-anilina, EtOH, Refluxo; (b) NaNO_2 , H_2O , $0-5^\circ\text{C}$; (c), anidrido trifluoroacético.

Nithinchandra e colaboradores (2012) prepararam sidnonas derivadas do conhecido anti-inflamatório ibuprofeno e avaliaram sua ação *in vivo*. Os híbridos reduziram o edema de pata de ratos *Wistar* em 38,5-67,9%, duas horas após a administração de carragenina. No estudo, as substâncias foram administradas via oral em uma dose de 20 mg/kg. Entre os compostos, **35** e **36** (Figura 1.18) exibiram as melhores atividades anti-inflamatórias, comparáveis à indometacina (redução de 70,1 %). Para o preparo das moléculas, a reação de formilação de Vilsmeier-Haack foi empregada para formular a *N*-fenil-sidnona ou a *N*-(fenil)-sidnona substituída de interesse (Figura 18). Em paralelo, o triazol-2-tiona **38** foi preparado pela reação entre o ibuprofeno e a tiocarboidrazida. A reação entre **37** e **38** resultou nos compostos imínicos de estrutura **39**, que após reação de mannich resultou nos produtos finais.

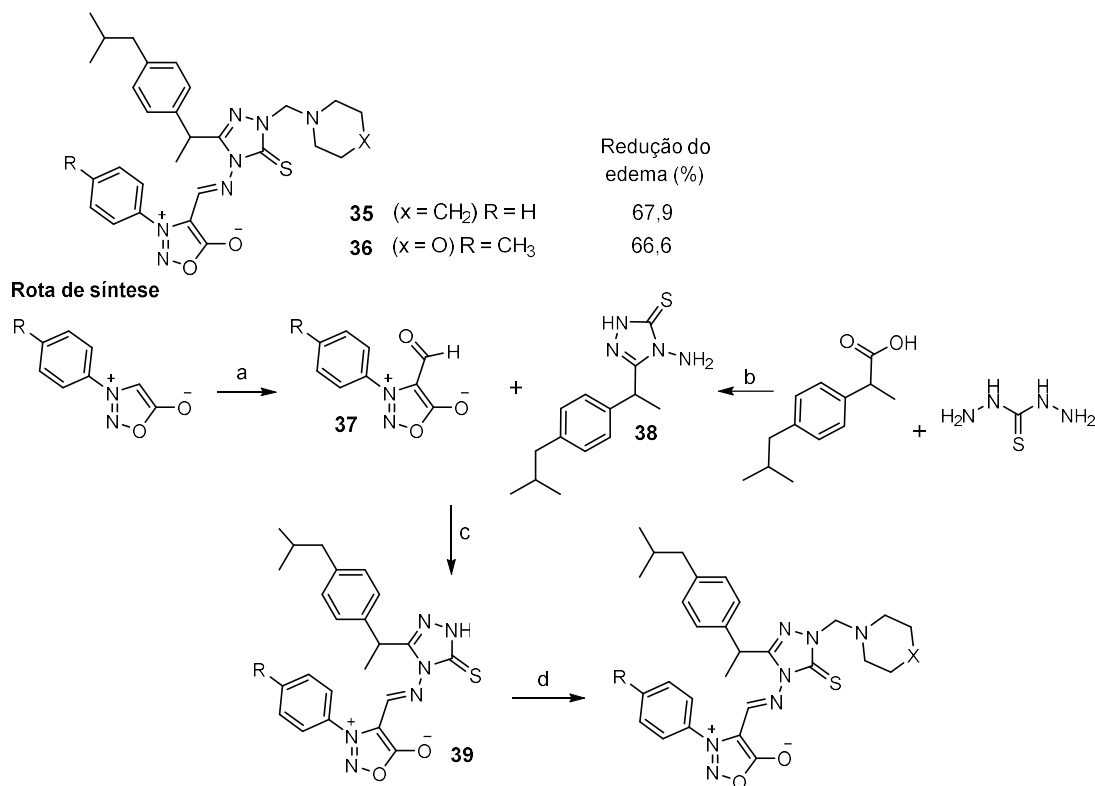


Figura 1.18. Derivados de ibuprofeno com atividade anti-inflamatória. Condições das reações: (a) *N*-metilformanilida, POCl₃, < 45°C; (b) aquecimento lento e brando; (c) EtOH, H₂SO₄, temperatura ambiente; (d) Formaldeído, aminas secundárias, EtOH, DMF, temperatura ambiente.

Shahrukh e colaboradores (2013) prepararam diversas bases de Mannich a partir da 4-metilfenil-sidnona ou da 3,3'-(4,4'-difenil)bis-sidnonil metano (Figura 1.19). As substâncias foram avaliadas em células pulmonares embrionárias humanas (HEL) infectadas pelo vírus HIV, citomegalovírus (CMV) ou vírus da varicela-zóster (VZV). Nenhuma das substâncias foi ativa contra HIV e VZV. Quatro delas (**40-43**) foram capazes de inibir a replicação do CMV, com valores de IC₅₀ de 4 a 15,3 µg/mL. Essas substâncias inibiram o crescimento da célula infectada em concentrações mais elevadas (CC₅₀ = 20-38,2 µg/mL), tendo a substância mais promissora (**41**) apresentado índice de seletividade de 7,2. As sidnonas foram preparadas pela rota clássica e em seguida reagidas com o paraformaldeído e a amina secundária adequado para formar as bases de Mannich. Esta é a única publicação que descreve sidnonas ativas contra algum vírus.

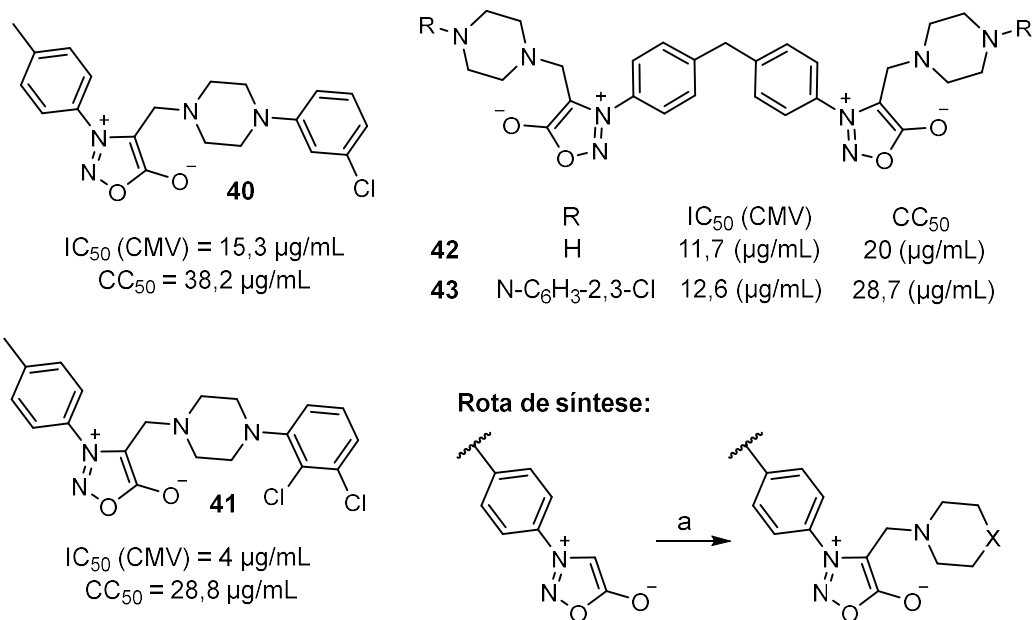


Figura 1.19. Bases de Mannich ativas contra o citomegalovírus (CMV). Condições de reação: (a) paraformaldeído, amina secundária, EtOH, CH₃CO₂H.

1.1.7. Albumina Sérica Humana

A albumina sérica humana (ASH), assim como outras proteínas plasmáticas (como a α 1-glicoproteína), desempenha um papel fundamental no transporte de várias substâncias endógenas e exógenas, incluindo fármacos. Por esse motivo, pode afetar significativamente suas propriedades farmacocinéticas, como distribuição, excreção e meia-vida plasmática (Goodman et al., 1996). Assim, avaliar a interação de moléculas bioativas com a ASH cedo nos programas de descoberta de fármacos tem se tornado uma estratégia (Fan et al., 2022). A interação com a ASH pode aumentar a solubilidade de compostos muito insolúveis e lipofílicos, permitindo que eles sejam transportados ao local de ação no organismo. No entanto, uma associação muito forte pode reduzir a biodisponibilidade das substâncias, prologando seu tempo de circulação no sangue e possivelmente exigindo doses mais elevadas para garantir uma concentração livre – não ligada à ASH – apreciável.

A ASH possui estrutura monomérica com 585 resíduos de aminoácidos organizados em três domínios: I, II e III. No subdomínio IIA, um resíduo de triptofano permite investigar a interação como moléculas bioativas por técnicas espectroscópicas, como fluorescência, absorção no ultravioleta (UV), dicroísmo circular (CD) e fluorescência resolvida no tempo (Chaves et al., 2024a). Essas análises permitem caracterizar o tipo de supressão de fluorescência (supressão estática ou dinâmica) e estimar a afinidade ASH-ligante por meio da constante de

extinção de Stern-Volmer (K_{SV}) e dos parâmetros termodinâmicos ΔG° , ΔH° e ΔS° (Chaves et al., 2024a).

1.2. Objetivos e Justificativa

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado continuamente à investigação da atividade biológica de compostos mesoiônicos e seus cloridratos, em especial as sidnonas (Galuppo et al., 2016) e os sais de 1,3,4-tiadiazólio (Neves et al., 2025). Embora as sidnonas já tenham demonstrado atividades biológicas promissoras, sua ação antiviral é praticamente inexplorada na literatura. Por outro lado, as sulfonamidas estão amplamente representadas em fármacos comercializados para o tratamento de doenças e condições variadas, fazendo parte, inclusive, da estrutura molecular de agentes antivirais ativos contra o SARS-CoV-2, vírus causador da COVID-19. Conforme discutido na introdução, tanto as sidnonas quanto as sulfonamidas aparecem em moléculas com propriedades anti-inflamatórias, reforçando a relevância farmacológica dessas classes. Nesse contexto, o presente trabalho propõe o planejamento racional de novas moléculas híbridas, incorporando as duas unidades estruturais, as sidnonas e as sulfonamidas, em uma mesma molécula (Figura 1.20) – estratégia conhecida como hibridização molecular. O objetivo é desenvolver novos candidatos bioativos com dupla ação, capazes de inibir a replicação do SARS-CoV-2 e, também, reduzir a inflamação associada à Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), condição frequentemente observada em casos graves de COVID-19 e em tantas outras ocasiões.

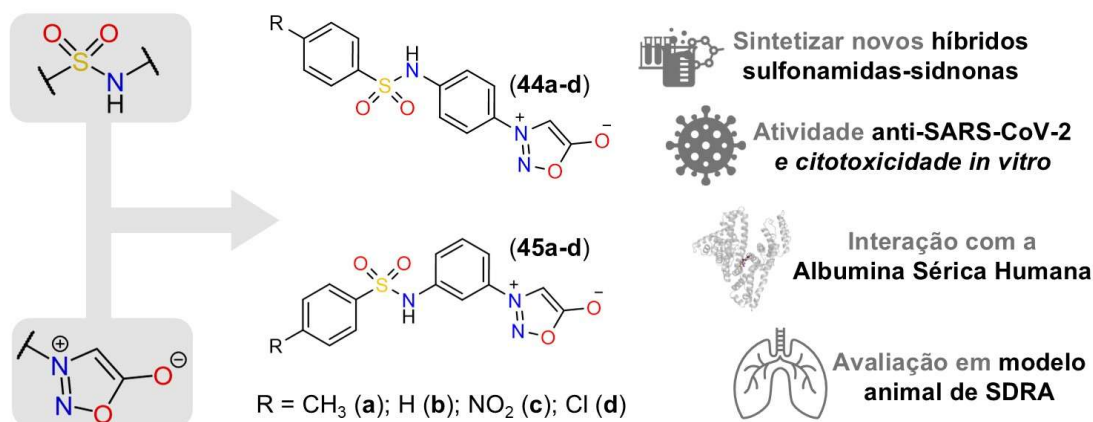
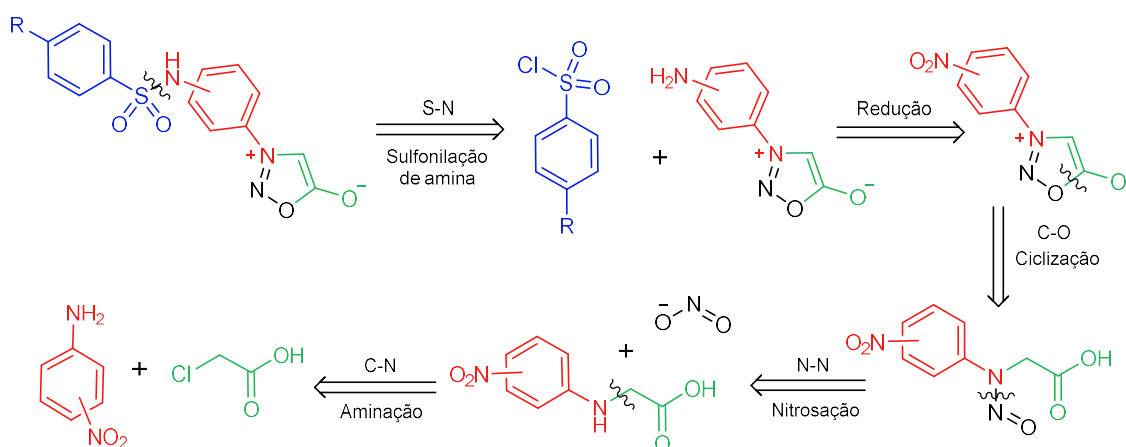


Figura 1.20. Estrutura das moléculas planejadas e principais objetivos do trabalho.

O Esquema 1.6 apresenta a análise retrossintética para a obtenção das novas sulfonamidas-sidnonas. Uma desconexão S-N revela que precursores viáveis para a formação desses produtos podem se tratar de cloretos de benzenossulfonila comerciais e 3-(*p/m*-aminofenil)-sidnonas. O grupo amino, por sua vez, pode ser obtido pela redução do grupo nitro presente nas 3-(*p/m*-nitrofenil)-sidnonas correspondentes. Por meio de uma desconexão C-O, tem-se como possíveis precursores as *N*-aril-*N*-nitroso-glicinas, as quais, pela desconexão N-N, resultam em *N*-aril-glicinas. Por fim, a desconexão C-N indica o ácido cloroacético e anilinas substituídas como possíveis reagentes para a síntese das glicinas.



Esquema 1.6. Análise retrossintética das sulfonamidas-sidnonas planejadas neste trabalho.

Além dos ensaios biológicos já mencionados, o trabalho buscou empregar ferramentas de estudo *in silico* para avaliar parâmetros de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET), a fim de prever, antes dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, se as novas sulfonamidas-sidnonas possuem propriedades farmacológicas favoráveis. Ferramentas simples e gratuitas disponíveis na web foram empregadas para prever suas possíveis atividades biológicas e corroborar o planejamento racional das mesmas. Por fim, a interação dessas substâncias com a albumina sérica humana foi investigada para avaliar a distribuição, excreção e tempo de residência na corrente sanguínea.

Assim, os objetivos desse trabalho de dissertação foram:

- Sintetizar e purificar 8 híbridos sulfonamidas-sidnonas (**44a-d** e **45a-d**);
- Caracterizar todas as moléculas por Infravermelho (IV), técnicas 1D e 2D de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio (RMN ¹³C e RMN ¹H,

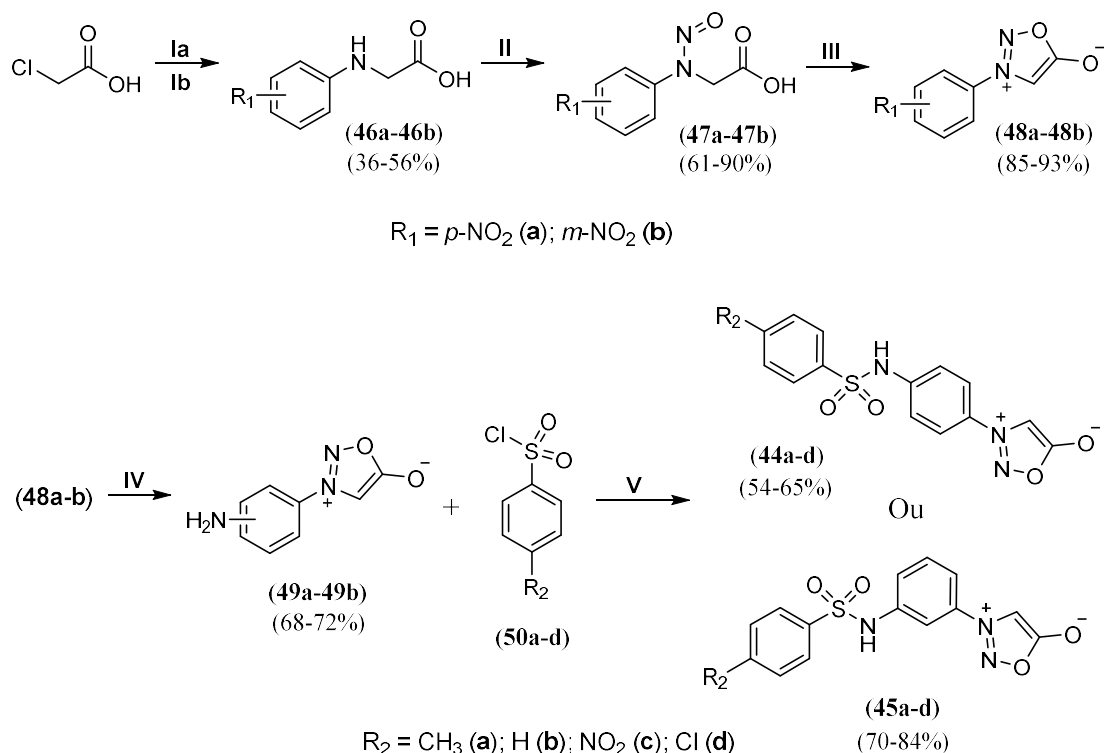
respectivamente), espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS), e Difração de Raio-X;

- Avaliar pureza por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Prever parâmetros de ADME e fármacossimilaridade pela plataforma SwissADME;
- Prever a toxicidade pela plataforma GUSAR Online;
- Estimar as prováveis atividades biológicas das sulfonamidas-sidnonas pela ferramenta PASS Online;
- Investigar a atividade antiviral em células Calu-3 infectadas pelo SARS-CoV-2 e avaliar sua citotoxicidade em células Calu-3 e Vero-3 não infectadas;
- Estudar a interação das substâncias com a Albumina Sérica Humana;
- Avaliar sua ação anti-inflamatória em modelo animal de SDRA induzida por Lipopolissacarídeo (LPS).

1.3. Resultados e discussão

1.3.1. Síntese das sulfonamidas-sidnonas

As substâncias-alvo foram preparadas por meio de uma rota sintética de cinco etapas, conforme ilustrado no Esquema 1.7. A formação das *N*-aril-glicinas (**46a-46b**) e de seus derivados nitrosados (**47a-47b**) foi confirmada por espectroscopia no infravermelho e pela comparação dos pontos de fusão (PF) observados com os valores descritos na literatura. Essas moléculas já são amplamente conhecidas na literatura. Além disso, não foram incluídas nos ensaios biológicos, tendo sido utilizadas exclusivamente como precursoras para a síntese das novas sulfonamidas-sidnonas, que constituem o foco do interesse biológico deste trabalho. Dessa forma, as técnicas de IV e PF foram suficientes para confirmar a sua obtenção. No entanto, para a caracterização das fenil-sidnonas substituídas **48a-48b** e **49a-49b**, também foram utilizadas as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , além do IV e PF. Todos os espectros de IV e RMN estão disponíveis na seção de anexos.

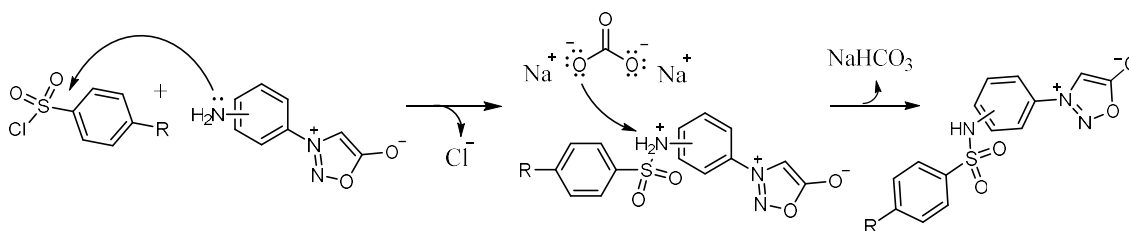


Esquema 1.7. Síntese das sulfonamidas-sidnonas. Condições de reação: (Ia) NaOH, H₂O, 0°C; (Ib) *p*-nitroanilina ou *m*-nitroanilina, H₂O, EtOH, refluxo, 54 h; (II) NaNO₂, H₂O, HCl, 0°C (1,5 h) e temperatura ambiente (40 min); (III) anidrido trifluoracético, temperatura ambiente, 30 min; (IV) SnCl₂, HCl, EtOH/H₂O/THF, refluxo, 1 h; (V) SiO₂, Na₂CO₃, maceração, 1-4 h.

Os novos híbridos **44a-d** e **45a-d** foram preparados em condições isentas de solvente, por meio da maceração de uma mistura de **49a** ou **49b** com um cloreto de benzenossulfonila adequado à temperatura ambiente. Sílica gel foi utilizada como suporte sólido e carbonato de sódio como base. A extração ácido-base foi empregada para isolar os compostos, que posteriormente foram purificados por recristalização ou por lavagem com solventes apropriados. Esses produtos foram obtidos com rendimento moderado a bom (54-84%), e suas estruturas foram confirmadas por IV e RMN de ¹H e ¹³C. Um sinal correspondente ao íon [M-H]⁻ no modo de ionização negativo da espectrometria de Massas de Alta Resolução foi observado para todos os híbridos. Além disso, a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) confirmou a pureza dos sólidos obtidos.

A reação de entre o cloroacetato de sódio e as fenilaminas nitradas trata-se de uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), em que o par de elétrons livre do nitrogênio, centro nucleofílico das aminas, ataca o carbono alfa à carbonila, promovendo a eliminação de um íon cloreto, conforme mostrado no esquema 1.8A (Clayden; Greeves; Warren, 2012). Na reação de nitrosação, em um primeiro momento ocorre, através de uma reação ácido-base entre a glicina

e o íon nitrito, a formação do eletrófilo, o ácido nitroso – espécie volátil e instável (Solomons; Fryhle, 2002). Em seguida, o eletrófilo é atacado pelo par de elétrons livre da amina secundária, formando um intermediário carregado que, após transferência de próton mediada por solvente, sofre eliminação de uma molécula de água. As *N*-nitroso-*N*-aril-glicinas formadas encontram-se em suas formas aniônicas e, portanto, o meio precisa ser acidificado para protonar o carboxilato e ocasionar a sua precipitação no meio aquoso. Por fim, o anel da sidnona é formado ao tratar as glicinas nitrosadas com anidrido trifluoracético. Ocorre a formação de um novo anidrido pela reação do ácido carboxílico da glicina com o anidrido trifluoracético. Então, o grupo nitroso participa de uma reação de ciclização atacando a carbonila desse anidrido. O íon trifluoacético liberado deve então capturar um dos hidrogênios do grupo metileno, levando à formação da sidnona (Baker; Ollis; Poole, 1950).



Esquema 1.9. Mecanismo proposto para a formação das sulfonamidas-sidnonas.

Sarojini e colaboradores prepararam a 4-metil-*N*-(3-nitrofenil)-benzenossulfonamida e compararam seu espectro de infravermelho experimental com as frequências vibracionais previstas por cálculos de DFT (Sarojini et al., 2013). Com base nisso, os autores atribuíram as bandas em 1338 cm^{-1} e 1155 cm^{-1} , observadas no espectro experimental, às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do grupo SO_2 , respectivamente. Normalmente, as bandas correspondentes a esses modos vibracionais são esperadas nas faixas de $1370\text{--}1315\text{ cm}^{-1}$ e $1170\text{--}1135\text{ cm}^{-1}$ para as sulfonamidas (Silverstein et al., 2014). Além disso, em amostras sólidas, a banda de maior frequência costuma ser larga e com múltiplos submáximos (Silverstein et al., 2014). Para os híbridos sulfonamidas-sidnonas obtidos no presente trabalho (Figura 1.21), as absorções de $\nu(\text{SO}_2)$ foram observadas nas faixas de $1362\text{--}1335\text{ cm}^{-1}$ e $1167\text{--}1153\text{ cm}^{-1}$, em concordância com os relatos da literatura. É possível também que a banda de estiramento simétrico do grupo NO_2 , em **44c** e **45c**, tenha se sobreposto a banda de $\nu(\text{SO}_2)$ assimétrico.

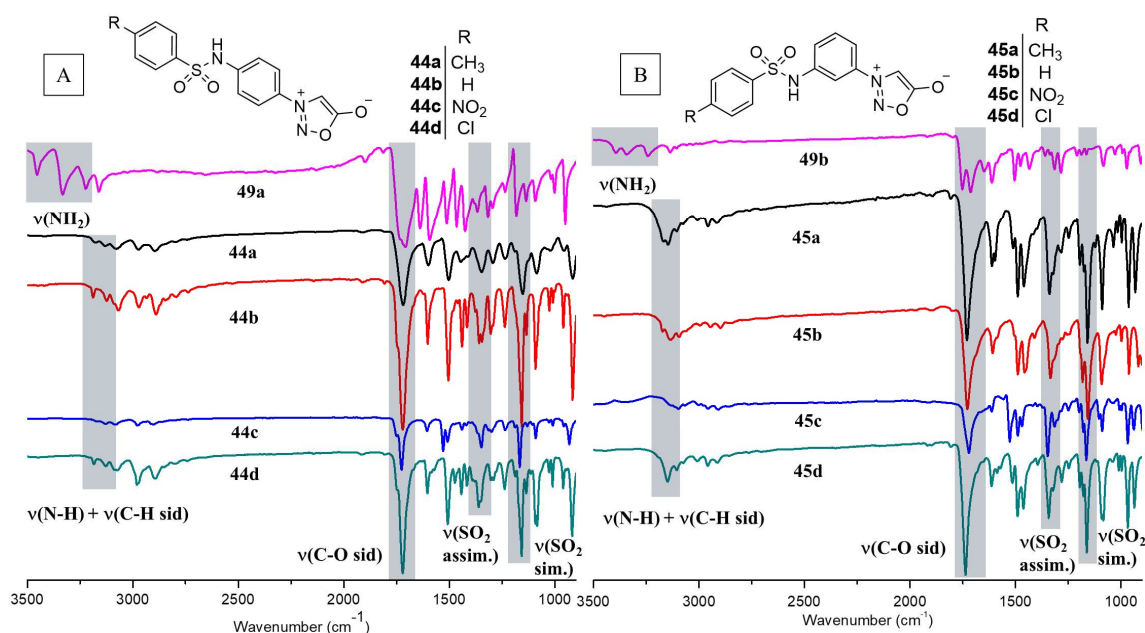


Figura 1.21. Espectros de IV de **49a** e **44a-d** (A), e **49b** e **45a-d** (A). Retângulos cinzas destacam as bandas atribuídas aos principais modos vibracionais.

As vibrações de estiramento do grupo NH_2 (assimétrico: $3454\text{--}3394\text{ cm}^{-1}$; simétrico: $3342\text{--}3333\text{ cm}^{-1}$) e de dobramento angular ($1649\text{--}1639\text{ cm}^{-1}$), observadas nos espectros dos precursores **49a** e **49b**, estão ausentes nos espectros de IV dos compostos **44a-d** e **45a-d**, indicando que as reações ocorreram com a modificação da amina aromática primária, como planejado. Esperava-se observar uma banda por volta de 3265 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo N-H da sulfonamida (Mphahlele; Onwu; Maluleka, 2021; Sanphui; Sarma; Nangia, 2010). No entanto, não foram observadas absorções acima de 3200 cm^{-1} , sugerindo que esse modo vibracional pode ocorrer em frequências mais baixas nos híbridos sulfonamidas-sidnonas, possivelmente devido à formação de fortes ligações de hidrogênio no estado sólido (espectro obtido no modo ATR) (Hansen et al., 2021) – de fato, observou-se por difração de raio X (discutida mais adiante) que o grupo sulfonamida de **44a** realiza ligação de hidrogênio intermolecular com o oxigênio exocíclico da sidnona. Assim, é provável que o estiramento N-H ocorra em uma faixa entre $3200\text{ e }2800\text{ cm}^{-1}$, região onde também se encontram as vibrações de estiramento C-H dos anéis benzílicos e da sidnona (Hansen et al., 2021; Kier; Roche, 1967). De acordo com a literatura, uma das características mais marcantes nos espectros de infravermelho das sidnonas é a presença de uma banda larga entre $1770\text{--}1718\text{ cm}^{-1}$, ocasionalmente com múltiplos picos, atribuída ao estiramento da ligação exocíclica C=O (Stewart, 1964). No presente trabalho, o estiramento C=O da sidnona foi observado entre $1738\text{--}1718\text{ cm}^{-1}$ como uma banda muito intensa.

Nos espectros de RMN de ^1H de todos os híbridos sulfonamidas-sidnonas, foi observado um sinal simplete na faixa de $11,32\text{--}10,86\text{ ppm}$, o que confirma a formação da ligação aminosulfonila, já que essa região de deslocamento químico é típica do hidrogênio ácido de sulfonamidas (SO_2NH) em DMSO-d_6 (Khalid et al., 2022; Mphahlele; Onwu; Maluleka, 2021; Yang et al., 2021). A presença do anel da sidnona nas estruturas dessas moléculas foi confirmada pelos sinais de ^1H e ^{13}C em $7,76\text{--}7,64\text{ ppm}$, $95,3\text{--}94,5\text{ ppm}$ e $168,6\text{--}168,4\text{ ppm}$, correspondentes aos átomos H2, C2 e C1 (Figura 1.22), respectivamente (Bhargava; Shrivastava; Tilwari, 2021; Simas; Miller; De Athayade Filho, 1998; Zhang et al., 2018).

Os sinais de ^1H referentes aos anéis fenila foram todos observados na faixa de $8,40\text{--}7,38\text{ ppm}$. Devido ao padrão de substituição meta, os híbridos **45a-d** apresentam espectros ligeiramente mais complexos do que o outro conjunto de sulfonamidas-sidnonas (**44a-d**). A única modificação estrutural realizada entre os compostos de cada série foi a variação do grupo

R no anel derivado dos cloretos de benzenossulfonila comerciais. Os hidrogênios ligados a esse anel (H10-H14) são os mais afetados pelos efeitos eletrônicos dos diferentes grupos substituintes e, por isso, seus deslocamentos químicos variam consideravelmente. Por outro lado, os sinais de H2-H8 permaneceram praticamente inalterados dentro de cada série, como pode ser observado na Figura 1.22.

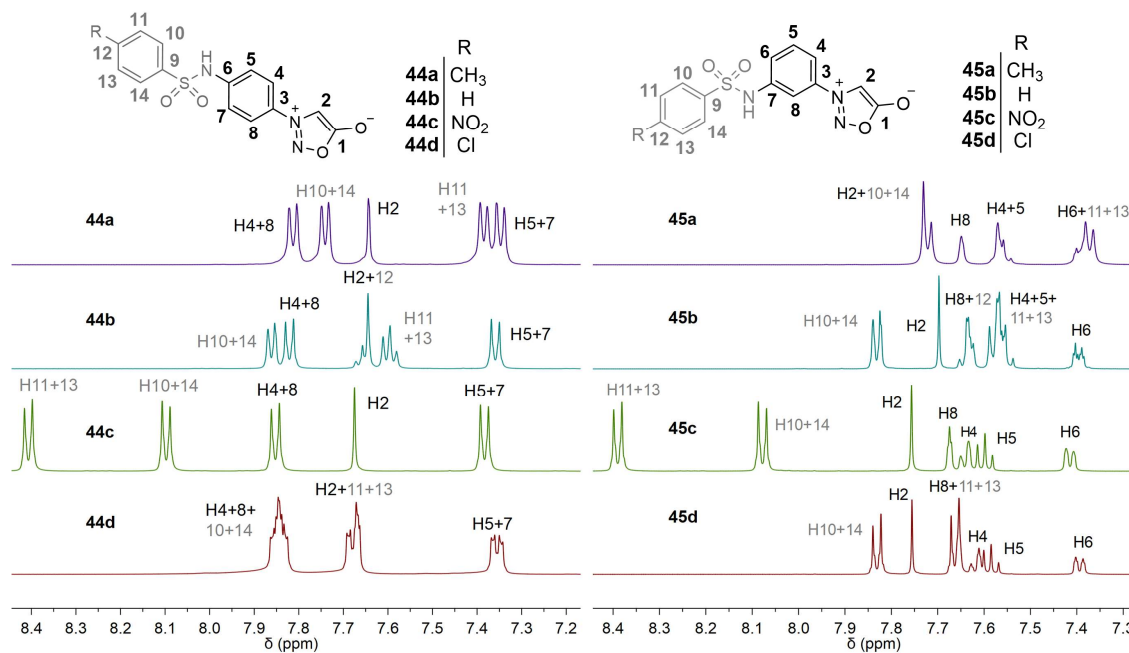


Figura 1.22. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de **44a-d** e **45a-d**. Para facilitar a visualização, os hidrogênios da porção benzenossulfonila foram identificados em cor cinza, enquanto aqueles derivados das amino-fenil-sidnonas foram assinalados em preto.

A Tabela 1.1 apresenta os dados das análises de RMN de ^{13}C dos compostos **49a**, **49b** e dos híbridos sulfonamidas-sidnonas. É possível observar que os deslocamentos químicos dos carbonos C4+8 (série **44a-d**) e C3 e C5 (série **45a-d**) sofreram poucas alterações com a introdução do grupo arilsulfonila. Isso era esperado, uma vez que esses carbonos estão em posição meta em relação ao grupo amino (Horyna; Lyčka; Šnobl, 1980). Os carbonos ligados diretamente ao átomo de nitrogênio (C6 na série **44a-d** e C7 na **45a-d**) são deslocados para campo alto com a introdução do grupo sulfonila, como observado anteriormente para compostos similares (Horyna; Lyčka; Šnobl, 1980). Por outro lado, os demais carbonos derivados das amino-fenil-sidnonas sofreram um deslocamento significativo para campo baixo após a formação da sulfonamida. Isso ocorre porque o grupo sulfonila é fortemente retirador de elétrons, o que reduz a disponibilidade do par de elétrons do nitrogênio para a conjugação com

o anel benzênico, resultando em menor blindagem dos carbonos em posições *orto* e *para* (Horyna; Lyčka; Šnobl, 1980).

Tabela 1.1. Deslocamentos químicos do RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) para **49a**, **49b**, **44a-d** e **45a-d**.

Átomo de carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)					Átomo de carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)				
	49a	44a	44b	44c	44d		49b	45a	45b	45c	45d
1	168.6	168.4	168.4	168.4	168.4	1	168.5	168.4	168.6	168.4	168.4
2	92.9	94.5	94.5	94.6	94.6	2	94.5	95.2	95.3	95.2	95.2
3	122.6	129.7	129.8	130.4	130.0	3	135.4	135.1	135.2	135.2	135.2
4+8	122.2	122.8	122.8	122.9	122.9	4	107.9	116.9	117.2	117.7	117.4
5+7	113.4	119.3	119.5	120.2	119.8	5	130.5	131.2	131.4	131.4	131.3
6	152.5	141.5	141.3	140.6	141.0	6	117.2	122.4	122.8	123.2	122.8
9	-	136.2	139.1	144.4	137.9	7	150.4	139.6	139.1	138.7	139.1
10+14	-	126.8	126.7	128.3	128.7	8	105.2	111.4	111.8	112.3	111.9
11+13	-	130.0	129.5	124.9	129.7	9	-	131.1	139.5	144.3	137.8
12	-	143.9	133.4	150.1	138.3	10+14	-	126.8	126.9	128.4	128.7
CH₃	-	21.0	-	-	-	11+13	-	130.0	129.7	124.9	129.7
						12	-	143.9	133.6	150.1	138.3
						CH₃	-	21.0	-	-	-

Monocristais do híbrido **44a** foram obtidos algumas semanas após uma solução em DMSO- d_6 ter sido deixada em repouso em um tubo de RMN aberto. Presumidamente, o DMSO adquire humidade lentamente devido a sua alta higroscopicidade, reduzindo a solubilidade da substância e forçando a sua cristalização. O composto em questão cristalizou no sistema monoclinico, grupo espacial P21/c, e sua estrutura molecular está representada na Figura 1.23. Um resumo dos comprimentos e ângulos de ligação selecionados estão descritos na Tabela 1.2. Informações sobre a estrutura cristalina, coleta de dados e refinamento estrutural, estão descritas no anexo (Tabela A1).

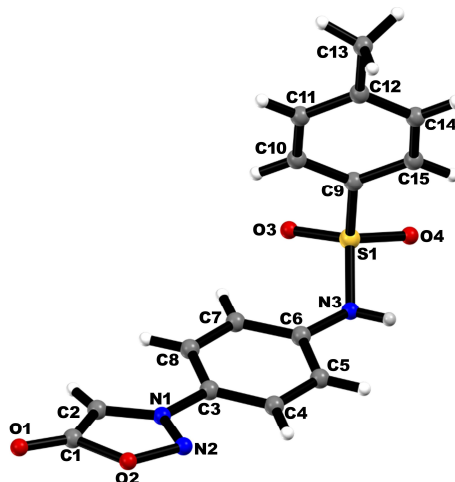


Figura 1.23. Estrutura cristalina do composto **44a** com identificação dos átomos. Código de cores: C (cinza), N (azul), S (amarelo), O (vermelho) e H (branco).

Os dados de difração de raios X revelaram que a unidade assimétrica do composto em questão é composta por uma molécula do híbrido sulfonamida-sidnona planejado (**44a**), conforme também demonstrado por outras técnicas espectroscópicas. Os grupos sulfonamida e sidnona estão conectados por um anel fenólico na posição para. Em relação ao anel mesoiônico de sidnona, os comprimentos de ligação observados são típicos quando comparados a compostos similares contendo esse grupo (Grossie; Harrison; Turnbull, 2014; Riddle; Grossie; Turnbull, 2004). Os comprimentos das ligações C1-O1 e C1-O2 são, respectivamente, 1,220(3) Å e 1,367(3) Å, apresentando caráter de dupla e simples. Além disso, as distâncias de ligação C1-C2 e O2-N2 são bastante semelhantes (1,377(4) Å e 1,367(3) Å, respectivamente), enquanto um valor menor é observado para a ligação N1-N2 (1,306(3) Å). Os anéis da sidnona e fenila central estão quase coplanares, com um ângulo diedro de 8,8° entre os planos calculados de ambas as unidades. Em contraste, ao se considerar o anel da porção benzenosulfonila e o grupo sidnona, o ângulo diedro entre eles é significativamente maior (70,2°), conferindo à molécula uma estrutura em forma angular, conforme ilustrado na Figura 1.23.

O grupo sulfonamida apresenta comprimentos de ligação S-O de 1,4217(19) Å e 1,4295(19) Å. O átomo de enxofre (S1) está ligado a um substituinte toluílico (C9) e ao átomo de nitrogênio N3, com comprimentos de ligação de 1,753(3) Å e 1,627(2) Å, respectivamente. Todos os valores estão dentro da faixa típica encontrada na literatura (Stenfors et al., 2020). Os ângulos de ligação O3-S1-O4 e N3-S1-C9 são de 120,0(1)° e 106,8(1)°, respectivamente. O átomo de enxofre exibe uma geometria tetraédrica ligeiramente distorcida, conforme indicado pelo parâmetro de Yang, $\tau_4 = 0,93$ (Yang; Powell; Houser, 2007).

Tabela 1.2. Comprimentos de ligação e ângulos selecionados para **45a** obtidos por DRX.

Átomos	comprimento/Å	Átomos	Ângulo /°
S1-O3	1.4217(19)	O3-S1-O4	119.96(13)
S1-O4	1.4295(19)	O3-S1-N3	108.67(12)
S1-N3	1.627(2)	O3-S1-C9	107.91(12)
S1-C9	1.753(3)	O4-S1-N3	104.60(12)
O1-C1	1.220(3)	O4-S1-C9	108.19(12)
O2-C1	1.391(3)	N3-S1-C9	106.83(11)
O2-N2	1.367(3)	C6-N3-S1	125.25(17)
N1-N2	1.306(3)	C2-N1-C3	128.3(2)
N1-C2	1.328(3)	N2-N1-C3	117.72(19)
N1-C3	1.437(3)	N2-N1-C2	113.9(2)
N3-C6	1.417(3)	N2-O2-C1	110.80(19)
C1-C2	1.377(4)	C10-C9-S1	120.09(19)
C3-C4	1.371(3)	C15-C9-S1	120.1(2)
C3-C8	1.366(3)	O1-C1-C2	137.5(3)
C4-C5	1.373(3)	C8-C3-N1	119.7(2)
C5-C6	1.381(3)	C5-C6-N3	117.7(2)
C6-C7	1.377(3)	C7-C6-N3	123.1(2)
C7-C8	1.377(3)	C4-C3-N1	119.7(2)
C9-C10	1.385(3)	O1-C1-O2	118.6(2)
C9-C15	1.383(3)	N1-C2-C1	107.3(2)
C10-C11	1.377(4)	N1-N2-O2	104.11(19)
C11-C12	1.379(4)	C2-C1-O2	103.9(2)
C12-C13	1.501(4)	C9-S1-N3-C6	64.4(2)
C12-C14	1.381(4)	N2-N1-C3-C4	7.5(3)
C15-C14	1.377(4)	S1-N3-C6-C7	35.3(4)
		N3-S1-C9-C15	89.8(2)

No empacotamento cristalino, uma ligação de hidrogênio intermolecular entre os átomos O1 da sidnona e o N3 da sulfonamida leva à formação de uma cadeia supramolecular ao longo do eixo cristalográfico b, conforme ilustrado na Figura 1.24 [$\text{N3-H3}\dots\text{O2}^i$ ($iii = -x+1, -y+2, -z+1$)]. Outros contatos fracos, como $\text{Csp}^2\text{-H}\dots\text{O}$ e $\text{Csp}^3\text{-H}\dots\text{O}$, também estão presentes e contribuem para a estabilização da rede cristalina.

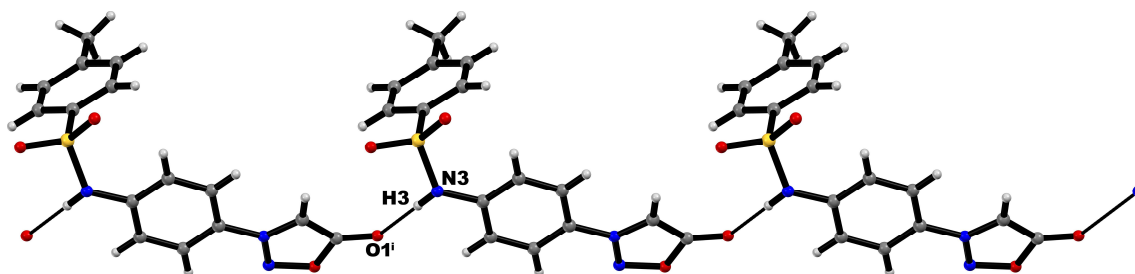


Figura 1.24. Detalhes do empacotamento cristalino, exibindo a cadeia supramolecular unidimensional (1D) ao longo do eixo cristalográfico b para o composto **44a**. As linhas pretas indicam a ligação de

hidrogênio entre os grupos sulfonamida e sidnona de moléculas vizinhas. Códigos de simetria para geração de átomos equivalentes: (i) 1+x, 1+y, +z.

1.3.2. Previsão de parâmetros de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e toxicidade

A eficácia de um candidato a fármaco *in vivo*, especialmente quando administrado por via oral – que é a forma mais conveniente e frequentemente preferida –, depende das propriedades farmacocinéticas da molécula. A estimativa antecipada dessas propriedades pode reduzir os riscos de falhas nas etapas mais avançadas dos programas de descoberta de fármacos. No entanto, a determinação experimental é demorada e nem sempre simples. Nesse contexto, os parâmetros físico-químicos, de ADME e fármacos similaridade dos novos híbridos sulfonamida-sidnona foram preditos utilizando a plataforma gratuita SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017). Embora essas previsões não sejam conclusivas, podem fornecer indícios sobre o perfil farmacocinético, auxiliando na seleção das moléculas mais promissoras para estudos posteriores.

Por meio da ferramenta SwissADME, a permeabilidade das moléculas pela barreira hematoencefálica (BBB, do inglês *Blood-Brain Barrier*) e a sua absorção intestinal humana (HIA, do inglês *Human Intestinal Absorption*) foram estimadas utilizando o modelo validado BOILED-egg (*Brain Or Intestinal EstimateD permeation*), que se baseia em dois descritores físico-químicos calculados: o WLOGP (indicador de lipofilicidade) e a área de superfície polar topológica (TPSA), indicadora de polaridade aparente – corresponde a um valor que estima a superfície de uma molécula que é polar (Daina; Michielin; Zoete, 2017). De acordo com as previsões, os híbridos sulfonamidas-sidnonas devem possuir baixa permeabilidade à BBB, conforme ilustrado na Figura 1.25. Espera-se que dentre todos os compostos, apenas **44c** e **45c** apresentem baixa absorção intestinal devido à sua alta polaridade aparente, enquanto os demais compostos, localizados na região branca do gráfico, têm maior probabilidade de exibir melhor absorção intestinal. Além disso, apenas os híbridos **44c** e **45c** foram indicados como possíveis substratos da glicoproteína-P (P-gp, do inglês P-glycoprotein) – estrutura importante envolvida no efluxo ativo de substâncias do sistema nervoso central (SNC) e do lúmen gastrointestinal (Lin; Yamazaki, 2003; Morishita et al., 2020).

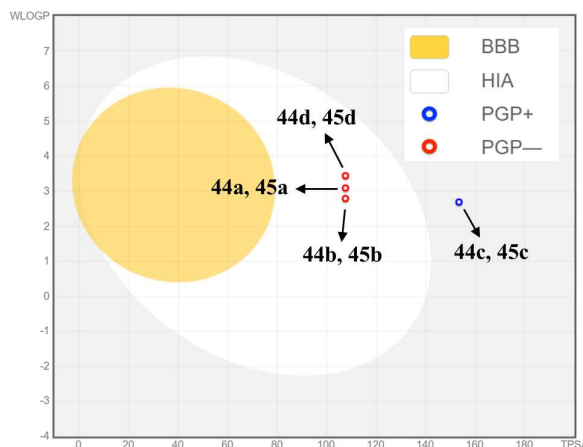


Figura 1.25. Modelo BOIELD-egg para **44a-d** e **45a-d**. BBB: absorção pela barreira hematoencefálica. HIA: absorção intestinal humana. PGP+: substrato para a P-gp. PGP- : não é substrato para a P-gp.

O SwissADME também forneceu um valor consensual de $\log P_{O/W}$ para cada molécula (Tabela 1.3), calculado como a média aritmética de cinco métodos preditivos distintos, incluindo o já citado WLOGP (Daina; Michielin; Zoete, 2017). Os valores indicam que a presença do grupo nitro nos híbridos sulfonamida-sidnona reduz significativamente a lipofilicidade. Esses dados, combinados às informações fornecidas pela abordagem combinada de lipofilicidade e polaridade do modelo BOILED-egg, sugerem que **44c** e **45c** possuem permeabilidade reduzida através de membranas biológicas em comparação aos outros seis híbridos. Além disso, o SwissADME verificou a conformidade das moléculas com cinco diferentes regras de fármacossimilaridade, que estabelecem características estruturais e físico-químicas compatíveis com fármacos. **44c** e **45c** foram os únicos híbridos que não obedeceram a todos esses critérios (Tabela 1.3). Por fim, os compostos **44c-d** e **45c-d** apresentaram alguma probabilidade de inibir uma das principais isoformas do citocromo P450 (CYP), enquanto nenhuma interação foi prevista para os demais compostos (Tabela 3). Em resumo, segundo as previsões de ADME, a maioria dos híbridos sulfonamidas-sidnonas possuem características favoráveis compatíveis à fármacos, e espera-se que apresentem, no geral, boa biodisponibilidade oral – esses dados reforçam o interesse em prosseguir com os estudos biológicos.

Tabela 1.3. Algumas propriedades físico-químicas e adequação a regras de fármacossimilaridade previstas pela plataforma da web SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017).

	Log P _{o/w} ^a	Inibição da CYP (Isoform)	Fármacossimilaridade (nº de violações)				
			Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge
44a	1.47	✗	✓	✓	✓	✓	✓
44b	1.24	✗	✓	✓	✓	✓	✓
44c	0.45	✓ (2C19)	✓	✓	✗ (1)	✗ (1)	✗ (1)
44d	1.66	✓ (2C19)	✓	✓	✓	✓	✓
45a	1.51	✗	✓	✓	✓	✓	✓
45b	1.20	✗	✓	✓	✓	✓	✓
45c	0.42	✓ (2C19)	✓	✓	✗ (1)	✗ (1)	✗ (1)
45d	1.66	✓ (2C19)	✓	✓	✓	✓	✓

^a log P_{o/w} consensual: coeficiente de partição octanol/ água calculado como a média aritmética de cinco modelos preditivos distintos de log P.

A toxicidade aguda em ratos, por meio de quatro diferentes vias de administração, foi predita utilizando a plataforma GUSAR Online (Tabela 1.4). As toxicidades são expressas como valores de DL₅₀ (dose letal mediana — quantidade de fármaco que causa a morte de 50% dos animais em um grupo de teste) e classificadas de acordo com o manual de classificação da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, do inglês *Organization for Economic Co-operation and Development*) (Lagunin et al., 2011). De modo geral, espera-se que os híbridos sulfonamidas-sidnonas apresentem baixa toxicidade em roedores – característica necessária, uma vez que os ensaios de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) são realizados em camundongos.

Tabela 1.4. Toxicidade aguda em roedores prevista pela plataforma GUSAR Online (Lagunin et al., 2011).

	Via de administração							
	Oral		Intravenosa		Subcutânea		Intraperitoneal	
	LD ₅₀ mg/kg	Categoria	LD ₅₀ mg/kg	Categoria	LD ₅₀ mg/kg	Categoria	LD ₅₀ mg/kg	Categoria
44a	2977.0	Classe 5	563.5	Classe 5	2567.0	N.T.	974.6	Classe 5
44b	3052.0	Classe 5	1090.0	N.T.	2370.0	Classe 5	1411.0	N.T.
44c	2308.0	Classe 5	776.6	N.T.	2352.0	Classe 5	3524.0	N.T.
44d	2940.0	Classe 5	688.3	Classe 5	2421.0	Classe 5	1447.0	N.T.
45a	2550.0	Classe 5	459.0	Classe 5	2111.0	Classe 5	1143.0	Classe 5
45b	2812.0	Classe 5	1034.0	N.T.	2078.0	Classe 5	1256.0	N.T.
45c	1878.0	Classe 5	671.50	Classe 5	2049.0	Classe 5	2128.0*	N.T.*
45d	2718.0	Classe 5	597.9	Classe 5	3066.0	N.T.	1645.0	N.T.

* Composto fora do domínio de aplicabilidade do modelo. N.T.: não tóxico. Classe 5: baixa toxicidade

1.3.3. Previsão da atividade biológica

Para fundamentar o planejamento racional dos novos híbridos sulfonamidas-sidnonas e reforçar o interesse na realização dos ensaios biológicos, seu perfil de atividade biológica foi previsto pela plataforma gratuita Pass Online. Esse recurso estima as prováveis atividades biológicas de candidatos a fármacos de origem natural, sintético ou semissintéticos, com base em sua fórmula estrutural (Elbouzidi et al., 2023; Filimonov et al., 2014). Para realizar a previsão, o PASS Online requer apenas a estrutura do composto, fornecida na forma de um arquivo Mol ou código SMILES. A análise é baseada em um amplo conjunto de treinamento, que abrange dados de estrutura e atividade de mais de 300.000 compostos orgânicos, e os resultados são expressos como probabilidade de ser ativo (Pa) ou inativo (Pi). Os valores de Pa e Pi variam de 0 a 1 e são calculados de forma independente, de modo que a sua soma normalmente é diferente de 1 (Filimonov et al., 2014; Poroikov et al., 2019). As chances de uma atividade ser comprovada experimentalmente aumentam com o aumento do valor de Pa e redução do valor de Pi (Filimonov et al., 2014; Poroikov et al., 2019). No entanto, essas probabilidades não indicam a intensidade, magnitude ou potência da dada atividade: valores altos ou baixos de Pa significam apenas uma maior ou menor probabilidade de o composto pertencer a uma classe de agentes com atividade biológica semelhante – não significam necessariamente que as substâncias serão mais ou menos potentes/ativas (Filimonov et al., 2014; Poroikov et al., 2019).

Desde o seu lançamento em 2000, o PASS Online tem sido amplamente utilizado, com alguns artigos confirmando as atividades previstas por meio de testes biológicos (Abozeid et al., 2020; Ammal P; Prasad; Joseph, 2020; Bistrovic et al., 2018; Demin et al., 2022; Elbouzidi et al., 2023; Filimonov et al., 2014; Gregoric et al., 2017; Ibarra-Hernández et al., 2022; Matin et al., 2022; Medvedeva; Shikhaliev, 2022; Muhammed Aziz et al., 2023; Sucman et al., 2024; Thakor et al., 2023). No presente trabalho, todos os híbridos sulfonamidas-sidnonas apresentaram probabilidades muito altas de exibirem atividades anti-inflamatória (Pa: 0,930-0,956; Pi: 0,004) e antioxidante (Pa: 0,67-0,835; Pi: 0,003-0,004), conforme Tabela 1.5. Essa previsão encorajadora motivou ainda mais os ensaios biológicos.

Tabela 1.5. Resultados da previsão de atividade biológica feita pela plataforma Pass Online.

Código	Atividade anti-inflamatória		Atividade antioxidante	
	Pa	Pi	Pa	Pi
44a	0,944	0,004	0,755	0,004
44b	0,956	0,004	0,835	0,003
44c	0,938	0,004	0,750	0,004
44d	0,946	0,004	0,731	0,004
45a	0,936	0,004	0,693	0,004
45b	0,953	0,004	0,807	0,003
45c	0,930	0,004	0,687	0,004
45d	0,938	0,004	0,670	0,004

Pa: probabilidade de ser ativo; Pi: probabilidade de ser inativo.

1.3.4. Atividade anti-SARS-CoV-2 e citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade e atividade anti-SARS-CoV-2 foram realizados pelo grupo coordenado pelo Dr. Thiago Moreno L. Souza, no Laboratório de Imunofarmacologia do Centro de Pesquisa, Inovação e Vigilância em COVID-19 e Emergências Sanitárias (CPIV, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz).

Inicialmente, a citotoxicidade das sulfonamidas-sidnonas foi investigada em células epiteliais de pulmão humano (Calu-3). Para tanto, as células foram incubadas em placas de 96 poços por 72 h, na presença de diferentes concentrações das moléculas (50-800 μ M). A viabilidade foi então avaliada pelo método da resazurina – um corante azul e pouco fluorescente, também conhecido como Alamar Blue (Präbst et al., 2017). Células metabolicamente ativas são capazes de reduzir esse corante pela atividade de desidrogenases ou redutases presentes nas mitocôndrias, citosol e microsossomos. Neste processo, a resazurina é convertida à resorufina, substância rosa e altamente fluorescente, cuja quantidade formada é proporcional ao número de células viáveis (Figura 1.26). A quantificação de resorufina, fornece, dessa forma, uma medida indireta da viabilidade celular. Essa substância pode ser quantificada pela mudança de absorção do meio, no entanto, normalmente emprega-se a medida de fluorescência, por ser mais sensível (Präbst et al., 2017). A molécula é excitada em 560 nm e a leitura da fluorescência é feita em 590 nm.

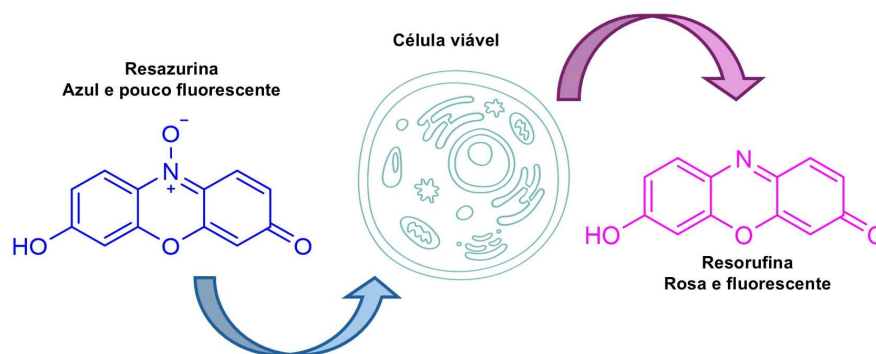


Figura 1.26. Redução da resazurina à resorufina em células metabolicamente ativas.

A viabilidade também foi investigada em células renais de macaco-verde africano (Vero E6), utilizando as mesmas concentrações dos híbridos e o mesmo período de incubação, porém, pelo método do cristal violeta (Feoktistova; Geserick; Leverkus, 2016). O método se baseia no fato de que as células aderentes, como é o caso das células Vero E6, desprendem do fundo da placa durante o processo de morte celular – essa característica pode ser usada para quantificar indiretamente a morte ou a proliferação de colônias. Para tanto, após o período de incubação das células com as substâncias de interesse, o meio é removido por sucção utilizando uma pipeta, e as células aderidas são lavadas com tampão PBS (do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*). Ao retirar o meio e realizar as lavagens, as células mortas não aderidas são removidas, deixando na placa somente as células viáveis aderidas (Figura 1.27). Uma solução do cristal violeta - um corante triarilmetano capaz de corar DNA, proteínas e lipídeos – é então adicionado à placa, corando as células aderentes vivas. A solução é removida e as células novamente lavadas, desta vez para retirar da placa o excesso de corante. Por fim, metanol é adicionado para dissolver todo o corante que marcou as células e em seguida a placa é lida em 570 nm.

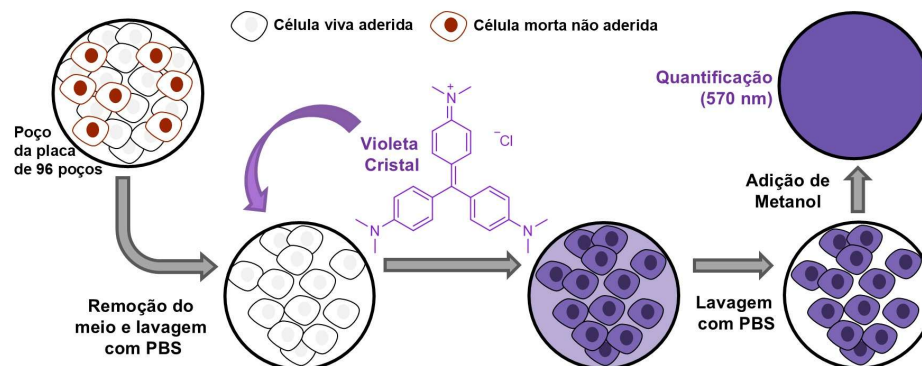


Figura 1.27. Representação ilustrativa do ensaio do Cristal Violeta utilizado para avaliar a citotoxicidade das sulfonamidas-sidnonas em células Vero E6.

As sulfonamidas-sidnonas apresentaram baixa citotoxicidade em células Calu-3 (Figura 1.28), tendo sido menos nocivas que o Remdesivir (Tabela 1.6), fármaco empregado como controle positivo nos ensaios antivirais. Uma vez que a maior concentração testada foi de 800 μM , a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (CC_{50}) teve que ser estimada por extrapolação da curva Dose-Inibição para algumas das moléculas (**44a-44d**; **45b-c**). Os valores de CC_{50} variaram na faixa de 724-1760 μM (tabela 1.6). Observou-se ainda que os novos híbridos foram mais citotóxicos em células Vero-E6, embora os valores de CC_{50} (125,6-831,9 μM) obtidos com essa célula também indiquem baixa citotoxicidade.

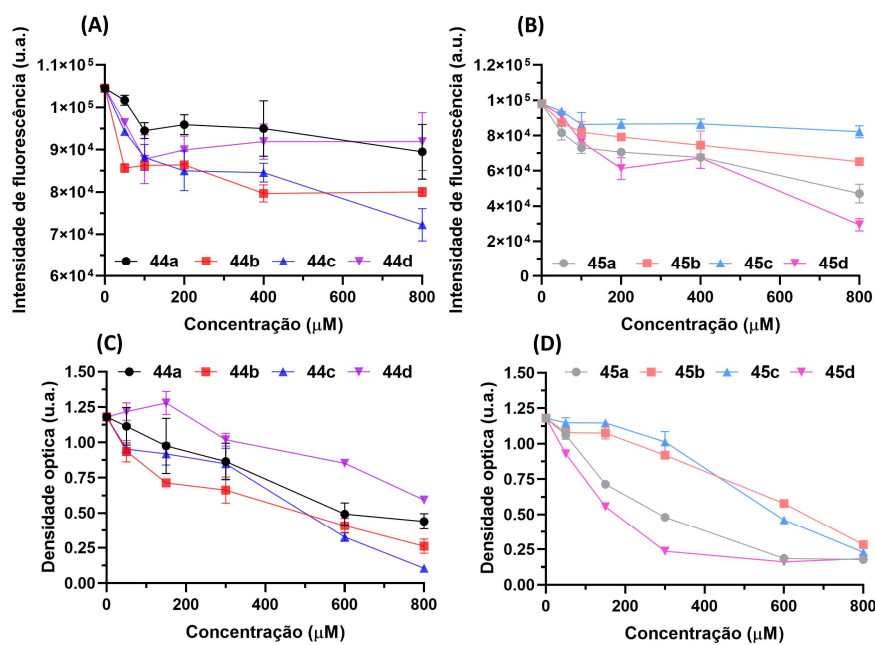


Figura 1.28. Gráficos de citotoxicidade para (A) **44a-44d** e (B) **45a-45d** em células Calu-3, obtidos pelo método da resazurina. 2×10^5 células/poço foram incubadas com ou sem as sulfonamidas-sidnonas em concentrações na faixa de 50-800 μM . Após 72 h a 37 °C e atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a viabilidade foi avaliada por meio do ensaio de resazurina (Excitação: 560 nm; Emissão: 590 nm). As barras representam valores de erro padrão da média (SEM); as médias e SEM foram calculados com dados de quatro experimentos independentes, cada um em triplicata. Gráficos de citotoxicidade para (C) **44a-44d** e (D) **45a-45d** em células Vero E6. 2×10^4 células/poço foram tratadas com diferentes concentrações das sulfonamidas-sidnonas (50-800 μM) por 72h, a 37 °C e atmosfera úmida com 5% de CO_2 . A viabilidade foi avaliada pelo método do Cristal Violeta. As barras representam valores de erro padrão da média (SEM); as médias e SEM foram calculados com dados de um experimento em triplicata.

Para avaliar a ação antiviral, células Calu-3 foram infectadas com multiplicidade de infecção 0,1 – isso significa que foi utilizada uma quantidade de inóculo viral que garantisse uma proporção média de 0,1 partícula viral infectante para cada célula (ou 1 partícula viral para cada 10 células). Essa proporção é amplamente utilizada em ensaios de avaliação antiviral.

Após o período de incubação, o inóculo foi removido e as células foram incubadas em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de **44a-d** e **45a-d**. Após 48 h, o conteúdo viral no sobrenadante foi quantificado pelo ensaio de redução de placas de lise. Neste ensaio, uma monocamada de células Vero E6 presentes em placas de 24 poços foi tratada com diluições seriadas do sobrenadante para que as partículas virais infecciosas presentes nessa solução pudessem aderir a novas células e infectá-las. Após uma hora em incubação, o inóculo foi retirado e o meio de cultivo (DMEM) contendo carboximetilcelulose (CMC) foi adicionado – a CMC torna o meio semi-sólido, impedindo que os vírus recém-liberados das células se espalhem livremente pelo meio. O resultado dessa restrição é que as partículas virais são capazes de infectar apenas células vizinhas, formando placas localizadas de lise, ou *plaques*. Após 72 h em incubação, formaldeído foi adicionado nas placas para garantir a fixação das células, e o meio semi-sólido foi retirado. Por fim, uma solução de cristal violeta foi adicionada para corar as células. As placas de lise correspondem a regiões brancas arredondadas, que são contadas. O resultado é expresso em PFU/mL (*plaque-forming units/ mL*).

As substâncias foram testadas em quatro concentrações, na faixa de 1,25 a 10 μM (Figura 1.29) - concentrações muito menores que os valores de CC_{50} determinados em Calu-3 e Vero E6. Todas as substâncias apresentaram valores de EC_{50} inferiores a 20 μM , destacando o potencial antiviral da nova classe de híbridos. No entanto, esse valor foi estimado para algumas moléculas, já que a maior concentração avaliada foi 10 μM . É evidente também, que as sidnonas contendo o grupo sulfonamida na posição *para* do anel fenila central são ligeiramente mais potentes (Tabela 1.6).

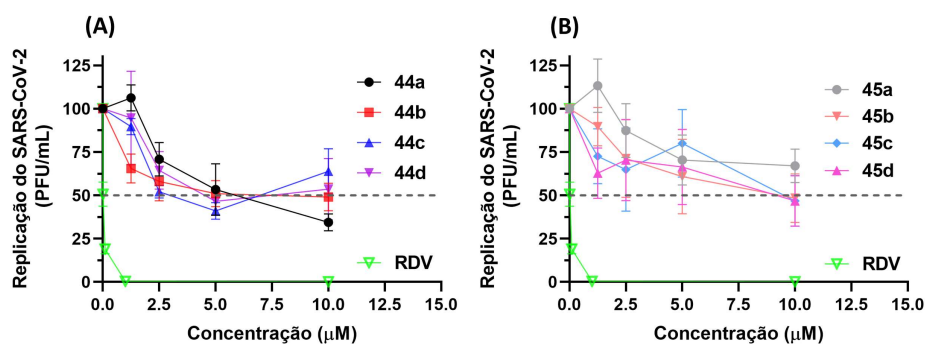


Figura 1.29. Replicação do SARS-CoV-2, medida em PFU/mL, após o tratamento com (A) **44a-44d** e (B) **45a-45d**. RDV foi utilizado como controle positivo. [44a-44d] = [45a-45d] = 10, 5,0, 2,5, 1,25 e 0,0 μM . [RDV] = 10, 1,0, 0,1, 0,01 e 0,0 μM . Células Calu-3 ($2,0 \times 10^5$ células por poço) foram infectadas com MOI de 0,1 por 1h à 37 °C e 5% de CO_2 . Após remoção do inóculo e adição do meio e das sulfonamidas-sidnonas, as células foram incubadas por 48 h e o vírus quantificado pelo ensaio de redução de placas de lise em células Vero E6 ($2,0 \times 10^4$). Os ensaios foram feitos em quadruplicatas independentes e os resultados apresentados como média \pm SEM.

Ao observar os valores do Índice de Seletividade (IS), calculado pela razão CC_{50}/EC_{50} , fica claro o perfil antiviral mais favorável da série **44a-d** (IS = 102-301 em Calu-3; e 33-102 em Vero E6), se comparado a série **45a-d** (IS = 49-94 em Calu-3; e 9-59 em Vero E6). Dentre todas os novos híbridos, **44a** parece ser o mais promissor, em virtude de seu menor valor de EC_{50} e maior seletividade, sendo, portanto, um forte candidato para ensaios antivirais posteriores envolvendo o SARS-CoV-2 e também um ótimo protótipo para o desenvolvimento de novos agentes Anti-SARS-CoV-2.

Tabela 1.6. Concentração capaz de reduzir a replicação viral do SARS-CoV-2 em 50% (EC_{50}) e concentração que causa redução ou morte celular em 50% da população de células (CC_{50}).

Composto	EC_{50} (μ M) ^a	CC_{50} (μ M) ^b	IS ^c	CC_{50} (μ M) ^d	IS ^e
44a	5,84 \pm 0,31	1760 \pm 194	301	505,1 \pm 77,4	87
44b	7,27 \pm 0,36	835 \pm 117	115	257,9 \pm 34,4	36
44c	10,7 \pm 0,64	1090 \pm 118	102	354,4 \pm 39,4	33
44d	7,96 \pm 0,48	1080 \pm 122	136	813,9 \pm 65,3	102
45a	15,3 \pm 0,99	731 \pm 83	48	204,0 \pm 12,6	13
45b	8,62 \pm 0,65	806 \pm 102	94	514,3 \pm 30,27	59
45c	16,8 \pm 1,2	1190 \pm 159	71	507,1 \pm 21,5	30
45d	14,8 \pm 0,96	724 \pm 97	49	125,6 \pm 9,8	9
RDV	0,091 \pm 0,002	480 \pm 55	5275	512,0 \pm 30,0	5626

[a] EC_{50} determinado em células Calu-3 infectadas. [b] CC_{50} determinado em células Calu-3 não infectadas. [c] IS calculado utilizando o CC_{50} obtido em células Calu-3. [d] CC_{50} determinado em células Vero E6 não infectadas. [e] IS calculado utilizando o CC_{50} obtido em células Vero E6.

1.3.5. Efeito das sulfonamidas-sidnonas em modelo animal de SDRA induzida por LPS

Todas as substâncias avaliadas neste trabalho apresentaram boa atividade anti-SARS-CoV-2 em ensaios *in vitro*. Além disso, exibiram baixa citotoxicidade nas linhagens celulares Calu-3 e Vero E6. As análises *in silico*, por sua vez, sugerem boas propriedades farmacocinéticas e de fármacossimilaridade para a maioria delas, além de baixa toxidez em roedores. Todos esses dados apontam para um perfil farmacológico promissor dessas moléculas e justificam a realização de ensaios *in vivo*. Por esse motivo, os 8 híbridos foram avaliados em modelo animal de LPA/SDRA. Todos os experimentos foram conduzidos após aprovação dos protocolos pelo Comitê de Ética local em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (Protocolo nº 1553/2023 e nº 1583). Esses ensaios foram realizados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, pelos alunos de Pós-Graduação Mayara Alves Amorim e Vitor Hélio de Souza Oliveira, sob orientação da Professora Doutora Eunice André.

A administração de LPS nas vias aéreas de roedores é um dos modelos animais mais utilizados para estudar LPA/SDRA. Essa administração induz danos à parênquima pulmonar por meio da geração e liberação de proteases, espécies reativas de oxigênio (ERO), e espécies reativas de nitrogênio (ERN) produzidas por macrófagos pulmonares ativados e neutrófilos transmigra dos nos compartimentos intersticial e alveolar. Após a administração de LPS, observam-se lesões na microvasculatura e dano alveolar difuso, características também comuns em pacientes humanos com SDRA (Chen; Bai; Wang, 2010).

As análises histológicas revelaram que a administração intratraqueal de LPS induziu lesões pulmonares significativas, caracterizadas por alterações histológicas como congestão alveolar, infiltrado de células inflamatórias, edema e hemorragia alveolar (escore histológico: $6,67 \pm 0,67$) em comparação ao grupo veículo (escore histológico: $3,33 \pm 0,67$), conforme Figura 1.30A-B. Além disso, todos os compostos (escore histológico: **44a**: $4,50 \pm 0,34$; **44b**: $4,33 \pm 0,21$; **44c**: $3,83 \pm 0,47$; **44d**: $4,00 \pm 0,51$; **45a**: $3,17 \pm 0,60$; **45b**: $3,33 \pm 0,33$; **45c**: $3,17 \pm 0,40$; **45d**: $3,67 \pm 0,42$) preveniram efetivamente essas lesões pulmonares (Figura 1.30A-B).

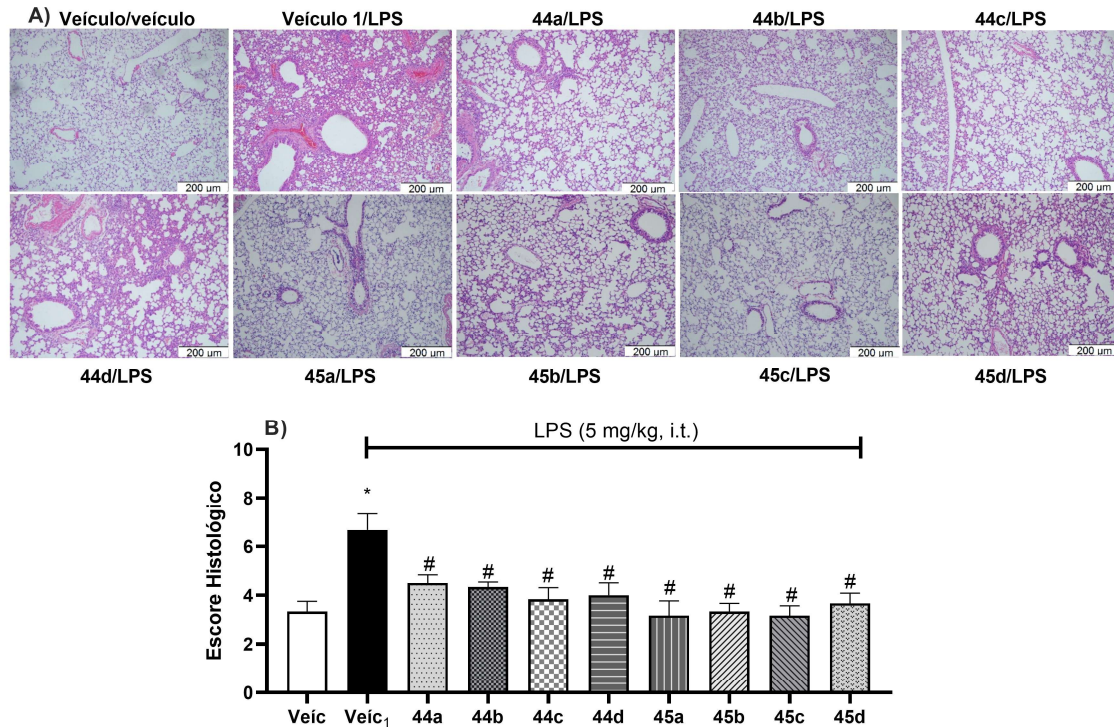


Figura 1.30. Microfotografias de luz e gráficos representativos ilustram os efeitos do pré-tratamento com compostos nas alterações histológicas da SDRA induzida por LPS em camundongos. A análise histológica (A, B) foi avaliada 24 horas após a administração de LPS em camundongos. Cada ponto

representa a média (SEM) de 6 camundongos. * $P \leq 0,05$ em comparação com o veículo (Veíc) do LPS e # $P \leq 0,05$ em comparação com o veículo dos compostos (Veíc1). A ANOVA unidirecional seguida do teste post-hoc de Tukey foi aplicada.

Foi observado um aumento significativo na contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar (BAL) em camundongos com SDRA induzida por LPS (Veíc1: $26,16 \times 10^6 \pm 1,77 \times 10^6$ células) em comparação ao grupo tratado com veículo (Veíc: $13,81 \times 10^6 \pm 0,76 \times 10^6$ células) (Figura 1.31A). O tratamento com todos os compostos foi eficaz em inibir esse aumento no influxo de leucócitos (**44a**: $17.54 \times 10^6 \pm 1.25 \times 10^6$ células; **44b**: $18.63 \times 10^6 \pm 1.26 \times 10^6$ células; **44c**: $16.13 \times 10^6 \pm 1.34 \times 10^6$ células; **44d**: $16.41 \times 10^6 \pm 2.64 \times 10^6$ células; **45a**: $13.79 \times 10^6 \pm 1.63 \times 10^6$ células; **45b**: $15.50 \times 10^6 \pm 1.81 \times 10^6$ células; **45c**: $14.88 \times 10^6 \pm 0.98 \times 10^6$ células; **45d**: $14.38 \times 10^6 \pm 0.54 \times 10^6$ células). Ainda, um aumento significativo do peso pulmonar foi observado ($4,15 \pm 0,43$) nos camundongos com SDRA induzida por LPS. No entanto, o tratamento com os compostos foi eficaz em prevenir esse aumento (Figura 1.31b). Esses resultados indicam que os novos híbridos sulfonamidas-sidnonas apresentaram excelentes efeitos anti-inflamatórios em camundongos, confirmando a previsão de atividade biológica feita pela plataforma Pass Online. Modelos semelhantes de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em roedores compartilham semelhanças com as alterações respiratórias causadas pelo SARS-CoV-2 (Hou et al., 2022), podendo servir como uma boa avaliação preliminar. No entanto, o uso de modelos animais que mimetizem melhor a resposta inflamatória causada pela infecção por SARS-CoV-2 é recomendado para confirmar seu potencial contra a SDRA causada por esse vírus. Este definitivamente é um próximo passo importante para as sulfonamidas-sidnonas.

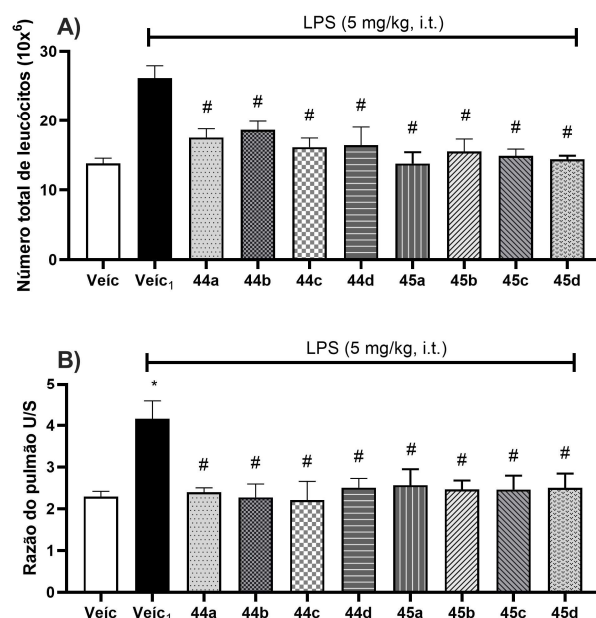


Figura 1.31. Efeito do pré-tratamento com os compostos sobre a infiltração leucocitária no LBA (A) e o peso pulmonar (B), avaliados 24 horas após a administração de LPS em camundongos. Cada ponto representa a média e erro (SEM) de 6-8 animais. * $P \leq 0,05$ em comparação com o veículo (Veic) do LPS e # $P \leq 0,05$ em comparação com o veículo dos compostos (Veic₁). A ANOVA unidirecional seguida pelo teste post-hoc de Tukey foi aplicada.

1.3.6. Interação entre Albumina Sérica Humana e 44a

A interação da sulfonamida **44a** com a ASH foi investigada pelo Dr. Otávio Augusto Chaves, sob orientação do Professor Dr. Carlos Serpa, no Departamento de Química da Universidade de Coimbra [Centro de Química de Coimbra – *Institute of Molecular Science (CQC-IMS)*].

Dentre as novas sulfonamidas-sidnonas sintetizadas neste trabalho, **44a** parece ser uma das mais promissoras quanto as atividades antiviral e anti-inflamatória. Por esse motivo, foi selecionada como um modelo para caracterizar, através de métodos biofísicos, sua interação com ASH. A Figura 1.32A mostra a emissão de fluorescência em estado estacionário da albumina, na ausência e na presença de diferentes concentrações de **44a**. Uma vez que não há evidência de deslocamento do espectro de emissão com a adição de **44a**, esse híbrido sulfonamida-sidnona parece interagir com a albumina sem perturbar de maneira significativa o microambiente ao redor dos fluoróforos.

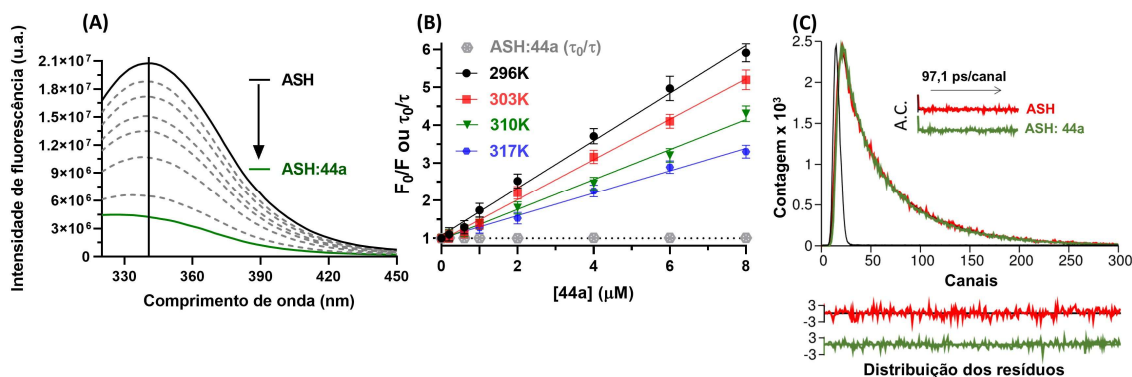


Figura 1.32. (A) Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para ASH (4,0 μ M) na ausência e na presença de **44a** (0,0; 0,2; 0,6; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 μ M), a 310 K. (B) Gráficos de Stern-Volmer para a interação HSA:**44a** em PBS a 296, 303, 310 e 317 K. (C) Decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo para HSA (4,0 μ M) na ausência e na presença de **44a**, na maior concentração da sulfonamida-sidnona empregada na análise de fluorescência em estado estacionário (8,0 μ M), a 296 K.

Os parâmetros quantitativos da interação entre ASH e **44a** foram determinados por meio de medidas de fluorescência em estado estacionário, aplicando a equação de Stern-Volmer. Os parâmetros obtidos estão resumidos na Tabela 1.7. Os valores da constante de Stern-Volmer (K_{sv}) diminuíram com o aumento da temperatura, o que já fornece algum indício do mecanismo de supressão da fluorescência. Existem dois mecanismos distintos: estático e dinâmico. No mecanismo estático, o supressor e a espécie fluorescente se associam no estado fundamental, antes mesmo do fluoróforo ser excitado pela luz. Neste mecanismo, espera-se que ao aumentar a temperatura, a soma das interações intermoleculares entre albumina e supressor (**44a**) seja mais fraca devido à maior energia cinética das espécies. No mecanismo dinâmico, no entanto, a associação ocorre quando o fluoróforo está no estado excitado, de modo que o supressor precisa se difundir pelo meio e encontrar o fluoróforo antes que ele decaia para o estado fundamental – assim, caso o mecanismo fosse dinâmico, seria esperado aumento da constante de Stern-Volmer com o aumento da temperatura, já que as espécies envolvidas (albumina excitada e supressor) teriam maior energia cinética, aumentando a frequência de colisões/encontros entre elas (maior probabilidade de supressão) (Soares et al., 2019).

Tabela 1.7. Parâmetros de fluorescência em estado estacionário para a interação ASH:**44a** em quatro temperaturas diferentes.

T (K)	$K_{SV} (\times 10^5)$ (M ⁻¹)	$k_q (\times 10^{14})$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
296	6,29 ± 0,18	1,22 ± 0,03	-28,3 ± 1,3	0,0158 ± 0,0064	-33,0
303	5,34 ± 0,14	1,03 ± 0,03			-33,1
310	3,98 ± 0,13	0,77 ± 0,03			-33,2
317	2,98 ± 0,11	0,58 ± 0,02			-33,3

Os valores da constante aparente de supressão bimolecular (k_q) foram cerca de 10 mil vezes maiores do que a constante máxima de difusão em água ($k_{diff} \approx 7,40 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 298K, segundo a teoria de Smoluchowski-Stokes-Einstein) (Wenskowsky et al., 2020), o que indica uma associação no estado fundamental, característica de um mecanismo de supressão do tipo estático. Para obter mais evidências do mecanismo de supressão, foram obtidos decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo para a ASH livre e na presença de **44a**. A albumina apresentou dois tempos de vida de fluorescência (τ_1 e τ_2) com percentuais relativos diferentes (% Rel) que resultou em um tempo de vida médio de fluorescência ($\tau_{médio}$) de 5,17 ns (Tabela 1.8), em concordância com a literatura (Soares et al., 2024). Uma vez que os decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo para a ASH livre e para ASH:**44a** na razão 1:8 são semelhantes (Figura 1.32C), e os valores de $\tau_{médio}$ se mantêm praticamente os mesmos em todas as concentrações da sulfonamida-sidnona utilizadas na análise em estado estacionário (Tabela 1.8, e τ_0/τ próximo à unidade na Figura 1.32B), o mecanismo de supressão de fluorescência é, de fato, estático (Soares et al., 2024). Caso o mecanismo de supressão fosse do tipo dinâmico, seria esperado uma redução do tempo de vida médio de fluorescência – na presença do supressor, o fluoróforo no estado excitado passa a ter outro meio para dissipar sua energia (decair), acelerando a velocidade com que o fluoróforo retorna ao estado fundamental (logo, menor tempo de vida de fluorescência). No mecanismo estático, no entanto, o decaimento do fluoróforo, que se encontra livre ao ser excitado, não é interferido pelo supressor, já que a associação só ocorre no estado fundamental.

Tablela 1.8. Parâmetros de fluorescência resolvida no tempo para a interação ASH:**44a** em diferentes concentrações do híbrido (296 K).

[44a] (μM)	τ_1 (ns)	Rel. %	τ_2 (ns)	Rel. %	$\tau_{\text{médio}}$ (ns)
0,0	1,55	16,6	5,89	83,4	5,17
0,2	1,45	15,7	5,83	84,3	5,14
0,6	1,52	17,3	5,91	82,7	5,15
1,0	1,49	16,6	5,89	83,4	5,16
2,0	1,51	16,9	5,92	83,1	5,17
4,0	1,47	16,2	5,83	83,8	5,12
6,0	1,45	15,8	5,82	84,2	5,13
8,0	1,41	14,9	5,77	85,1	5,12

Os valores de K_{SV} são da ordem de 10^5 M^{-1} (Tabela 1.7), indicando interação forte, que pode resultar em um tempo de residência elevado do composto **44a** na corrente sanguínea humana. Essa forte interação também poderá causar grande redução de sua fração livre (não associada à albumina) na corrente sanguínea, limitando a ação terapêutica – uma vez que é a fração livre da substância que é capaz de interagir com os alvos biológicos. A provável baixa biodisponibilidade de **44a** pode levar a necessidade de empregar altas doses caso ele seja administrado via oral ou intravenosa, a fim de aumentar a sua fração livre (ativa) (Costa-Tuna et al., 2024; Naveenraj; Anandan, 2013). Dessa forma, é necessário ter cautela ao realizar e interpretar resultados de estudos *in vivo* com essa substância. No presente trabalho, as sulfonamidas-sidnonas foram administradas diretamente no alvo terapêutico, o pulmão do camundongo. Caso tivessem sido administradas por via oral ou intravenosa, a interação com a albumina poderia afetar significativamente a sua farmacocinética, possivelmente reduzindo a resposta terapêutica e exigindo doses mais elevadas para alcançar a mesma eficácia observada através da administração intratraqueal.

De acordo com a abordagem de Ross e Subramanian (Ross; Subramanian, 1981), o sinal e a magnitude dos parâmetros termodinâmicos, ou seja, as variações de entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°), são importantes para determinar as forças de interação envolvidas na associação proteína-ligante. Assim, foi realizada a análise de Van'tHoff (Figura 1.33A), e os valores obtidos ($\Delta S^\circ = 0,0158 \pm 0,0064 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$; $\Delta H^\circ = -28,3 \pm 1,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) podem estar relacionados a forças hidrofóbicas, provavelmente decorrentes do processo de dessolvatação, e a forças iônicas, atribuídas à natureza mesoiônica do núcleo das sidnonas. Assim, a espontaneidade da associação ASH:**44a** ($\Delta G^\circ < 0$, Tabela 1.7) é impulsionada tanto entropicamente quanto entalpicamente (Soares et al., 2024).

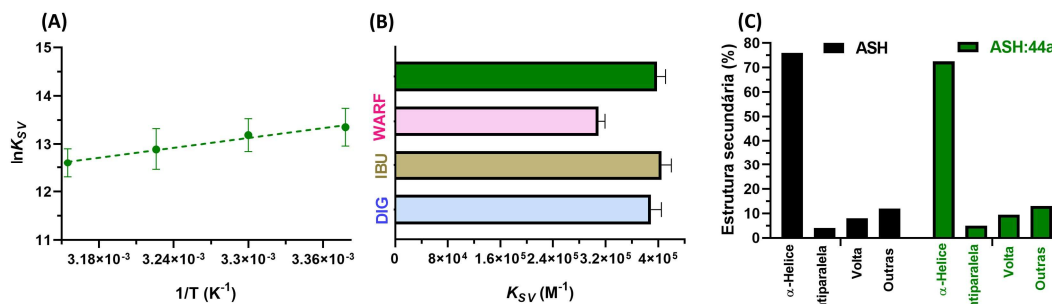


Figura 1.33. (A) Gráfico de Van't Hoff baseado nos valores de K_{SV} para ASH:44a. (B) Valores de K_{SV} para ASH:44a na ausência e presença das sondas varfarina (WARF), ibuprofeno (IBU) e difitoxina (DIG) a 310 K. (C) Estrutura secundária (%) na albumina livre (4 μ M) e ASH: 44a (1:8).

A albumina possui três sítios de ligação principais: o subdomínio IIA (sítio I), o subdomínio IIIA (sítio II) e o subdomínio IB (sítio III), nos quais a varfarina (**WARF**), o ibuprofeno (**IBU**) e a digitoxina (**DIG**) se ligam seletivamente, respectivamente (Chaves et al., 2017; Costa-Tuna et al., 2024; Zsila, 2013). Para identificar o principal sítio de ligação do composto **44a**, foram realizados ensaios de competição na presença de **WARF**, **IBU** e **DIG** a 310 K (Figura 1.33B). Os valores correspondentes de K_{SV} foram $(3,98 \pm 0,13)$, $(3,09 \pm 0,10)$, $(4,05 \pm 0,15)$ e $(3,89 \pm 0,16) \times 10^5 M^{-1}$, com uma redução de aproximadamente 22,4% na presença de **WARF**, indicando que o subdomínio IIA é o principal sítio de ligação para o **44a** (Chaves et al., 2017). Possivelmente, o sítio I foi identificado como o principal sítio de interação devido à sua capacidade de interagir com diversos compostos aromáticos e heterocíclicos, como a fenilbutazona, dicumarol, naproxeno e diflunisal (SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1975; Sudlow; Birkett; Wade, 1976). Por fim, a análise de dicroísmo circular (CD) (Figura 1.33C) indica que, na maior razão utilizada de albumina:44a (1:8), a sulfonamida-sidnona causa pouca perturbação no conteúdo de estrutura secundária da proteína (Chaves et al., 2017).

Para avaliar se as demais sulfonamidas-sidnonas também poderiam interagir com a albumina, foram realizados cálculos in silico nos subdomínios IIA, IIIA e IB. Os valores de score obtidos para o subdomínio IIA foram 57.5 (**44a**), 58.0 (**44b**), 54.6 (**44c**), 56.2 (**44d**), 57.9 (**45a**), 58.8 (**45b**), 56.0 (**45c**) e 57.0 (**45d**), enquanto as pontuações correspondentes ao subdomínio IIIA foram 48,8 (**44a**), 47,9 (**44b**), 46,8 (**44c**), 47,4 (**44d**), 51,3 (**45a**), 52,3 (**45b**), 51,9 (**45c**) e 53,9 (**45d**). Por fim, os valores de pontuação para o subdomínio IB foram 45,1 (**44a**), 46,5 (**44b**), 44,3 (**44c**), 48,4 (**44d**), 49,2 (**45a**), 50,0 (**45b**), 49,9 (**45c**) e 50,2 (**45d**). Os valores de pontuação bem parecidos entre as oito sulfonamidas-sidnonas, indica que todas elas devem interagir de maneira praticamente igual com a albumina, o que é reforçado pelas

poses similares observadas na docagem (Figura 1.34A-B). Os híbridos aparecem completamente imersos em uma cavidade de potencial eletrostático positivo da albumina, próxima ao fluoróforo, o resíduo Trp-214. Por fim, os resultados de docking indicam a presença interações hidrofóbicas, empilhamento- π e π -cátion entre a HSA e as sidnonas, estando de acordo com a tendência termodinâmica experimental observada para HSA:**44a**. Como exemplo, os resíduos de aminoácidos Leu-198, Lys-199, Phe-211, Trp-214, Asp-451 e Val-455 estão envolvidos em interações hidrofóbicas com o composto **44a** (2,75 e 3,95 Å), o que pode estar relacionado ao ΔS° positivo obtido no estudo termodinâmico. Há ainda uma interação π -stacking entre o resíduo Trp-214 e o grupo tolúil de **44a**, com uma distância de 3,51 Å. Ainda, o resíduo Lys-195, carregado positivamente, interage com o anel aromático central de **44a** por meio de força π -cátion, com uma distância de 4,01 Å (Figura 1.34C).

Não há na literatura dados cristalográficos para complexos albumina:sidnonas. No entanto, uma estrutura cristalográfica para o complexo albumina:sulfasalazina (PDB 6R7S) foi reportada por Wenskowsky e colaboradores [ref]. Comparando com a pose de **44a**, um dos anéis aromáticos dos dois compostos heterocíclicos pode interagir com o principal fluoróforo da albumina por força π -stacking (3,51 e 3,20 Å para **44a** e sulfasalazina, respectivamente).

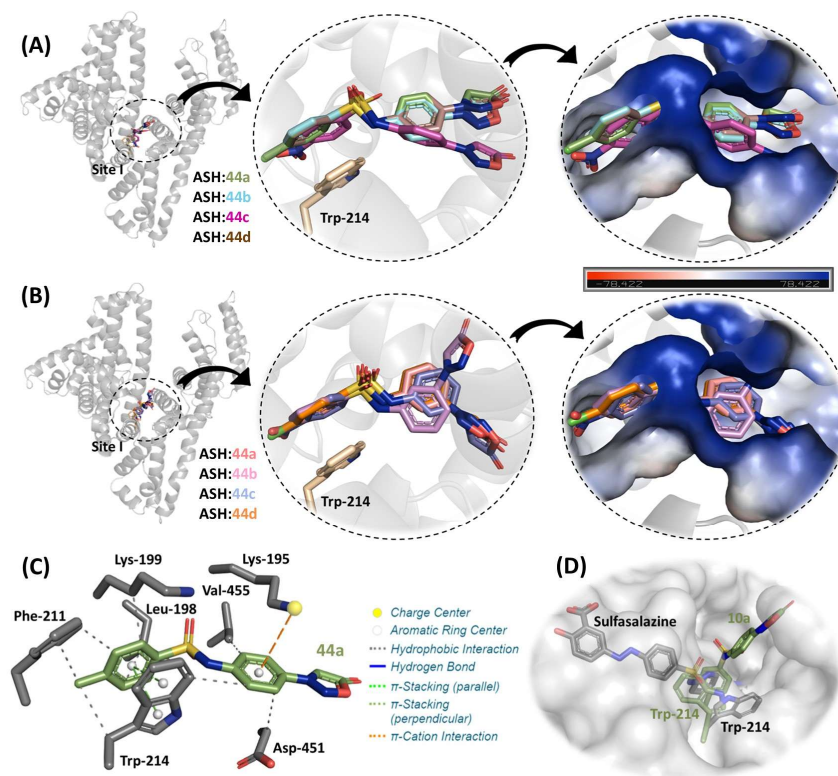


Figura 1.34. Poses obtidas no *docking* molecular dos compostos (A) **44a–44d** e (b) **45a–45d** no subdomínio IIA da albumina, com a respectiva ampliação e o mapa de potencial eletrostático da proteína.

(C) Principais resíduos de aminoácidos e forças de interação envolvidos na interação ASH:**44a** no subdomínio IIA. (D) Sobreposição da melhor pose de **44a** (em verde) na ASH com os dados cristalográficos do complexo ASH:sulfassalazina (em cinza, código PDB 6R7S) no subdomínio IIA, destacando o principal fluoróforo da proteína (resíduo Trp-214). Átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização. Átomos de enxofre, nitrogênio, oxigênio e cloro estão representados em amarelo, azul-escuro, vermelho e verde, respectivamente.

1.4. Conclusões e perspectivas

Novos híbridos sulfonamidas-sidnonas foram preparados e purificados com sucesso, com rendimentos moderados a bons (54-84%). Foram amplamente caracterizados por Espectrometria de Massas de Alta Resolução, Espectroscopia no Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear. Ainda, a análise por difração de raios X confirmou a estrutura do composto **44a**. As previsões *in silico* indicaram boa biodisponibilidade oral para a maioria dos compostos, excetuando **44c** e **45c**, os quais também foram os únicos que não obedeceram a todas as regras de fármacossimilaridade avaliadas. Apesar dos bons resultados preliminares nas avaliações biológicas experimentais, **44c** e **45c** devem ser preteridos em ensaios posteriores devido às previsões menos favoráveis. Os ensaios *in vitro* revelaram baixa citotoxicidade em duas linhagens celulares distintas. Ainda, os híbridos demonstraram excelente atividade anti-inflamatória e antiviral. Inibiram a replicação do SARS-CoV-2 em células Calu-3 e preveniram lesões pulmonares, influxo de leucócitos e aumento do peso pulmonar em camundongos desafiados com LPS. Esses resultados indicam que as sulfonamidas-sidnonas representam uma nova classe química de baixa citotoxicidade e com propriedades anti-inflamatórias e antivirais.

Estudos posteriores devem priorizar híbridos com o grupo sulfonamida na posição *para* do anel fenila central, já que apresentaram um perfil antiviral ligeiramente mais favorável, em especial **44a**. É necessário avaliar se **44a** é eficaz em reduzir a SDRA em modelos animais mais específicos para a infecção causada pelo SARS-CoV-2. Além disso, a investigação de seus mecanismos antivirais e anti-inflamatórios será de suma importância para futuras propostas de modificação estrutural da série. O conhecimento de seus alvos moleculares permitirá o uso do *docking* molecular para auxiliar o processo de planejamento racional das moléculas. Ainda, caso **44a** seja administrado via oral ou intravenosa em algum estudo *in vivo*, é necessário levar em consideração sua forte interação com a ASH – a concentração livre da molécula na corrente sanguínea pode se tornar baixa devido a essa interação, o que possivelmente exigirá doses mais elevadas do híbrido.

1.5. Materiais e métodos

Todos os solventes e reagentes foram adquiridos da Neon e Sigma-Aldrich, respectivamente e usados como recebidos. Os espectros de infravermelho foram obtidos pela técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance*), na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , em um espectrofotômetro *Brüker*, modelo *FT-IR Vertex 70*. Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (500 MHz ou 400 MHz) e carbono (125 MHz ou 100 MHz) foram realizados em um espectrômetro *Bruker Ultrashield Plus*, utilizando DMSO- d_6 como solvente. A referência interna foi o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades foram designadas da seguinte forma: s, simpleto; d, duplete; dd, duplo duplete; t, tripleto; dt, duplo tripleto; m, multiplete. A atribuição completa dos sinais foi realizada com auxílio de experimentos bidimensionais (COSY, NOESY HMBC E HSQC) para os compostos **49a**, **49b**, e os híbridos sulfonamidas-sidnonas (**44a-d** e **45a-d**). Os pontos de fusão (P.F.) foram obtidos em um aparelho da marca Gehaka, modelo PF1500 FARMA, e não foram corrigidos. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD) em cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (Merck) e reveladas em lâmpada UV (254 nm ou 365 nm). Espectrometria de Massas de Alta Resolução foi realizada em modo negativo usando um espectrômetro de massas *Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific)* com uma fonte de ionização por electrospray. Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas a 26°C, em um equipamento *Prominance (Shimadzu)*, equipado com uma coluna C18 *BetaSil* (25cm x 4,6mm x 5 μ m). Foi utilizado sistema de solventes ACN (48%): 52% H_2O (1% AcOH) e o fluxo foi ajustado em 1,0 mL por minuto. A detecção foi feita por Detector de Arranjo de Diodos (DAD) em 280 nm.

Os reagentes e produtos tiveram suas massas aferidas na balança analítica ATX-224 SHIMADZU ou na balança semi-analítica BEL ENGINEERING MARK S 203. As reações e recristalizações foram realizadas com uma placa de agitação e aquecimento C-MAG HS7 (IKA). Para a aferição do pH das soluções foram utilizadas fitas de pH universal da marca Macherey-Nagel.

1.5.1. Procedimentos sintéticos e caracterização

1.5.1.1. Síntese de 46a e 46b

46a e 46b foram preparados de acordo com um procedimento modificado encontrado na literatura (Zhang et al., 2018). Uma solução de ácido cloroacético (40 mmol, 3,78g) em água (8 mL) foi neutralizada à 0 °C com a adição de uma solução aquosa de NaOH 10%. Então, 5 mL de etanol e 6,08 g de *p*-nitroanilina ou *m*-nitroanilina (44 mmol) foram adicionados. A suspensão foi mantida em refluxo por 54 h, resfriada a 0 °C em um banho de gelo, alcalinizada com hidróxido de sódio (2,1g) e filtrada para eliminar a amina que não reagiu. A solução obtida foi acidificada com ácido clorídrico concentrado (pH 2-3). O precipitado obtido foi filtrado, lavado com água destilada e seco.

***N*-(*p*-nitro-fenil)-glicina (46a):** Sólido amarelo; ponto de fusão (°C): 213-218 (lit. 221-223, Abdualkader et al., 2021); rendimento: 36%. FTIR (ATR) cm⁻¹: 3360 (ν_{N-H}), 3500-2400 (ν_{O-H}), 3097 (ν_{C-H} aromático), 2892 (ν_{C-H} alifático), 1732 (ν_{C=O}), 1600-1436 (ν_{C=C} aromático), 1531 (ν_{NO2} assimétrico), 1406 (δ CH₂), 1284 (ν_{NO2} simétrico + ν_{C-O}), 839 (C-H, dobramento fora do plano de anel *para*-substituído).

***N*-(*m*-nitro-fenil)-glicina (46b):** Sólido amarelo; ponto de fusão (°C): 154-156 (lit. 156-158, Abdualkader et al., 2021); rendimento: 56%. FTIR (ATR) cm⁻¹: 3400 (ν_{N-H}), 3500-2400 (ν_{O-H}), 3095 (ν_{C-H} aromático), 2981, 2944, 2889 (ν_{C-H} alifático), 1713 (ν_{C=O}), 1622-1423 (ν_{C=C} aromático), 1547 (ν_{NO2} assimétrico), 1410 (δ CH₂), 1350 (ν_{NO2} simétrico), 733, 808 e 858 (C-H, dobramento fora do plano de anel *meta*-substituído).

1.5.1.2. Síntese de 47a e 47b

As *N*-fenil-*N*-nitroso-glicinas foram preparadas conforme procedimento previamente descrito na literatura, porém com algumas modificações (Abdualkader et al., 2021; Zhang et al., 2018). Uma suspensão da respectiva *N*-fenil glicina (2,86 g, 14,6 mmol) em água (24 mL) foi resfriada em um banho de gelo e sal e vigorosamente agitada enquanto 8 mL de uma solução aquosa gelada de nitrito de sódio (16,06 mmol, 1,12 g) foi adicionada gota à gota. A mistura foi mantida em agitação e resfriamento por 1,5 h. Então, a mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente por 40 min, filtrada, e acidificada pela adição de 2,2 mL de HCl concentrado ao filtrado. O precipitado foi separado por filtração à vácuo, lavado com água gelada, seco e usado na próxima reação sem mais etapas de purificação.

***N*-nitroso-*N*-(*p*-nitro-fenil)-glicina (47a):** Sólido amarelo; ponto de fusão (°C): 140-142 (lit.138, Abdualkader et al., 2021); rendimento: 61 %. FTIR (ATR) cm⁻¹: 3300-2400 (ν_{O-H}), 3124, 3092 (ν_{C-H} aromático), 2982, 2889 (ν_{C-H} alifático), 1728 (ν_{C=O}), 1599-1423 (ν_{C=C} aromático), 1520 (ν_{NO2} assimétrico), 1487 (ν_{N=O} + ν_{C=C} aromático), 1396 (δ_{CH2}), 1344 (ν_{NO2} assimétrico), 941 (ν_{N-N}), 847 (C-H, dobramento fora do plano de anel *para*-substituído).

***N*-nitroso-*N*-(*m*-nitro-fenil)-glicina (47b):** Sólido amarelo; ponto de fusão (°C): 154-156 (lit. 156-157, Abdualkader et al., 2021); rendimento: 90 %. FTIR (ATR) cm⁻¹: 3300-2400 (ν_{O-H}), 3109, 3001 (ν_{C-H} aromático), 2958, 2881 (ν_{C-H} alifático), 1720 (ν_{C=O}), 1464-1436 (ν_{C=C} aromático), 1537 (ν_{NO2} assimétrico), 1464 (ν_{N=O} + ν_{C=C} aromático), 1396 (δ_{CH2}), 1348 (ν_{NO2} simétrico), 966 (ν_{N-N}), 735, 800 e 845 (C-H dobramento fora do plano de anel *meta*-substituído).

1.5.1.3. Procedimento para a síntese de 48a e 48b

Anidrido trifluoracético (5 mL) foi adicionado a um balão de fundo redondo contendo 6 mmol (1,35 g) da respectiva *N*-fenil-*N*-nitroso-glicina (**47a** ou **47b**) (Abdualkader et al., 2021; Zhang et al., 2018). Um tubo de secagem (CaCl₂) foi acoplado ao frasco e a mistura foi mantida em agitação leve por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a solução obtida foi resfriada em banho de gelo e vertida em uma única porção em água gelada. O precipitado foi filtrado, lavado com água e seco. Finalmente, o produto bruto foi purificado por recristalização em THF (**48a**) ou etanol (**48b**).

3-(*p*-Nitro-fenil)-sidnona (48a): Cristais amarelos; ponto de fusão (°C): 193-195 (lit. 190-192, Abdualkader et al., 2021); rendimento: 93%. RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,98 (s, 1H, H2), 8,23 (d, 2H, *J*= 9.02 Hz, H4 + H8), 8,53 (d, 2H, *J*= 9.02 Hz, H5 + H7). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 95,8 (C2), 123,2 (C4 + C8), 125,5 (C5 + C7), 138,5 (C3), 149,4 (C6), 168,4 (C1). FTIR (ATR) cm⁻¹: 3117 (ν_{C-H} sidnona), 1763-1728 (ν_{C=O} sidnona), 1620-1458 (ν_{C=C} aromático), 1522 (ν_{NO2} assimétrico), 1344 (ν_{NO2} simétrico), 845 (C-H, dobramento fora do plano de anel *para*-substituído).

3-(*m*-Nitro-fenil)-sidnona (48b): Cristais amarelos; ponto de fusão (°C): 141-142 (lit. 140-142, Abdualkader et al., 2021); rendimento: 85%. RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8,00 (m, 2H, H2 + H5), 8,40 (d, 1H, *J*= 8,01 Hz, H4), 8,56 (d, 2H, *J*= 8.01 Hz, H6), 8,76 (s, 1H, H8). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 95,9 (C2), 117,2 (C8), 126,9 (C4), 128,0 (C6), 131,9 (C5), 135,1 (C3), 148,3 (C7), 168,4 (C1). FTIR (ATR) cm⁻¹: 3149 (ν_{C-H}

sidnona), 3115, 3061 (VC-H aromático), 1751-1732 (VC-O sidnona), 1614-1443 (VC=C aromático), 1531 (VNO₂ assimétrico), 1356 (VNO₂ simétrico), 723, 812 e 837 (C-H dobramento fora do plano de anel *meta*-substituído).

1.5.1.4. Procedimento para a síntese de 49a e 49b

49a e 49b foram obtidos por um procedimento descrito por Zhang e colaboradores, com pequenas modificações na etapa de purificação (Zhang et al., 2018). Brevemente, à uma solução da sidnona adequada (**48a** ou **48b** – 900 mg, 4,34 mmol) em 75 mL de uma mistura de EtOH/H₂O/THF (2:1:3 v/v/v), 7,34 g de SnCl₂ e 4,0 mL de ácido clorídrico concentrado foram adicionados. A solução formada foi mantida em refluxo por 1 h. Em seguida, foi resfriada em banho de gelo, diluída com 60 mL de água e alcalinizada pela adição de NaHCO₃ (pH 8). O precipitado foi removido por filtração a vácuo em funil de vidro sinterizado contendo uma pequena camada de celite. O filtrado foi concentrado a pressão reduzida, e os cristais amarelos formados foram filtrados, lavados com água destilada gelada e secos.

3-(*p*-Amino-fenil)-sidnona (49a): Cristais amarelos; ponto de fusão (°C): 194-196 (lit. 195-196, Popoff; Singhal, 1968); rendimento: 72%. RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 6,03 (s, 2H, NH₂), 6,70 (d, 2H, *J* = 8,80 Hz, H5 + H7), 7,51 (s, 1H, H2), 7,57 (d, 2H, *J* = 8,80 Hz, H4 + H8). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 92,9 (C2), 113,4 (C5 + C7), 122,2 (C4 + C8), 122,6 (C3), 152,5 (C6), 168,6 (C1). FTIR (ATR) cm⁻¹: 3454 (VNH₂ assimétrico), 3333 (VNH₂ simétrico), 3161 (VC-H sidnona), 1707 (VC-O sidnona), 1639 (δNH₂), 1593-1468 (VC=C aromático), 814 (C-H dobramento fora do plano de anel *para*-substituído).

3-(*m*-Amino-fenil)-sidnona (49b): Cristais amarelos; ponto de fusão (°C): 150-152; rendimento: 68%. RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 5,78 (s, 1H, NH₂), 6,84 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H6), 6,96 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H4), 7,00 (d, 1H, *J* = 1,83, H8), 7,29 (t, 1H, *J* = 8,1 Hz, H5), 7,63 (s, 1H, H2). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 94,5 (C2), 105,2 (C8), 107,9 (C4), 117,2 (C6), 130,5 (C5), 135,4 (C3), 150,4 (C7), 168,5 (C1). FTIR (ATR) cm⁻¹: 3394 (VN-H assimétrico), 3342 (VN-H simétrico), 3136 (VC-H sidnona), 3007, 3059, 3030 (VC-H aromático), 1751 e 1713 (VC-O sidnona), 1649 (δNH₂), 1612-1435 (VC=C aromático), 727, 771 e 852 (C-H dobramento fora do plano de anel *meta*-substituído).

1.5.1.5. Procedimento para a síntese dos híbridos sulfonamidas-sidnonas

Os cloretos de benzenossulfonila adequados (**50a-d**, 0,75 mmol) 49a ou 49b (133 mg, 0,75 mmol), carbonato de sódio (87,5 mg, 0,83 mmol) e 600 mg de sílica gel (70-230 mesh) foram macerados manualmente por 1-4 h. O progresso da reação foi monitorado por CCD [CH₂Cl₂:EtOAc (8:2 v/v)]. Após o término da reação, extrações com acetato de etila (5 x 10 mL) e metanol (2 x 10 mL) foram realizadas. O solvente foi completamente removido à pressão reduzida e o sólido obtido foi parcialmente dissolvido em solução aquosa de NaOH. A amina que não reagiu foi extraída com CH₂Cl₂, ou EtOAc (no caso de **44c** e **45c**). A solução alcalina foi então resfriada em banho de gelo e acidificada com HCl concentrado à pH 2-3. O precipitado foi filtrado e lavado com água. O produto bruto foi então purificado por recristalização em etanol (**45a**, **45b**, **45d**) lavado com EtOH e EtOAc (**45c**) ou lavado com algumas porções de THF, metanol e EtOAc (**44a-44d**).

44a: Pó bege; ponto de fusão (°C): 260-263; rendimento: 61%. RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10,94 (s, 1H, NH), 7,81 (d, 2 H, *J* = 8,68 Hz, H4+8), 7,74 (d, 2H, *J* = 7,70 Hz, H10+14), 7,64 (s, 1H, H2), 7,39 (d, 2H, *J* = 7,70 Hz, H11+13), 7,35 (d, 2H, *J* = 8,68 Hz, H5+7), 2,34 (s, 3H, H15). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 94,5 (C2), 119,3 (C5+7), 122,8 (C4+8), 126,8 (C10+14), 130,0 (C11+13), 168,4 (C1), 21,0 (C15), 129,7 (C3); 141,5 (C6), 136,2 (C9), 143,9 (C12). FTIR (ATR) cm⁻¹: 3200-2800 (ν_{N-H}), 3176 (ν_{C-H} sidnona), 3078 (ν_{C-H} aromático), 2972, 2895 (ν_{C-H} alifático), 1718 (ν_{C=O} sidnona), 1599-1446 (ν_{C=C} aromático), 1348 (ν_{SO₂} assimétrico), 1153 (ν_{SO₂} simétrico), 841, 808 (C-H dobramento fora do plano de anel *para*-substituído). HRMS *m/z* calculado para [M – H]⁻, 330,05540; observado, 330,05444. Pureza (CLAE): >99%.

44b: Pó bege; ponto de fusão (°C): 247-249; rendimento: 54%. RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11,01 (s, 1H, NH), 7,86 (d, 2 H, *J* = 7,52 Hz, H10+14), 7,82 (d, 2H, *J* = 8,96 Hz, H4+8), 7,66 (m, 2H, H2+12), 7,60 (t, 2H, *J* = 7,52 Hz, H11+13), 7,36 (d, 2H, *J* = 8,96 Hz, H5+7). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 94,5 (C2), 119,5 (C5+7), 122,8 (C4+8), 126,7 (C10+14), 129,5 (C11+13), 129,8 (C3), 133,4 (C12), 139,1 (C9), 141,3 (C6), 168,4 (C1). FTIR (ATR) cm⁻¹: 3200-2800 (ν_{N-H}), 3187 (ν_{C-H} sidnona), 3068 (ν_{C-H} aromático), 1720 (ν_{C=O} sidnona), 1603-1441 (ν_{C=C} aromático), 1360 (ν_{SO₂} assimétrico), 1157 (ν_{SO₂} simétrico), 839 (C-H dobramento fora do plano de anel *para*-substituído) 687, 744 (C-H dobramento fora do plano de anel mono-substituído). HRMS *m/z*: calculado para [M – H]⁻: 316,03975; observado, 316,03833. Pureza (CLAE): >99%.

44c: Pó bege; ponto de fusão (°C): 269-271; rendimento: 61%. RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11,32 (s, 1H, NH), 8,41 (d, 2 H, *J* = 8,80 Hz, H11+13), 8,10 (d, 2H, *J* =

8,80 Hz, H10+14), 7,85 (d, 2H, J = 8,96 Hz, H4+8), 7,68 (s, 1H, H2), 7,38 (d, 2H, J = 8,96 Hz, H5+7). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 94,6 (C2), 120,2 (C5+7), 122,9 (C4+8), 124,9 (C11+13), 128,3 (C10+14), 130,4 (C3), 140,6 (C6), 144,4 (C9), 150,1 (C12), 168,4 (C1). FTIR (ATR) cm^{-1} : 3200-2800 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3128 ($\nu_{\text{C-H}}$ sidnona), 3084 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1726 ($\nu_{\text{C-O}}$ sidnona), 1604-1441 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático), 1529 (ν_{NO_2} assimétrico), 1348 (ν_{NO_2} simétrico + ν_{SO_2} assimétrico), 1167 (ν_{SO_2} simétrico), 849, 831 (C-H dobramento fora do plano de anel *para*-substituído). HRMS m/z calculado para $[\text{M} - \text{H}]^-$, 361,02483; observado, 361,02371. Pureza (CLAE): >99%.

44d: Pó bege; ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$): 255-258; rendimento: 65%. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11,09 (s, 1H, NH), 7,85 (m, 4H, H4+8+10+14), 7,68 (m, 3H, H2+11+13), 7,36 (dd, 2H, H5+7). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 94,6 (C2), 119,8 (C5+7), 122,9 (C4+8), 128,7 (C10+14), 129,7 (C11+13), 130,0 (C3), 137,9 (C9), 138,3 (C12), 141,0 (C6), 168,4 (C1). FTIR (ATR) cm^{-1} : 3200-2800 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3184 ($\nu_{\text{C-H}}$ sidnona), 3085, 3072 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1720 ($\nu_{\text{C-O}}$ sidnona), 1605-1443 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático), 1362 (ν_{SO_2} assimétrico), 1157 (ν_{SO_2} simétrico), 841 (C-H dobramento fora do plano de anel *para*-substituído). HRMS m/z calculado para $[\text{M} - \text{H}]^-$, 350,00078; observado, 349,99982. Pureza (CLAE): >99%.

45a: Cristais laranjas; ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$): 187-189; rendimento: 84%. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10,86 (s, 1H, NH), 7,72 (m, 3H, H2+10+14), 7,65 (s, 1H, H8), 7,57 (m, 2H, H5+H4), 7,38 (m, 3H, H6+11+13), 2,34 (s, 3H, H15). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 168,4 (C1), 95,2 (C2), 135,1 (C3), 116,9 (C4), 131,2 (C5), 122,4 (C6), 139,6 (C7), 111,4 (C8), 136,1 (C9), 126,8 (C10+14), 130,0 (C11+13), 143,9 (C12), 21,0 (C15). FTIR (ATR) cm^{-1} : 3200-2800 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3146 ($\nu_{\text{C-H}}$ sidnona), 3076, 3005 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 2957, 2914 ($\nu_{\text{C-H}}$ alifático), 1730 ($\nu_{\text{C-O}}$ sidnona), 1610-1460 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático), 1338 (ν_{SO_2} assimétrico), 1159 (ν_{SO_2} simétrico), 665, 781 e 872 (C-H dobramento fora do plano de anel *meta*-substituído), 814 (C-H dobramento fora do plano de anel *para*-substituído). HRMS m/z calculado para $[\text{M} - \text{H}]^-$, 330,05540; observado, 330,05446. Pureza (CLAE): >99%.

45b: Cristais laranjas; ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$): 181-184; rendimento: 70%. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10,94 (s, 1H, NH), 7,83 (d, 1 H, J = 7,34 Hz, H10+14), 7,70 (s, 1H, H2), 7,64 (m, 2H, H8+H12), 7,57 (m, 4H, H4+5+11+13), 7,40 (dt, 1H, 3J = 6,86 Hz, 4J = 2,03 Hz, H6). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 168,6 (C1), 95,3 (C2), 135,2 (C3), 117,2 (C4), 131,4 (C5), 122,8 (C6), 139,1 (C7), 111,8 (C8), 139,5 (C9), 126,9 (C10+14), 129,7 (C11+13), 133,6 (C12). FTIR (ATR) cm^{-1} : 3200-2800 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3173 ($\nu_{\text{C-H}}$ sidnona), 3094, 3063 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1728 ($\nu_{\text{C-O}}$ sidnona), 1609-1456 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático), 1335 (ν_{SO_2} assimétrico), 1157 (ν_{SO_2} simétrico),

656, 794 e 883 (C-H dobramento fora do plano de anel *meta*-substituído), 685, 760 (C-H dobramento fora do plano de anel mono-substituído). HRMS m/z calculado para $[M - H]^-$, 316.03975; observado, 316.03859. Pureza (CLAE): >99%.

45c: Pó bege; ponto de fusão (°C): 257-260; rendimento: 72%. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11,24 (s, 1H, NH), 8,39 (d, 2H, $J = 8,79$ Hz, H11+13), 8,08 (d, 2H, $J = 8,79$ Hz, H10+14), 7,76 (s, 1H, H2), 7,67 (t, 1H, $J = 1,92$ Hz, H8), 7,64 (d, 1H, $J = 8,06$ Hz, H4), 7,60 (t, 1H, $J = 8,06$ Hz, H5), 7,41 (d, 1H, $J = 8,06$ Hz, H6). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 168,4 (C1), 95,2 (C2), 135,2 (C3), 117,7 (C4), 131,4 (C5), 123,2 (C6), 138,7 (C7), 112,3 (C8), 144,3 (C9), 128,4 (C10+14), 124,9 (C11+13), 150,1 (C12). FTIR (ATR) cm^{-1} : 3200-2800 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3132 ($\nu_{\text{C-H}}$ sidona), 3066, 3003 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1720 ($\nu_{\text{C=O}}$ sidona), 1612-1470 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático), 1527 (ν_{NO_2} assimétrico), 1348 (ν_{NO_2} simétrico + ν_{SO_2} assimétrico), 1165 (ν_{SO_2} simétrico), 679, 777 e 897 (C-H dobramento fora do plano de anel *meta*-substituído), 854 (C-H dobramento fora do plano de anel *para*-substituído). HRMS m/z calculado para $[M - H]^-$, 361,02483; observado, 361,02365. Pureza (CLAE): 98,5%.

45d: Cristais laranjas; ponto de fusão (°C): 197-199; rendimento: 76 %. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11,01 (s, 1H, NH), 7,83 (d, 2H, $J = 8,64$ Hz, H10+14), 7,76 (s, 1H, H2), 7,66 (d, 3H, H8+11+13), 7,61 (dt, 1H, $J = 8,04$ Hz, $J = 1,72$ Hz, H4), 7,58 (t, 1H, $J = 8,04$ Hz, H5), 7,39 (dt, 1H, $J = 8,04$ Hz, $J = 1,72$ Hz, H6). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 168,4 (C1), 95,2 (C2), 135,2 (C3), 117,4 (C4), 131,3 (C5), 122,8 (C6), 139,1 (C7), 111,9 (C8), 137,8 (C9), 128,7 (C10+14), 129,7 (C11+13), 138,3 (C12). FTIR (ATR) cm^{-1} : 3200-2800 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3149 ($\nu_{\text{C-H}}$ sidona), 3105, 3074, 3007 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1738 ($\nu_{\text{C=O}}$ sidona), 1614-1462 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático), 1342 (ν_{SO_2} assimétrico), 1162 (ν_{SO_2} simétrico), 783 e 881 (C-H dobramento fora do plano de anel *meta*-substituído), 829 (C-H dobramento fora do plano de anel *para*-substituído). HRMS m/z calculado para $[M - H]^-$, 350,00078; observado, 349,99979. Pureza (CLAE): >99%.

1.5.2. Difração de raio-X de monocristal

A análise de difração de raio-X foi realizada pelo Professor Doutor Guilherme Pereira Guedes, do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense (UFF). Os dados de difração de raios X do composto **44a** (Tabela A1, anexos) foram coletados em um equipamento Bruker D8-Venture, utilizando radiação Mo K α monocromatizada por grafite ($\lambda = 0,71073$ Å) à temperatura ambiente. A coleta dos dados, o refinamento da célula unitária e a redução dos dados foram realizados utilizando os programas *Bruker Instrument Service vV6.2.16*, *APEX4*

(Bruker, 2012. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, EUA) e *SAINT V8.40B* (Bruker, 2012. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, EUA), respectivamente. A correção de absorção, utilizando reflexões equivalentes, foi realizada com o programa *SADABS2016/2* (Krause et al., 2015). A solução da estrutura e o refinamento por mínimos quadrados em matriz completa baseado em F^2 foram realizados com os programas *SHELXS* e *SHELXL* (Sheldrick, 2015). Todos os átomos, com exceção dos hidrogênios, foram refinados de forma anisotrópica. Os átomos de hidrogênio foram tratados com refinamento misto. As representações da estrutura foram feitas com o programa Mercury (Macrae et al., 2006).

1.5.3. Predição de ADMET e atividades biológicas

Parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos, e fármacossimiladidade foram estimados para todas as sulfonamidas-sidnonas utilizando a ferramenta online e gratuita SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017), disponível em: <http://www.swissadme.ch>. A previsão da toxicidade aguda em ratos e dos espectros de atividade biológica dos híbridos foi realizada com os recursos GUSAR Online (Lagunin et al., 2011) e Pass Online (Filimonov et al., 2014), respectivamente – todos disponibilizados pela plataforma Way2Drug (<http://www.way2drug.com/dr/>).

1.5.4. Análises Biológicas

1.5.4.1. Animais

Todos os ensaios in vivo, que envolveram a investigação da atividade anti-inflamatória em modelo de ARDS induzida por LPS, foram realizados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, pelos alunos de Pós-Graduação Mayara Alves Amorim e Vitor Hélio de Souza Oliveira, sob orientação da Professora Doutora Eunice André.

Camundongos Swiss (20-25 g) foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos em ambiente controlado, com temperatura de 21 ± 2 °C, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas, com luzes acesas às 6 h da manhã. Eles receberam ração peletizada Nubilab CR-1 (Quimtia, Paraná, Brasil) e água potável à vontade. A pesquisa seguiu as diretrizes ARRIVE, conforme descrito por Percie du Sert (2020). Todos os procedimentos experimentais foram realizados após aprovação dos protocolos pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da

Universidade Federal do Paraná (Protocolos nº1553/2023 e nº1583). Para garantir um estudo não enviesado, os animais foram aleatoriamente distribuídos nos diferentes grupos experimentais e os experimentos foram conduzidos de forma cega, ou seja, o avaliador responsável pelas análises dos animais não tinha conhecimento prévio dos tratamentos administrados. Foi utilizado um número mínimo de 5 ou 7 animais por grupo, considerado necessário para a obtenção de dados confiáveis e consistentes. Nenhum dado bruto foi omitido durante o cálculo das médias, análises estatísticas ou interpretação dos resultados.

1.5.4.2. Reagentes e formulações para os ensaios

Nos experimentos foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (O111:B4, Sigma-Aldrich). LPS foi preparado em NaCl 0,9%. Soluções dos compostos (**44a-d** e **45a-d**) foram preparadas usando NaCl 9% contendo 10% de DMSO e 5% de Tween 80. As soluções foram preparadas no dia do experimento, imediatamente antes de seu início.

1.5.4.3. Efeito das sulfonamidas-sidnonas em modelo de LPA/SDRA em camundongos

Neste estudo, a SDRA foi induzida por administração intratraqueal (i.t.) de LPS em uma dose de 5 mg/kg/50 µL ou do veículo (salina, 50 µL), em camundongos Swiss machos. Para tanto, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com ketamina/xilazina (100 e 15 mg/kg, respectivamente). Em seguida, foram colocados em posição de decúbito dorsal. Em condições assépticas, foi realizada uma pequena incisão vertical de 5 mm na pele do pescoço. A traqueia foi localizada, e a injeção de LPS (5 mg/kg/50 µL) ou de seu veículo (soro fisiológico/50 µL) foi realizada diretamente na traqueia com o uso de uma agulha estéril de calibre 30. A pele foi suturada e os animais foram avaliados 24 horas após a indução da SDRA.

Para avaliar o efeito dos híbridos sulfonamidas-sidnonas (**44a-d** e **45a-d**) na SDRA induzida por LPS, os compostos (10 mg/kg) ou os seus respectivos veículos foram administrados 15 minutos antes da injeção i.t. de LPS (5 mg/kg/50 µL). 24 h após a administração do LPS ou de seu veículo, os animais foram eutanasiados com uma overdose de tiopental (100 mg/kg, i.p.), precedida da aplicação de lidocaína (10 mg/mL, i.p.). Em seguida, foi realizada uma perfusão trans cardíaca com solução salina a 0,9% (NaCl) para remoção dos

pulmões, que foram utilizados nas análises histológicas. Também foi coletado o lavado broncoalveolar (BAL) dos animais com SDRA, para posterior análise dos infiltrados celulares.

1.5.4.4. Análise histológica do pulmão dos camundongos

O pulmão foi coletado 24 horas após a administração de LPS ou de seu veículo em camundongos previamente tratados com as sulfonamidas-sidnonas ou seus respectivos veículos. O tecido foi fixado em paraformaldeído a 4%, contendo parafina, cortado em seções de 4 µm e corado com hematoxilina e eosina (HE). Em seguida, a histologia dos tecidos pulmonares foi realizada por um patologista por meio de microscopia óptica, classificando as alterações patológicas em uma escala de 4 graus: normal (0), leve (1), moderada (2) e grave (3). Foram analisados os seguintes parâmetros: congestão alveolar, infiltração de células inflamatórias, edema e hemorragia alveolar. Os valores foram expressos como a soma dos escores obtidos após a análise histopatológica, conforme representado no gráfico.

1.5.4.5. Quantificação de leucócitos totais no BAL

O lavado bronco alveolar foi coletado 24 horas após a administração de LPS ou de seu veículo em camundongos previamente tratados com os compostos ou seus respectivos veículos. Após 24 horas, os animais foram eutanasiados com uma overdose de tiopental (100 mg/kg, i.p.), precedida da administração de lidocaína (10 mg/ml, i.p.). Em seguida, a traqueia foi exposta e canulada com um tubo de polietileno conectado a uma seringa. Os pulmões foram lavados com uma solução tampão de PBS. O tampão PBS foi transferido por meio da cânula traqueal em um volume de 1 mL, sendo posteriormente aspirado; esse procedimento foi repetido três vezes para coletar o exsudato. O fluido recuperado após cada lavagem foi combinado e centrifugado (290 g por 8 minutos a 4 °C). O pellet de células foi ressuspenso em 100 µL de tampão PBS, e a contagem total de células foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer (American Optical, Southbridge, MA), após a adição de solução de Türk (0,5 mg/mL em PBS), por observação em microscópio óptico (aumento de 400x). Os resultados foram expressos como número total de células ($\times 10^6$).

1.5.4.6. Medida da proporção pulmão úmido/seco

A proporção pulmão úmido/seco foi obtida 24 horas após a administração de LPS ou de seu veículo em camundongos previamente tratados com os compostos ou seus respectivos veículos. Após 24 horas, os animais foram eutanasiados com uma overdose de tiopental (100 mg/kg, i.p.), precedida da administração de lidocaína (10 mg/mL, i.p.). Após a coleta dos pulmões, o conteúdo de água pulmonar foi avaliado para determinar a gravidade do edema pulmonar, utilizando a razão úmido/seco (W/D ratio). O peso úmido do pulmão foi medido e, em seguida, os pulmões foram secos em estufa a 60 °C por 72 horas para obtenção do peso seco. Posteriormente, a razão W/D foi calculada da seguinte forma: a diferença entre o peso úmido e o peso seco do pulmão (em miligramas) dividida pelo peso corporal (em gramas).

1.5.4.7. Materiais para ensaio antiviral e estudos com a ASH

Varfarina, ibuprofeno, digitoxina, Ludox®, remdesivir (RDV), e ASH (pureza > 99%, A3782) foram adquiridos na Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha) e usado sem purificação prévia. A solução de PBS foi preparada com 137,0; 2,7; 8,0 e 2,0 mM de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato dissódico (Na₂HPO₄) e dihidrogeno fosfato de potássio (KH₂PO₄), respectivamente, para atingir pH 7,4.

1.5.4.8. Células e vírus

Os ensaios de citotoxicidade e atividade anti-SARS-CoV-2 foram realizados pelo grupo coordenado pelo Dr. Thiago Moreno L. Souza, no Laboratório de Imunofarmacologia do Centro de Pesquisa, Inovação e Vigilância em COVID-19 e Emergências Sanitárias (CPIV, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz).

Células epiteliais do pulmão humano (Calu-3) e células renais de macaco-verde-africano (Vero E6) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com alta concentração de glicose, suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (FBS), sendo incubadas a 37 °C com 5% de CO₂.

A cepa B.1 do SARS-CoV-2 (GenBank #MT710714) foi isolada em células Vero E6, a partir de swab nasofaríngeo de um paciente com doença respiratória que evoluiu para COVID-19. Todos os procedimentos relacionados ao cultivo do vírus foram realizados na plataforma

multiusuário de nível de biossegurança 3 (NBL 3) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro, Brasil, de acordo com as diretrizes descritas por Bain et al (2020).

1.5.4.9. Ensaios de citotoxicidade

Monocamadas de células Calu-3 (2×10^5 células/poço) foram tratadas por 3 dias com várias concentrações (50, 150, 300, 500, 600, 800 μM) dos híbridos sulfonamidas-sidnonas (**44a-44d**, **45a-45d**). Em seguida, 100 μL do sobrenadante foi removido e 20 μL de resazurina foi adicionado às células (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay – Promega). Após incubação por 3 horas à temperatura ambiente, as células foram analisadas em um espectrofluorímetro, com excitação em 560 nm e emissão em 590 nm. A concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade (CC_{50}) foi calculada por meio de análise de regressão não linear das curvas dose-resposta. Os ensaios foram realizados em quadruplicata, e os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão da média (SEM).

Células Vero ($2,0 \times 10^4$ células/poço) foram tratadas por 72 horas com diferentes concentrações (50, 150, 300, 500, 600, 800 μM) dos híbridos sulfonamidas-sidnonas (**44a-44d**, **45a-45d**), seguindo o procedimento descrito anteriormente (Chaves et al., 2022a). A viabilidade foi avaliada pelo método do Cristal Violeta. A absorbância foi medida em 570 nm utilizando um leitor de microplacas. Um único ensaio foi conduzido em triplicata, e os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM).

1.5.4.10. Ensaios de redução de título viral e titulação do vírus

Células Calu-3 ($2,0 \times 10^5$ células/poço) em microplacas de 96 poços foram infectadas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 por 1 hora a 37 °C, em ambiente com 5% de CO_2 . O inóculo foi removido, e as células foram incubadas com 10,0; 5,0; 2,5 e 1,25 μM de **44a**, **44b**, **44c**, **44d**, **45a**, **45b**, **45c** e **45d** em DMEM com 10% de FBS. Após 48 horas, o conteúdo viral no sobrenadante foi quantificado por ensaios de formação de placas (*plaque forming assays*) em células Vero E6 ($2,0 \times 10^4$ células/poço), conforme descrito em publicações anteriores (Chaves et al., 2022b). Os títulos virais foram calculados pela contagem de unidades formadoras de placas (PFU/mL). Remdesivir (RDV) foi utilizado como controle positivo. Os ensaios antivirais foram realizados em quadruplicata. Os dados foram analisados utilizando o

software GraphPad Prism 8.0 (Windows GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores foram apresentados como médias \pm SEM.

1.5.5. Análises espectroscópicas da interação ASH:44a

A interação da sulfonamida **44a** com a ASH foi investigada pelo Dr. Otávio Augusto Chaves, sob orientação do Professor Dr. Carlos Serpa, no Departamento de Química da Universidade de Coimbra [Centro de Química de Coimbra – Institute of Molecular Science (CQC-IMS)].

Os espectros de fluorescência em estado estacionário foram obtidos em um leitor de microplacas *SpectraMax iD5* (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA), utilizando uma placa de 96 poços. Os espectros foram registrados na faixa de 320 a 450 nm em cinco diferentes temperaturas (296, 303, 310 e 317 K), com comprimento de excitação (λ_{exc}) de 280 nm. A uma concentração fixa de 4,0 μ M de albumina, foram adicionadas soluções do composto **44a** até atingir as concentrações finais de 0,0; 0,2; 0,6; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 μ M. Em cada caso, a linha de base correspondente foi subtraída. Para a obtenção dos parâmetros quantitativos de afinidade de ligação entre HSA e **44a**, foram utilizadas as aproximações matemáticas de Stern-Volmer, Van't Hoff e energia livre de Gibbs, após a correção do filtro interno, conforme descrito em trabalhos anteriores (Chaves et al., 2024b).

Os ensaios de competição com os fármacos foram realizados utilizando sondas para o sítio I (varfarina), sítio II (ibuprofeno) e sítio III (digitoxina) (Chaves et al., 2017). As medidas de fluorescência em estado estacionário foram obtidas sob as mesmas condições descritas acima, a 310 K. Cada sonda de sítio foi incubada com solução de HSA a 4,0 μ M (relação 1:1) antes da adição do composto **44a** nas concentrações de 0,0; 0,2; 0,6; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 μ M. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os espectros foram analisados utilizando o GraphPad Prism versão 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

Os espectros de fluorescência resolvida no tempo (TRF, do inglês *Time-resolved fluorescence*) foram obtidos por meio de um equipamento de contagem de fótons únicos correlacionado no tempo construído em laboratório, conforme descrito anteriormente (Pina et al., 2009). Os decaimentos foram coletados com excitação em 282 nm (Horiba Jobin-Yvon-IBH nanoLED) e emissão em 338 nm. Os decaimentos de fluorescência para a ASH (4,0 μ M, em PBS) e para o sistema ASH:**44a** (com concentrações do composto de 0,0; 0,2; 0,6; 1,0; 2,0; 4,0;

6,0 e 8,0 μM), bem como a função de resposta instrumental (IRF, obtida utilizando uma dispersão de Ludox®), foram registrados com 1024 canais e uma resolução de 97,1 ps/canal. A deconvolução das curvas de decaimento de fluorescência foi realizada utilizando o método da função de modulação, conforme implementado por G. Striker no software SAND, como relatado previamente na literatura (Striker et al., 1999).

Os experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados em um espectrofotômetro Olis DSM-20CD (OLIS, Inc., Bogart, GA, EUA), com um sistema de controle de temperatura Quantum Northwest CD 150 (Quantum Northwest, Inc., Liberty Lake, WA, EUA). Utilizando uma cubeta com caminho óptico de 0,1 cm, os espectros de CD no UV distante da ASH (200-250 nm) foram registrados na ausência e na presença do composto **44a**, nas proporções 1:0 e 1:8. Os espectros médios obtidos a partir de três medições sucessivas foram corrigidos pela subtração do sinal do tampão. Os resultados foram normalizados (Chaves et al., 2024b) e o conteúdo de estrutura secundária foi estimado por meio da análise dos espectros no UV, utilizando o servidor online Beta Structure Selection (BestSel, <http://bestsel.elte.hu/index.php>) (Micsonai et al., 2018).

1.5.6. Interação *in silico* ASH:44a

A estrutura dos híbridos sulfonamidas-sidnonas (**44a-44d** e **45a-45d**) foi construída e minimizada no programa Spartan'24 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, EUA) (Shao et al., 2006b), utilizando o método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Os cálculos de docking molecular foram realizados com o software GOLD 2022.3.0 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, CB2 1EZ, Reino Unido) (Jones et al., 1997).

Os cálculos de *docking* foram realizados considerando um raio de 8 Å ao redor de cada sítio de ligação selecionado, e a função de pontuação padrão ChemPLP foi utilizada devido à melhor correlação relatada entre os dados *in silico* e os dados experimentais para a ASH (Chaves et al., 2022c; Chaves; Menezes; Iglesias, 2019). O servidor *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP) (Adasme et al., 2021) foi utilizado para identificar os principais resíduos de aminoácidos e as respectivas distâncias de interação das poses que apresentaram os maiores valores de pontuação. As figuras foram geradas com o programa PyMOL Molecular Graphics System nível 1.0 (Delano Scientific LLC software, Schrödinger, Nova York, EUA) (Yuan; Chan; Hu, 2017).

1.6. Referências

ABANI, Obbina *et al.* Baricitinib in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial and updated meta-analysis. **The Lancet**, v. 400, n. 10349, p. 359–368, 2022.

ABDUALKADER, Abdualrahman Mohammed *et al.* Discovery of Bis-sydnone styryl ketone as a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 62, 2021.

ABOUL-FOTOUH, Sawsan *et al.* What are the current anti-COVID-19 drugs? From traditional to smart molecular mechanisms. **Virology journal**, v. 20, n. 1, p. 241, 2023.

ABOZEID, Mohamed Ahmed *et al.* Synthesis of novel naphthalene-heterocycle hybrids with potent antitumor, anti-inflammatory and antituberculosis activities. **RSC Advances**, v. 10, n. 70, p. 42998–43009, 2020.

ADASME, Melissa F. *et al.* PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W530–W534, 2021.

AHMED-BELKACEM, Rostom *et al.* Synthesis of adenine dinucleosides SAM analogs as specific inhibitors of SARS-CoV nsp14 RNA cap guanine-N7-methyltransferase. **European journal of medicinal chemistry**, v. 201, p. 112557, 2020.

AHMED-BELKACEM, Rostom *et al.* Potent Inhibition of SARS-CoV-2 nsp14 N 7-Methyltransferase by Sulfonamide-Based Bisubstrate Analogues. **Journal of medicinal chemistry**, v. 65, n. 8, p. 6231–6249, 2022.

AL-HUSINAT, Lou'i *et al.* A narrative review on the future of ARDS: evolving definitions, pathophysiology, and tailored management. **Critical Care**, v. 29, n. 1, p. 88, 2025.

AMMAL P, Rugmini; PRASAD, Anupama R.; JOSEPH, Abraham. Synthesis, characterization, in silico, and in vitro biological screening of coordination compounds with 1,2,4-triazine based biocompatible ligands and selected 3d-metal ions. **Heliyon**, v. 6, n. 10, 2020.

ANDREWS, Hayden S.; HERMAN, Jonathan D.; GANDHI, Rajesh T. Treatments for COVID-19. **Annual review of medicine**, v. 75, n. 1, p. 145–157, 2024.

ARIBINDI, Katyayini *et al.* Investigational pharmacological agents for the treatment of ARDS. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 33, n. 3, p. 243–277, 2024.

ASUNDARIA, Shahruxh T. *et al.* Synthesis of novel biologically active methylene derivatives of sydnones. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 12, p. 5752–5763, 2013.

AUTILIO, Chiara; PÉREZ-GIL, Jesús. Understanding the principle biophysics concepts of pulmonary surfactant in health and disease. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 104, n. 4, p. F443–F451, 2019.

BAGGIO, Jussara A. Oliveira *et al.* **Síndrome respiratória aguda grave (SRAG) causada por COVID-19: um fator regional.** [S.l.]: SciELO Brasil, 2021. v. 117 p. 976–977

BAIN, William *et al.* Practical Guidelines for Collection, Manipulation and Inactivation of SARS-CoV-2 and COVID-19 Clinical Specimens. **Current Protocols in Cytometry**, v. 93, n. 1, p. e77, 2020.

BAKER, Wilson; OLLIS, W. D. Structure of the ‘Sydnones’. **Nature**, v. 158, n. 4020, p. 703–703, 1946.

BAKER, Wilson; OLLIS, W. D. Meso-ionic compounds. **Quarterly Reviews, Chemical Society**, v. 11, n. 1, p. 15–29, 1957.

BAKER, Wilson; OLLIS, W. D.; POOLE, V. D. 73. Cyclic meso-ionic compounds. Part I. The structure of the sydnones and related compounds. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 307–314, 1949.

BAKER, Wilson; OLLIS, W. D.; POOLE, V. D. 320. Cyclic meso-ionic compounds. Part III. Further properties of the sydnones and the mechanism of their formation. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, n. 0, p. 1542–1551, 1950.

BARBER, M. *et al.* Electronic structure of sydnones. An investigation by means of ESCA and molecular orbital calculations. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 11, p. 1517–1521, 1972.

BÄRNIGHAUSEN, H. *et al.* The structure of N-(p-bromophenyl)sydnone. **Acta Crystallographica**, v. 16, n. 6, p. 471–475, 1963.

BELLANI, Giacomo *et al.* Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. **Jama**, v. 315, n. 8, p. 788–800, 2016.

BELLINGAN, Geoff *et al.* Comparison of the efficacy and safety of FP-1201-lyo (intravenously administered recombinant human interferon beta-1a) and placebo in the treatment of patients with moderate or severe acute respiratory distress syndrome: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 18, n. 1, p. 536, 2017.

BENEDETTO TIZ, Davide *et al.* FDA-approved small molecules in 2022: Clinical uses and their synthesis. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 2538, 2022.

BHARGAVA, Anjali; SHRIVASTAVA, Pragma; TILWARI, Anita. HPTLC analysis of *Fumaria parviflora* (Lam.) methanolic extract of whole plant. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 1, 2021.

BIRD, C. W. A new aromaticity index and its application to five-membered ring heterocycles. **Tetrahedron**, v. 41, n. 7, p. 1409–1414, 1985.

- BISTROVIĆ, Andrea *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel benzimidazole amidines as potent multi-target inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1616–1634, 2018.
- BIZETTO, Eduardo Luis *et al.* Effect of sydnone SYD-1 on certain functions of LPS-stimulated macrophages. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 360, n. 1, p. 15–21, 2012.
- BOS, Lieuwe DJ; WARE, Lorraine B. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. **The Lancet**, v. 400, n. 10358, p. 1145–1156, 2022.
- CHAVES, Otávio A. *et al.* Commercially Available Flavonols Are Better SARS-CoV-2 Inhibitors than Isoflavone and Flavones. **Viruses**, v. 14, n. 7, 2022a.
- CHAVES, Otávio A. *et al.* Atazanavir Is a Competitive Inhibitor of SARS-CoV-2 Mpro, Impairing Variants Replication In Vitro and In Vivo. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 1, 2022b.
- CHAVES, Otavio Augusto *et al.* Investigation of interaction between human plasmatic albumin and potential fluorinated anti-trypanosomal drugs. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 199, p. 103–112, 2017.
- CHAVES, Otávio Augusto *et al.* Apixaban, an orally available anticoagulant, inhibits SARS-CoV-2 replication and its major protease in a non-competitive way. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 6, p. mjac039, 2022c.
- CHAVES, Otávio Augusto *et al.* Spectroscopic and in silico evaluation on the interactive behavior between substituted β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones and human serum albumin. **Chemical Physics Impact**, v. 8, p. 100465, 2024a.
- CHAVES, Otávio Augusto *et al.* Synthetic dimethoxyxanthenes bind similarly to human serum albumin compared with highly oxygenated xanthenes. **Chemical Physics Impact**, v. 8, p. 100411, 2024b.
- CHAVES, Otavio Augusto; MENEZES, Lucas B.; IGLESIAS, Bernardo A. Multiple spectroscopic and theoretical investigation of meso-tetra-(4-pyridyl) porphyrin-ruthenium (II) complexes in HSA-binding studies. Effect of Zn (II) in protein binding. **Journal of Molecular Liquids**, v. 294, p. 111581, 2019.
- CHEN, Hong; BAI, Chunxue; WANG, Xiangdong. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 4, n. 6, p. 773–783, 2010.
- CHEN, Jing-rui *et al.* Serine protease inhibitor MDSP16 ameliorates LPS-induced acute lung injury through its anti-inflammatory activity. **International Immunopharmacology**, v. 88, p. 107015, 2020.
- CHEN, Pan *et al.* Design, synthesis, and bioactivity evaluation of novel amide/sulfonamide derivatives as potential anti-inflammatory agents against acute lung injury and ulcerative colitis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 259, p. 115706, 2023.

CLAYDEN, Jonathan; GREEVES, Nick; WARREN, Stuart. **Organic Chemistry**. [S.l.]: OUP Oxford, 2012.

COSTA-TUNA, Andreia *et al.* Profiling the interaction between human serum albumin and clinically relevant HIV reverse transcriptase inhibitors. **Viruses**, v. 16, n. 4, p. 491, 2024.

CUCINOTTA, Domenico; VANELLI, Maurizio. WHO declares COVID-19 a pandemic. **Acta bio medica: Atenei parmensis**, v. 91, n. 1, p. 157, 2020.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

DAVEY, A.; MCAULEY, D. F.; O'KANE, C. M. Matrix metalloproteinases in acute lung injury: mediators of injury and drivers of repair. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 4, p. 959–970, 2011.

DECUYPERE, Elodie *et al.* Sydnone–alkyne cycloaddition: applications in synthesis and bioconjugation. **Chemical Communications**, v. 53, n. 84, p. 11515–11527, 2017.

DEMİN, Konstantin A. *et al.* Acute behavioral and Neurochemical Effects of Novel N-Benzyl-2-Phenylethylamine Derivatives in Adult Zebrafish. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 13, n. 13, p. 1902–1922, 2022.

DENG, Jane C.; STANDIFORD, Theodore J. Growth factors and cytokines in acute lung injury. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 1, p. 81–104, 2011.

EADE, Ronald A.; EARL, J. Campbell. 118. The sydnones. A new class of compound containing two adjacent nitrogen atoms. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 591–593, 1946.

EADE, Ronald A.; EARL, J. Campbell. 464. Further studies on the sydnones. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 2307–2310, 1948.

EARL, J. C. Structure of the sydnones. **Nature**, v. 158, n. 4025, p. 910–910, 1946.

EARL, J. C.; LEAKE, Eleanor MW; LE FÈVRE, R. J. W. 460. The dipole moments of N- and C-substituted sydnones. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 2269–2275, 1948.

EARL, J. Campbell; MACKNEY, Alan W. 204. The action of acetic anhydride on N-nitrosophenylglycine and some of its derivatives. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 899–900, 1935.

ELBOUZIDI, Amine *et al.* Exploring the Multi-Faceted Potential of Carob (*Ceratonia siliqua* var. *Rahma*) Leaves from Morocco: A Comprehensive Analysis of Polyphenols Profile, Antimicrobial Activity, Cytotoxicity against Breast Cancer Cell Lines, and Genotoxicity. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 6, 2023.

FAN, Jianwei *et al.* Using Human Serum Albumin Binding Affinities as a Proactive Strategy to Affect the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Preclinical Drug Candidates. **ACS Pharmacology & Translational Science**, v. 5, n. 9, p. 803–810, 9 set. 2022.

FAN, Jumn Min; WANG, Yu; UENG, Chuen Her. Electrostatic properties of sydnone derivatives. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 31, p. 8193–8199, 1993.

FEOKTISTOVA, Maria; GESERICK, Peter; LEVERKUS, Martin. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, p. pdb.prot087379, 2016.

FILIMONOV, D. A. *et al.* Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 50, n. 3, p. 444–457, 2014.

FRANCO, Lucas S.; MAIA, Rodolfo C.; BARREIRO, Eliezer J. Identification of LASSBio-1945 as an inhibitor of SARS-CoV-2 main protease (M PRO) through in silico screening supported by molecular docking and a fragment-based pharmacophore model. **RSC medicinal chemistry**, v. 12, n. 1, p. 110–119, 2021.

FUGGER, Joseph; TIEN, Jack M.; HUNSBERGER, I. Moyer. The Preparation of Substituted Hydrazines. I. Alkylhydrazines via Alkylsydnones¹. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 7, p. 1843–1848, 1955.

GALUPPO, Larissa Favaretto *et al.* Sydnone 1: A Mesoionic Compound with Antitumoral and Haematological Effects In Vivo. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 119, n. 1, p. 41–50, 2016.

GANDHI, Shiv *et al.* De novo emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient: a case report. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 1547, 2022.

GHOSH, Arun K. *et al.* SARS-CoV-2 papain-like protease (PLpro) inhibitory and antiviral activity of small molecule derivatives for drug leads. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 96, p. 129489, 2023.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Evangelos J. *et al.* The pathophysiology of sepsis and precision-medicine-based immunotherapy. **Nature immunology**, v. 25, n. 1, p. 19–28, 2024.

GIBSON, Peter G.; QIN, Ling; PUAH, Ser Hon. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS. **The Medical Journal of Australia**, v. 213, n. 2, p. 54, 2020.

GOODMAN, Louis Sanford *et al.* **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9th ed ed. [S.l.]: McGraw-Hill, Health Professions Division, 1996.

GORMAN, Ellen A.; O'KANE, Cecilia M.; MCAULEY, Daniel F. Acute respiratory distress syndrome in adults: diagnosis, outcomes, long-term sequelae, and management. **The Lancet**, v. 400, n. 10358, p. 1157–1170, 2022.

GRAMS, Frank *et al.* Pyrimidine-2, 4, 6-Triones: a new effective and selective class of matrix metalloproteinase inhibitors. 2001.

GREGORIĆ, Tomislav *et al.* Novel pyrimidine-2,4-dione-1,2,3-triazole and furo[2,3-d]pyrimidine-2-one-1,2,3-triazole hybrids as potential anti-cancer agents: Synthesis, computational and X-ray analysis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 1247–1267, 2017.

GROSSIE, D.; HARRISON, L.; TURNBULL, K. Crystal structure of 4-(2-bromo-prop-ion-yl)-3-phenyl-sydnone. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, v. 70, n. 11, p. o1165–o1166, 2014.

GRUBER, Cesare Ernesto Maria *et al.* Molnupiravir increases SARS-CoV-2 genome diversity and complexity: A case-control cohort study. **Journal of medical virology**, v. 96, n. 5, p. e29642, 2024.

HANSEN, Poul E. *et al.* NH Stretching Frequencies of Intramolecularly Hydrogen-Bonded Systems: An Experimental and Theoretical Study. **Molecules**, v. 26, n. 24, 2021.

HE, Wei *et al.* Novel 5-Hydroxy, 5-Substituted Benzenesulfonamide Pyrimidine-2, 4, 6-Triones Attenuate Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury via Inhibition of the Gelatinases, MMP-2 and MMP-9. **Drug Development Research**, v. 77, n. 5, p. 251–257, 2016.

HEARN, Milton T. W.; POTTS, Kevin T. Pulsed Fourier-transformed ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of methylsydnone and related compounds. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 8, p. 875–877, 1974.

HERRIDGE, Margaret S. Functional Disability 5 Years after ARDS. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 3, p. 275–276, 2011.

HORYNA, Jaroslav; LYČKA, Antonín; ŠNOBL, Dobroslav. ¹³ C-NMR spectra of benzenesulphonyl derivatives. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 45, n. 5, p. 1575–1580, 1980.

HOU, Xiaodan *et al.* **Inhibitory effects of GT0918 on acute lung injury and the molecular mechanisms of anti-inflammatory response.** bioRxiv, , 2022. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.06.29.498191v1>>. Acesso em: 4 set. 2025

HWANG, Tsong-Long *et al.* Synthesis and pharmacological characterization of 2-aminobenzaldehyde oxime analogs as dual inhibitors of neutrophil elastase and proteinase 3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1123–1134, 2015.

IBARRA-HERNÁNDEZ, Javier Alejandro *et al.* Novel Compounds Based on Chalcone- and Pyrazoline-DIM Hybrids as Inhibitors of Staphylococcus aureus, Synthesis, DFT Studies, Biological Evaluation and Docking Studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1249, p. 131499, 2022.

IL'YA, A. Cherepanov; MOISEEV, Sergey K. Recent developments in the chemistry of sydnones and sydnone imines. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 131, p. 49–164, 2020.

JONES, Gareth *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997.

KAMDAR, Biren B. *et al.* Joblessness and lost earnings after acute respiratory distress syndrome in a 1-year national multicenter study. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 196, n. 8, p. 1012–1020, 2017.

KAMDAR, Biren B. *et al.* Return to work and lost earnings after acute respiratory distress syndrome: a 5-year prospective, longitudinal study of long-term survivors. **Thorax**, v. 73, n. 2, p. 125–133, 2018.

KENNER, J.; MACKAY, Kathleen. Structure of the sydnone. **Nature**, v. 158, n. 4025, p. 909–910, 1946.

KHALID, Zunera *et al.* Experimental and Computational Analysis of Newly Synthesized Benzotriazinone Sulfonamides as Alpha-Glucosidase Inhibitors. **Molecules**, v. 27, n. 20, 2022.

KHAN, Takallum *et al.* A review on synthesis, characterization, and pharmacological properties of some sydnone derivatives. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 359–380, 2025.

KIER, Lemont B.; ROCHE, Edward B. Medicinal Chemistry of the Mesoionic Compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, n. 2, p. 149–168, 1967.

KRAUSE, Lennard *et al.* Comparison of silver and molybdenum microfocus X-ray sources for single-crystal structure determination. **Applied Crystallography**, v. 48, n. 1, p. 3–10, 2015.

KUMARI, Poonam *et al.* Off-label use of itolizumab in patients with COVID-19 ARDS: our clinical experience in a dedicated COVID center. **Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine**, v. 25, n. 4, p. 467, 2021.

LAGUNIN, Alexey *et al.* QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 2–3, p. 241–250, 2011.

LAMERS, Mart M.; HAAGMANS, Bart L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature reviews microbiology**, v. 20, n. 5, p. 270–284, 2022.

LEPORI, Irene *et al.* Bioorthogonal “Click” Cycloadditions: A Toolkit for Modulating Polymers and Nanostructures in Living Systems. **reactions**, v. 5, n. 1, p. 231–245, 2024.

LEWIS, Sharon R. *et al.* Pharmacological agents for adults with acute respiratory distress syndrome. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2019.

LIN, Jinfeng *et al.* Machine learning-based model for predicting the occurrence and mortality of nonpulmonary sepsis-associated ARDS. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 28240, 2024.

LIN, Jiunn H.; YAMAZAKI, Masayo. Clinical Relevance of P-Glycoprotein in Drug Therapy. **Drug Metabolism Reviews**, v. 35, n. 4, p. 417–454, 2003.

LIU, Wei; CHEN, Jianli; SU, Weike. Recent advances in the synthesis of sulfonamides intermediates. **Pharmaceutical Fronts**, 2024.

MACRAE, C. F. *et al.* Mercury: visualization and analysis of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 39, n. 3, p. 453–457, 2006.

MATIN, Mohammed Mahbubul *et al.* In vitro antimicrobial, physicochemical, pharmacokinetics and molecular docking studies of benzoyl uridine esters against SARS-CoV-2 main protease. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 8, p. 3668–3680, 2022.

MATTHAY, Michael A. *et al.* Acute respiratory distress syndrome. **Nature reviews Disease primers**, v. 5, n. 1, p. 18, 2019.

MEDURI, G. Umberto *et al.* Methylprednisolone infusion in early severe ARDS: results of a randomized controlled trial. **Chest**, v. 131, n. 4, p. 954–963, 2007.

MEDVEDEVA, Svetlana M.; SHIKHALIEV, Khidmet S. Synthesis of 4,5-Dihydro-1H-[1,2]dithiolo[3,4-c]quinoline-1-thione Derivatives and Their Application as Protein Kinase Inhibitors. **Molecules**, v. 27, n. 13, 2022.

MEHTA, Nikita *et al.* Pharmacotherapy in COVID-19; A narrative review for emergency providers. **The American journal of emergency medicine**, v. 38, n. 7, p. 1488–1493, 2020.

MICSONAI, András *et al.* BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W315–W322, 2018.

MISSET, Benoît *et al.* Convalescent plasma for Covid-19–induced ARDS in mechanically ventilated patients. **New England Journal of Medicine**, v. 389, n. 17, p. 1590–1600, 2023.

MONDAL, Shovan; MALAKAR, Suniti. Synthesis of sulfonamide and their synthetic and therapeutic applications: Recent advances. **Tetrahedron**, v. 76, n. 48, p. 131662, 2020.

MORISHITA, Hiroki *et al.* Gastrointestinal absorption of pimozide is enhanced by inhibition of P-glycoprotein. **PLOS ONE**, v. 15, n. 10, p. e0232438, 2020.

MORLEY, John O. Theoretical studies on the structure and electronic properties of 3-(4-tolyl)sydnone. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 2, p. 253–257, 1995.

MPHAHLELE, Malose J.; ONWU, Eugene E.; MALULEKA, Marole M. Spectroscopic, X-ray Diffraction and Density Functional Theory Study of Intra- and Intermolecular Hydrogen Bonds in Ortho-(4-tolylsulfonamido)benzamides. **Molecules**, v. 26, n. 4, 2021.

MUHAMMED AZIZ, Dara *et al.* A synergistic investigation of azo-thiazole derivatives incorporating thiazole moieties: a comprehensive exploration of their synthesis, characterization, computational insights, solvatochromism, and multimodal biological activity assessment. **RSC Advances**, v. 13, n. 49, p. 34534–34555, 2023.

NAVEENRAJ, Selvaraj; ANANDAN, Sambandam. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 14, p. 53–71, 2013.

NEVES, Ana Paula Perbiche *et al.* Oxidative imbalance linked to impaired mitochondrial bioenergetics mediates the toxicity of mesoionic compounds MI-D and MI-J in hepatocarcinoma cells (HepG2). **Free Radical Research**, v. 59, n. 4, p. 308–320, 2025.

NITHINCHANDRA *et al.* Regioselective reaction: Synthesis, characterization and pharmacological activity of some new Mannich and Schiff bases containing sydnone. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 597–604, 2012.

OGILVIE, James W.; CORWIN, Alsoph H. The Structure of Dehydrodithizone: A Novel Synthesis of Tetrazolium Salts¹. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, n. 24, p. 5023–5027, 1961.

ODD, Lavi; GARZA, John. The contribution of COVID-19 to acute respiratory distress syndrome-related mortality in the United States. **Journal of clinical medicine research**, v. 15, n. 5, p. 279, 2023.

OVUNG, Aben; BHATTACHARYYA, Jhimli. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. **Biophysical reviews**, v. 13, n. 2, p. 259–272, 2021.

OZIMINSKI, Wojciech P.; RAMSDEN, Christopher A. A DFT and ab initio study of conjugated and semi-conjugated mesoionic rings and their covalent isomers. **Special Memorial Issue for Professor Alan Katritzky**, v. 71, n. 39, p. 7191–7198, 2015.

PELLY, Stephen; LIOTTA, Dennis. **Potent SARS-CoV-2 direct-acting antivirals provide an important complement to COVID-19 vaccines**. [*S.l.*]: ACS Publications, 2021.

PERCIE DU SERT, Nathalie *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research*. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 40, n. 9, p. 1769–1777, 2020.

PINA, J. *et al.* Alternating Binaphthyl–Thiophene Copolymers: Synthesis, Spectroscopy, and Photophysics and Their Relevance to the Question of Energy Migration versus Conformational Relaxation. **Macromolecules**, v. 42, n. 5, p. 1710–1719, 2009.

POJTANADITHEE, Piyatida *et al.* Identification of promising sulfonamide chalcones as inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro through structure-based virtual screening and experimental approaches. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 16, p. 5244–5258, 2023.

POPOFF, I. C.; SINGHAL, G. H. Antimalarial agents. I. Reduction of sydnone derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 631–633, 1968.

POROIKOV, V. V. *et al.* Computer-aided prediction of biological activity spectra for organic compounds: the possibilities and limitations. **Russian Chemical Bulletin**, v. 68, n. 12, p. 2143–2154, 1 dez. 2019.

PRÄBST, Konstantin *et al.* Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: GILBERT, Daniel F.; FRIEDRICH, Oliver (Orgs.). **Cell Viability Assays: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2017. p. 1–17.

PRIKIS, Marios; CAMERON, Alexandra. Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir) and tacrolimus drug-drug interaction in a kidney transplant patient with SARS-2-CoV infection: a case report. In: Transplantation Proceedings, 2022.

RAMIREZ, Giuseppe A. *et al.* Clinical and Pathophysiological Tangles Between Allergy and Autoimmunity: Deconstructing an Old Dichotomic Paradigm. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 68, n. 1, p. 13, 2025.

RANIERI, V. Marco *et al.* Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. **JAMA: Journal of the American Medical Association**, v. 307, n. 23, 2012.

RANIERI, V. Marco *et al.* Effect of intravenous interferon β -1a on death and days free from mechanical ventilation among patients with moderate to severe acute respiratory distress syndrome: a randomized clinical trial. **Jama**, v. 323, n. 8, p. 725–733, 2020.

RATIA, Kiira *et al.* A noncovalent class of papain-like protease/deubiquitinase inhibitors blocks SARS virus replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 42, p. 16119–16124, 2008.

RIDDLE, G. B.; GROSSIE, D. A.; TURNBULL, K. The sydnone compound 4-hydroxy-4-benzyl-sydno-[3,4-a]-indole. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, v. 60, n. 9, p. o1568–o1570, 2004.

ROSS, Philip D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981.

SANPHUI, Palash; SARMA, Bipul; NANGIA, Ashwini. Polymorphism in Secondary Benzene Sulfonamides. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 10, p. 4550–4564, 2010.

SAROJINI, K. *et al.* Synthesis, structural, spectroscopic studies, NBO analysis, NLO and HOMO–LUMO of 4-methyl-N-(3-nitrophenyl)benzene sulfonamide with experimental and theoretical approaches. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 108, p. 159–170, 2013.

SCHÖNBERG, Alexander. 158. The constitution and isomerism of certain triazole derivatives of the nitron type in the light of the Bredt rule and the theory of resonance. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 824–825, 1938.

SHAO, Yihan *et al.* Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 27, p. 3172–3191, 2006.

SHELDRICK, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 3–8, 2015.

SILVERSTEIN, Robert M. *et al.* **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 8^a ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2014.

SIMAS, Alfredo Mayall; MILLER, Joseph; DE ATHAYADE FILHO, Petrônio Filgueiras. Are mesoionic compounds aromatic? **Canadian Journal of Chemistry**, v. 76, n. 6, p. 869–872, 1998.

SNEADER, Walter. **Drug discovery: a history**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2005.

SOARES, Franciela A. *et al.* Tianeptine Esters Derivatives: A Study of Protein-Drug Interaction Performed by Fluorescence Quenching and Molecular Docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 2125–2135, 2019.

SOARES, Marilia Amável Gomes *et al.* Insights into the effect of glucose on the binding between human serum albumin and the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 265, p. 131148, 2024.

SOLOMONS, TWG; FRYHLE, CB. **Química Orgânica**. [S.l.: S.n.]. v. 2

STENFORS, B. A. *et al.* Crystal structure of 4-methyl-N-propyl-benzene-sulfonamide. **Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications**, v. 76, n. 7, p. 1070–1074, 2020.

STEWART, F. H. C. The Chemistry of the Sydnones. **Chemical Reviews**, v. 64, n. 2, p. 129–147, 1964.

STRIKER, George *et al.* Photochromicity and Fluorescence Lifetimes of Green Fluorescent Protein. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 40, p. 8612–8617, 1999.

SUCMAN, Natalia *et al.* New 1H-1,2,4-Triazolyl Derivatives as Antimicrobial Agents. **Chemistry & Biodiversity**, v. 21, n. 5, p. e202400316, 2024.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. **Molecular Pharmacology**, v. 11, n. 6, p. 824–832, 1975.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular Pharmacology**, v. 12, n. 6, p. 1052–1061, 1976.

SUN, Baizhong *et al.* Mechanistic investigation of CO generation by pyrolysis of furan and its main derivatives. **RSC Advances**, v. 9, n. 16, p. 9099–9105, 2019.

TANG, Qiufeng *et al.* Association between Glucocorticoids and Mortality in Patients with Severe Pneumonia: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on Randomized Controlled Trials. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2022, n. 1, p. 1191205, 2022.

THAKOR, Priteshkumar M. *et al.* Synthesis, Spectral Characterization, Thermal Investigation, Computational Studies, Molecular Docking, and In Vitro Biological Activities of a New Schiff Base Derived from 2-Chloro Benzaldehyde and 3,3'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine. **ACS Omega**, v. 8, n. 36, p. 33069–33082, 12 set. 2023.

THIESSEN, William E.; HOPE, Hakon. Molecular geometry and bonding in the sydnone ring. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 23, p. 5977–5978, 1 nov. 1967.

TIN-LOK, Chan; MILLER, J.; STANSFIELD, F. 238. The SN mechanism in aromatic compounds. Part XXX. The sydnone ring. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, n. 0, p. 1213–1216, 1964.

TORNER, Núria. The end of COVID-19 public health emergency of international concern (PHEIC): And now what? **Vacunas (English Edition)**, 2023.

TSAI, Yung-Fong *et al.* Carnosic acid inhibits reactive oxygen species-dependent neutrophil extracellular trap formation and ameliorates acute respiratory distress syndrome. **Life Sciences**, v. 321, p. 121334, 15 maio 2023.

TU, Zhaoxu *et al.* Design of therapeutic biomaterials to control inflammation. **Nature Reviews Materials**, v. 7, n. 7, p. 557–574, 2022.

VILLAR, Jesús *et al.* Dexamethasone treatment for the acute respiratory distress syndrome: a multicentre, randomised controlled trial. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 3, p. 267–276, 2020.

V'KOVSKI, Philip *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, 2021.

VLAAR, Alexander PJ; JUFFERMANS, Nicole P. Transfusion-related acute lung injury: a clinical review. **The Lancet**, v. 382, n. 9896, p. 984–994, 2013.

WANG, Yeming *et al.* Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. **The lancet**, v. 395, n. 10236, p. 1569–1578, 2020.

WATSON, Oliver J. *et al.* Global impact of the first year of COVID-19 vaccination: a mathematical modelling study. **The Lancet infectious diseases**, v. 22, n. 9, p. 1293–1302, 2022.

WENSKOWSKY, Lea *et al.* Resolving Binding Events on the Multifunctional Human Serum Albumin. **ChemMedChem**, v. 15, n. 9, p. 738–743, 6 maio 2020.

WHO. **COVID-19 cases | WHO COVID-19 dashboard**. Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>>. Acesso em: 4 set. 2025.

WICK, Katherine D.; WARE, Lorraine B.; MATTHAY, Michael A. Acute respiratory distress syndrome. **Bmj**, v. 387, 2024.

YAMAMOTO, Chie *et al.* Nirmatrelvir resistance in an immunocompromised patient with persistent coronavirus disease 2019. **Viruses**, v. 16, n. 5, p. 718, 2024.

YAMANA, Teresa K. *et al.* The impact of COVID-19 vaccination in the US: averted burden of SARS-COV-2-related cases, hospitalizations and deaths. **PLoS One**, v. 18, n. 4, p. e0275699, 2023.

YANG, Chengbin *et al.* Bioisosteric replacements of the indole moiety for the development of a potent and selective PI3K δ inhibitor: Design, synthesis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 223, p. 113661, 5 nov. 2021.

YANG, Lei; POWELL, Douglas R.; HOUSER, Robert P. Structural variation in copper(i) complexes with pyridylmethylamide ligands: structural analysis with a new four-coordinate geometry index, τ_4 . **Dalton Transactions**, n. 9, p. 955–964, 2007.

YUAN, Shuguang; CHAN, H. C. Stephen; HU, Zhenquan. Using PyMOL as a platform for computational drug design. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 7, n. 2, p. e1298, 1 mar. 2017.

ZHANG, Linmeng *et al.* Discovery of Fluorogenic Diarylsydnone-Alkene Photoligation: Conversion of ortho-Dual-Twisted Diarylsydnones into Planar Pyrazolines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 24, p. 7390–7394, 20 jun. 2018.

ZHAO, Yuanrui *et al.* Glucocorticoid therapy for acute respiratory distress syndrome: Current concepts. **Journal of Intensive Medicine**, v. 4, n. 04, p. 417–432, 2024.

ZHOU, Peng *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020.

ZHU, Na *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England journal of medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 2020.

ZSILA, Ferenc. Subdomain IB Is the Third Major Drug Binding Region of Human Serum Albumin: Toward the Three-Sites Model. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 5, p. 1668–1682, 6 maio 2013.

Capítulo II: Obtenção e atividade anticâncer de compostos mesoiônicos e derivados de chalconas

Resumo

Neste capítulo, diferentes classes de compostos foram avaliadas contra células tumorais. Inicialmente, uma introdução aborda em detalhe os tipos de câncer que são de interesse para o presente trabalho: hepatocarcinoma, leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e glioblastoma. Então, a relevância biológica das classes abordadas neste estudo é discutida e o planejamento racional das substâncias é explicado em detalhe. No total, 25 tiossemicarbazonas derivadas de chalconas ou azachalconas foram preparadas, oito das quais foram avaliadas contra células de hepatocarcinoma humano Huh-7. Os derivados de azachalconas apresentaram potência mil vezes superior ($IC_{50} = 0,0175\text{-}0,0418\ \mu\text{M}$) aos análogos derivados de chalcona ($29,86\text{-}41,76\ \mu\text{M}$). Um breve estudo mecanístico indicou que a citotoxicidade das azachalconas-tiossemicarbazonas e di-hidroazachalconas-tiossemicarbazonas depende da complexação dessas substâncias com íons cobre presentes no meio celular. Além disso, este estudo mostra, pela primeira vez, que a citotoxicidade dos derivados de chalconas não sofre influência direta significativa da dupla ligação olefínica, uma vez que seus análogos saturados (di-hidroazachalconas-tiossemicarbazonas) apresentaram potência similar. Na sequência, um novo complexo de zinco (**CTCI-Zn**), preparado com uma chalcona-tiossemicarbazona (**CTCI**) como ligante, foi preparado e avaliado contra uma linhagem de ATLL (MT2). A complexação com este metal de transição aumentou a citotoxicidade do ligante em 36% (IC_{50} : $47,06\ \mu\text{M}$ para **CTCI** e $30,01\ \mu\text{M}$ para **CTCI-Zn**). Ligante e complexo induziram a morte celular por apoptose por um mecanismo que não parece envolver a produção de espécies reativas de oxigênio nos primeiros momentos após o tratamento das células. Em seguida, 10 ftalazinonas, derivadas do ácido 2-acetilbenzóico e tiossemicarbazida foram preparadas e avaliadas contra células Huh-7. Uma delas (**A3**) destacou-se como a mais promissora, apresentando IC_{50} de $14,79\ \mu\text{M}$. Verificou-se que o novo híbrido ftalazinona-feniltiazol afeta a função mitocondrial das células Huh-7 tratadas. Uma redução drástica no consumo de oxigênio associado à síntese de ATP foi observada. Uma vez que a respiração basal e a respiração máxima induzida por FCCP não sofreram mudança estatisticamente significativa, **A3** parece interferir na síntese de ATP sem interromper a cadeia transportadora de elétrons – um possível sinal de permeabilização da membrana mitocondrial interna e apoptose. Resultados de *docking* molecular e cálculos semi-empíricos sugerem a interação com a proteína pró-apoptótica BAX como um possível mecanismo de ação para **A3**. Estudos fotofísicos indicam que a albumina sérica humana é capaz de interagir com **A3**, o que deve possibilitar seu transporte pela corrente sanguínea. Por fim, o conhecido cloridrato mesoiônico **MI-D** foi preparado e avaliado pela primeira vez em células

de glioblastoma, tendo apresentado atividade promissora contra essa forma de câncer tão agressiva.

Abstract

In this chapter, different classes of compounds were evaluated against cancer cell lines. Initially, an introduction provides a detailed overview of the types of cancer of interest to the present work: hepatocarcinoma, adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), and glioblastoma. The biological relevance of the classes investigated is then discussed, and the rational design of the compounds is explained in detail. In total, 25 thiosemicarbazones derived from chalcones or azachalcones were synthesized, eight of which were tested against human hepatocarcinoma Huh-7 cells. The azachalcone derivatives displayed potency up to one thousand times higher ($IC_{50} = 0,0175\text{--}0,0418\text{ }\mu\text{M}$) than the corresponding chalcone derivatives ($IC_{50} = 29,86\text{--}41,76\text{ }\mu\text{M}$). A brief mechanistic investigation indicated that the cytotoxicity of the azachalcone-thiosemicarbazones and dihydroazachalcone-thiosemicarbazones depends on the complexation of these compounds with copper ions in the cellular medium. Furthermore, this study shows, for the first time, that the cytotoxicity of the chalcone derivatives is not significantly influenced by the olefinic double bond, since their saturated analogues (dihydroazachalcone-thiosemicarbazones) exhibited similar potency. Subsequently, a novel zinc complex (**CTCI-Zn**), prepared from a chalcone-thiosemicarbazone (**CTCI**) as ligand, was synthesized and evaluated against an ATLL cell line (MT2). Coordination with this transition metal increased the cytotoxicity of the ligand by 36% (IC_{50} : $47,06\text{ }\mu\text{M}$ for **CTCI** and $30,01\text{ }\mu\text{M}$ for **CTCI-Zn**). Both ligand and complex induced apoptosis through a mechanism that does not appear to involve the production of reactive oxygen species in the early stages of cell treatment. Next, 10 phthalazinones derived from 2-acetylbenzoic acid and thiosemicarbazide were synthesized and tested against Huh-7 cells. One compound (**A3**) emerged as the most promising, with an IC_{50} of $14,79\text{ }\mu\text{M}$. Cells treated with this novel phthalazinone-phenylthiazole hybrid exhibited impaired mitochondrial function. A drastic reduction in oxygen consumption associated with ATP synthesis was observed. Since both Basal and maximum FCCP-induced respiration showed no statistically significant changes, **A3** seems to interfere with ATP synthesis without disrupting the electron transport chain – possibly indicating inner mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. Molecular docking and semi-empirical calculations suggested interaction with the pro-apoptotic protein BAX as a potential mechanism of action for **A3**. Photophysical studies indicated that human serum albumin is capable of interacting with **A3**, which could facilitate its transport through the bloodstream. Finally, the well-known mesoionic hydrochloride MI-D was synthesized and, for the first time, evaluated in glioblastoma cells, where it exhibited promising activity against this highly aggressive cancer type.

2.1. Introdução

Dados de 2021 tratados e divulgados pelo *Our World in Data*, projeto do Laboratório de Dados sobre Mudanças Globais (*Global Change Data Lab*, GCDL), apontam que o câncer trata-se da segunda maior causa de mortes no mundo, ficando atrás somente das doenças cardiovasculares (Our Word in Data, 2021). Essa posição tem sido mantida ano após ano (Our Word in Data, 2021), deixando evidente a necessidade de se investigar novas formas de prevenção e tratamento. De acordo com os dados mais recentes reportados pelo Observatório Global do Câncer (*Global Cancer Observatory*, GCO), em 2022 houve cerca de 20 milhões de novos casos e 9,7 milhões de mortes por essa doença, havendo a previsão de que esses números aumentem com o crescimento populacional esperado para os próximos anos (Bray et al., 2024).

Estima-se que aproximadamente um em cada cinco homens ou mulheres desenvolverá câncer ao longo da vida, sendo que um em cada nove homens e uma em cada doze mulheres devem morrer em decorrência dessas neoplasias. Em 2022, os cânceres mais frequentemente diagnosticados foram os de: pulmão (12,4%), mama (11,6%), colorretal (9,6%), próstata (7,3%) e estômago (4,9%). Os cânceres de pulmão, cólon e fígado ocupam a primeira, segunda e terceira posições entre os que mais matam - sendo responsáveis por 18,7%, 9,3% e 7,8% do total de mortes, respectivamente (Bray et al., 2024).

Dados mostram que o risco de se desenvolver câncer aumenta com o nível do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). Para homens, por exemplo, o risco de desenvolver câncer antes dos 75 anos de idade varia de 10,52% em regiões de baixo IDH a 31,49% em regiões de IDH muito alto (Bray et al., 2024). Apesar da mortalidade variar menos, o padrão permanece o mesmo, havendo um risco de 7,7% de morte por câncer para homens em locais de IDH baixo e 12,21% em regiões de IDH muito alto (Bray et al., 2024). Para as mulheres, o risco acumulado de incidência é de 12,55% e 25,25% em regiões de índices de IDH baixo e muito alto, respectivamente. Curiosamente, o risco acumulado de morte em mulheres antes de atingirem 75 anos sofre pouquíssima variação: 8,82% (IDH baixo) vs 8,21% (IDH muito alto) (Bray et al., 2024).

Essa variação em função do índice de IDH está associada a uma combinação de fatores relacionados ao envelhecimento populacional, estilo de vida e acesso ao diagnóstico (Cao et al., 2024). O câncer é uma doença fortemente relacionada à idade, havendo maiores taxas de incidência e mortalidade em populações mais idosas. Isso se deve, em parte, a mutações genéticas acumuladas ao longo da vida, a um maior tempo de exposição a agentes

carcinogênicos – como luz solar, fumo e produtos químicos nocivos –, e à redução da função imunológica do organismo, que compromete o combate às células cancerosas (Laconi; Marongiu; DeGregori, 2020; White et al., 2014). Além disso, o desenvolvimento econômico e urbano promovem mudanças comportamentais relacionadas ao aumento do risco de câncer, como: tabagismo, dieta rica em ultraprocessados e gorduras, consumo excessivo de álcool, sedentarismo e obesidade – todos fatores de risco amplamente reconhecidos (WHO, 2007; White et al., 2014). Esses e outros fatores contribuem para maiores riscos de câncer em regiões mais desenvolvidas. No entanto, espera-se que, ao longo dos anos, o aumento no número de casos e mortes por câncer ocorra de maneira desproporcional, afetando em maior extensão populações de países em desenvolvimento, à medida em que crescem, envelhecem e adotam hábitos de vida menos saudáveis (Cao et al., 2024). Nesses países em transição, espera-se redução das formas de câncer relacionadas a infecções e aumento daquelas mais fortemente associadas a maus hábitos e velhice, como cânceres de pulmão, colorretal, mama e próstata. Essa tendência alerta para um cenário extremamente preocupante, já que essas populações possuem menos recursos direcionados a diagnóstico e tratamento de câncer – são países que precisam se preparar para lidar com o crescente número de casos e mortes, direcionando seus esforços para o diagnóstico precoce e prevenção através de programas de controle de tabaco e consumo de álcool, redução dos níveis de poluição e implementação de políticas públicas que reforcem de maneira efetiva hábitos de vida saudáveis (Cao et al., 2024).

O câncer causa um impacto econômico muito grande e evidente tanto para os indivíduos acometidos, quanto para os sistemas de saúde públicos e privados (Chen et al., 2023; OECD, 2024). O custo global com essa doença foi estimado em 25,2 trilhões de dólares para o período de 2020 a 2050 (Chen et al., 2023). Os pacientes frequentemente sofrem efeitos diretos pela redução da renda familiar, uma vez os regimes de tratamento, somados com o comprometimento de suas condições de saúde física e mental os forçam a abandonar seus empregos ou reduzir a jornada de trabalho, mesmo após a conclusão de seus tratamentos (Bentley et al., 2022; Donkor et al., 2022; Zajacova et al., 2015). Os sistemas de saúde, por sua vez, possuem custos elevados associados a diagnóstico, tratamento e acompanhamento pós-terapêutico – custos esses, que devem crescer com o passar dos anos, impulsionados pelo aumento de casos da doença e pelo encarecimento dos tratamentos. Um estudo demonstrou que os custos econômicos impostos pelo câncer no sistema público de saúde brasileiro aumentam todos os anos, tendo atingido 59,7 bilhões de dólares em 2015 (Siqueira et al., 2017). A análise detalhada desses tratamentos realizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) aponta para um

gasto médio por paciente de 9.572 dólares anuais, variando de \$5.782 para o câncer de mama a \$16.656 para o câncer cervical (Lana et al., 2020).

Em resumo, o câncer é uma doença que afeta a vida de milhares de pessoas todos os anos, levando a perda irreversível de incontáveis vidas e gerando custos exorbitantes para os indivíduos acometidos e para os sistemas de saúde. O investimento em prevenção e diagnóstico deve ser priorizado para reduzir o impacto desta doença em todo o mundo. Ainda, a busca por tratamentos mais eficazes é de extrema importância, já que em muitos casos, mesmo com as terapias mais avançadas disponíveis a mortalidade continua alta.

Nas próximas subseções, serão discutidos os tipos de câncer de interesse para o presente trabalho, sendo eles: hepatocarcinoma (câncer de fígado), leucemia/linfoma de células T do Adulto (forma de leucemia causada pelo vírus HTLV-1) e glioblastoma (câncer cerebral). Em seguida, três classes de substâncias serão apresentadas – as tiossemicarbazonas, as ftalazinonas e os cloridratos mesoiônicos. Nesta tese, os estudos envolvendo essas classes são independentes e são discutidos separadamente, seguindo a seguinte ordem de apresentação: literatura sobre a classe de interesse, justificativas e objetivos, resultados e discussão, materiais e métodos, e conclusões e perspectivas.

2.1.1. Hepatocarcinoma

O câncer de fígado está entre os tipos de câncer mais incidentes no mundo. Em 2022, ocupou a sexta posição em número de casos, contabilizando aproximadamente 865 mil novos casos ao redor do mundo. O prognóstico ruim para esse tipo de neoplasia é refletido em sua posição no ranking de mortes: foi o terceiro tipo de câncer que mais matou em 2022 – posição frequentemente mantida –, tendo sido responsável por cerca de 758 mil mortes no ano em questão (Bray et al., 2024). O câncer de fígado é a segunda principal causa de morte por câncer entre os homens. Além disso, as taxas de incidência e mortalidade são duas a três vezes maiores entre homens que entre mulheres (Bray et al., 2024).

Dentre os tipos histológicos de câncer de fígado, os dois mais prevalentes são o Carcinoma Hepatocelular ou Hepatocarcinoma (HCC), responsável por $\approx 75-85\%$ dos casos, e o colangiocarcinoma (CC), que representa $\approx 10-15\%$ dos diagnósticos (Bray et al., 2024). No Brasil, o número de mortes decorrentes de neoplasias do fígado tem aumentado em todos os grupos étnicos desde 1996 (Guimarães et al., 2024) e no período de 1996 a 2022, o hepatocarcinoma foi a causa de cerca de 10% dos transplantes hepáticos realizados no país

(Guimarães et al., 2024). O HCC surge dos hepatócitos – as células do fígado responsáveis pelas principais funções do órgão, como produção de bile, síntese proteica e metabolização de substâncias endógenas e exógenas. O colangiocarcinoma, por sua vez, se origina dos colangiócitos – as células epiteliais que revestem os dutos biliares, estruturas responsáveis por modificar a bile produzida pelos hepatócitos e transportá-la para a vesícula biliar e intestino delgado (Hundt; Wu; Young, 2017; Tabibian et al., 2013).

Estima-se que infecções pelos Vírus da Hepatite B (HBV) e Hepatite C (HCV) sejam responsáveis por cerca de 56% e 20% do total de casos de HCC no mundo, respectivamente (Rumgay et al., 2022). Na Ásia e África, o HBV é reportado como o principal causador de HCC em 60% dos casos, enquanto no ocidente, essa porcentagem é bem menor, aproximadamente 20% (Llovet et al., 2021). Embora a infecção pelo vírus da Hepatite B por si só – sem que haja diagnóstico concomitante de cirrose – aumente a probabilidade de desenvolver hepatocarcinoma, a cirrose é identificada em grande parte dos pacientes com HCC relacionadas ao HBV (Llovet et al., 2021). Na África e em parte da Ásia, a exposição à aflatoxina B1 age sinergicamente com a infecção pelo HBV, aumentando o risco de hepatocarcinoma (Liu; Wu, 2010; Llovet et al., 2021; Rumgay et al., 2022). As aflatoxinas são produzidas principalmente pelos fungos alimentícios *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que contaminam diversos alimentos, incluindo o milho e as oleaginosas. Esse tipo de contaminação é muito comum em partes do continente africano e asiático, em virtude de condições climáticas favoráveis ao crescimento desses fungos e também devido a práticas agrícolas e de armazenamento inadequadas. Ainda, muitas populações de baixa renda nessas regiões dependem desses alimentos e não podem descartá-los, mesmo que estejam contaminados, o que favorece a ingestão contínua desses carcinógenos (Liu; Wu, 2010).

O HBV é um vírus de DNA capaz de integrar o seu material genético no genoma do hospedeiro, promovendo mutação e oncogênese. A infecção pelo vírus da hepatite B pode ser prevenida por meio da vacinação. Contudo, até 2019, aproximadamente 1,5 milhões de infecções que poderiam ser prevenidas pela vacinação continuavam a acontecer todos os anos (Flores et al., 2022). Esses números reforçam a necessidade da promoção contínua de alta cobertura vacinal contra o vírus em todo o mundo, uma vez que esta é a principal estratégia de saúde pública para a prevenção do hepatocarcinoma (Flores et al., 2022). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estipulou a meta de que até 2030 a vacinação alcance 90% de cobertura global (Flores et al., 2022).

Diferente do vírus da hepatite B, o HCV é um vírus de RNA e não é capaz de se integrar ao DNA do hospedeiro para induzir mutações genéticas de forma direta (Llovet et al., 2021). A infecção crônica pelo HCV promove o hepatocarcinoma por meio do dano acumulado ao fígado e também pela ativação de vias pró-oncogênicas (Goto et al., 2020). Até o momento não há vacina disponível para a prevenção dessa infecção e os antivirais de ação direta (DAA) são a principal forma de tratamento para a hepatite C. Esses medicamentos atuam inibindo proteínas virais específicas e são altamente eficazes, promovendo uma resposta virológica sustentada (RVS) em 95% dos casos (Marshall et al., 2024). A RVS é alcançada quando o vírus é indetectável seis meses após o término do tratamento – esse status corresponde a uma cura da infecção pelo HCV (Vicentim; Beretta, 2019). Em indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C, estima-se que o tratamento eficaz – que atinge o status de RVS – reduz em 50 a 80% o risco de HCC (Kanwal et al., 2017).

O consumo excessivo de álcool pode causar uma série de malefícios ao fígado, como o desenvolvimento da doença hepática alcoólica (DHA). Essa doença possui um padrão de progressão bem reconhecido. No primeiro estágio, ocorre a esteatose (acúmulo de gordura nas células do órgão), também conhecida como doença do “fígado gordo” (Seitz et al., 2018). Em alguns casos, ela pode evoluir para uma esteatohepatite alcoólica, ou simplesmente hepatite alcoólica – nessa condição, além da gordura acumulada, ocorre um processo inflamatório intenso que pode ocasionar até mesmo processos de necrose. A doença pode se agravar ainda mais com o desenvolvimento de cirrose, caracterizada por extensa fibrose hepática (Seitz et al., 2018). Esses estágios avançados da doença podem ainda resultar em hepatocarcinoma. Em 2016, aproximadamente 27% das mortes por cirrose e outras doenças crônicas do fígado foram atribuídas ao consumo em excesso de álcool (Seitz et al., 2018). Com relação ao hepatocarcinoma, dependendo da região geográfica e do período analisado, a parcela de diagnósticos atribuída ao álcool pode corresponder a 17-30% do total de casos de câncer de fígado (Global Burden of Disease Liver Cancer Collaboration, 2017; Rungay et al., 2021, 2022).

Outro importante fator de risco para o desenvolvimento de HCC é a esteatohepatite não alcoólica (NASH, do inglês *Non-Alcoholic Steatohepatitis*). Essa forma de hepatite é extremamente associada a obesidade, diabetes mellitus do tipo 2, hipertensão e dislipidemia (Shao et al., 2022).

Todos os dados apontados até o momento indicam que o número de casos e mortes por HCC poderia ser drasticamente reduzido por meio de medidas preventivas já disponíveis. A

vacinação contra o HBV, a redução do consumo de álcool e a adoção de exercícios físicos e hábitos alimentares mais saudáveis podem impactar diretamente na redução do HCC. Além disso, garantir o diagnóstico precoce de HCV e o acesso ao tratamento completo com antivirais de ação direta certamente terão um papel importante na redução de HCC ao redor do mundo.

2.1.2. Prevenção e Tratamento clínico do Hepatocarcinoma

A vacinação continua sendo a forma preventiva mais eficaz para reduzir a infecção e a replicação do vírus da hepatite B, tendo como consequência direta a redução da incidência de hepatocarcinoma. Neste contexto, é necessário combater a atual onda de hesitação vacinal gerada pela desinformação e desconfiança acerca da segurança e eficácia das vacinas (Decoteau; Sweet, 2024; França et al., 2025). Ainda, o tratamento da hepatite C com os antivirais de ação direta têm reduzido a incidência de HCC em pacientes com infecção crônica do vírus. No entanto, a infecção é muitas vezes silenciosa, de modo que inúmeras pessoas com hepatite C, aguda ou crônica, não sabem que estão infectadas (Lauer; Walker, 2001; Ray; Ray, 2019) – os primeiros sintomas podem levar décadas para se manifestar e para aqueles que desenvolvem algum sintoma na fase inicial da infecção, normalmente são moderados e inespecíficos, como fadiga. É comum, portanto, que a doença não seja descoberta antes de atingir estágios avançados, em que o fígado já sofreu bastante dano e desenvolveu cirrose e/ou câncer (Lauer; Walker, 2001; Ray; Ray, 2019). Assim, para garantir o diagnóstico o mais cedo possível, é necessário tornar a testagem disponível para a população (principalmente para as parcelas que mais têm risco).

Além da vacinação e dos antivirais usados contra as viroses em questão, a aspirina e o café têm demonstrado efeito preventivo significativo em pacientes com infecção pelo HBV e HCV. Dados suecos, por exemplo, apontam que entre os indivíduos com infecção crônica, o uso de aspirina em baixa dose (75 mg ou 160 mg) reduziu a incidência de HCC de 8,3% para 4,0%, após acompanhamento médio de 8 anos (Simon et al., 2020). Apesar de alguns estudos demonstrarem benefícios com o uso de aspirina, a Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL, do inglês *European Association for the Study of Liver*) avaliou que ainda é necessário obter mais evidências desse efeito e, por tanto, não recomenda o uso dessa substância como agente preventivo contra o HCC (Sangro et al., 2025). O café, por sua vez, aparenta reduzir o risco de HCC independente da doença hepática previamente apresentada pelos pacientes (seja relacionada a álcool ou hepatite viral, por exemplo). A EASL reconhece a necessidade de mais

investigações, uma vez que os estudos observacionais acerca da influência de alimentos e bebidas sobre o risco de HCC são complicados de interpretar – aqueles que têm o costume de beber café podem possuir outros hábitos distintos capazes de influenciar o risco de HCC, por exemplo. Todos os estudos, no entanto, não demonstram efeitos nocivos relacionados ao consumo de café. Assim, a EASL recomenda (fracamente) o consumo dessa bebida como quimio-preventivo (Sangro et al., 2025).

O hepatocarcinoma normalmente ($\approx 80-90\%$ dos casos) é observado em pacientes que já apresentam cirrose, o que pode limitar as opções de tratamento uma vez que nesses casos o fígado já apresenta grande comprometimento. As estratégias preferencialmente adotadas para o tratamento da doença dependem de seu estágio de desenvolvimento e correspondem normalmente a: ressecção, transplante e ablação local (estágio inicial); quimioembolização (estágio intermediário); e imunoterapia com anticorpos monoclonais (atezolizumabe e bevacizumabe) ou terapia sistêmica com pequenas moléculas (sorafenibe, lenvatinibe, entre outros) para os casos mais avançados (Llovet et al., 2021).

O fármaco sorafenibe representou a primeira grande inovação para o tratamento de casos avançados de hepatocarcinoma. Foi aprovado em 2007 pela FDA (*Food and Drug Administration*) e ainda hoje é utilizado como uma das opções de primeira linha de tratamento em casos de HCC avançados, em que a ressecção e quimioembolização já não são mais aplicáveis (Villarruel-Melquiades et al., 2023). No estudo clínico SHARP a mediana de sobrevida global (MSG, tempo médio em que metade dos participantes permanece viva) foi de 10,7 meses no grupo tratado com sorafenibe e 7,9 meses no grupo que recebeu placebo. Uma análise atualizada, inclusive indica que a sobrevida do grupo sorafenibe alcança uma mediana de 13,4 meses (Llovet et al., 2021).

O sorafenibe é um inibidor de tirosina-quinases e serina/treonina-quinases. São enzimas que desempenham funções de sinalização por meio da transdução de sinais celulares – ou seja, são responsáveis por converter sinais extracelulares em alguma resposta/evento celular. Essas enzimas desempenham essa função catalisando a transferência do grupo fosfato do ATP para resíduos de tirosina (ou serina/treonina) na proteína substrato. A modificação dessas proteínas regula processos de crescimento celular, morte celular, angiogênese entre tantos outros. A expressão aumentada das tirosinas-quinases está associada ao crescimento anormal das células e a outros eventos importantes para o desenvolvimento de tumores (Jiao et al., 2018). As investigações indicam que o sorafenibe reduz o crescimento das células cancerígenas pela inibição das quinases B-Raf e Raf-1, além das quinases da via de sinalização

Ras/Raf/MEK/ERK. Além disso, foi demonstrado que a substância é capaz de inibir receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR- β), receptores do fator de crescimento endotelial vascular 1-3 (VEGFR 1-3), receptor do fator de crescimento de hepatócitos (c-KIT), entre outras proteínas, reduzindo, dessa forma, a angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos – essencial para o crescimento tumoral (Tang et al., 2020). A Figura 2.1 mostra a estrutura química dos fármacos utilizados no tratamento do hepatocarcinoma em estágio avançado, bem como o ano em que foram introduzidos.

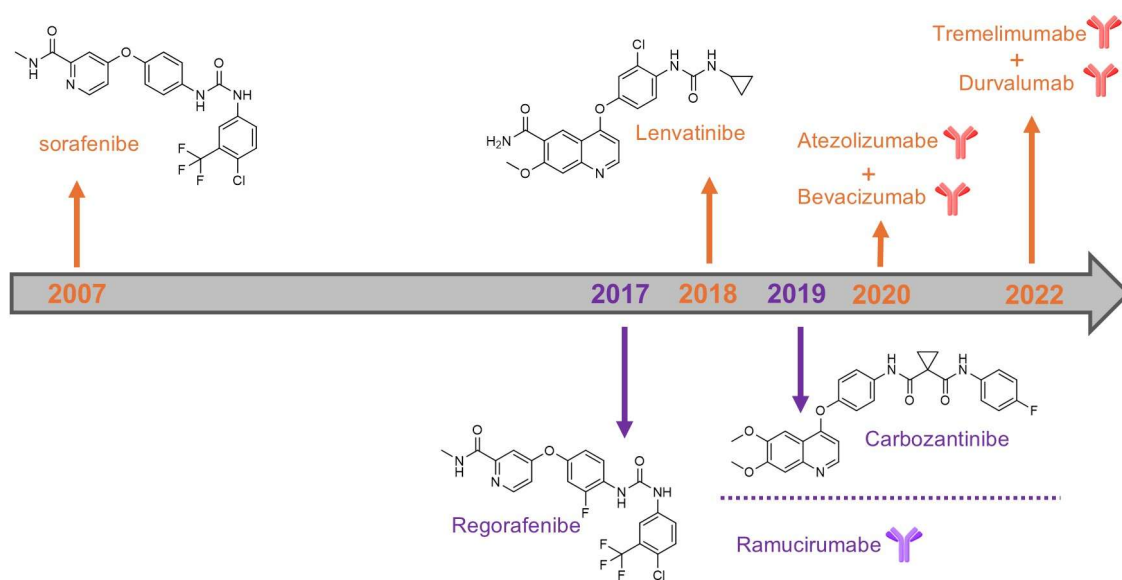


Figura 2.1. Principais terapias aprovadas para o tratamento de hepatocarcinoma em estágio avançado. Os tratamentos de primeira linha estão destacados em laranja. Os de segunda linha estão destacados em roxo. Tratamentos diferentes aprovados no mesmo ano são separados por uma linha pontilhada.

Durante uma década não houve qualquer outra alternativa medicamentosa aprovada como terapia de primeira linha para o hepatocarcinoma avançado. Então, em 2018, o lenvatinibe foi aprovado pela FDA com base no estudo clínico REFLECT, que demonstrou eficácia comparável ao sorafenibe. O lenvatinibe apresentou MSG de 13,6 meses, enquanto o sorafenibe de 12,3 meses (Villarruel-Melquiades et al., 2023). Essa substância também atua como inibidor de múltiplos receptores de quinases: receptor do fator de crescimento de fibroblastos 1-4 (FGFR 1-4), receptor rearranjado durante transfecção (RET), VEGFR 1-3, PDGFR- α e KIT (Buttelli; Qiu, 2023).

Inibidores de *checkpoint* imunológicos também têm sido aplicados no tratamento de HCC. Os *checkpoints* imunológicos são proteínas expressas em células do sistema imune, responsáveis por regular a ativação imunológica, com o intuito de impedir reações autoimunes,

ou reduzir respostas imunes exacerbadas (Meng et al., 2024). Essas estruturas são ativadas quando proteínas presentes na superfície de outras células as reconhecem e se ligam a elas. Assim, alguns tumores inibem a resposta de células do sistema imune por meio da produção excessiva de proteínas ligantes que interagem e ativam os *checkpoints* imunológicos. Na imunoterapia, anticorpos da proteína de *checkpoint*, ou de sua parceira (proteína ligante), são empregados para impedir que essa interação ocorra, de modo que as células de defesa sejam ativadas e passem a atacar as células de câncer (Meng et al., 2024).

Uma das vias naturais de supressão imunológica mais conhecidas é aquela composta pelo checkpoint PD-1 e seu ligante PD-L1. Anticorpos que impedem a interação PD-1/PD-L1 têm sido utilizados clinicamente para o tratamento de algumas formas de câncer avançados. Um desses anticorpos, o atezolizumabe, foi aprovado pela FDA em 2020 para uso contra o HCC em combinação com o anticorpo bevacizumab (responsável por inibir a atividade do VEGF). Essa combinação representa a opção de primeira linha mais eficaz para tratar HCC avançado. A mediana de sobrevida global foi de 19,2 meses no grupo que recebeu os anticorpos, comparado a 13,4 meses no grupo tratado com sorafenibe (Llovet et al., 2021).

Outra terapia com inibidores de *checkpoint* aprovada recentemente pela FDA como primeira linha de tratamento consiste no uso combinado de tremelimumab (anticorpo monoclonal de imunoglobulina G - (IgG)2 – atua contra a proteína de *checkpoint* CTLA-4) e o anticorpo monoclonal durvalumab, que atua se ligando ao PD-L1. A MSG alcançada com essa combinação foi de 16,56 meses, enquanto o grupo tratado com sorafenibe obteve MSG de 13,77 meses (Villarruel-Melquiades et al., 2023).

Por fim, a combinação dos anticorpos nivolumabe (inibidor de PD-1) e ipilimumabe (inibidor de CTLA-4) já foi aprovada como segunda linha de tratamento e tem sido investigada como primeira linha de tratamento (estudo clínico CheckMate 9DW), revelando resultados promissores, muito superiores a monoterapia com sorafenibe ou lenvatinibe (Yau et al., 2025).

Alguns pacientes não apresentam resposta ao tratamento com o sorafenibe, ou a resposta é reduzida com o tempo, levando a progressão da doença. Nesses casos, a segunda linha de tratamento é recomendada. Os fármacos de segunda linha aprovados até o momento são os inibidores de quinases regorafenibe e cabozantinibe. Nos estudos clínicos, essas substâncias aumentaram de maneira significativa a sobrevida dos pacientes (10,2-10,6 meses de MSG), se comparado ao placebo (7,8-8,0 meses de MSG). Por fim, o ramucirumabe, anticorpo monoclonal anti-VEGFR 2, foi aprovado em 2019 pela FDA para o tratamento de pacientes cuja doença progrediu com sorafenibe e que apresentam altas concentrações de α -fetoproteína

(Kanogawa et al., 2023). Estudos clínicos mostraram que esse anticorpo é mais eficaz em pacientes com concentrações elevadas dessa proteína, sendo assim usada como um biomarcador para indicar se o ramucirumabe deve ou não ser prescrito (Kanogawa et al., 2023).

2.1.3. Leucemia/linfoma de células T do adulto – ATLL

No início dos anos 80, pela primeira vez um retrovírus foi isolado de seres humanos. O vírus foi obtido de pacientes com leucemia de células T adultas e recebeu o nome de HTLV-1 (do inglês, *Human T cell-leukemia Virus 1*) (Poiesz et al., 1980, 1981). Foi uma das primeiras viroses capazes de causar câncer já identificadas, assim como o vírus do papiloma humano (HPV) e o vírus Epstein-Barr (EBV) (Tagaya; Matsuoka; Gallo, 2019). Pode ser transmitido por meio de relações sexuais sem proteção, transfusões sanguíneas e transplante de órgãos. A transmissão também pode ocorrer da mãe para o filho através da amamentação, sendo essa uma das principais vias de contaminação (Tagaya; Matsuoka; Gallo, 2019). Estima-se que 5-10 milhões de pessoas estejam infectadas por este vírus no mundo. Esse valor, no entanto, pode ser maior devido à baixa vigilância (Gessain; Cassar, 2012). É endêmico no Japão, América do Sul (incluindo o Brasil), ilhas caribenhas, Austrália central, África Ocidental, Central e Meridional, e alguns poucos países Europeus (Bangham et al., 2015).

O HTLV-1 é capaz de infectar diversas células – linfócitos T CD8⁺, macrófagos, monócitos, células dendríticas – mas, em especial, os linfócitos T CD4⁺. Os linfócitos são um tipo de glóbulo branco (leucócitos), importantes para o sistema imune. São responsáveis pelo processo de reconhecimento e defesa contra agentes potencialmente nocivos, como: vírus, bactérias e células tumorais. São classificados em linfócitos **T** – maturam no **Timo** – e linfócitos **B** – maturam na medula óssea (*Bone Marrow*). São três os tipos de linfócitos T: CD4⁺ – comumente chamados de T auxiliares, coordenam a resposta imune por meio da ativação/regulação de outras células imunes; CD8⁺ – conhecidas também como T citotóxicos, atuam geralmente exibindo citotoxicidade direta contra células infectadas e até mesmo tumores; T reguladoras – controlam a resposta imune para prevenir autoimunidade e inflamação excessiva (Beissert; Schwarz; Schwarz, 2006; Topchyan; Lin; Cui, 2023).

A infecção pelo HTLV-1 é muitas vezes silenciosa, com a maioria dos infectados assintomáticos. No entanto, doenças graves podem surgir em decorrência dessa infecção. Uma minoria da população infectada desenvolve uma forma de câncer durante a vida: a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL). É observada em cerca de 2-7% dos pacientes

HTLV-1 positivos, geralmente três a cinco décadas após a infecção inicial (Schierhout et al., 2020). Devido ao longo período de incubação necessário para o desenvolvimento de ATLL, é incomum observar a doença em pessoas contaminadas durante a vida adulta – é muito mais comum observá-la naqueles contaminados durante a amamentação (Itabashi; Miyazawa, 2021). Um estudo no Japão mostrou que a transmissão de mãe para filho foi de 20,5% com amamentação por pelo menos 6 meses, 8,3 % após amamentação inferior a 6 meses e apenas 2,4% quando não houve amamentação, somente alimentação por fórmula (Moriuchi et al., 2013). Esse dado indica a importância de realizar a testagem das mães para interromper ou impedir a amamentação em caso de resultado positivo – essa medida tem grande potencial para reduzir consideravelmente a incidência de ATLL no futuro.

Outra manifestação clínica importante é a Mielopatia associada ao HTLV-1 / Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Ocorre em somente 0,3-5% dos portadores do vírus e é mais comum naqueles que foram contaminados por transfusão de sangue ou transplante de órgãos (Tagaya; Matsuoka; Gallo, 2019). Resumidamente, é uma doença neurológica inflamatória e progressiva que afeta a coluna espinhal e causa fraqueza ou paralisia das pernas, dor lombar e sintomas urinários. A doença não possui cura e os portadores costumam ter uma vida em média 15 anos mais curta (Bangham et al., 2015). A infecção pelo HTLV-1 também pode causar outras doenças inflamatórias, como uveíte, artropatia, dermatite infecciosa e miosite.

Uma vez que o risco de contaminação é baixo e que raramente são observados sintomas ou doenças graves associadas, a infecção pelo HTLV-1 é altamente negligenciada. No entanto, um estudo recente mostrou um cenário muito mais preocupante. Neste estudo, buscou-se avaliar as consequências dessa infecção excluindo da análise as doenças necessariamente associadas ao vírus (ATLL, HAM/TSP, uveíte e dermatite infecciosa) ou associadas a condições psiquiátricas. Os autores verificaram que pessoas infectadas possuem um risco de morte prematura muito maior, aproximadamente 57% superior a indivíduos não infectados. Além disso, portadores do vírus possuem risco aumentado de desenvolver diversas doenças não diretamente associadas ao HTLV-1, como Síndrome de Sjögren, bronquiectasia, infecções pulmonares e do trato urinário, e neoplasias (diferentes de ATLL) (Schierhout et al., 2020). Esse estudo demonstra que as consequências da infecção pelo HTLV-1 talvez não sejam tão raras e com toda certeza merecem mais atenção da saúde pública – por exemplo, através de testagens, principalmente em gestantes, sangue e órgãos para doação – e da indústria farmacêutica – para a produção de antivirais, vacinas e outras terapias.

A infecção assintomática e a testagem escassa contribuem para a disseminação silenciosa do vírus. Não há vacinas ou terapias antivirais comprovadamente eficazes contra o HTLV-1. Há, no entanto, terapias disponíveis para o tratamento de algumas das doenças causadas por ele, como a ATLL e HAM/TSP. Contudo, mesmo com terapias disponíveis, o prognóstico para essas doenças ainda é ruim.

2.1.4. ATLL: Sintomas e tratamentos disponíveis

Pacientes com ATLL apresentam diversas características clínicas distintas, como linfadenopatia generalizada (aumento anormal de linfonodos em duas ou mais regiões do corpo não relacionadas), lesões cutâneas, hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e do baço), leucocitose (aumento anormal no número de leucócitos) com aumento de linfócitos anormais possuindo núcleo em formato de flor (*Flower Cells*) ou cerebriforme. Também são frequentemente observadas infecções oportunistas por *Pneumocystis jirovecii*, *Candida*, *citomegalovírus* e *Strongyloides stercoralis*. O estado imunossupressor dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 pode ser ao menos parcialmente explicado pelo aumento do número de linfócitos T que expressam fenótipos de células T reguladoras. Ainda, as células de ATLL expressam os seguintes marcadores tumorais: CCR4, CD4, CD25, CD3, FOXP3 (Ishitsuka; Tamura, 2014).

De acordo com a classificação de Shimoyama, a doença é classificada em quatro subtipos clínicos: aguda, linfoma, crônica e latente/smoldering. A forma crônica é ainda dividida em favorável e desfavorável. O subtipo desfavorável apresenta níveis elevados de LDH e uréia no soro sanguíneo e/ou níveis reduzidos de albumina. As formas aguda, linfoma e crônica desfavorável são consideradas formas agressivas de ATLL e possuem um prognóstico negativo, enquanto as demais formas são consideradas ATLL indolentes e possuem um prognóstico menos desfavorável (Ishitsuka; Tamura, 2014). No entanto, de forma geral, os portadores de ATLL têm um prognóstico ruim para a evolução da doença, com taxas estimadas de sobrevida em quatro anos de 11%, 16%, 36% e 52% para as formas aguda, linfoma, crônica e latente/smoldering, respectivamente (Katsuya et al., 2015).

O tratamento de ATLL é definido com base no tipo de doença e prognóstico do paciente. De modo geral, incluem: esperar e observar a condição da doença (*watchful waiting*); terapia antiviral com zidovudina (Figura 2.2) combinada com interferon- α (AZT/IFN- α); transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (allo-HSCT); e quimioterapia com

múltiplos agentes (Ishitsuka; Tamura, 2014). A lista de agentes quimioterápicos utilizados é extensa e entre os regimes de primeira linha empregados no tratamento de casos agressivos, o VCAP-AMP-VECP (Figura 2.3) se destaca como um dos mais promissores. Consiste na administração sequencial e semanal dos quimioterápicos: vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina e prednisona (VCAP); doxorrubicina, ranimustina e prednisona (AMP); e vindesina, etoposídeo, carboplatina e prednisona (VECP). O ciclo quimioterápico é repetido seis vezes a cada quatro semanas. A taxa de resposta patológica completa (CR, *complete response*) foi superior no grupo tratado com VCAP-AMP-VECP do que no grupo que recebeu a combinação CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona) a cada duas semanas (40% vs 25%). Ainda, a sobrevida global (OS, *overall survival*) em 3 anos foi de 24% no grupo VCAP-AMP-VECP e de apenas 13% no grupo CHOP (Tsukasaki et al., 2007).

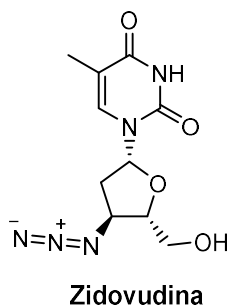


Figura 2.2. Estrutura da zidovudina, utilizada em combinação com interferon- α no tratamento de ATLL.

A terapia com AZT/IFN- α parece funcionar inibindo a replicação do HTLV-1 nas células tumorais, ao invés de provocar efeitos citotóxicos diretos. Esta tem demonstrado resultados promissores para o tratamento das formas aguda e, principalmente, crônica e latente/*smoldering*. Uma meta análise comparou os efeitos do tratamento AZT/IFN- α com a quimioterapia [ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisona (CHOP) ou ciclofosfamida, vindesina, bleomicina, e prednisona (ACVB)] e verificou que os grupos alcançaram uma mediana de sobrevida de 17 meses e 10 meses, respectivamente. A taxa de sobrevida global em 5 anos foi também significativamente superior no grupo AZT/IFN- α (46%), comparado à quimioterapia (20%). Pacientes com os subtipos crônico e latente apresentaram sobrevida global de 100% em 5 anos de acompanhamento, enquanto a quimioterapia resultou em somente 42% de sobrevida global. O subtipo agudo apresentou resultados menos promissores: 28% dos pacientes tratados com AZT/IFN- α se encontravam vivos ao fim de 5 anos de estudo, enquanto apenas 10% daqueles que receberam quimioterapia

sobreviveram nesse período. Os pacientes com o subtipo linfoma obtiveram melhor resposta com a quimioterapia que a combinação AZT/IFN- α (Bazarbachi et al., 2010). Em um estudo de caso, foi reportado que um paciente manteve o quadro de remissão por 6 anos após a terapia com AZT/IFN- α (Cook et al., 2018). A Figura 2.3 mostra as estruturas de alguns fármacos utilizados nos tratamentos da ATLL, bem como um dos regimes de administração empregados em tratamentos clínicos.

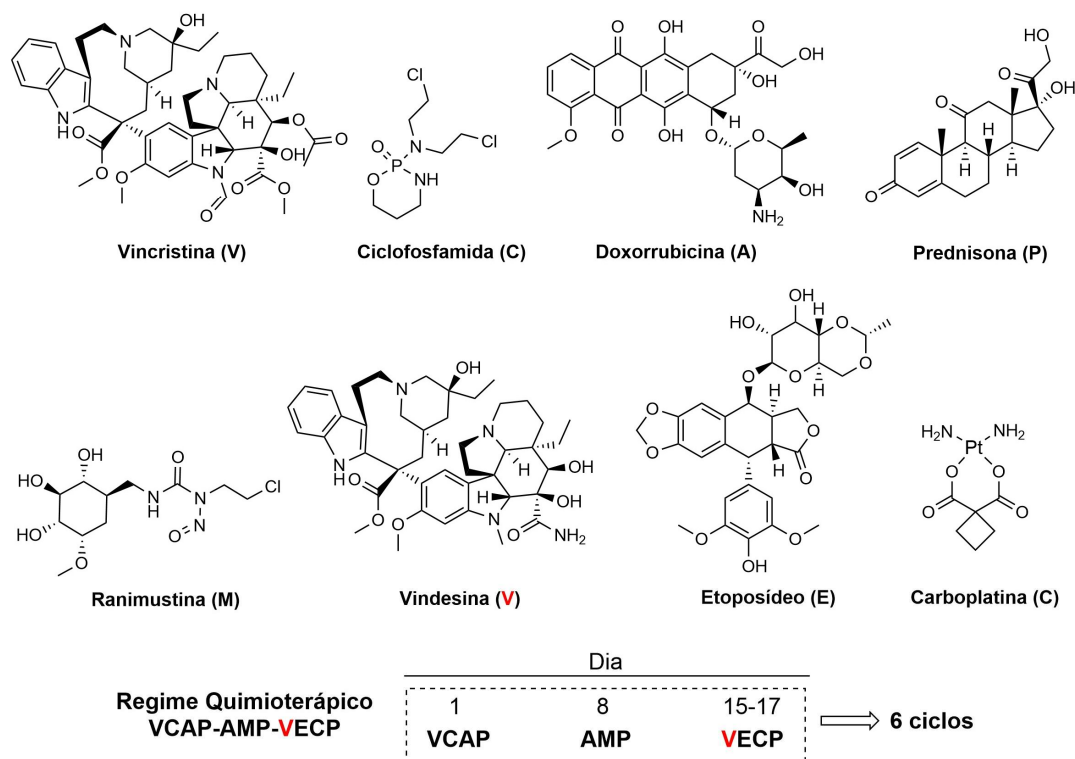


Figura 2.3. Um dos regimes quimioterápicos utilizados no tratamento de ATLL.

O Transplante Alogênico de Células-Tronco Hematopoéticas (allo-HSCT) é até o momento o único tratamento potencialmente curativo. É empregado após o regime quimioterápico, normalmente entregando melhores resultados em pacientes com o status de resposta completa à quimioterapia (Inoue et al., 2018). Nesta terapia, células tronco de um doador saudável são infundidas no paciente por transfusão. Antes do transplante, o paciente passa por sessões de quimioterapia (às vezes associada a radiação) para reduzir ao máximo o número de células cancerígenas, e para suprimir o sistema imune a fim de evitar a rejeição do transplante. As células tronco transplantadas alcançam a medula óssea onde começam a produzir novas células saudáveis. As novas células imunes podem reconhecer as células

tumorais residuais e atacá-las, efeito conhecido como “enxerto contra ATLL” (*graft-versus-ATLL*). Esse tratamento, no entanto, apresenta diversos riscos e complicações, como: doença do enxerto contra hospedeiro (*Graft-Versus-Host Disease*) – o sistema imune do doador ataca as células saudáveis do receptor –; infecções muito graves, já que o sistema imune se encontra comprometido no início do tratamento; rejeição do enxerto; e morte relacionada ao transplante (Giralt; Bishop, 2009).

Outros agentes também têm sido utilizados no tratamento da ATLL, como o anticorpo mogamulizumabe – se liga ao receptor de quimosina CCR4, expresso constitutivamente em células de ATLL de ~90% dos pacientes, ajudando o sistema imune a reconhecer e atacar as células tumorais. Foi aprovado no Japão como uma monoterapia e tem sido investigado em combinação com regimes quimioterápicos (EPOCH e VCAP-AMP-VECP) (Tsukasaki et al., 2020). Efeitos positivos também foram obtidos com a combinação da quimioterapia CHEP (ciclofosfamida, doxorrubicina, etoposídeo e prednisona) e Brentuximabe Vedotina (Figura 2.4), um conjugado anticorpo-droga – o anticorpo se liga ao receptor CD30 expresso na superfície de algumas células de ATLL, sendo em seguida internalizado em lisossomos, onde proteases clivam o espaçador, liberando a monometil auristatina E (MMAE) após clivagem autoimolativa do grupo *p*-aminobenziloxicarbonil. A MMAE atua sobre os microtúbulos, inibindo sua polimerização (Tsukasaki et al., 2020).

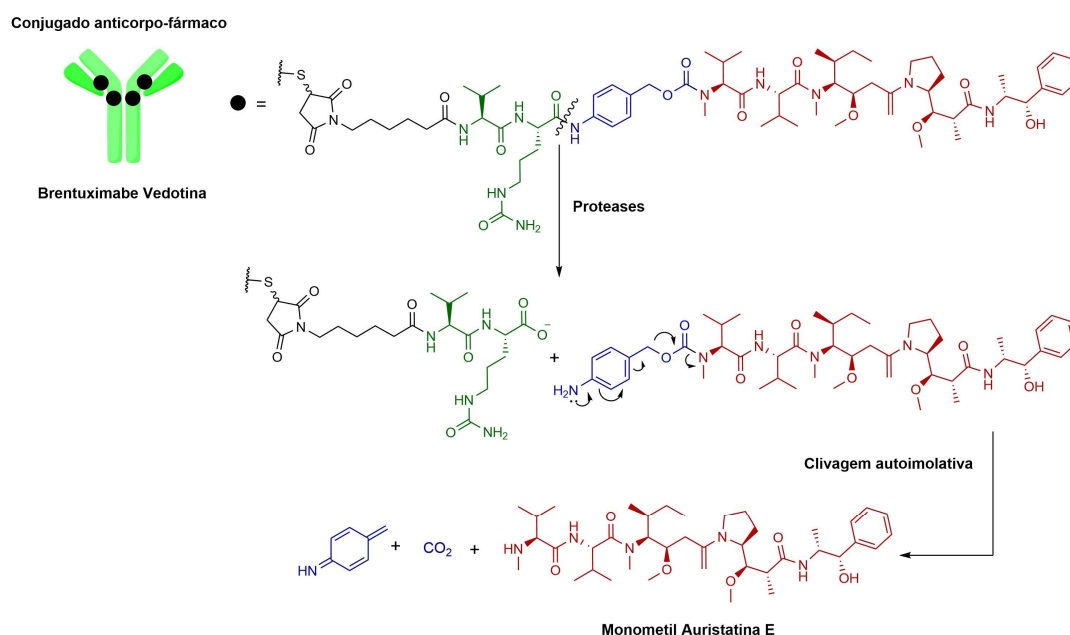


Figura 2.4. Brentuximabe Vedotina. Hidrólise do espaçador pela ação de proteases e liberação de monometil auristatina E mediante clivagem autoimolativa do grupo para-aminobenziloxicarbonil.

A proliferação das células infectadas é promovida pela expressão de genes virais, em especial, pelos genes tax e HBZ. A proteína tax normalmente é expressa mais precocemente na infecção, sendo frequentemente “silenciada” a maior parte do tempo. Ela atua como transativador viral, promovendo a transcrição de genes do HTLV-1. Ainda, modula a expressão de genes da célula hospedeira, promovendo transformação e proliferação celular. Já a proteína HBZ, é expressa constitutivamente nas células de ATLL e promove a proliferação dos linfócitos infectados e a redução da resposta imune do organismo (Giam; Semmes, 2016). Ambas as proteínas são importantes para o processo oncogênico. Dessa forma, seria interessante desenvolver terapias que atuem sobre elas, com o intuito de suprimir a proliferação das células de ATLL (Maseko et al., 2023; Sugata et al., 2015). Recentemente, Maseko e colaboradores (2023) identificaram uma molécula (**1**, Figura 2.5) capaz de interferir na interação entre a proteína tax do HTLV-1 e a proteína hDLG1 (*human homolog of the drosophila discs large tumor supressor*) – proteína humana com funções associadas a regulação da proliferação celular (Marziali et al., 2017). Essa molécula inibiu a interação em diversos modelos *in vitro* e impediu a transmissão do vírus de célula para célula.

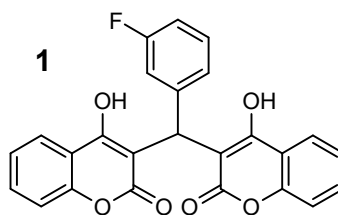


Figura 2.5. Inibidor da interação entre tax-1 (HTLV-1) e a proteína humana DLG1.

2.1.5. Glioblastoma: classificação, dados estatísticos, tratamento clínico e busca por novas terapias

As últimas estimativas divulgadas pelo Observatório Global do Câncer, indicam que os cânceres de cérebro e do sistema nervoso central ocupam a décima nona e décima segunda posições nos rankings de incidência e mortalidade, respectivamente. Em 2022, cerca de 321 mil novos diagnósticos foram reportados e cerca de 248 mil mortes ocorreram em decorrência dessas neoplasias (Bray et al., 2024). O termo glioma é utilizado para descrever os tumores primários cerebrais – ou seja, refere-se aos tumores que se originaram no próprio cérebro. Têm origem nas células de suporte do sistema nervoso central (SNC), as células gliais – essas, ao contrário dos neurônios, não conduzem impulsos elétricos, mas são essenciais para o

funcionamento, proteção e manutenção dos neurônios (Jessen, 2004). São quatro os tipos de células gliais: astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células ependimárias (Jessen, 2004; Shiyu Deng, 2023).

Até 2016, a classificação histopatológica dos gliomas era realizada majoritariamente pela comparação das características morfológicas das células tumorais com aquelas de células saudáveis, de modo que: tumores que se assemelhavam a astrócitos eram classificados como astrocíticos (astrocitoma, astrocitoma anaplástico e glioblastoma); os que possuíam maior semelhança com oligodendrócitos eram chamados de oligodendrogliomas; os mais parecidos com células ependimárias eram tratados como ependimomas; e aqueles com características de múltiplas células gliais eram tidos como gliomas mistos (Park et al., 2023). No entanto, as classificações de 2016 e 2020 da Organização Mundial da Saúde incorporaram perfis moleculares em conjunto com a morfologia celular para fornecer maior valor prognóstico – diversos estudos identificaram alterações moleculares em células de glioma que permitem a melhor classificação dos diferentes tipos tumorais, tornando-se mais útil para prever a evolução da doença e qual o melhor curso para o seu tratamento (Park et al., 2023). Uma discussão mais detalhada dessas classificações está além dos objetivos desta introdução.

Grande parte dos tumores cerebrais primários e de outras neoplasias do SNC diagnosticados todos os anos são classificados como benignos – cerca de 72% do total. Os gliomas correspondem a aproximadamente 24% dos tumores primários do cérebro e a 81% dos casos malignos originados nesse órgão (Ostrom et al., 2022). Dentre todos os gliomas, o glioblastoma é o tumor maligno mais prevalente - 59,2% dos casos - e agressivo, sendo responsável por cerca de 50% dos diagnósticos de tumores cerebrais malignos. Esse tumor pode surgir em diferentes faixas etárias, mas sua incidência aumenta com a idade, sendo mais comum entre 75 e 84 anos. Além disso, é observado mais comumente em homens, que são acometidos cerca 1,6 vezes mais do que as mulheres. O prognóstico para o glioblastoma é extremamente desfavorável: em média, somente 6,9% dos pacientes sobrevivem cinco anos após o diagnóstico (Ostrom et al., 2022). No Brasil, entre os anos 2012 e 2021, foram registrados 13.764 casos, acometendo 6,04 pessoas a cada 100 mil habitantes (Silva et al., 2024).

Apesar dos tratamentos disponíveis, o tempo médio de sobrevida global para pacientes diagnosticados com glioblastoma é de apenas 15 a 18 meses (Wen et al., 2020). O tratamento padrão atual para tumores recém diagnosticados segue o chamado protocolo de Stupp. Inicialmente, uma cirurgia é realizada para remover o máximo de tumor possível, em seguida,

sessões de radioterapia são combinadas com a administração oral do quimioterápico temozolomida (TMZ, Figura 6). Após essa fase, o paciente recebe ciclos de quimioterapia adjuvante com TMZ por algumas semanas (Batistella et al., 2021).

A temozolomida é uma pró-droga estável em pH ácido, o que permite a sua administração oral. É bem absorvida no trato gastrointestinal, alcançando eficientemente a corrente sanguínea. No entanto, em ambientes alcalinos, como na corrente sanguínea (pH 7,4), o fármaco é convertido na 5-(3-metiltriazen-1-il)-imidazol-4-carboxamida (MTIC). Então, essa substância sofre nova decomposição, levando a formação da 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e liberação do íon reativo metildiazônio, a espécie responsável por alquilar o DNA das células tumorais (Svec et al., 2018). O íon metildiazônio formado é responsável por metilar, principalmente, os resíduos de guanina, formando O⁶ e N⁷-metilguanina (Figura 2.6). A alteração do DNA leva, em última instância, à morte celular por apoptose. A TMZ é rapidamente eliminada do organismo, apresentando um tempo de meia-vida de aproximadamente 2 h. Por se tratar de uma molécula pequena, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e alcançar as células tumorais. No entanto, estudos *in vivo* realizados em humanos demonstram que os níveis de TMZ no cérebro e fluido cerebrospinal é apenas 20% da concentração presente na corrente sanguínea, indicando acúmulo limitado no local de ação desejado (Ostermann et al., 2004). A baixa concentração do fármaco no cérebro pode ser reflexo não só da lipofilicidade reduzida da molécula, como também de sua rápida eliminação em decorrência da instabilidade em pH fisiológico. Em contrapartida, tem sido sugerido que o fármaco deve hidrolisar mais rapidamente no ambiente alcalino dos gliomas, garantindo alguma seletividade frente às células tumorais (Svec et al., 2018).

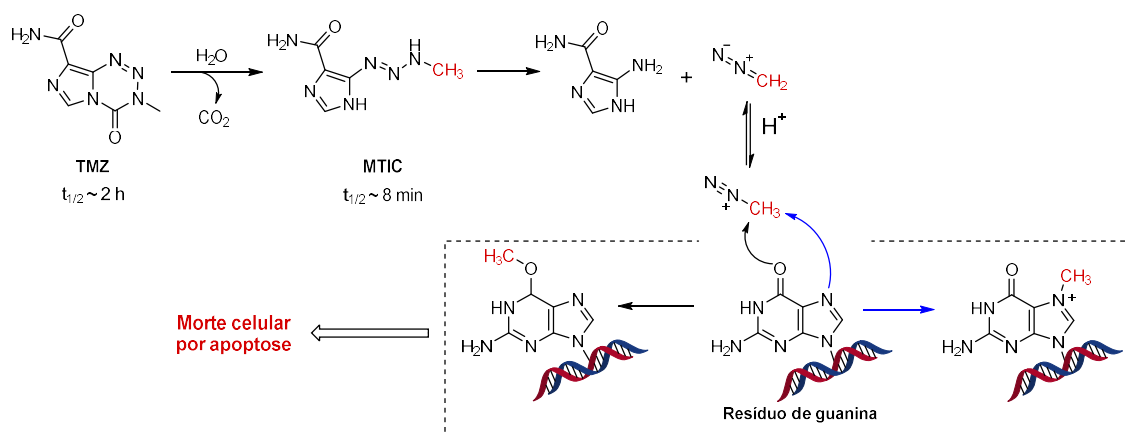


Figura 2.6. Mecanismo de ação da temozolomida.

A temozolomida é em geral bem tolerada pelos pacientes e somente 15% abandonam o tratamento devido aos efeitos colaterais. Os efeitos colaterais mais comuns incluem: náusea, vômito, fadiga e mielossupressão. A mielossupressão corresponde ao acometimento da medula óssea, resultando em redução na produção de células sanguíneas, o que ocasiona desenvolvimento de neutropenia, trombocitopenia, linfopenia e leucopenia – esses efeitos hematológicos adversos aumentam o risco de infecções e sangramento (Jezierzański et al., 2024).

A resistência de tumores à TMZ é comum. Um dos principais mecanismos que tornam esse fármaco inefetivo corresponde a expressão da O⁶-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT), que desempenha papel crucial na reparação de danos causados ao DNA. Essa enzima remove grupos alquila da posição O⁶ de resíduos de guanina, restaurando a forma original dessa base nitrogenada (Hegi et al., 2005). No processo de restauração, a MGMT é modificada permanentemente, perdendo a sua função – a célula necessita sintetizar novamente a enzima para garantir o reparo contínuo do DNA (Hegi et al., 2005).

Para que a temozolomida apresente efeito citotóxico significativo nas células tumorais, é necessário que possuam um sistema funcional de reparo do DNA por incompatibilidade (MMR, do inglês *mismatch repair*). Durante o processo de cópia do DNA, às vezes, uma base errada é inserida pelo maquinário celular, de modo que haja pareamento errado de algumas bases. O sistema MMR é responsável por identificar esse pareamento errôneo, retirar a base errada e substituir pela correta, reparando o DNA. No entanto, alguns danos ao DNA não podem ser corretamente corrigidos por essa ferramenta, levando a ciclos de repetidas tentativas e fracassos de reparo, que culminam no dano irreversível do material genético e morte celular por apoptose. A metilação do DNA pela TMZ não pode ser reparada pelo sistema MMR, o que leva à morte das células tratadas com essa substância. Em algumas células tumorais, no entanto, esse mecanismo de reparo é falho e o pareamento errado causado pela inserção da O⁶-metilguanina não é reconhecido – a metilação torna-se tolerada pela célula, que sobrevive mesmo com alterações extensas em seu DNA (Li, 2008).

A enzima MGMT e o processo de reparo por MMR são responsáveis por lidar com a guanina metilada em O⁶. A N⁷-metilguanina é reparada por outro processo: reparo por excisão de base (BER, do inglês *base excision repair*). Grande parte das metilações induzidas pela TMZ no nitrogênio 7 da guanina é reconhecida e reparada pelo mecanismo BER. Diversas proteínas têm papel fundamental nesse processo de reparo. Uma delas, a poli-(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1), é crucial para a identificação e sinalização da presença de danos no DNA. A

expressão aumentada da PARP1 é associada em alguns casos à resistência à quimioterapia com TMZ. A inibição dessa enzima pode ser uma boa estratégia para aumentar a sensibilidade de algumas células a esse tratamento (Pu et al., 2025).

Embora alguns tumores sejam inicialmente sensíveis à TMZ, é comum que desenvolvam resistência ao longo do tratamento. Possivelmente, em alguns casos, a quimioterapia elimina as células mais suscetíveis ao fármaco, favorecendo a sobrevivência e proliferação da subpopulação de células resistentes, promovendo a permanência e crescimento do tumor (Zhang; F.G. Stevens; D. Bradshaw, 2012). Em outros casos, as células podem passar a desenvolver novos mecanismos de resistência adaptativa, como o aumento da expressão da enzima MGMT, maior produção e recrutamento de bombas de efluxo, como as glicoproteínas-p, e adquirir deficiências no processo de reparo do DNA por MMR (Pu et al., 2025).

A temozolomida ainda hoje é considerada o agente quimioterápico de maior sucesso no tratamento de glioblastoma. Assim, diversos estudos pré-clínicos têm focado no desenvolvimento de análogos estruturais com o objetivo de reduzir algumas de suas limitações farmacocinéticas. Essas investigações buscam compostos que possuam maior lipofilicidade – a fim de garantir maior penetração pela barreira hematoencefálica – e maior estabilidade em meio aquoso, o que deve prolongar o tempo de circulação na corrente sanguínea e favorecer o acúmulo do fármaco no cérebro. Ainda, essas modificações têm como objetivos permitir o uso de doses mais baixas do quimioterápico e reduzir os efeitos colaterais possivelmente associados à sua hidrólise na corrente sanguínea, onde não deveria ocorrer (a hidrólise deve ocorrer preferencialmente no ambiente tumoral). Nesses estudos, as novas substâncias são comumente testadas em um painel de células com expressões distintas de MGMT e sistemas de reparo MMR com proficiências distintas (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Células tumorais e características de mecanismo de reparo do DNA.

Célula	Tipo	MGMT ^a	MMR ^b
A172	Glioblastoma	-	+
D54		-	+
U118MG		+	+
T98G		+	+
U87		-	+
U251		-	+
HCT116	Carcinoma colorretal	-	-
D341 Med	Meduloblastoma	+	-
RKO	Carcinoma colorretal	+	-

^aMGMT (-): não expressa a enzima MGMT; MGMT (+): expressa a enzima MGMT em grande quantidade; ^bMMR (+): sistema de reparo por MMR funcional; ^bMMR (-): sistema de reparo por MMR defeituoso.

Neste contexto, Yu e colaboradores (2021) desenvolveram cinco novos ésteres derivados da temozolomida, cada um contendo cadeias alifáticas saturadas de diferentes comprimentos. Foram utilizadas cadeias com 4, 6, 8, 12 e 16 átomos de carbono. Observou-se que o aumento da cadeia carbônica resultou em aumento significativo da lipofilicidade, conforme revelado pelos valores crescentes de $\log P$ experimentais (Figura 2.7). Um ensaio celular realizado pelo grupo, mostrou que quanto mais longa a cadeia alquila do composto, maior a penetração celular, indicando que o aumento da lipofilicidade – em virtude da esterificação – facilitou a permeabilidade dessas moléculas pela membrana celular. Curiosamente, também foi observado que a estabilidade das substâncias no plasma e em homogeneizado de cérebro aumentou com o número de carbonos da cadeia. A citotoxicidade das substâncias foi inicialmente avaliada em linhagem celular C6, que corresponde a células isoladas de glioma murino. Derivados com cadeias mais longas apresentaram maior citotoxicidade, provavelmente devido a lipofilicidade e penetração celular superiores. A substância mais ativa (**6**, Figura 2.7) foi avaliada em mais duas linhagens: uma sensível a TMZ (U251) e outra resistente a TMZ (T98G). O novo derivado foi muito mais ativo que o TMZ nas duas linhagens. Os autores propuseram que a maior penetração celular do composto **6** deve ter sido responsável por superar a resistência das células T98G, que superexpressam a enzima MGMT. Neste estudo, todos os ensaios de citotoxicidade foram realizados com 48 h de incubação na presença dos alquilantes. O éster **6** reduziu o crescimento do tumor *in vivo* em 68,59% em uma dose de 50 mg/kg por 5 dias, enquanto o tratamento com TMZ reduziu a proliferação em apenas 17,58% (Yu et al., 2021).

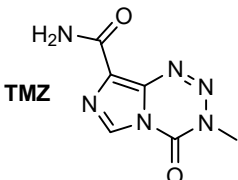
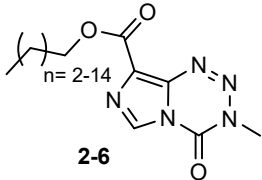
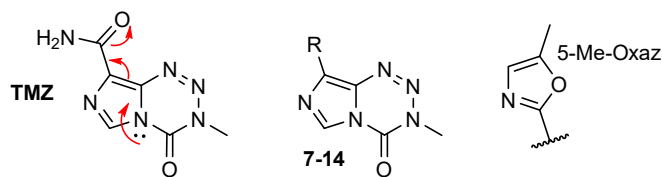
				IC ₅₀ (μM)		
		LogP	t _{1/2} (Homogeneizado cerebral)	Penetração celular (%)	T98G	U251
TMZ	n	-1,26	<2 min	10,47	1185,07	56,18
2	2	0,55	<2 min	12,49	-	-
3	4	0,80	12,84 min	13,48	-	-
4	6	1,79	81,63 min	19,19	-	-
5	10	2,71	129,61 min	27,51	-	-
6	14	3,51	558,72 min	50,00	13,80	0,051

Figura 2.7. Ésteres derivados da TMZ, suas citotoxicidades e principais propriedades farmacocinéticas determinadas experimentalmente.

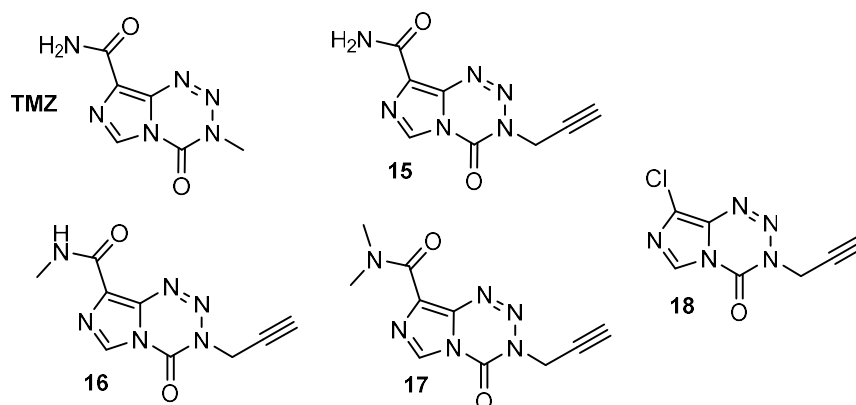
Svec e colaboradores (2018) exploraram modificações estruturais na posição 8 do anel da TMZ, a fim de gerar novos derivados com maior estabilidade à hidrólise e avaliar como essa estabilidade influenciaria a atividade anticâncer das imidazotetrazinas. Os autores observaram que grupos com maior poder retirador de elétrons reduzem o tempo de meia-vida em PBS (pH 7,4), conforme exemplificado na Figura 2.8. A carbonila que é atacada pela água no processo de hidrólise, deve ser estabilizada por ressonância principalmente pelo par de elétrons livre do nitrogênio do grupo triazenil. O outro nitrogênio conectado à carbonila, pertencente ao anel imidazol, também deve contribuir para a estabilização, no entanto, em menor extensão, tendo em vista que seu par de elétrons se encontra ocupado mantendo a aromaticidade do anel. Ainda, grupos retiradores de elétrons em C8, devem tornar o par de elétrons desse átomo ainda menos disponível para conjugar com a carbonila (Figura 2.8), tornando-a mais suscetível à hidrólise. Moléculas com maior tempo de meia-vida apresentaram maior citotoxicidade (Figura 2.8) em ensaios *in vitro*, até mesmo quando avaliadas em células que expressam a enzima MGMT em grande quantidade (U118MG e T98G) – valores de meia-vida superiores devem garantir ao pró-fármaco bastante tempo para que possa se deslocar ao núcleo antes de sua conversão no agente alquilante ativo, aumentando a atividade anticâncer. Moléculas que hidrolisam muito rapidamente devem liberar o íon metil diazônio antes de se acumular no ambiente do DNA, reduzindo sua atividade contra a célula cancerígena. Moléculas com grupos retiradores de elétrons mais potentes, por mais que apresentem menores tempos de meia-vida, podem exibir maior citotoxicidade (**8** vs TMZ), possivelmente devido a sua maior lipofilicidade, que garante passagem mais facilitada pelas membranas celular e nuclear. Apesar das moléculas mais resistentes à hidrólise apresentarem maior citotoxicidade *in vitro*, em modelo *in vivo* foram menos eficientes. A menor eficiência observada quando testada em animal pode ser resultado da eliminação dessas moléculas por outras rotas, diferentes da hidrólise, como excreção e oxidação, não havendo tempo para serem convertidas à espécie alquilante ativa (Svec et al., 2018).



				IC ₅₀ (μM; 7 dias de incubação)			
	R	cLogP	t _{1/2} (PBS, pH 7,4)	U87	D54	U118MG	T98G
TMZ	CONH ₂	-1,58	1,98 h	51	12	322	660
7	CN	-	0,57 h	500	91	670	>1000
8	COMe	-1,08	1,20 h	44	18	115	240
9	CONHMe	-1,34	2,70 h	49	11	280	580
10	CONMe ₂	-1,18	2,80 h	51	12	322	660
11	5-Me-Oxaz	-1,19	3,00 h	27	9	70	100
12	Cl	-0,72	3,10 h	15	21	60	60
13	Ph	-0,56	27 h	9	7	3	14
14	CH ₃	-	40 h	3	6	7	6

Figura 2.8. Novos derivados da TMZ com perfis de lipofilicidade e estabilidade superiores. As setas vermelhas indicam como grupos retiradores (por ressonância) em C8 influenciam a disponibilidade do par de elétrons do N imidazólico. clogP: logP calculado teoricamente.

Em um artigo ainda mais recente, Svec e colaboradores (2022) buscaram preparar derivados da temozolomida contendo grupos alquilantes diferentes, com o intuito de criar imidazotetrazinas análogas capazes de introduzir no DNA uma porção que não possa ser removida pela enzima MGMT, superando um dos mecanismos de resistência (Svec et al., 2022). O derivado com o grupo propargil apresentou uma das atividades mais potentes nas células com e sem expressão de MGMT (**15** vs **TMZ**, Figura 2.9). Contudo, o tempo de meia-vida dessa molécula mostrou-se muito inferior à TMZ. Por esse motivo, os autores procuraram substituir a amida primária em C8 por grupos retiradores mais fracos. A estratégia foi eficiente, gerando moléculas com maior estabilidade e citotoxicidade (**16-18**). O derivado mais potente (**18**, Figura 2.9), foi muito mais ativo que à TMZ mesmo em linhagens celulares com um mecanismo de reparo MMR defeituoso (HCT116 e D341 Med), indicando que o padrão de alquilação do DNA é possivelmente diferente, um que não dependa do mecanismo MMR funcional para ativar a morte celular. Os autores então propuseram dois mecanismos em que o DNA é danificado por ligação cruzada entre suas cadeias (Svec et al., 2022).



	cLogP	$t_{1/2}$ (PBS, pH 7,4)	Estabilidade (2 h)	IC ₅₀ (μM; 7 dias de incubação)			
				U87	T98G	HCT116	D341 Med
TMZ	-0,81	1,63 h	40%	50	570	840	460
15	-0,71	0,57 h	8%	29	77	-	-
16	-0,71	-	18%	40	87	-	-
17	-0,71	-	27%	20	40	-	-
18	-0,71	-	30%	9	27	14	8

Figura 2.9. Novos derivados da TMZ com perfis de lipofilicidade e estabilidade superiores. clogP: logP calculado teoricamente. Estabilidade (2 h): porcentagem do derivado que permanece intacto após 2 horas em PBS (pH 7,4).

Inúmeros ensaios clínicos têm sido conduzidos nos últimos anos com o objetivo de desenvolver terapias alternativas mais eficazes para o glioblastoma. Grande parte dessas investigações tem focado em alvos moleculares específicos, pertencentes a vias de sinalização que se encontram desreguladas neste tipo de tumor, a fim de tornar a tratamento mais seletivo – abordagem conhecida como terapia-alvo, ou terapia direcionada (*targeted therapy*). Liu e colaboradores publicaram uma revisão extensa sobre o assunto, destacando os principais avanços, limitações e perspectivas no combate dessa neoplasia (Liu et al., 2022). Diante da imensa quantidade de dados disponíveis na literatura, somente alguns deles serão destacados nesta introdução.

São três as vias mais frequentemente alteradas no glioblastoma: via RTKs/RAS/PI3K (em 88% dos pacientes); via p53 (em 87% dos pacientes); e via RB (em 78% dos pacientes). Essas vias controlam funções essenciais como proliferação, reparo do DNA e progressão do ciclo celular. A desregulação de qualquer uma delas contribui para o crescimento tumoral (Liu et al., 2022). Os mecanismos de resistência à TMZ também têm sido alvo de investigações, com o intuito de encontrar moléculas capazes de aumentar a sua ação antitumoral.

O iniparibe (4-iodo-3-nitrobenzamida) foi desenvolvido para atuar como um inibidor da PARP1. Pensava-se inicialmente que a inibição da PARP1 por essa molécula poderia aumentar

a eficácia da quimioterapia com agentes alquilantes ao prejudicar um dos mecanismos de reparo do DNA – o mecanismo BER. No entanto, estudos posteriores sugerem que essa molécula atua como um pró-fármaco, onde o grupo nitro é reduzido a um grupo nitroso ou a um radical nitrosil (Mendeleyev et al., 1995; Novello et al., 2014). Sugere-se que o metabólito nitrosado é capaz de formar adultos de maneira não seletiva com proteínas que contém resíduos de cisteína livres (Liu et al., 2012). A resposta antioxidante mediada por Nrf2 e a cadeia transportadora de elétrons parecem ser os responsáveis pela redução da molécula, cujo metabólito atua como desacoplador na cadeia transportadora de elétrons, gerando ROS em níveis citotóxicos (Licht et al., 2011). Apesar da incerteza envolvendo seu mecanismo de ação, a molécula avançou para vários estudos clínicos. Na última atualização das investigações em glioblastoma, o iniparibe foi utilizado em combinação com radioterapia e temozolomida, alcançando resultados promissores. Somente pacientes recém diagnosticados com glioblastoma foram inseridos no estudo. A sobrevida média com esse tratamento foi de 22 meses. Ainda, 38% e 25% dos pacientes encontravam-se vivos 2 e 3 anos após o início dessa terapia (Blakeley et al., 2019). A Figura 2.10 mostra as estruturas químicas de alguns agentes quimioterápicos investigados para o tratamento de glioblastoma.

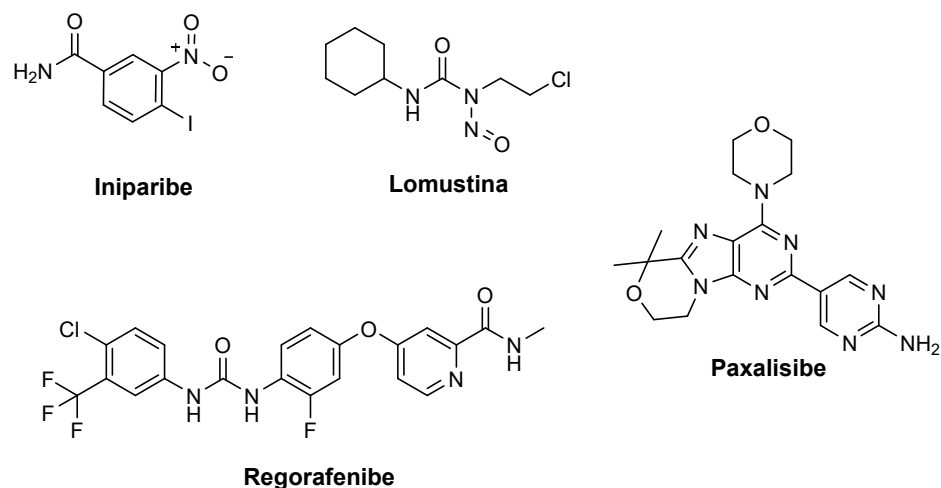


Figura 2.10. Estrutura de alguns agentes quimioterápicos investigados no tratamento de glioblastoma.

Um estudo demonstrou que cerca de 72% dos pacientes tratados pelo protocolo de Stupp apresentam recorrência da doença dentro de um ano após o início do tratamento. Nesses casos, novas cirurgias, mais sessões de radioterapia e quimioterapia podem ser recomendadas. Nova administração de temozolomida normalmente não gera boa resposta clínica. Tem sido recomendado como segunda linha de tratamento, o uso de nitrosoureas e do anticorpo

bavacizumabe (Tünbekici et al., 2025). O ensaio clínico REGOMA buscou comparar na fase 2 a lamustina e o regorafenibe. A lomustina é uma nitrosourea que contém um grupo halo-alcano em sua estrutura. Essa molécula elícita sua ação anticâncer pela alquilação e ligação cruzada do DNA. O regorafenibe, por sua vez, foi brevemente apresentado no início deste capítulo como um dos agentes quimioterápicos de segunda linha aprovados contra o hepatocarcinoma. Essa molécula é um inibidor de múltiplas quinases envolvidas nos processos de crescimento, proliferação e formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Possui diversos alvos moleculares, entre eles as quinases VEGF 1-3 e o receptor FGFR. Pensou-se em avaliar o regorafenibe contra o glioblastoma por ser um tumor bem vascularizado e que superexpressa as quinases VEGF e outras proteínas envolvidas no processo de angiogênese. O ensaio demonstrou a superioridade do regorafenibe que apresentou sobrevida média de 7,4 meses, em comparação a apenas 5,6 meses no grupo tratado com lomustina (Lombardi et al., 2019). Estudos posteriores também indicaram benefícios desse fármaco (Lombardi et al., 2021).

Embora a sinalização anormal envolvendo a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) esteja presente em mais de 80% dos casos de glioblastoma, o desenvolvimento de inibidores dessa enzima enfrenta dificuldades devido à barreira hematoencefálica, que essas moléculas precisam atravessar para alcançarem as células tumorais. Pensando nisso, um novo inibidor de PI3K ($K_i = 2$ nM) capaz de passar por essa barreira foi desenvolvido após longas rodadas de modificação estrutural (Heffron et al., 2016). Essa molécula, conhecida como paxalisibe, também atua como potente inibidora da quinase mTOR ($K_i = 70$ nM) (Salphati et al., 2016). Um estudo clínico de fase 2 recrutou pacientes que haviam sido anteriormente tratados pelo protocolo Stupp e cuja doença não tinha progredido antes do ensaio com o paxalisibe. O fármaco demonstrou atividade clínica promissora, alcançando sobrevida média de 15,7 meses e um período médio de sobrevida sem progressão da doença de 8,6 meses. Destaca-se que neste estudo o paxalisib foi utilizado como tratamento de segunda linha, já que os pacientes já haviam sido tratados por outra modalidade anteriormente. Além disso, foram selecionados somente os pacientes com status de promotor MGMT não-metilado – que indica expressão da enzima MGMT em sua forma ativa e preclui desfechos clínicos ruins devido à resistência à temozolomida (Wen et al., 2022).

2.2. Revisão literária das classes bioativas de interesse e apresentação das justificativas e resultados

Neste trabalho, três classes de substâncias foram estudadas: as tiossemicarbazonas, as ftalazinonas e os cloridratos mesoiônicos. A partir da próxima subseção a seguinte sequência textual será seguida:

- A) Revisão literária sobre as tiossemicarbazonas; objetivos e justificativas envolvendo essa classe; apresentação dos resultados de síntese e avaliação biológica (hepatocarcinoma e ATLL) das tiossemicarbazonas; materiais e métodos; conclusões e perspectivas;
- B) Objetivos e justificativas para a síntese e avaliação de um complexo de zinco com tiossemicarbazona; apresentação dos resultados de síntese e avaliação biológica (ATLL) do complexo e de zinco e seu ligante livre; materiais e métodos; conclusões e perspectivas;
- C) Revisão literária sobre as ftalazinonas; objetivos e justificativas envolvendo essa classe; apresentação dos resultados de síntese e avaliação biológica das ftalazinonas (hepatocarcinoma e ATLL); materiais e métodos; conclusões e perspectivas;
- D) Revisão literária sobre os cloridratos mesoiônicos; objetivos e justificativas envolvendo essa classe; apresentação dos resultados de síntese e avaliação biológica do mesoiônico contra glioblastoma; materiais e métodos; conclusões e perspectivas;

Então, o capítulo 2 será encerrado com as referências e, na sequência, o material anexo de toda a tese (capítulo 1 e 2) será apresentado.

2.3. Tiossemicarbazonas: breve histórico, atividades biológicas e estudos clínicos

As tiossemicarbazonas são uma classe de moléculas amplamente explorada na Química Medicinal. Sua estrutura tem o esqueleto básico representado na Figura 2.11, onde os substituintes R₁ a R₄ podem ser hidrogênio, grupos alquila, arila ou heteroarila. Passaram a receber considerável interesse após Domagk e sua equipe reportarem nos anos 40 suas descobertas sobre o potencial antimicobacteriano dessas substâncias (Offe, 1988). Inicialmente, o grupo se concentrou na avaliação de diversas sulfonamidas frente às micobactérias, motivados principalmente pelos bons resultados dessa classe contra outros patógenos microbianos, como

o *Streptococcus*. No entanto, os desfechos desses testes eram no geral decepcionantes, mostrando que as sulfonamidas possuíam ação significativamente limitada, especialmente contra micobactérias.

Em um dado momento, verificou-se que sulfonamidas contendo um anel tiazólico ou tiadiazólico eram candidatos mais promissores (Domagk et al., 1946). Para a síntese dos compostos sulfa-tiadiazólicos eram necessários 2-amino-tiadiazóis que, por sua vez, podiam ser obtidos a partir de tiossemicarbazonas. Decidiu-se avaliar a atividade desses precursores sintéticos e verificou-se, surpreendentemente, que algumas tiossemicarbazonas, especialmente aquelas derivadas de benzaldeídos (como o composto **19**, Figura 2.11), possuíam atividade antimicobacteriana superior não só em relação às sulfonamidas e sulfa-tiadiazóis, mas também à estreptomicina, um dos principais fármacos empregados na época contra a tuberculose (Domagk et al., 1946).

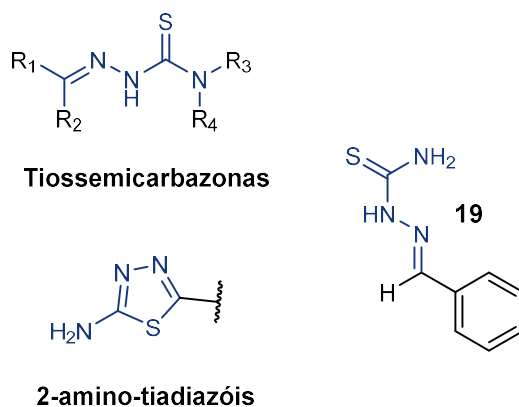


Figura 2.11. Estrutura básica das tiossemicarbazonas e de 2-amino-tiadiazóis. Estrutura de uma das tiossemicarbazonas testadas por Domagk e colaboradores (Domagk et al., 1946).

Uma das tiossemicarbazonas avaliadas *in vitro*, a tiacetazona (Figura 2.12), avançou para estudos *in vivo* e rapidamente começou a ser usada em ambiente clínico, onde demonstrou alguma eficácia. Apesar disso, esse fármaco entrou em desuso devido aos efeitos colaterais constantemente observados e à disponibilidade de terapias mais eficazes. O uso de tiacetazona está comumente associado à náusea, vômito, anorexia, tontura, dor de cabeça, visão embaçada e, em menor extensão, à anemia, conjuntivite, eritema, agranulocitose, entre tantos outros efeitos nocivos (“Thiacetazone”, 1951). A Organização Mundial da Saúde, recomendou que essa substância não seja prescrita à pacientes portadores de HIV, já que neles são observados efeitos especialmente tóxicos, como a síndrome de Steven-Johnson (Nunn; Porter; Winstanley, 1993) – reação cutânea grave, manifestada por erupções cutâneas dolorosas, bolhas e

descamações da pele e mucosa. No entanto, a necessidade de um tratamento barato tem mantido seu uso até hoje em algumas regiões, principalmente em partes da África, Ásia e América do Sul, onde é comumente administrada em combinação com a isoniazida (Nunn; Porter; Winstanley, 1993).

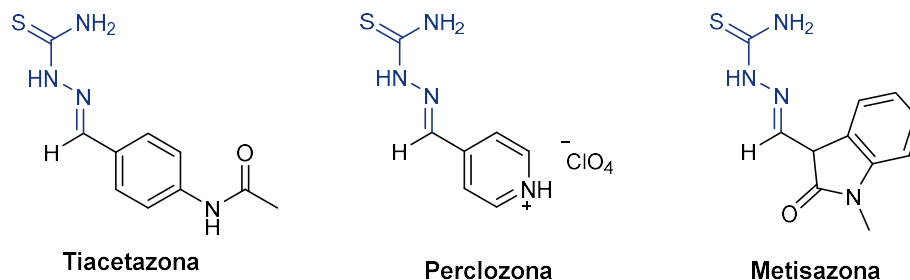


Figura 2.12. Tiossemicarbazonas utilizadas no tratamento de tuberculose (tiacetazona e perclozona) ou investigada como agente profilático contra a varíola (metisazona).

Em 2012, outra tiossemicarbazona começou a ser empregada no tratamento de tuberculose resistente a múltiplas drogas, a perclozona (Figura 2.12). Até o momento, esse fármaco foi aprovado somente pela federação Russa e sua eficácia e segurança são questionáveis em grande parte devido à falta de transparência envolvendo tanto os estudos clínicos, como o processo de aprovação (Lessem, 2016). Foi demonstrado que essa molécula, assim como a tiacetazona, atua como pró-fármaco, sendo ativado pela monooxigenase EthA. No entanto, essa enzima também está envolvida na ativação de fármacos de segunda linha, como a etionamida e a protionamida, e aparece mutada em muitas cepas de micobactérias resistentes, levantando a hipótese de que haja em muitos casos resistência prévia a perclozona devido a tratamentos anteriores com o etionamida e protionamida (Lessem, 2016).

Após a eficácia de algumas tiossemicarbazonas no tratamento da tuberculose, essa classe foi avaliada em camundongos infectados pelos vírus da varíola, tendo sido capazes de reduzir a mortalidade desses animais. Esses resultados foram bastante animadores e motivaram estudos clínicos em humanos envolvendo uma das tiossemicarbazonas, a metisazona (Fenner et al., 1988), Figura 2.12. Os resultados, no entanto, indicaram que essa substância era inútil no tratamento da doença. Estudos clínicos posteriores buscaram avaliar sua eficácia como agente profilático em pacientes já vacinados. Os poucos ensaios clínicos realizados sugerem que a metisazona de fato exerce alguma atividade protetora, reduzindo o risco de infecção pelo vírus da varíola (Fenner et al., 1988). Essa substância, no entanto, não foi mais explorada devido a erradicação do vírus pela ampla vacinação global (Weiss et al., 2004).

Atualmente, as tiossemicarbazonas são conhecidas por seu vasto espectro de atividades biológicas. É possível encontrar moléculas dessa classe não só com ação antimicrobacteriana e antiviral, mas também várias delas com eficácia contra parasitas, fungos e, em especial, câncer (De Siqueira et al., 2019). Uma busca na plataforma Scopus pelos termos “thiosemicarbazone OR thiossemicarbazones” resultou em 9765 artigos originais publicados entre 1922 e 2025. Há um grande estouro no número de publicações em 1951, movido principalmente pelas investigações envolvendo a atividade antimicrobacteriana dessa classe. Após esse ano, há um declínio nas publicações e o interesse por essa classe passa a reemergir somente no final da década 90, quando é possível observar o crescimento progressivo de artigos publicados (Figura 2.13).

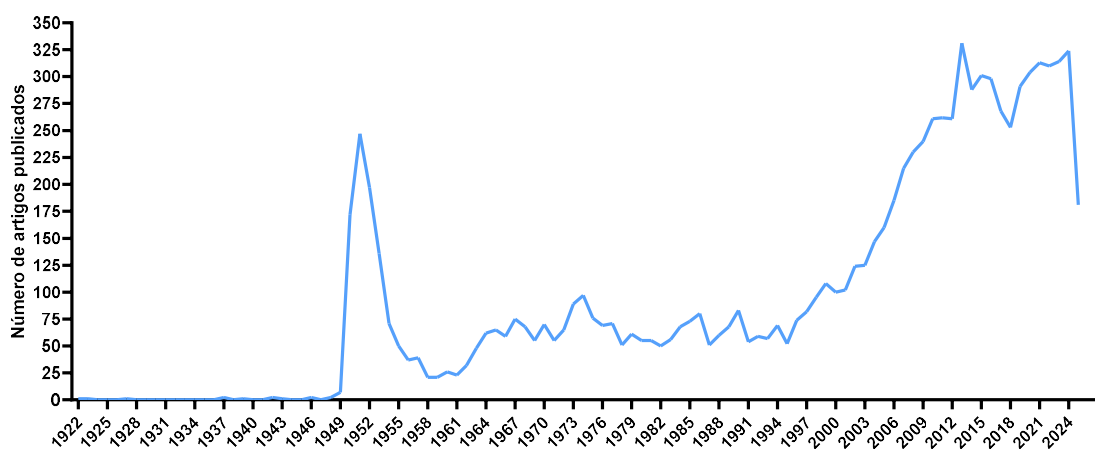


Figura 2.13. Número de artigos originais encontrados pela plataforma Scopus pela busca com os termos “(thiosemicarbazone OR thiossemicarbazones)”.

Quando os termos *cancer* e *anticancer* são incluídos na busca [“(thiosemicarbazone OR thiossemicarbazones) AND (cancer OR anticancer)”], 1639 artigos originais são encontrados no período de 1951 e 2025, com um aumento contínuo e considerável no número de publicações a partir do início dos anos 2000 (Figura 2.14). Esse dado indica que o interesse reemergente pelas tiossemicarbazonas a partir do fim do século passado foi impulsionado em grande parte por sua atividade anticâncer – foco do presente trabalho de tese.

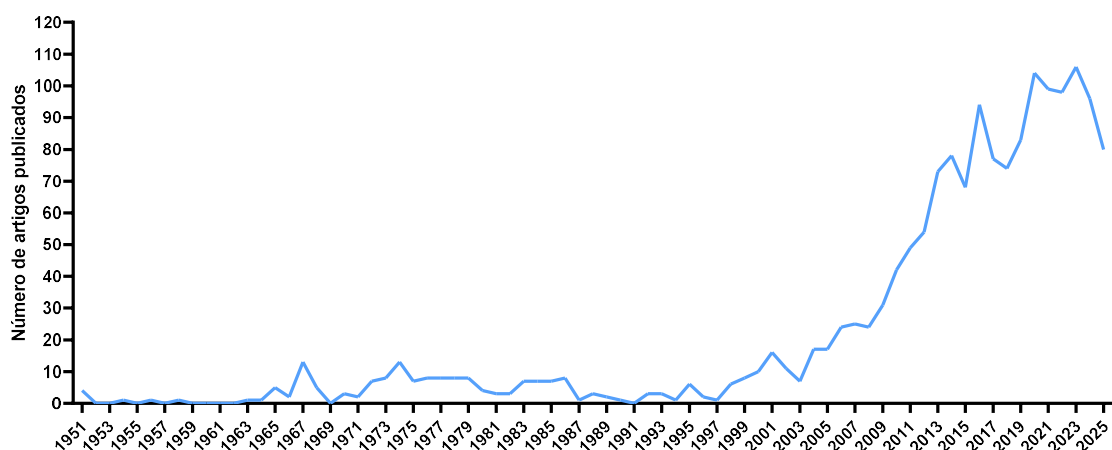


Figura 2.14. Número de artigos originais encontrados pela plataforma Scopus pela busca com os termos [“(thiosemicarbazone OR thiossemicarbazones) AND (cancer OR anticancer)”].

As tiossemicarbazonas contendo um grupo α -*N*-heterocíclico (ou seja, um anel heterocíclico nitrogenado, cujo nitrogênio encontra-se ligado ao carbono alfa em relação ao grupamento hidrazônico das tiossemicarbazonas) são provavelmente os representantes mais estudados dessa classe de moléculas (Figura 2.15). A presença do nitrogênio nesta posição do heterociclo dá a essas moléculas excelentes propriedades anticâncer (Heffeter et al., 2019). A 2-piridina-carboxialdeído-tiossemicarbazona (substância **20** na Figura 2.15) foi uma das primeiras tiossemicarbazonas do tipo avaliada contra essas neoplasias. Observou-se que **20** foi capaz de aumentar a sobrevivência de camundongos com leucemia (Brockman et al., 1956). French e Blanz, em seguida, descreveram tiossemicarbazonas com outros anéis heterocíclicos conectados ao carbono imínico das tiossemicarbazonas. Os resultados foram decepcionantes, levando os autores a proporem que a presença do nitrogênio heterocíclico na posição em questão era essencial para uma ação anticâncer significativa e que essa atividade biológica poderia estar relacionada a capacidade quelante dessas substâncias (Agrawal; Sartorelli, 1978; French; Blanz, 1965), uma vez que o grupo de heteroátomos “*N-N-S*” tornaria essas moléculas excelentes ligantes tridentados para uma variedade de metais de transição (Figura 2.15).

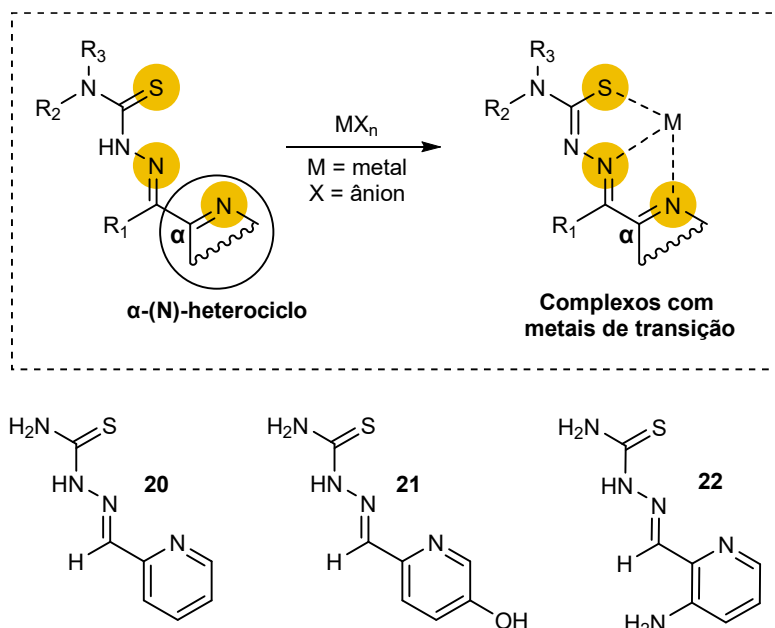


Figura 2.15. Esqueleto principal de uma tiossemicarbazona α -(N)-heterocíclica e estrutura geral de complexos formados entre essas moléculas e metais de transição. Os pontos de coordenação desses ligantes encontram-se destacados em amarelo. Estrutura das primeiras tiossemicarbazonas contendo o grupo “N-N-S” (**20-22**) avaliadas em estudos clínicos para o tratamento de câncer.

A primeira tiossemicarbazona a alcançar a fase de estudos clínicos para o tratamento de câncer foi a 5-hidroxi-2-formilpiridina-tiossemicarbazona (**21**, Figura 1.15). Foi testada em 13 pacientes durante a fase I das investigações clínicas, 5 dos quais possuíam leucemia e os 8 restantes apresentavam tumores sólidos. A substância não demonstrou efeito anticancerígeno em nenhum dos pacientes com tumores sólidos. Notou-se alguma atividade antileucêmica nos demais participantes do estudo, mas os efeitos colaterais impediram que essa molécula continuasse a ser investigada (DeConti et al., 1972). O fracasso dessa molécula também foi fortemente associado à sua baixa meia-vida – resultado da rápida formação e eliminação do conjugado glucuronídeo (DeConti et al., 1972).

Em 1992, outro candidato promissor dessa classe surgiu (Liu; Lin; Sartorelli, 1992) – a triapina (**22**, Figura 2.15). Essa tiossemicarbazona demonstrou ser um potente inibidor da ribonucleotídeo redutase (RNR), enzima-chave na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, etapa essencial na síntese de DNA (Finch et al., 2000). Apesar de ser considerado um de seus principais mecanismos de ação, o exato modo de inibição dessa enzima ainda é debatido. Um possível mecanismo envolve a formação de complexos de Fe(III) no meio intracelular. Esses complexos seriam capazes de gerar, por meio de um ciclo redox entre Fe(II) e Fe(III), espécies reativas de oxigênio (ROS) responsáveis por extinguir o radical tirosina

presente no sítio catalítico da enzima, tornando-a inativa (Shao et al., 2006a). Por outro lado, o complexo de ferro com a triapina poderia reduzir diretamente a enzima, conforme indicado por um estudo mais recente (Aye; Long; Stubbe, 2012). Até o momento, essa molécula foi avaliada em mais de 30 estudos clínicos, muitos dos quais combinando-a com outros quimioterápicos (Heffeter et al., 2019). Esses estudos indicam uma ação mais expressiva em cânceres hematológicos que em tumores sólidos (em linha com o perfil exibido pelo derivado **21**) (Miah; Harrington; Nutting, 2010).

A empresa *Critical Outcome Technologies Inc.* descobriu por meio de sua ferramenta computacional de aprendizado de máquina, chamada CHEMSAS, uma nova tiossemicarbazona promissora contra o câncer. Essa molécula recebeu o nome de **COTI-2** (Figura 2.16), em alusão às iniciais da própria empresa. Essa molécula demonstrou potente atividade em uma variedade de linhagens celulares de câncer, independente do tecido de origem (Salim et al., 2016b). É sugerido que a sua atividade anticâncer esteja relacionada a capacidade dessa molécula restaurar a função da proteína p53 selvagem e facilitar a reorganização estrutural de suas versões mutadas, atuando como uma chaperona (Lindemann et al., 2019; Şimşek et al., 2025; Synnott et al., 2020). Em uma publicação recente, foi proposto que esse efeito sob a proteína p53 não ocorre devido a uma interação direta com a COTI-2. Ao invés disso, parece que a reativação da p53 é dependente de zinco: a tiossemicarbazona deve complexar com íons Zn(II) e o complexo em si deve atuar como uma chaperona, entregando às proteínas mutantes o zinco que lhe foi “perdido” devido às mutações (Şimşek et al., 2025). Essa molécula encontra-se em estudo clínico (NCT02433626) para o tratamento de câncer ginecológico recorrente (Lindemann et al., 2019; Salim et al., 2016a; Westin et al., 2018). Recentemente, também foi verificado que a formação de complexos de cobre (II) com essa tiossemicarbazona está associado a mecanismos de resistência desenvolvido por algumas células contra essa molécula. Em maior detalhe, foi proposto que na presença de íons Cu(II), a COTI-2 forma complexos estáveis, contendo a glutatona (GSH) como um dos ligantes. Esses complexos são então reconhecidos como substratos pela bomba de efluxo ABCC1, sendo transportados para fora das células (Bormio Nunes et al., 2020). Pela primeira vez um estudo demonstrou que íons cobre II não são capazes somente de influenciar o mecanismo de ação de tiossemicarbazonas contendo α -N-heterocíclico (aumentando sua citotoxicidade), mas também influenciam mecanismos de resistência a essas substâncias.

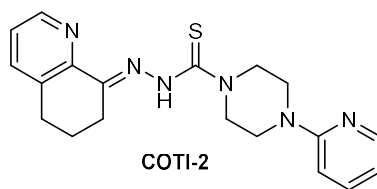


Figura 2.16. Tiossemicarbazona desenvolvida pela *Critical Outcome Technologies Inc* como um potente agente anticâncer capaz de ativar a proteína p53.

Foi demonstrado pelo grupo liderado por Des R. Richardson que a atividade antiproliferativa potente de diversas tiossemicarbazonas acopladas a um α -N-heterociclo está fortemente associada à formação de complexos de Fe(III) e Cu(II) no meio intracelular (Dharmasivam et al., 2025; Lovejoy et al., 2011). Após uma série de modificações no esqueleto estrutural básico de tiossemicarbazonas e semicarbazonas, o grupo reportou em 2004 os primeiros compostos da série DpT (Figura 2.17), a mais amplamente investigada e conhecida até o momento (Whitnall et al., 2006; Yuan; Lovejoy; Richardson, 2004). Acredita-se que a redução da biodisponibilidade de íons ferro, causada pela capacidade quelante dessa nova série, induza a interrupção do ciclo celular e expressão aumentada do supressor de metástase, NDRG1. Além disso, foi demonstrado que essas tiossemicarbazonas formam complexos de Fe(III) e Cu(II) com ciclo redox ativo, capazes de causar danos pela geração de ROS (Dharmasivam et al., 2025).

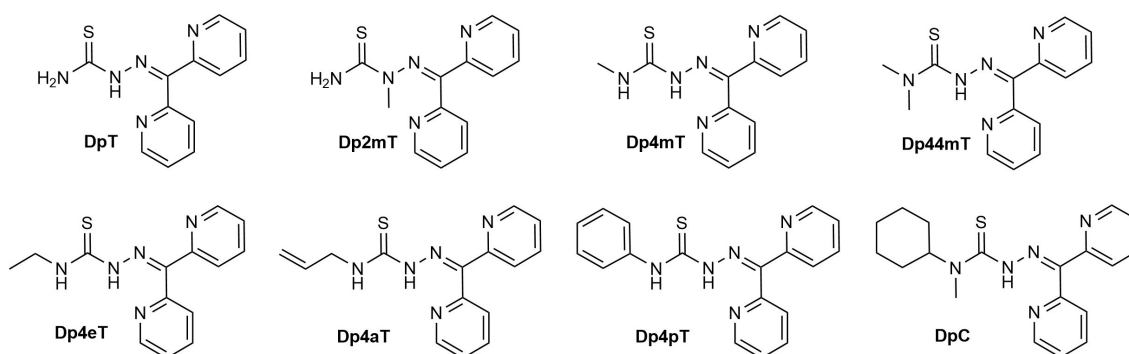


Figura 2.17. Estrutura das moléculas da série DpT (Yuan; Lovejoy; Richardson, 2004).

Em específico, dois desses derivados, DpC e Dp44mT atuam como substratos da glicoproteína-p e são expulsos da célula por essas bombas de efluxo, mas também são deslocados para o interior de lisossomos pela ação dessas mesmas proteínas. Durante o processo de endocitose, a membrana celular torna-se invertida: a camada de fosfolípidos que correspondia à porção interna da membrana celular, torna-se a porção externa da membrana do

lisossomo. A glicoproteína-p que foi “transferida” para o lisossomo no processo de endocitose ainda tem o seu sítio ativo voltado para o citoplasma celular, mas o resto de sua estrutura é direcionado para o interior do lisossomo e não para o exterior da célula – desse modo, a proteína que antes bombeava as moléculas para fora da célula, passa a bombeá-las do citoplasma para o interior dos lisossomos. A protonação dessas moléculas em virtude do baixo pH supostamente colabora para que fiquem presas no lisossomo. Em seguida, formam complexos com íons Cu(II) e geram ROS, espécies responsáveis por aumentar a permeabilidade da membrana lisossomal, causando liberação de proteases e, fatalmente, resultando em apoptose (Stacy et al., 2016).

Devido à potente atividade anticâncer e a seu perfil farmacológico favorável em animais, o derivado DpC foi promovido para estudos clínicos de fase I (NCT02688101). Ele apresenta diversas vantagens em relação ao seu análogo de primeira geração, o Dp44mT. A exemplo, ao contrário do derivado Dp44mT, o Dpc não induz fibrose cardíaca. Além disso, o derivado Dp44mT sofre rápida desmetilação *in vivo*, o que pode estar relacionado a sua rápida eliminação ($T_{1/2} = 1.7$ h) em comparação ao seu análogo de segunda geração, o DpC ($T_{1/2} = 10.7$ h) (Sestak et al., 2015). Apesar do grande favoritismo do DpC, resultados preliminares indicaram que ele causa dor muscular ao ser administrado por via oral, o que resultou no encerramento do estudo clínico. Essa observação clínica pode estar supostamente associada a um efeito adverso conhecido das tiossemicarbazonas α -N-heterocíclicas: a oxidação do íon ferro presente na hemoglobina e mioglobina, impedindo sua ligação ao oxigênio molecular (Azad et al., 2025). Um estudo anterior já havia demonstrado que a triapina e o Dp44mT levavam a formação *in vivo* de metemoglobina e metemioglobina (formas oxidadas da hemoglobina e mioglobina, respectivamente). O derivado DpC, embora não fosse completamente isento desse problema, causava-o em menor extensão (Quach et al., 2012). Parece que os complexos de ferro (III) formados *in vivo* com essas tiossemicarbazonas são os responsáveis diretos pela oxidação do ferro (II) presente no grupo heme. A proximidade entre o nitrogênio terminal das tiossemicarbazonas e o ácido carboxílico do grupo heme parece ter relação com a eficácia da conversão, de modo que a adição de grupos volumosos nessa posição, como no DpC, reduz esse processo (Basha et al., 2016). Estudos posteriores do grupo, focaram em desenvolver derivados com ação anticâncer mais pronunciada e efeitos hematológicos reduzidos (Dharmasivam et al., 2023, 2025; Kaya et al., 2024). A introdução de grupos volumosos ao redor dos pontos de coordenação tem tido um papel importante para alcançar esses objetivos.

Atualmente, nosso grupo tem se interessado em desenvolver derivados de compostos naturais, como as chalconas, uma classe relevante na química medicinal. São amplamente distribuídas em espécies vegetais e apresentam diversas atividades biológicas, como antimicrobiana (Burmaoglu et al., 2017), anticancerígena (Sakagami et al., 2017), antiparasitária (Moreno-Rodríguez et al., 2014) e antiviral (Elkhalifa et al., 2021). O amplo potencial terapêutico das chalconas e das tiossemicarbazonas, encorajou a síntese e a investigação biológica de híbridos chalconas-tiossemicarbazonas (**CT**, **23-29** na Figura 2.18). Em um trabalho recente desenvolvido por nosso grupo foi demonstrado que híbridos **CT** são capazes de reduzir a viabilidade de uma linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) *in vitro* ($IC_{50} = 20,90 - 50,52 \mu M$) e que essa capacidade pode estar associada a alguma disfunção mitocondrial causada pelos compostos já que um dos híbridos foi capaz de reduzir o consumo de oxigênio da célula dependente de ATP em 60%, mesmo quando avaliado em uma condição que antecipa perdas mais significativas de viabilidade celular (Rodrigues et al., 2022). Além disso, nosso grupo demonstrou os efeitos anti-leishmania dos mesmos híbridos **CT** contra a *Leishmania amazonensis* (Mendes et al., 2019). As substâncias apresentaram IC_{50} contra a forma amastigota intracelular na faixa de 3,40-5,95 μM , sendo o derivado não substituído aquele que apresentou maior índice de seletividade ($IS = 12,05$) (Mendes et al., 2019).

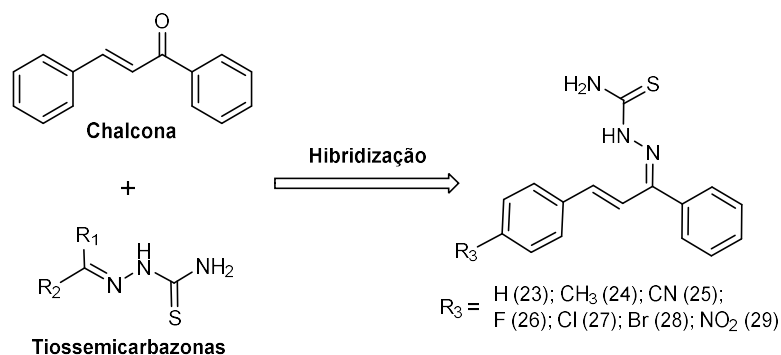


Figura 2.18. Estrutura dos híbridos Chalcona-Tiossemicarbazonas preparados e avaliados pelo grupo NUSQUIMED.

2.3.1. Justificativas e Objetivos

Anteriormente, nosso grupo de pesquisa (NUSQUIMED-Núcleo de Síntese e Química Medicinal) descreveu a atividade biológica de sete tiossemicarbazonas derivadas de chalconas (**CT**) frente à linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2 (Rodrigues et al., 2022) e contra parasitos do gênero *Leishmania* (Mendes et al., 2019). Em células HepG2, os compostos

apresentaram IC_{50} na faixa de 20,90-50,52 μM , após 24 horas de tratamento. Já contra a *Leishmania amazonensis* essas substâncias mostraram excelente eficácia com 48 horas de tratamento (IC_{50} = 3,40-5,95 μM), e baixa toxicidade para macrófagos murinos não infectados (LD_{50} = 32,48-56,35 μM), garantindo índices de seletividade de 7,27 a 12,05 (LD_{50}/IC_{50}). Diante desses resultados, o presente trabalho propôs expandir a série CT (Figura 2.19), testando os novos compostos frente à linhagem de hepatocarcinoma Huh-7 e à espécie *Leishmania infantum*, causadora da leishmaniose visceral. Além disso, oito híbridos azachalconas-tiossemicarbazonas (CPT), com um dos anéis benzênicos substituído por piridina, foram planejados com o intuito de avaliar se essa substituição levaria ao aumento da atividade anti-hepatocarcinoma e anti-leishmania *in vitro*, uma vez que relatos na literatura apontam que a presença do anel piridínico diretamente conectado ao carbono sp^2 de tiossemicarbazonas é capaz de potencializar os efeitos citotóxicos em células de câncer, conforme discutido na introdução deste capítulo (Heffeter et al., 2019). Por fim, considerando que a importância da ligação dupla vinílica para a atividade dos híbridos CT ainda não é clara, quatro análogos saturados (HCT1-2 e HCPT1-2) foram também incluídos nas investigações. No total, foram sintetizados 25 derivados, dos quais oito foram testados contra células Huh-7. Os ensaios frente ao parasito (*L. infantum*) não tiveram continuidade e, portanto, não serão discutidos nesta tese.

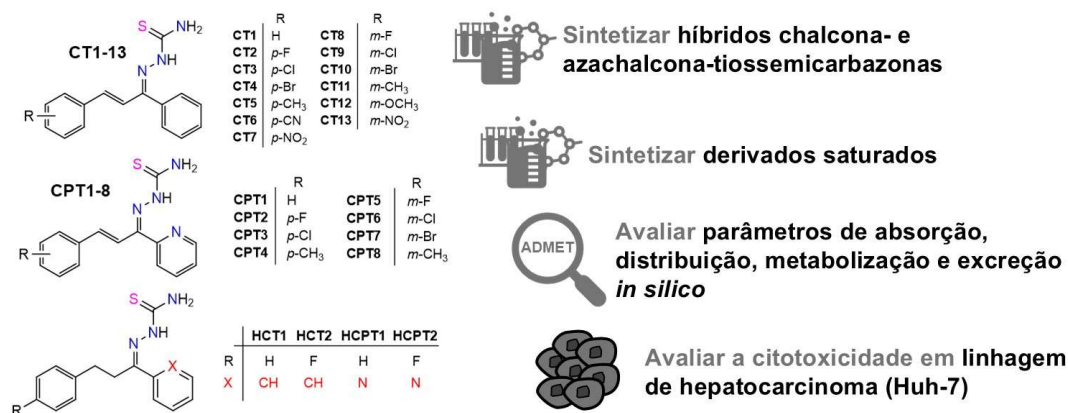
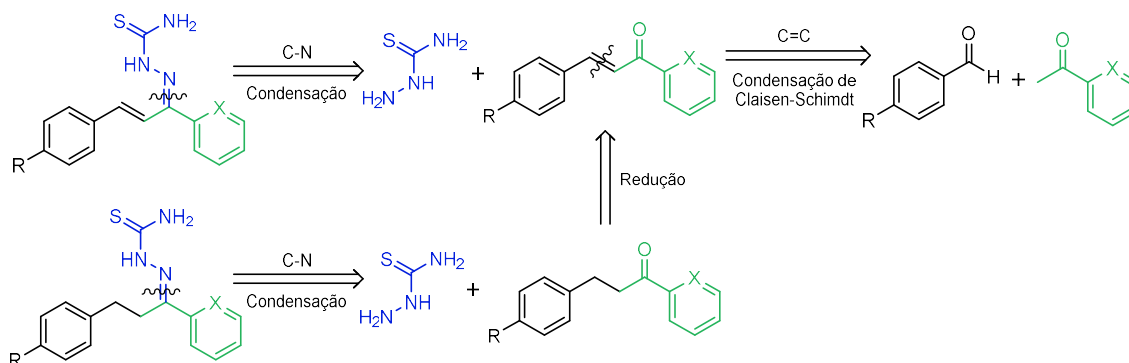


Figura 2.19. Estrutura das moléculas planejadas e principais objetivos do trabalho.

O Esquema 2.1 apresenta a análise retrosintética para a obtenção das chalconas-tiossemicarbazonas. Pela desconexão da ligação C=N obtêm-se a tiossemicarbazida e as chalconas ou azachalconas como precursores das tiossemicarbazonas. A desconexão da ligação olefínica C=C indica que aldeídos e aril-cetonas podem ser empregados em uma condensação de Claisen-Schmidt para a formação dos precursores α,β -insaturados. Por fim, as di-

hidrochalconas e di-hidroazachalconas, podem ser preparadas pela hidrogenação catalítica de chalconas ou azachalconas.



Esquema 2.1. Análise retrossintética das chalconas-tiossemicarbazonas e seus análogos estruturais.

O trabalho também buscou empregar ferramentas de estudo *in silico* para avaliar parâmetros de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME), a fim de prever se os híbridos possuem propriedades farmacológicas favoráveis.

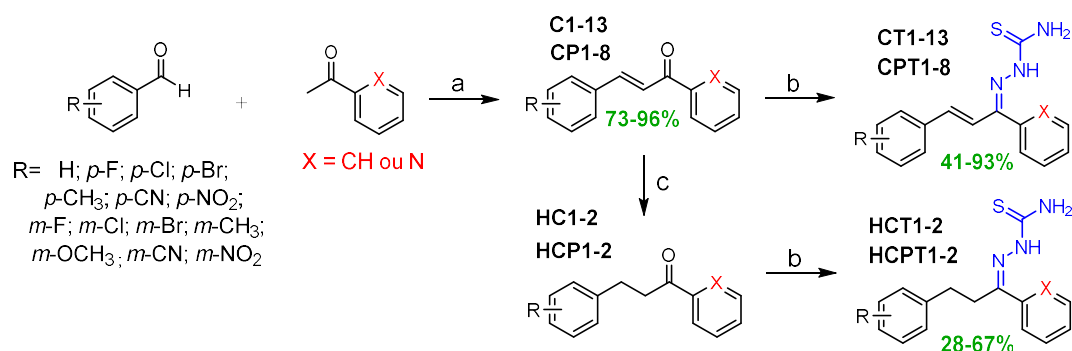
Assim, os objetivos envolvendo as tiossemicarbazonas foram:

- Sintetizar e purificar os 25 derivados de chalconas e azachalconas apresentados na Figura 31, sendo 11 inéditos (CT10-11; CPT2; CPT5-CPT8; HCT2 e HCPT1-2);
- Caracterizar todos os compostos por Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e ^{13}C), incluindo técnicas 2D (COSY, NOESY, HSQC e HMBC). Para os compostos inéditos, caracterizá-los também por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS);
- Prever os espectros de RMN de ^{13}C por cálculos DFT para confirmar as atribuições experimentais;
- Prever parâmetros de ADME e fármacossimilaridade pela plataforma SwissADME;
- Investigar a atividade anticâncer em células Huh-7;
- Investigar o mecanismo de ação em células Huh-7.

2.3.2. Resultados e discussão

2.3.2.1. Síntese dos híbridos chalconas-tiossemicarbazonas e seus análogos estruturais

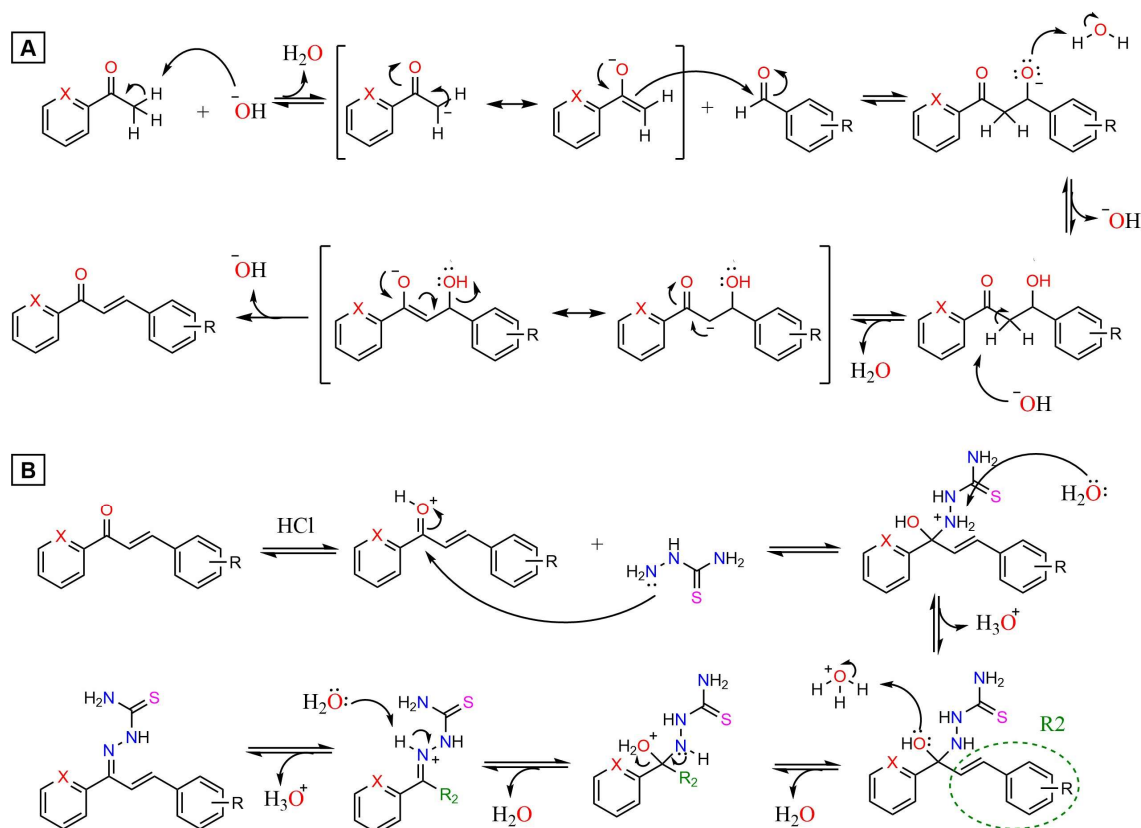
O Esquema 2.2 mostra a sequência de reações utilizadas para a obtenção de todas as tiossemicarbazonas. As chalconas (**C1-13**) e azachalconas (**CP1-8**) foram obtidas em bons rendimentos (73-90%) pela tradicional reação de condensação de Claisen-Schmidt entre a metil-cetona adequada (acetofenona ou 2-acetilpiridina) e benzaldeídos substituídos. Os híbridos **CT1-13** e **CPT1-8** foram preparados pela reação entre a tiossemicarbazida e as chalconas ou azachalconas, com 41-93% de rendimento.



Esquema 2.2. Síntese dos híbridos chalconas- e azachalconas-tiossemicarbazonas. Reagentes e condições: (a) NaOH, EtOH, H₂O, 0°C (15-20 min) e temperatura ambiente (1,5 h); (b) tiossemicarbazida, EtOH, HCl, Refluxo, 4-6 h; (c) H₂, Pd/C, CH₂Cl₂, temperatura ambiente, 1-2 h.

Inicialmente, a acetofenona ou a 2-acetil-piridina deve ser desprotonada pelo íon hidróxido presente no meio aquoso (Esquema 2.3). O enolato formado, cuja carga negativa é parcialmente estabilizada pela conjugação com a carbonila, é a espécie nucleofílica nesta reação. Ele ataca a carbonila do aldeído, formando uma beta-hidroxi-cetona, que sofre uma nova desprotonação. O novo intermediário aniônico perde um íon hidróxido, resultado nas chalconas e azachalconas desejadas. Então, resumidamente, o enolato formado pela desprotonação das cetonas é convertido em um aldol que desidrata por um mecanismo E1cB (*Elimination Unimolecular conjugate Base*: eliminação unimolecular via base conjugada) dando origem às cetonas α,β -insaturadas (Clayden; Greeves; Warren, 2012). A reação entre as chalconas e a tiossemicarbazida deve seguir um mecanismo de condensação simples. A protonação do oxigênio carbonílico, torna este grupo mais eletrofílico, facilitando a reação com a tiossemicarbazida. O ataque nucleofílico gera uma espécie de hemiaminal que, após protonação da hidroxila, sofre eliminação de água gerando um grupo imína – que, no presente caso, recebe o nome especial de tiossemicarbazona. Este é o mesmo mecanismo envolvido na

formação das hidrazonas, compostos estruturalmente similares (Clayden; Greeves; Warren, 2012). De maneira geral, o ataque de α -nucleófilos (como é o caso da tiossemicarbazida) a aldeídos e cetonas é rápido e não representa a etapa lenta da reação, na maioria dos casos. Assim, essa primeira etapa do mecanismo normalmente não requer catalise ácida – apesar disso, a protonação da carbonila foi representada pois o mecanismo ainda é bastante discutido dessa forma na literatura. Normalmente, a etapa lenta dessa reação é a desidratação. O ácido catalisa esta etapa pela protonação da hidroxila, que leva a formação de um grupo de saída muito melhor, a água (Kölmel; Kool, 2017). As di-hidrochalconas-tiossemicarbazonas e di-hidroazachalconas-tiossemicarbazonas devem ser formadas pelo mesmo mecanismo.



Esquema 2.3. Mecanismos propostos para a formação das chalconas e azachalconas (A) e das tiossemicarbazonas. X corresponde à CH ou N.

A hidrogenação das chalconas **C1-2** e das azachalconas **CP1-2**, catalisada por Pd/C, mostrou-se problemática, uma vez que em todos esses casos não somente a dupla ligação vinílica foi reduzida. Durante a redução de **C1**, a CCD revelou a formação de dois produtos distintos, indicando que a dupla ligação vinílica não foi a única função a ser hidrogenada. Além da di-hidro-chalcona desejada (**HC1**), o 1-hidroxi-1,3-difenilpropano (**HC1-OH**) também foi

observado por RMN (Figuras 2.20 e 2.21). No espectro de RMN de ^1H é possível distinguir facilmente os sinais referentes aos hidrogênios 3-7 de **HC1**, que aparecem acima de 7,50 ppm. Isso ocorre devido ao efeito desprotetor que a carbonila exerce sobre o anel, fazendo com que seus sinais sejam observados em campo mais baixo se comparados aos hidrogênios correspondentes do álcool **HC1-OH**. Os sinais dos grupos metileno de **HC1** foram observados como tripletos, como esperado, comprovando a ocorrência da hidrogenação. A presença do subproduto **HC1-OH** é notada pelo multipletto em 4,53, atribuído ao CH diretamente conectado à hidroxila. Além disso, os multipletos em campo alto – referentes aos demais hidrogênios alifáticos (H8 e H9) – e o dupletto em 5,30 ppm – atribuído à hidroxila – confirmam a presença da cadeia alifática do subproduto **HC1-OH**.

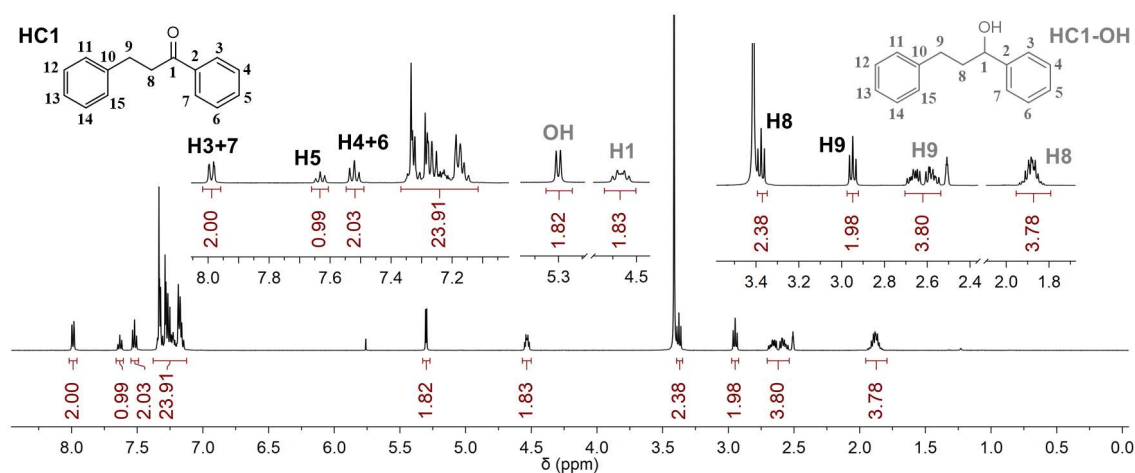


Figura 2.20. RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) da mistura obtida na etapa de hidrogenação da chalcona **C1**.

O RMN de ^{13}C também é bem elucidativo, confirmando a mistura formada por **HC1** e **HC1-OH**. Na figura 2.21 são destacados os sinais de carbono mais característicos de cada produto de hidrogenação. A presença de **HC1** é notada pelos sinais da carbonila em 199,6 ppm e dos carbonos metilênicos em 41,6 e 32,0 ppm. O sinal em 72,1 ppm indica a presença de um CH bem desprotegido – ligado a oxigênio –, corroborando a hidrogenação da carbonila e formação de **HC1-OH**. Os sinais atribuídos a **HC1-OH** são extremamente similares aos observados em espectros reportados na literatura para essa substância pura em DMSO-d_6 (Enamide Ltd. Catálogo: EN300-56231) e em clorofórmio deuterado (Deng et al., 2019).

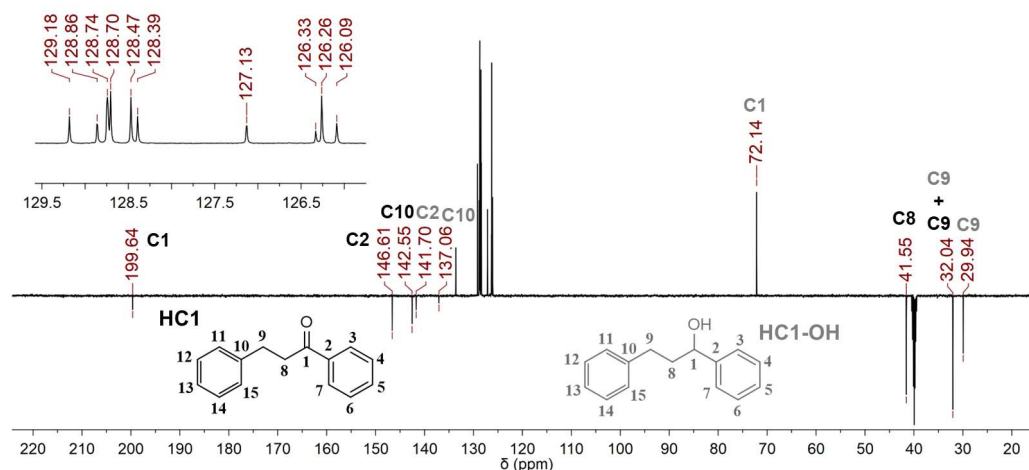


Figura 2.21. RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 , 125 MHz) da mistura obtida na etapa de hidrogenação da chalcona **C1**.

A hidrogenação não seletiva também ocorreu na síntese de **HC2**, em que a dihidrochalcona fluorada e, supostamente, o 2-hidroxi-1,3-difenilpropano fluorado foram observados por CCD (RMN da mistura não foi obtido). Esse subproduto resultante da hidrogenação excessiva das chalconas é relativamente apolar. Além disso, não deve reagir com a tiossemicarbazida na etapa seguinte, já que não possui uma carbonila ou um outro centro eletrofílico adequado para sofrer ataque nucleofílico. Por esses motivos, foi antecipado que seria razoavelmente fácil retirá-los na próxima etapa por meio da lavagem das tiossemicarbazonas com hexano. Dessa maneira, as di-hidrochalconas não foram isoladas e a mistura obtida na hidrogenação foi utilizada sem purificação prévia. Essa estratégia se mostrou eficaz, já que foi possível obter os híbridos di-hidrochalcona-tiossemicarbazonas em sua forma pura, evitando a necessidade de realizar cromatografia em coluna para purificar seus precursores - uma etapa que certamente adicionaria custos e exigiria bastante tempo. Apesar da síntese e purificação de **HCT1-2** ter sido concluída, o rendimento global desses compostos foi baixo (28-37%), em virtude da quantidade reduzida de di-hidrochalcona obtida na etapa anterior.

Na redução de **CP1-2**, também ocorreu a hidrogenação da carbonila, levando ao 1-hidroxi-1-piridin-2-il-3-fenilpropano correspondente. A presença da piridina aumenta a polaridade desse subproduto, por isso, foi previsto que haveria dificuldade para retirá-lo por lavagem com hexano na etapa seguinte (síntese da tiossemicarbazona). Por esse motivo, as di-hidroazachalconas, diferente de **HC1-2**, foram isoladas por cromatografia em coluna (27-63%) e reagidas na sequência com a tiossemicarbazida, rendendo **HCPT1-2** em 55-67%. As Figuras 2.22 e 2.23 mostram o espectro de RMN de ^1H e ^{13}C das di-hidroazachalconas, comprovando

a sua obtenção e purificação. Experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC) foram realizados para **HCP1**, a fim de auxiliar a correta atribuição de todos os sinais nos espectros de ^1H e ^{13}C . Uma vez que o átomo de flúor deve influenciar somente os deslocamentos químicos do anel onde se encontra conectado, a realização desses experimentos 2D pôde ser dispensada para **HCP2** – a comparação com seu análogo não substituído bastou para certificar as atribuições. Os tripletos em 3,50 (C8) e 2,95 (C9) confirmam a hidrogenação da ligação vinílica das azachalconas. A ausência de multipletos por volta de 4-5 ppm mostra que as dihidro-azachalconas foram devidamente separadas de seus álcoois pela cromatografia em coluna. O RMN de ^{13}C apresenta um sinal em ~200 ppm que confirma a presença da carbonila cetônica. Por fim, sinais na região de carbono alifático (39,3-28,9 ppm), indicam a formação dos grupos metileno.

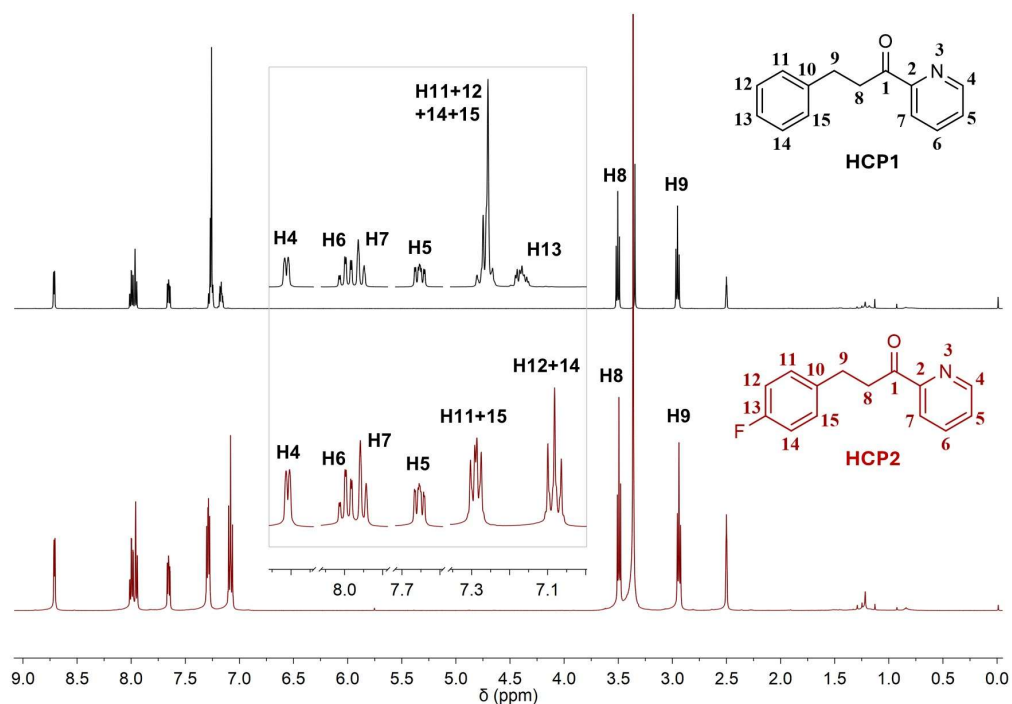


Figura 2.22. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) de **HCP1** e **HCP2** purificados por cromatografia em coluna.

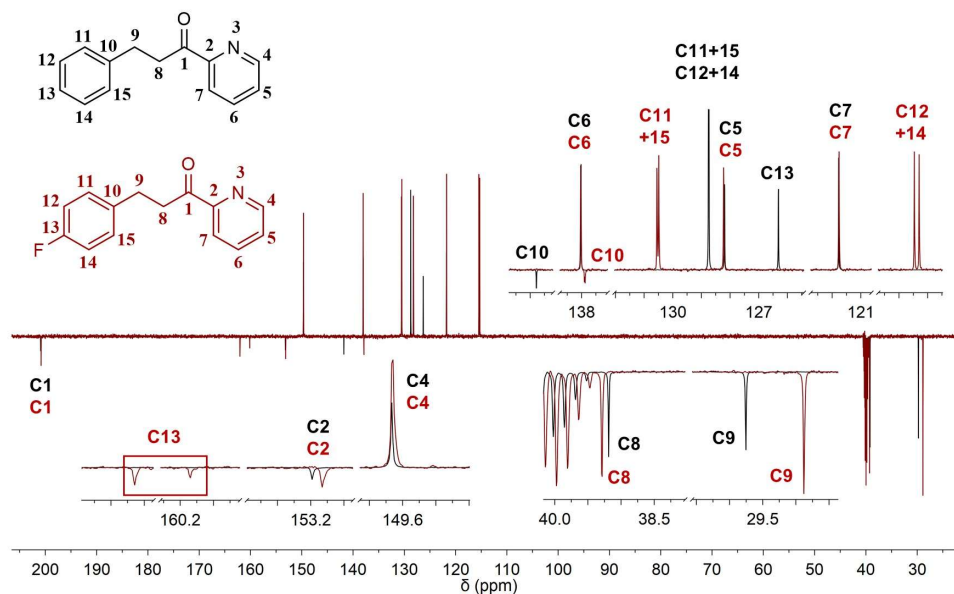


Figura 2.23. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz) de **HCP1** e **HCP2** purificados por cromatografia em coluna.

O espectro de HMBC da di-hidroazachalcona **HCP1** (Figura 2.24) mostra uma correlação à longa distância entre o tripleto em 2,96 ppm (^1H) e o sinal em 128,76 ppm (^{13}C), indicando que H9 é de fato o grupo metileno mais protegido, enquanto H8, adjacente à carbonila cetônica, é mais desprotegido. H8 está muito distante de todos os CH's aromáticos, impedindo que correlações com esses carbonos sejam observadas no espectro de HMBC.

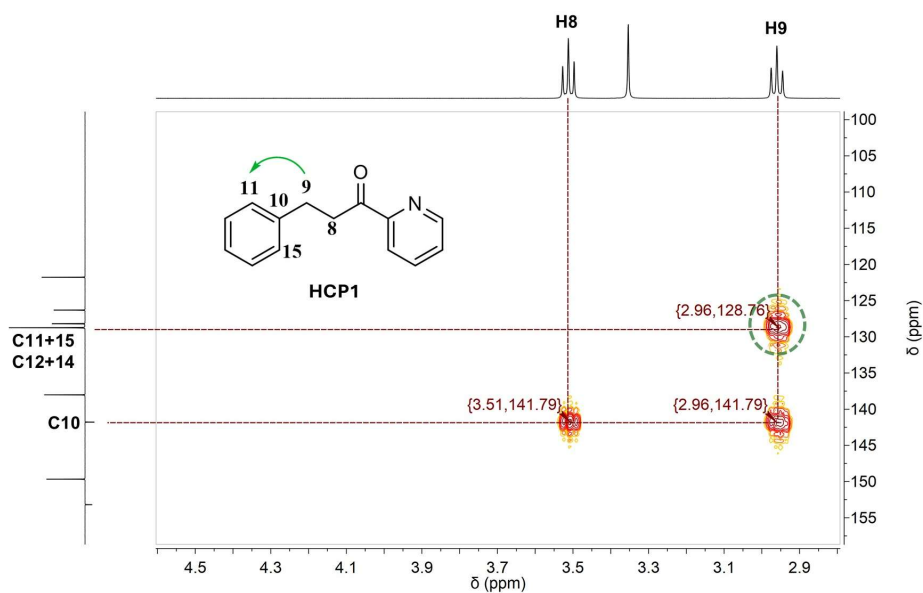
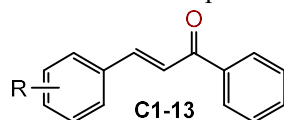


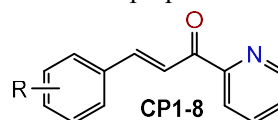
Figura 2.24. Espectro de HMBC da dihidro-azachalcona **HCP1**.

As chalconas e azachalconas foram caracterizadas somente por infravermelho e ponto de fusão (**Tabela 2.2**). Entre as chalconas, o derivado *meta*-fluorado **C8** apresentou ponto de fusão (53-56°C) bem distinto do valor que é frequentemente reportado na literatura (86-88°C). Uma busca na plataforma Scifinder permitiu a identificação de um valor mais próximo para a fusão desse derivado, de 43-45°C (Larionov et al., 2015). É possível que a grande diferença entre os pontos de fusão seja devido a existência de formas cristalográficas distintas, que fundem em diferentes temperaturas. De fato, o polimorfismo é um fenômeno comum entre as chalconas (Barsky et al., 2008; Hall et al., 2020; Price; Price, 2022). Por exemplo, a metilchalcona **C5** pode existir ao menos como três formas polimórficas distintas, que fundem em 96,5°C, 91°C e 86°C (Hall et al., 2020). Ao tentar purificar algumas das azachalconas por recristalização em etanol, notou-se que a solução aquecida adquiriu coloração verde e então amarronzada. Além disso, não foi possível recuperar material ao resfriar essa solução a temperatura ambiente. Por isso, as azachalconas passaram a ser purificadas somente por uma lavagem simples com uma mistura de metanol:água (4:6 v/v). No entanto, o ponto de fusão de algumas delas destoou bastante dos valores relatados na literatura, em especial de **CP4**, sendo possível que essa diferença seja devido a impurezas nos produtos lavados. Mesmo assim, os sólidos foram utilizados na etapa seguinte sem purificações adicionais.

Tabela 2.2. Rendimentos e pontos de fusão das chalconas e azachalconas preparadas.



R = H (**C1**); *p*-F (**C2**); *p*-Cl (**C3**); *p*-Br (**C4**); *p*-CH₃ (**C5**); *p*-CN (**C6**); *p*-NO₂ (**C7**); *m*-F (**C8**); *m*-Cl (**C9**); *m*-Br (**C10**); *m*-CH₃ (**C11**); *m*-OCH₃ (**C12**); *m*-NO₂ (**C13**)



R = H (**CP1**); *p*-F (**CP2**); *p*-Cl (**CP3**); *p*-CH₃ (**CP4**); *m*-F (**CP5**); *m*-Cl (**CP6**); *m*-Br (**CP7**); *m*-CH₃ (**CP8**)

Código	Rend. (%)	P.F. (°C)	P.F. (°C) ^{Ref}	Código	Rend. (%)	P.F. (°C)	P.F. (°C) ^{Ref}
C1	80	56-58	56-58 ^a	C12	89	59-62	58-59 ^g
C3	79	88-90	88-90 ^b	C13	90	144-146	144-145 ^j
C3	90	114-115	113-114 ^b	CP1	80	60-63	65,4-67,5 ^k
C4	91	121-123	121-123 ^b	CP2	90	88-90	90-92 ^l
C5	83	90-91	89-91 ^c	CP3	76	88-94	92-94 ^l
C6	96	154-156	154-156 ^d	CP4	83	<55	76-79 ^m
C7	93	163-165	164-165 ^e	CP5	90	70-72	74-77 ^l
C8	93	53-56	43-45 ^f	CP6	80	94-96	89-91 ^l
C9	96	76-77	74-75 ^g	CP7	90	97-98	88-92 ^l
C10	94	85-87	85-86 ^e	CP8	73	<55	-
C11	95	66-67	64-65 ⁱ				

^a(Krishnakumar; Swaminathan, 2011); ^b(Stroba et al., 2009); ^c(Hall et al., 2020); ^d(Ashtekar; Staples; Borhan, 2011); ^e(Rivett; Rosevear; Wilshire, 1979); ^f(Myers et al., 2016) ^g(Cocconcilli et al., 2008); ^h(Farid et al., 2013); ⁱ(Huang; Xie; Wu, 1988); ^k(Albaladejo; Alonso; González-Soria, 2015); ^l(Li; Shen; Shih, 2017); ^m(Yadav et al., 2020).

A análise de infravermelho confirmou a obtenção de todas as chalconas e azachalconas pela presença de uma banda de estiramento intensa em $1655\text{--}1672\text{ cm}^{-1}$, referente a carbonila cetônica duplamente conjugada (Silverstein et al., 2014). Além disso, uma banda de intensidade forte à moderada foi observada entre $972\text{ e }993\text{ cm}^{-1}$, atribuída ao dobramento fora do plano das ligações C-H olefínicas em configuração trans (Silverstein et al., 2014).

Os espectros de IV das tiossemicarbazonas apresentaram absorções na faixa de $3136\text{--}3506\text{ cm}^{-1}$ devido às vibrações de estiramento axial N-H (Figura 2.25), conforme relatado anteriormente para compostos semelhantes (Barbosa et al., 2018). A atribuição da banda de estiramento axial C=N é mais difícil de ser feita para esses compostos, já que deve ser observada em uma região onde outros modos vibracionais também são esperados, como $\nu(\text{C}=\text{C})$ e $\delta(\text{N-H})$ (Figura 2.25). Portanto, é provável que haja sobreposição dessas bandas. Apesar dessa difícil atribuição, os espectros de todas as tiossemicarbazonas não possuem as bandas de estiramento das carbonilas, indicando que essa função foi modificada pela reação com a tiossemicarbazida – o que indiretamente sugere a formação da ligação C=N. Uma banda intensa e fina, característica de dobramento C-H fora do plano de alcenos trans foi observada em $951\text{--}970\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das CTs e CPTs, confirmando a configuração trans da olefina. Nos espectros dos análogos HCTs e HCPTs, essa banda está ausente ou parcialmente suprimida, confirmando a ausência da olefina nesses compostos.

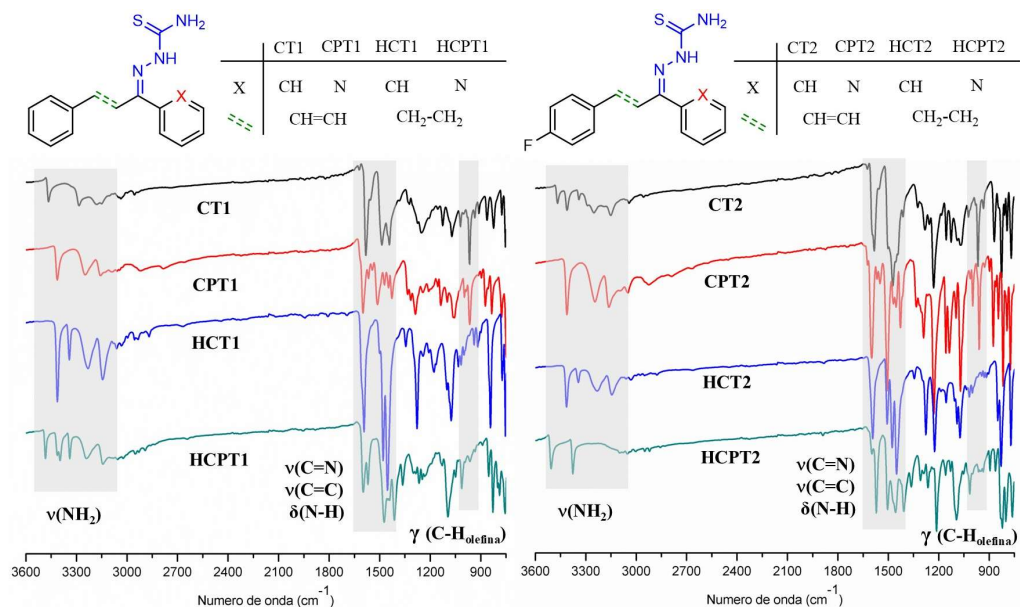


Figura 2.25. Espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas CT1-2, HCT1-2, CPT1-2, HCPT1-2.

Na literatura, a vibração de estiramento C=S tem sido atribuída em diferentes regiões do espectro infravermelho. No entanto, Wiles e colaboradores (Wiles; Gingras; Suprunchuk, 1967), após uma análise cuidadosa dos espectros de IV de várias tiossemicarbazonas, selenosemicarbazonas e seus complexos de Cu(II), chegaram à conclusão de que uma banda em torno de 830-800 cm^{-1} representaria melhor esse modo vibracional. Recentemente, alguns trabalhos atribuíram uma banda nesta região à vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$ de diferentes tiossemicarbazonas. Por exemplo, Aguirre e colaboradores (Aguirre et al., 2022) atribuíram uma absorção em 842 cm^{-1} à vibração $\nu(\text{C}=\text{S})$ de uma tiossemicarbazona derivada de antraldeído, que mudou para 820 cm^{-1} sob complexação com Zn (II). No presente trabalho, esse modo vibracional foi atribuído a uma banda de absorção em 818-849 cm^{-1} .

Ao obter os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , sinais extras inesperados foram notados, indicando claramente a presença de uma segunda espécie no meio. Esses resultados foram uma surpresa, tendo em vista que os espectros das CTs reportados em uma publicação anterior do grupo, indicavam a presença de somente uma espécie em solução (Mendes et al., 2019). A análise cuidadosa dos espectros obtidos no presente trabalho, revelou que as duas espécies observadas em solução tratavam-se dos isômeros *E* e *Z* das tiossemicarbazonas (Figura 2.26). De fato, a literatura mostra que compostos contendo uma função imina, incluindo as tiossemicarbazonas, comumente isomerizam em solução, processo que é observado em experimentos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e RMN (Afonin et al., 2020; DA SILVA et al., 2013). É possível que Mendes e colaboradores tenham realizado as análises de RMN dos híbridos CTs com soluções recentemente preparadas em DMSO- d_6 , não havendo tempo suficiente para que o processo de isomerização ocorresse em grande extensão, a ponto de permitir a fácil observação de um segundo isômero. No presente trabalho, por questões logísticas da central analítica da UFRRJ, a maior parte dos espectros dos híbridos CTs, CPTs, e de seus análogos hidrogenados, foram obtidos várias horas ou dias após a solubilização do material em solvente deuterado, permitindo que a isomerização ocorresse em grande extensão.

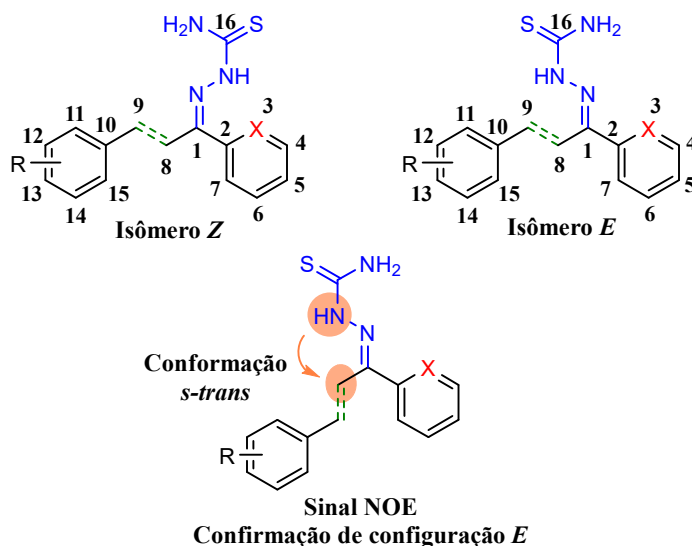


Figura 2.26. Isômeros *E* e *Z* observados nos espectros de RMN dos híbridos preparados no presente trabalho e ilustração do efeito NOE esperado para o isômero *E*.

Para alguns híbridos, os espectros foram obtidos em dois momentos: imediatamente após a dissolução e horas ou dias depois. Experimentos de NOESY foram então utilizados para atribuir a configuração das espécies majoritária e minoritária presentes no meio. A forma isomérica que apresentasse um sinal cruzado devido a interação à distância entre o NH central da tiossemicarbazona e algum hidrogênio olefínico (**CTs** e **CPTs**) ou alifático (**HCTs** e **HCPTs**), corresponderia à forma *E* (Figura 2.26).

Essas análises revelaram que o isômero *Z* parece ser a espécie majoritária presente em soluções recentemente preparadas dos híbridos **CTs** (a) e que, com o tempo, é convertida em seu isômero *E*. A Figura 2.27A mostra que imediatamente após dissolver **CT3** em DMSO- d_6 , somente uma espécie é observada. Com o tempo, uma nova espécie surge e torna-se majoritária (Figura 2.27B). Essa nova espécie, possui um simpleto acima de 11 ppm referente ao NH central da tiossemicarbazona. O experimento de NOESY (Figura 2.29A) revelou que esse NH se encontra próximo do hidrogênio olefínico H8, indicando que a espécie majoritária presente em soluções antigas corresponde ao isômero *E*. Já para os análogos hidrogenados **HCTs**, não foi observada mudança no espectro com o tempo de dissolução (Figura 2.27C e 2.27D) e a forma majoritária corresponde ao isômero *E* (Figura 2.29C). O isômero *Z* encontra-se em quantidade muito inferior, independente do período em solução.

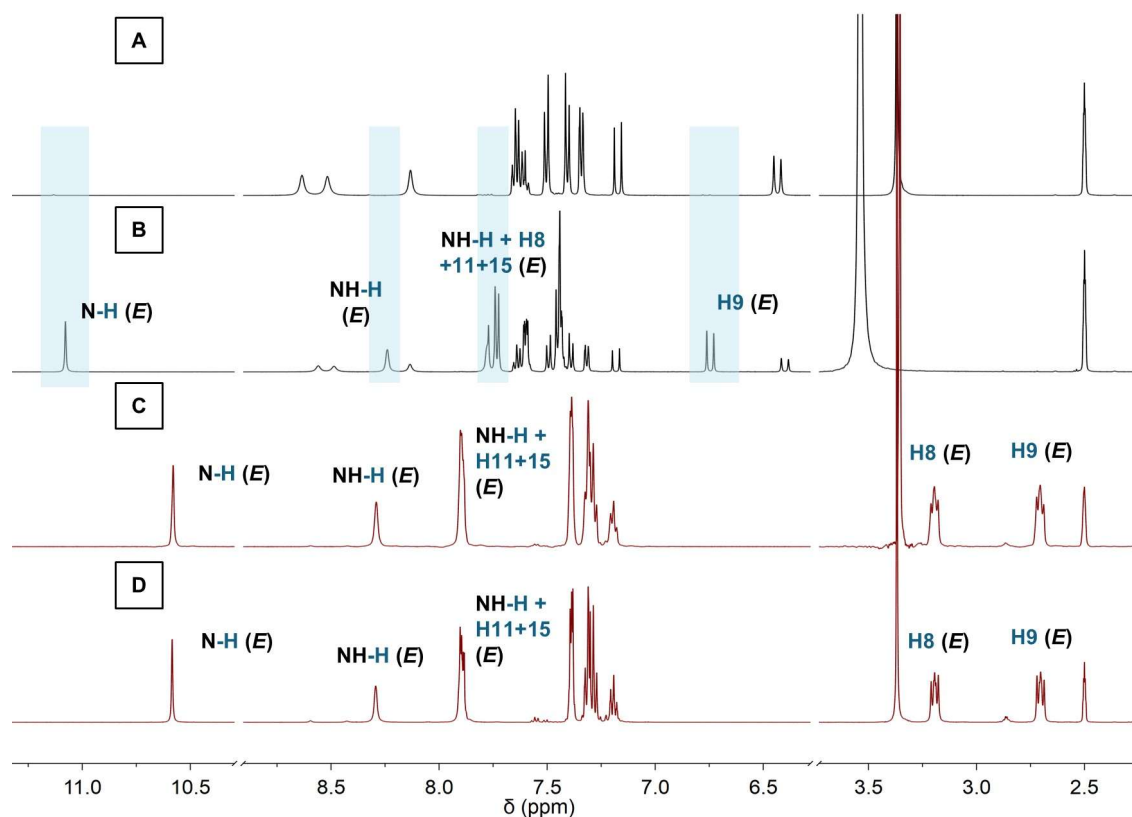


Figura 2.27. RMN de ^1H de **CT3** ($R=p\text{-Cl}$) imediatamente após dissolução (A) e dias depois (B). RMN de ^1H de **HCT1** ($R = \text{H}$) imediatamente após dissolução (C) e dias depois (D). Foram destacados por um retângulo azul alguns dos sinais que surgem ou aumentam em intensidade com o passar do tempo em solução.

Para os híbridos **CPTs**, a configuração *E* é a predominante imediatamente após a dissolução, sendo parcialmente convertido com o passar do tempo no isômero *Z* – essas observações estão de acordo com os resultados anteriormente apresentados para um grupo de azachalconas-tiossemicarbazonas (DA SILVA et al., 2013). Na ocasião, no entanto, da Silva e colaboradores atribuíram a configuração das espécies através de experimentos de NOEDIFF, ao invés de NOESY (DA SILVA et al., 2013). Na Figura 2.28a observa-se a presença de duas formas isoméricas em soluções recém preparadas de **CPT2**, sendo uma delas muito tênue. Com o passar do tempo, essa forma aparece em maior quantidade, embora ainda seja a espécie minoritária. O experimento de NOESY mostra que a espécie majoritária é a forma *E*, já que detecta uma interação a distância entre o NH em 11,21 ppm e o H8 em 7,68 ppm (Figura 2.29B). Por fim, para o derivado saturado **HCPT1** duas espécies são observadas em grande quantidade

em soluções recém preparadas. A espécie inicialmente majoritária (Z) é convertida na espécie E, conforme relevado pelo experimento de NOESY (Figura 2.29D).

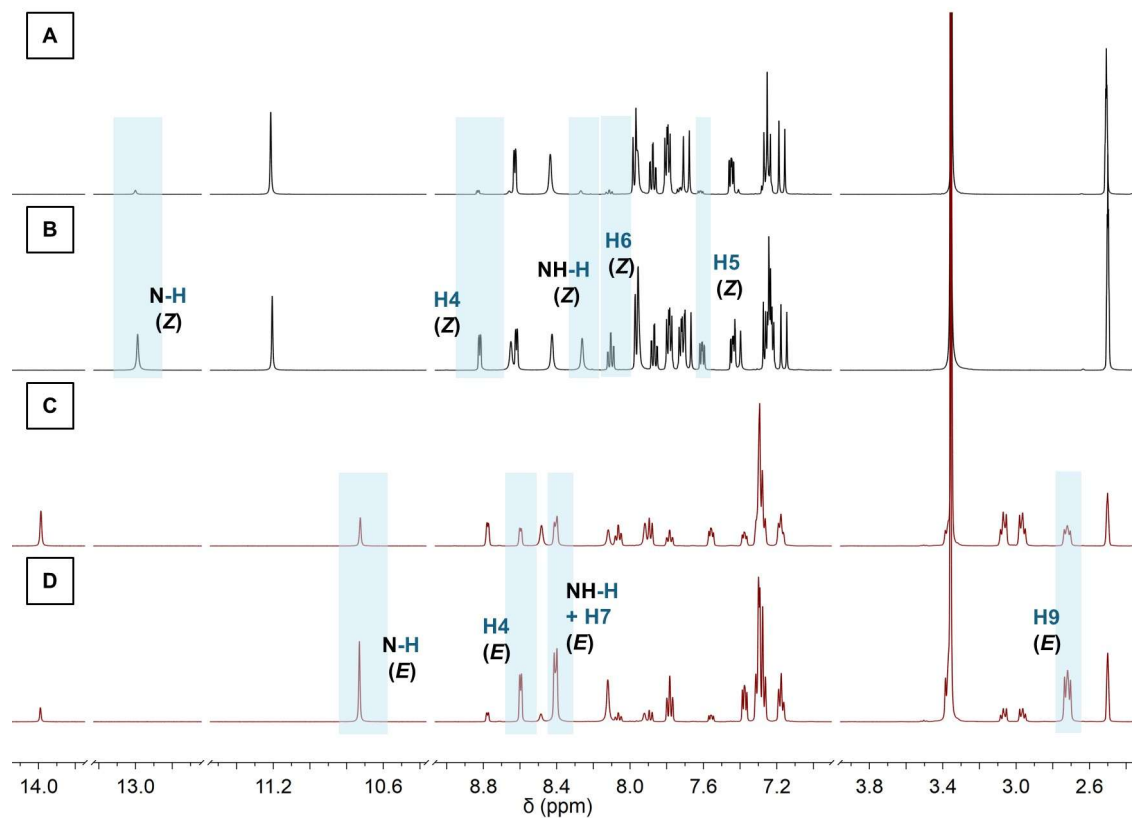


Figura 2.28. RMN de ^1H de CPT2 ($R=p\text{-F}$) imediatamente após dissolução (A) e dias depois (B). RMN de ^1H de HCPT1 ($R = \text{H}$) imediatamente após dissolução (C) e dias depois (D). Foram destacados por um retângulo azul alguns dos sinais que surgem ou aumentam em intensidade com o passar do tempo em solução.

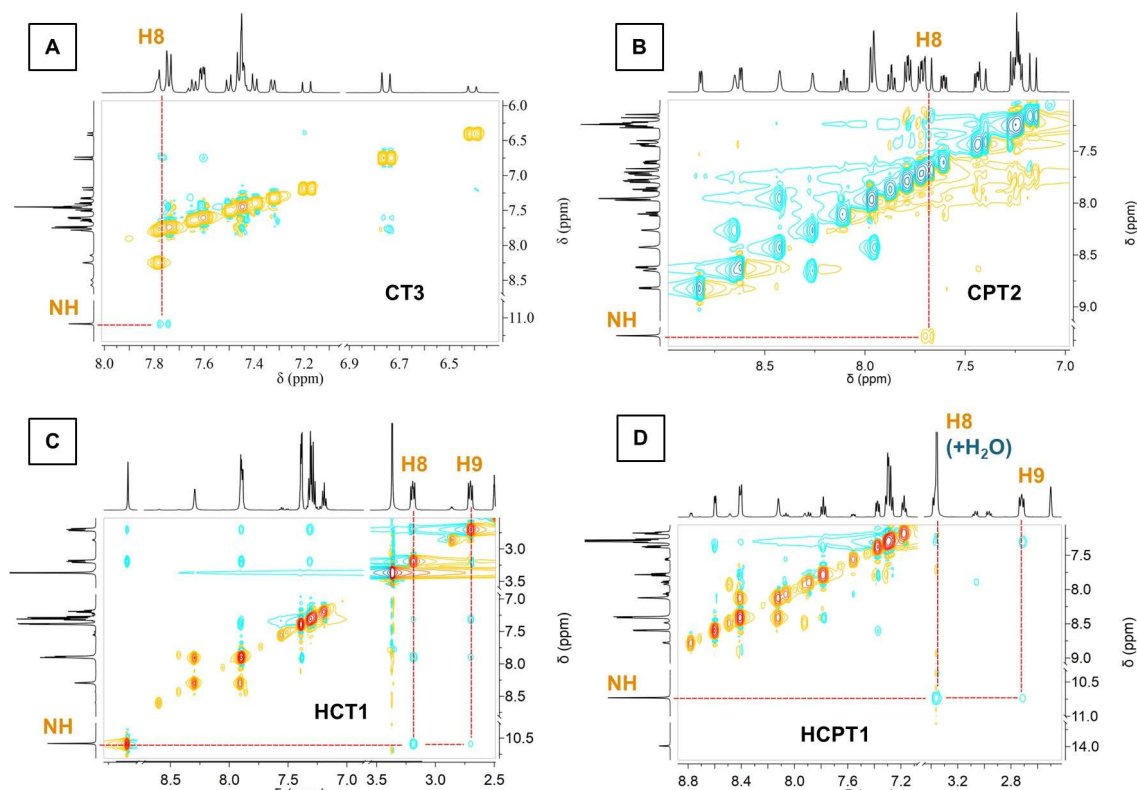


Figura 2.29. Experimentos de NOESY. Espectros das substâncias **CT3** (R= *p*-Cl, A), **CPT2** (R= *p*-F, B), **HCT1** (C) e **HCPT1** (R= H, D) foram obtidos ao menos um dia após a dissolução em DMSO- d_6 . Linhas pontilhadas indicam interação a distância entre o N-H central da tiossemicarbazona e algum hidrogênio olefínico ou alifático em isômeros *E*.

O fato do hidrogênio 8 estar próximo espacialmente do NH central, conforme experimentos de NOESY demonstraram, revela que a conformação preferencial dessas moléculas deve ser semelhante àquela mostrada na Figura 2.26, em que o grupo estiril ou etilbenzeno assume uma conformação *S-trans*. Além disso, nesta conformação, é possível que H9 esteja próximo ao campo de proteção anisotrópico do grupo arila adjacente (benzeno ou piridina), justificando também o fato de H9 ser mais protegido que H8. Apesar de iminas serem consideradas retiradoras de elétrons por indução e ressonância, a imina em questão encontra-se ligada a um grupo amino com par de elétrons livre. Esse par pode ser conjugado não só com a tiocarbonila, mas também com o grupo imina, o que também pode ser responsável por aumentar a densidade eletrônica sobre H9.

A presença dos dois isômeros dificulta a atribuição de todos os sinais observados no RMN de ^1H e ^{13}C , tendo em vista que esses sinais aparecem duplicados e em muitos casos se sobrepõem. Os experimentos 2D de COSY, NOESY, HSQC e HMBC foram utilizados para garantir sua correta atribuição. Além disso, espectros teóricos de RMN de ^1H e ^{13}C das oito

tiossemicarbazonas que prosseguiram nos ensaios biológicos foram previstos por DFT. Para tanto, as estruturas dos isômeros *E* e *Z* de **CT1-2**, **CPT1-2**, **HCT1-2** e **HCPT1-2** foram construídas no programa Spartan'24 (Wavefunction, Inc., 2025) e tiveram suas energias minimizadas por mecânica molecular (MMFF, *Merck Molecular Force Field*). Em seguida, uma busca pelos confôrmeros de baixa energia foi realizada pelo método MMFF corrigido (apresentado no Software como *MMFF corrected*, ou *corrected MMFF*). Neste método, os confôrmeros são gerados por mecânica molecular e as suas energias são corrigidas por uma rede neural treinada para reproduzir resultados do método DFT ω B97X-V/6-311+G(2df,2p)//MMFF, que é mais sofisticado e custoso (Hehre et al., 2025). Em seguida, os confôrmeros com energia relativa (E_{rel}) superior a 20 kJ/mol, em relação ao mais estável, foram selecionados para a etapa de otimização de geometria por DFT, com o funcional EDF2/6-31G*. Por fim, os espectros de RMN dos confôrmeros mais estáveis ($E_{rel} \leq 10$ kJ/mol) foram calculados utilizando o mesmo funcional. No programa, existe um grande banco de dados que compara os valores de deslocamentos químicos experimentais ($\delta_{experimental}$) com os deslocamentos químicos teóricos previstos por EDF2/6-31G* ($\delta_{teórico}$). Uma regressão linear é gerada pela comparação desses dados ($\delta_{experimental}$ vs $\delta_{teórico}$) e utilizada para ajustar os deslocamentos químicos dos carbonos de moléculas submetidas a este mesmo método de cálculo.

Os resultados dessas previsões foram utilizados para auxiliar na identificação dos isômeros majoritário e minoritário observados nos espectros experimentais, obtidos horas ou dias após a dissolução das amostras em solvente deuterado. De acordo com o manual e guia para usuários do Spartan'24, o programa permite calcular os espectros de RMN por dois modelos distintos: ω B97X-D/6-31G* e EDF2/6-31G*. O primeiro, embora mais eficiente, exige um custo computacional muito superior. O modelo EDF2/6-31G* foi então utilizado por ser mais rápido e ainda bem robusto. Na subseção seguinte, serão discutidos em detalhes os resultados desses cálculos.

2.3.2.2. RMN: experimental vs teórico (EDF2/6-31G*)

Inicialmente, as geometrias calculadas serão brevemente discutidas para explicar alguns padrões observados nos espectros de RMN de ^1H experimentais. Nos espectros das tiossemicarbazonas não-piridinas (**CT1-2**; **HCT1-2**) em configuração *E*, o hidrogênio do grupo N-H central foi observado na região de 10,58 a 11,12 ppm (Tabela 2.3). Esse mesmo hidrogênio,

no entanto, foi observado em campo relativamente mais alto para as espécies de configuração *Z* (8,46-8,48 ppm). O motivo dessa grande diferença torna-se aparente ao observar os conformêros mais estáveis em ambas as configurações (Figura 2.30). Na configuração *Z*, o hidrogênio em questão encontra-se na extremidade do campo de proteção anisotrópico do anel benzênico, devendo ser, por tanto, mais blindado que o mesmo hidrogênio no isômero *E*.

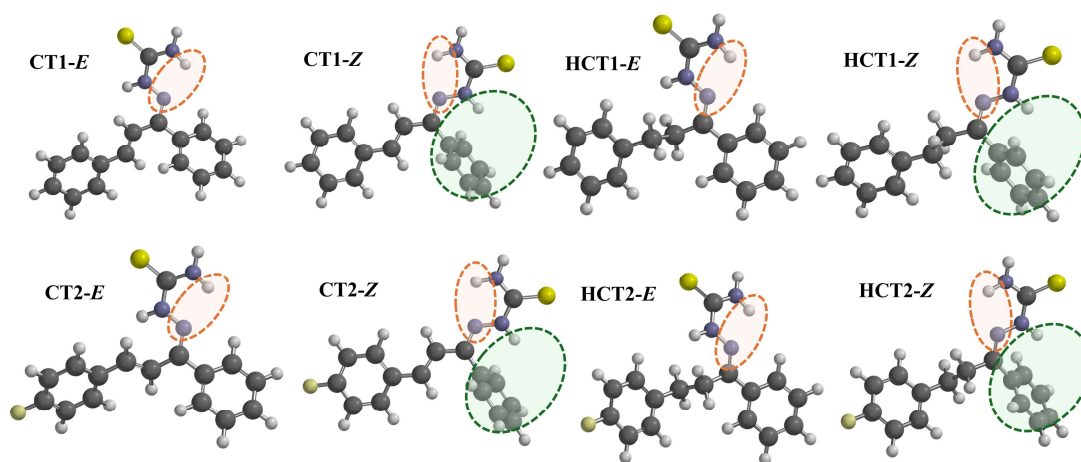


Figura 2.30. Estrutura dos conformêros mais estáveis (**CT1-2**, **HCT1-2**) obtidos nos cálculos de distribuição de conformêros (*MMFF corrected*) e otimização de geometria (EDF2/6-31G*). Em laranja destaca-se a proximidade de um dos hidrogênios do grupo NH_2 terminal com o nitrogênio imínico – o que deve possibilitar uma ligação de hidrogênio intramolecular. Em verde destaca-se a proximidade do hidrogênio do grupo NH central da extremidade do campo de proteção anisotrópico do anel benzênico.

Os hidrogênios do grupo NH_2 terminal foram observados na forma de dois simpletos bem separados, de acordo com a tabela 2.3. A ressonância do par de elétrons livre desse nitrogênio com o sistema π da tiocarbonila, deve resultar em uma ligação $\text{N-C}_{\text{tiocarbonila}}$ com certo caráter de dupla, dificultando a sua rotação. Além disso, é possível que uma ligação de hidrogênio intramolecular entre um de seus hidrogênios e o nitrogênio imínico (Figura 2.30) ocorra, o que deve dificultar ainda mais o giro da ligação $\text{N-C}_{\text{tiocarbonila}}$. Essa interação intramolecular é comumente observada na estrutura cristalina das tiossemicarbazonas (Sankaraperumal; Nityananda Shetty; Karthikeyan, 2015). Assim, a ligação com caráter de dupla e a ligação de hidrogênio intramolecular devem impedir a rotação livre da ligação $\text{N-C}_{\text{tiocarbonila}}$, tornando os hidrogênios do grupo NH_2 terminal magneticamente não equivalentes.

Tabela 2.3. Valores de deslocamentos químicos (ppm) experimentais dos hidrogênios dos grupos NH central e NH₂ terminal.

Código	NH central		NH ₂ terminal			
	E	Z	E		Z	
			Lig. de H	-	Lig. de H	-
CT1	11,12	8,48	8,33	7,81	8,63	8,14
CT2	11,08	8,46	8,27	7,78	8,59	8,14
HCT1	10,58	*	8,29	7,90	*	*
HCT2	10,60	*	8,30	7,90	*	*
CPT1	11,23	12,82	8,44	7,96	8,66	8,29
CPT2	11,21	12,99	8,43	7,96	8,65	8,26
HCPT1	10,73	13,99	8,40	8,12	8,49	7,92
HCPT2	10,77	13,99	8,43	8,17	8,48	7,93

*Isômero Z foi observado em quantidade muito inferior ao isômero E, por isso não foi considerado na comparação.

Nos espectros das tiossemicarbazonas piridinas (**CPT1-2**; **HCPT1-2**) em configuração E, o hidrogênio do grupo N-H central foi observado na mesma região dos análogos não piridínicos, em 10,73-11,23 ppm (Tabela 2.3). No entanto, no isômero Z, esse hidrogênio aparece em campo mais baixo (12,82-13,99 ppm) devido a ocorrência de uma ligação de hidrogênio intramolecular com o nitrogênio da piridina. Essa interação é evidente nos confôrmeros previstos (Figura 2.31). Ainda, o mesmo padrão observado para o grupo NH₂ terminal nos espectros das tiossemicarbazonas não piridínicas é notado para as tiossemicarbazonas piridínicas, indicando a rotação impedida da ligação N-C_{tiocarbonila}.

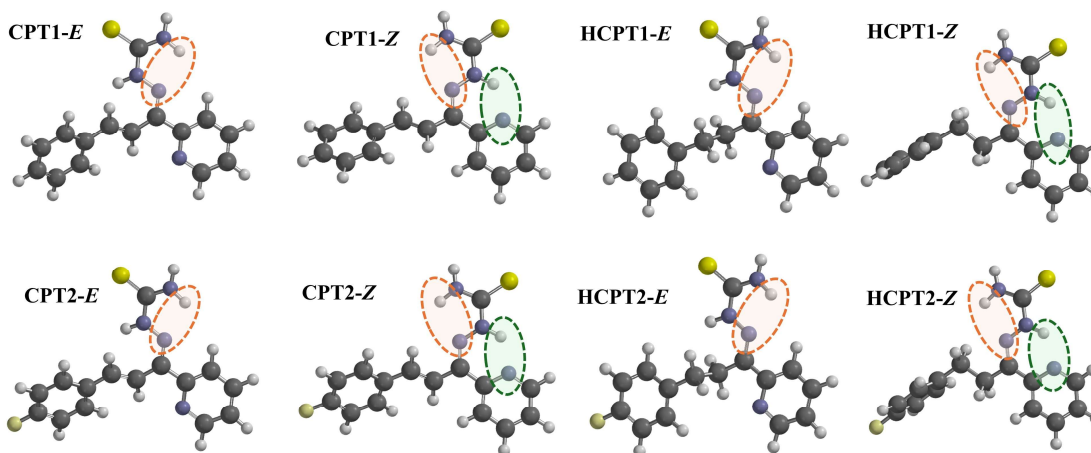


Figura 2.31. Estrutura dos confôrmeros mais estáveis (**CPT1-2**, **HCPT1-2**) obtidos nos cálculos de distribuição de confôrmeros (*MMFF corrected*) e otimização de geometria (EDF2/6-31G*). Em laranja destaca-se a proximidade de um dos hidrogênios do grupo NH₂ terminal com o nitrogênio imínico – o que deve possibilitar uma ligação de hidrogênio intramolecular. Em verde destaca-se a proximidade do hidrogênio do grupo NH central da extremidade do campo de proteção anisotrópico do anel benzênico.

Assim, resumidamente, os sinais referentes ao hidrogênio do grupo NH central podem ser utilizados para diferenciar os dois isômeros nos espectros de ^1H . Para os derivados não piridínicos, o sinal de maior deslocamento químico ($\sim 10\text{-}11$ ppm) é referente ao isômero *E*, enquanto o sinal em campo mais alto ($\sim 8\text{-}9$ ppm) deve-se ao isômero *Z*. Para os derivados piridínicos, no entanto, o sinal em campo mais baixo ($\sim 12,5\text{-}14,0$ ppm) é referente ao isômero *Z*, enquanto os sinais em $\sim 10,5\text{-}11,50$ ppm são atribuídos ao isômero *E*.

O RMN de ^{13}C dos confôrmeros mais estáveis de cada isômero ($E_{\text{rel}} \leq 10,0$ kJ/mol) foram previstos por DFT e, para cada carbono, foi realizada uma média ponderada considerando a população calculada pela distribuição de Boltzmann ($P_{\text{dist.Boltzmann}}$), conforme a equação: $\delta_{\text{teórico médio}} = [(\delta_{\text{confôrmero 1}} \times P_{\text{dist.Boltzmann 1}}) + (\delta_{\text{confôrmero 2}} \times P_{\text{dist.Boltzmann 2}}) + (\delta_{\text{confôrmero 3}} \times P_{\text{dist.Boltzmann 3}})]$... Os resultados foram tabelados e comparados com os deslocamentos químicos experimentais referentes ao isômero observado em maior quantidade (Majoritário/Major.) e aquele observado em menor quantidade (Minoritário/Minor.). Para averiguar o quão próximos os valores previstos estão dos valores observados, uma ferramenta estatística muito comum foi empregada: o desvio médio quadrático (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*), calculado conforme a equação 1 (Costa et al., 2021).

$$\text{Equação 1: } RMSD = \sqrt{\frac{\sum n |\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{exp}}|^2}{n}}$$

Onde:

- RMSD: desvio médio quadrático;
- δ_{calc} : deslocamento químico médio calculado para um dos carbonos;
- δ_{exp} : deslocamento químico experimental de um dos carbonos;
- n : número de carbonos envolvidos no cálculo

A tabela 2.4 mostra os resultados para as chalconas-tiossemicarbazonas **CT1-2**. O menor RMSD para os sinais do isômero mais abundante foi obtido com os deslocamentos químicos calculados para o isômero *E*. Para o isômero minoritário, por sua vez, o menor RMSD foi obtido com os deslocamentos químicos calculados para o isômero *Z*. Esses resultados sugerem que o isômero *E*, de fato trata-se do isômero presente em maior quantidade horas ou dias após a solubilização da amostra em DMSO deuterado, ao passo que a espécie em menor quantidade, responsável pelos sinais extras observados nos experimentos de RMN, trata-se do

isômero Z. Em laranja são destacados os carbonos cujos deslocamentos químicos mais variaram de um isômero para o outro. C2, carbono aromático diretamente conectado ao grupo imina, aparece por volta de 130 ppm no isômero Z, enquanto na forma E é observado em ~136 ppm. C8, carbono olefínico conectado ao grupo imina, apresenta deslocamentos químicos ainda mais diferentes ($\Delta\delta \sim 9,6$ ppm). De fato, era esperado que esses carbonos fossem os mais distintos entre os isômeros, já que se encontram diretamente conectados a região da molécula que sofre isomerização.

Tabela 2.4. Deslocamentos químicos (ppm) experimentais e calculados (EDF2/6-31G*) para CT1-2.

Carbono	CT1				CT2			
	Experimental		EDF2/6,31G*		Experimental		EDF2/6,31G*	
	Major.	Minor.	E	Z	Major.	Minor.	E	Z
C1	148,18	150,5	146,47	148,42	148,43	150,87	143,00	148,28
C2	136,84	130,29	137,06	130,76	136,9	130,8*	137,60	130,77
C3+7	129,2	128,18	128,64	129,17	129,39	128,36	126,60	129,15
C4+6	128,26	129,78	128,65	129,80	128,54	130,04	128,80	129,78
C5	129,04	129,99	129,41	130,00	129,39	130,3	129,20	130,08
C8	118,73	128,3	113,41	126,94	118,74	128,44	115,20	126,45
C9	139,63	136,56	140,68	135,74	138,64	135,67	138,10	134,57
C10	135,81	135,7	134,48	135,90	132,61	132,53	129,90	131,75
C11+15	127,95	126,89	127,81	127,11	130,33	129,25	129,30	128,71
C12+14	128,62	128,91	129,50	129,10	115,84	116,06	117,20	116,81
C13	129,3	128,82	129,33	128,61	162,89	162,46	164,00	162,92
C16	178,9	177,75	177,56	176,21	178,98	n.o.	177,00**	176,32**
RMSD			Major.	3,31	RMSD			Major.
			Minor.	5,05				Minor.
				1,77				2,35
				0,94				3,25
								5,27
								1,14

*Não foi observado no espectro 1D (DEPTQ). No entanto, um sinal correlacionando 130,8 ppm e 7,12 ppm (H8) foi observado no HMBC, atribuído a um acoplamento a 3 ligações de distância (3J CH: H8-C2). n.o.: não observado em espectros 1D e 2D.**Já que o sinal correspondente não foi observado no RMN experimental, esses valores não foram considerados para o cálculo de RMSD.

Para os análogos saturados, HCT1-2 (tabela 2.5), também fica evidente que a espécie majoritária observada experimentalmente trata-se do isômero E e, novamente, os carbonos C2 e C8 são os que possuem maior diferença de deslocamento químico entre os isômeros.

Tabela 2.5. Deslocamentos químicos (ppm) experimentais e calculados (EDF2/6,31G*) para **HCT1-2**.

Carbono	HCT1			HCT2		
	Experimental		EDF2/6,31G*		Experimental	
	Major.*		E	Z	Major.*	
C1	150,06		145,97	148,11	149,72	
C2	136,68		136,44	132,44	136,63	136,41
C3+7	126,81		125,48	127,26	126,85	125,55
C4+6	128,4		129,20	129,93	128,4	128,90
C5	129,14		129,23	129,90	129,18	129,12
C8	27,64		30,07	43,40	27,69	30,03
C9	31,46		33,26	36,05	30,69	32,38
C10	140,63		139,64	140,81	136,76	136,79
C11+15	128,38		128,26	128,37	130,29	129,76
C12+14	128,21		129,70	128,39	114,86	116,88
C13	126,11		131,09	126,74	160,83	162,62
C16	179,08		177,26	176,93	179,03	176,92
RMSD	Major.		2,23	5,00	RMSD	Major.
						1,78
						4,89

*Somente um isômero foi observado em quantidade apreciável, portanto, os sinais do segundo isômero não foram atribuídos.

Com relação aos análogos piridínicos, **CPT1-2** (Tabela 2.6) e **HCPT1-2** (Tabela 2.7), o mesmo padrão é observado, com a espécie majoritária correspondendo ao isômero *E*. No entanto, além dos carbonos C2 e C8, C1 também apresenta deslocamentos químicos bem distintos entre os dois isômeros ($\Delta\delta = 5,69$ -9,15 ppm), sendo muito mais blindado no isômero *Z*.

Dessa maneira, a comparação dos RMNs de ^{13}C experimentais e teóricos confirma de forma inequívoca a identidade das duas espécies presentes em solução. Além disso, fornece alguns referenciais que podem ser utilizados na caracterização estrutural de compostos similares (C1, C2 e C8, em especial).

Tabela 2.6. Deslocamentos químicos (ppm) experimentais e calculados (EDF2/6-31G*) para **CPT1-2**.

Carbono	CPT1				CPT2			
	Experimental		EDF2/6,31G*		Experimental		EDF2/6,31G*	
	Major.	Minor.	E	Z	Major.	Minor.	E	Z
1	146,06	140,37	142,40	136,71	145,85	140,05	142,50	136,55
2	155,41	151,31	156,30	153,77	155,31	151,32	156,20	153,73
4	148,35	148,71	149,10	148,40	148,3	148,61	149,10	148,50
5	123,75	124,94	123,00	122,96	123,69	124,86	123,10	122,96
6	136,93	138,57	135,40	136,28	136,85	138,5	135,40	136,29
7	123,98	124,78	119,00	123,78	123,87	124,68	119,10	123,71
8	117,21	124,39	116,60	124,27	117,04	124,14	116,00	124,02
9	140,14	134,73	137,10	132,41	138,82	133,42	135,80	131,43
10	136,27	136,44	135,10	136,16	132,89	133,06	130,80	132,10
11+15	127,88	127,21	127,70	126,84	129,96	129,19	129,50	128,46
12+14	128,69	128,8	129,30	129,20	115,59	115,65	117,00	116,80
13	129,25	128,58	129,80	128,31	162,59	162,16	163,80	162,86
16	179,12	178,23	177,50	178,45	179,12	178,25	177,20	178,50
RMSD	Major.		2,09	3,95	RMSD	Major.	2,14	3,90
	Minor.		3,36	1,65		Minor.	3,47	1,64

Tabela 2.7. Deslocamentos químicos (ppm) experimentais e calculados (EDF2/6-31G*) para **HCPT1-2**.

Carbono	HCPT1				HCPT2			
	Experimental		EDF2/6,31G*		Experimental		EDF2/6,31G*	
	Major.	Minor.	E	Z	Major.	Minor.	E	Z
1	150,06	140,91	148,03	135,21	148,78	140,84	147,73	135,21
2	154,29	151,93	155,30	153,77	153,66	151,97	155,07	153,85
4	148,5	147,99	149,37	148,18	148,15	148,06	149,38	148,31
5	123,82	124,64	123,15	122,26	124,12	124,75	123,32	122,50
6	136,39	138,47	135,38	136,22	137,34	138,56	135,48	136,35
7	121,30	124,13	119,19	122,03	121,67	124,23	119,23	122,06
8	25,97	35,66	28,72	38,96	26,2	35,73	28,21	38,98
9	31,18	32,65	33,86	34,72	30,45	31,77	32,88	33,89
10	141,08	141,42	140,48	141,25	137,13	137,61	135,23	136,51
11+15	128,24	128,39	128,02	128,43	130,19	130,22	129,90	130,11
12+14	128,08	128,22	129,51	128,80	114,81	114,93	116,82	116,45
13	125,9	125,83	127,34	126,66	160,77	160,70	162,65	162,66
16	179,23	178,4	177,03	178,72	179,27	178,41	176,95	178,84
RMSD		Major.	1,66	5,59	RMSD		Major.	1,78
		Minor.	3,47	2,28			Minor.	3,60
								2,36

Com relação a todas as tiossemicarbazonas preparadas neste trabalho, os hidrogênios do grupo NH₂ terminal foram observados na forma de dois singletos na região de 8,70-7,86 ppm. O próton do grupo NH central, conectado ao nitrogênio imínico, aparece em campo mais baixo (10,58-13,99 ppm), exceto para os isômeros Z dos derivados CTs (8,44-8,67). Os espectros de RMN de ¹³C apresentaram um sinal em ~138-153,0 ppm atribuído ao carbono imínico (C=N, C-1). Sinais em 177,2-179,5 ppm foram atribuídos ao carbono da tiocarbonila (C=S, C-16). As absorções características dos carbonos olefínicos foram observadas em ~117,0-123,0 ppm (C-8, E), 123,0-133,0 ppm (C-8, Z), ~136,0-141,0 ppm (C-9, E), ~132-137 ppm (C-9, Z). Para os derivados saturados, os grupos metilenos foram observados nas regiões características, conforme as tabelas apresentadas anteriormente.

2.3.2.3. Espectrometria de massas de alta resolução.

Para encerrar a caracterização das moléculas preparadas, a análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) foi realizada para as 6 CPTs inéditas e para os 3 derivados hidrogenados inéditos. As massas observadas estavam muito próximas das massas calculadas, o que confirmou, mais uma vez, a obtenção dos compostos (Tabela 2.8, espectros em anexo).

Tabela 2.8. Resultados da espectrometria de massas de alta resolução para as CPTs e seus derivados saturados inéditos.

Código	R	HRMS calculado (M+H)	HRMS observado
CPT2	<i>p</i> -F	301.0918	301.0918
CPT4	<i>p</i> -CH ₃	297.1169	297.1172
CPT5	<i>m</i> -F	301.0918	301.0921
CPT6	<i>m</i> -Cl	317.0628	317.0323
CPT7	<i>m</i> -Br	363.0097	363.0092
CPT8	<i>m</i> -CH ₃	297.1169	297.1168
HCT1	H	284.1216	284.1211
HCT2	<i>p</i> -F	302.1122	302.1119
HCPT1	H	285.1168	285.1164
HCPT2	<i>p</i> -F	303.1074	303.1070

2.3.2.4. Avaliação biológica das tiossemicarbazonas.

No total, oito tiossemicarbazonas foram avaliadas contra células de hepatocarcinoma Huh-7: **CT1-2**; **HCT1-2**; **CPT1-2**; **HCPT1-2**. Esse grupo de moléculas foi selecionado por permitir avaliar a influência de três alterações estruturais sob a atividade anti-tumoral da classe: i) a presença de um anel fenila ou piridina ligado ao carbono azometínico; ii) avaliar a relevância da dupla ligação olefínica para a atividade biológica; e iii) avaliar se a presença do átomo de flúor no anel do grupo estiril ou etilbenzeno tem alguma influência para a atividade. A citotoxicidade das substâncias apresentou comportamento dose-dependente (Figura 2.32). Com relação aos derivados não-piridínicos, os valores de IC₅₀ foram obtidos entre 29,8 e 37,02 µM, em cultura de 48 h (Tabela 2.9). Embora o tratamento dos dados tenha revelado que não há diferença estatística significativa entre os valores de IC₅₀ das tiossemicarbazonas não-piridínicas (**CT1-2**; **HCT1-2**), há uma tendência: as tiossemicarbazonas insaturadas, ou seja, aquelas que possuem um grupo estiril em sua estrutura (**CT1-2**), são ligeiramente mais ativas que seus análogos saturados (**HCT1-2**). Considerando esse resultado e o fato de que para obter as di-hidroclonas-tiossemicarbazonas (**HCTs**) uma etapa sintética adicional é necessária, parece ser mais interessante investir nos derivados sintéticos diretos das chalconas (**CTs**), ou seja, os produtos saturados – ligeiramente mais ativos e obtidos somente por duas etapas sintéticas.

CT1 e **CT2** já haviam sido testadas contra outra linhagem de hepatocarcinoma (HepG2), tendo apresentado IC₅₀ (24 h de tratamento) de 28,12 ± 4,10 µM e 41,07 ± 1,90 µM, respectivamente (Rodrigues et al., 2022). Assim, o presente trabalho, confirma a ação citotóxica dessas moléculas contra células de hepatocarcinoma, ao demonstrar que também são ativas na linhagem Huh-7. Além disso, foi demonstrado que a dupla ligação olefínica tem pouca

influência direta sob a atividade dessa classe, sendo quase indiferente a sua presença ou ausência (na forma dos derivados saturados).

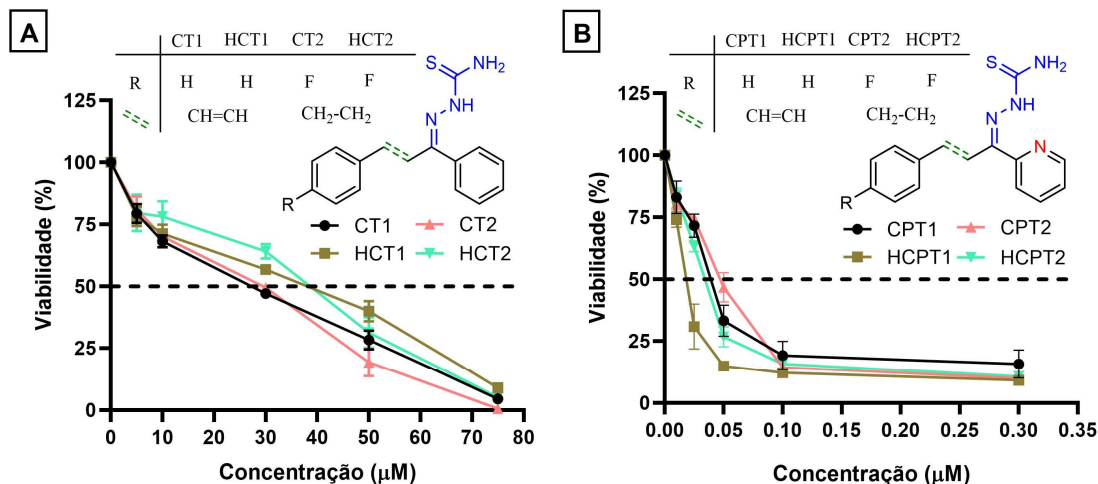


Figura 2.32. Ação das tiossemicarbazonas não piridínicas (A) e piridínicas (B) contra células Huh-7. Cerca de $1,3 \times 10^4$ células Huh-7 foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%), CT1-2, HCT1-2 (5-75 μM), CPT1-2 ou HCPT1-2 (0,01-0,30 μM). Após 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT ($n \geq 3$). Os resultados representam a média \pm erro-padrão da média.

Os derivados piridínicos foram significativamente mais ativos (Figura 2.32B), com valores de IC₅₀ cerca de 1000 vezes menores (17,51-41,76 nM, Tabela 2.9) quando comparados a CT1-2 e HCT1-2. Ao contrário do que ocorreu para os derivados das chalconas (CT1-2 e HCT1-2), a ausência da ligação dupla olefínica tornou os derivados de azachalconas ligeiramente mais ativos. A análise ANOVA com teste *post-hoc* de Turkey mostra que o IC₅₀ de HCPT1 possui diferença estatística significativa entre os demais compostos da série, confirmando que a redução da dupla ligação foi capaz de gerar um derivado mais ativo contra as células Huh-7.

Tabela 2.9. Valores de IC₅₀ calculados para as tiossemicarbazonas, com base nos ensaios de MTT em 48 h de incubação a 37 °C, 5% de CO₂ e atmosfera úmida.

Código	IC ₅₀ [#]	Código	IC ₅₀ ^{##}
CT1	29,86 \pm 2,43 μM	CPT1	36,51 \pm 3,96 nM**
HCT1	37,02 \pm 1,05 μM	HCPT1	17,51 \pm 1,75 nM
CT2	31,00 \pm 0,91 μM	CPT2	41,76 \pm 3,22 nM***
HCT2	36,33 \pm 1,88 μM	HCPT2	30,82 \pm 1,83 nM*

Os resultados representam a média \pm erro-padrão da média. [#]IC₅₀ obtido por tratamento dos dados via regressão linear. ^{##}IC₅₀ obtido por tratamento dos dados via regressão não-linear. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via e as médias foram comparadas por meio do teste *post-hoc* de Turkey (o teste não foi aplicado entre os grupos de compostos não-piridínicos e piridínicos). *P < 0,05, **P < 0,005, ***P < 0,001 e foram

considerados estatisticamente significativos em comparação ao tratamento com **HCPT1**. Nenhuma outra diferença estatística significativa foi encontrada.

O citotoxicidade de tiossemicarbazonas contendo um anel piridina na mesma posição que os compostos **CPT1-2** e **HCPT1-2** tem sido relacionada a sua capacidade quelante. Essas moléculas formam complexos com íons Fe^{+3} e Cu^{+2} (Lovejoy et al., 2011), os quais, por sua vez, são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) através de um ciclo redox em que o centro metálico é reduzido por substratos endógenos ($\text{Cu}^{+2} + \text{reductor} \rightarrow \text{Cu}^{+1} + \text{reductor}^{+}$), formando um novo complexo capaz de reduzir oxigênio molecular e gerar superóxido ($\text{Cu}^{+1} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{+2} + \text{O}_2^{\cdot-}$) (Selyutina et al., 2022). Para avaliar se o mecanismo de ação das tiossemicarbazonas estudadas no presente trabalho envolve formação de complexos de cobre com ciclo redox ativo, a atividade das substâncias foi verificada na presença de tetratiomolibdato de amônio (TTM). O tetratiomolibdato forma complexos insolúveis com íons cobre (Maiti, 2021), reduzindo a biodisponibilidade desses íons no meio biológico. Assim, caso o mecanismo de ação das substâncias dependa do cobre, sua atividade deve ser inferior na presença de TTM, já que reduz a quantidade de íons cobre disponíveis para complexar com as tiossemicarbazonas.

Para os derivados de azachacona (**CPT1-2** e **HCPT1-2**) houve uma clara redução da atividade citotóxica na presença de TTM (5 μM), sugerindo que o mecanismo dessas moléculas envolve, ao menos em parte, a formação de complexos de cobre capazes de gerar ROS (Figura 2.33). Para os derivados de chalcona (**CT1-2** e **HCT1-2**), esse mesmo comportamento não foi identificado. A adição de TTM não alterou de forma significativa a viabilidade celular, exceto no tratamento com **HCT1**. A Figura 2.33 mostra os resultados obtidos. No entanto, ainda é necessário repetir os experimentos pelo menos mais duas vezes para confirmar com maior segurança os efeitos observados.

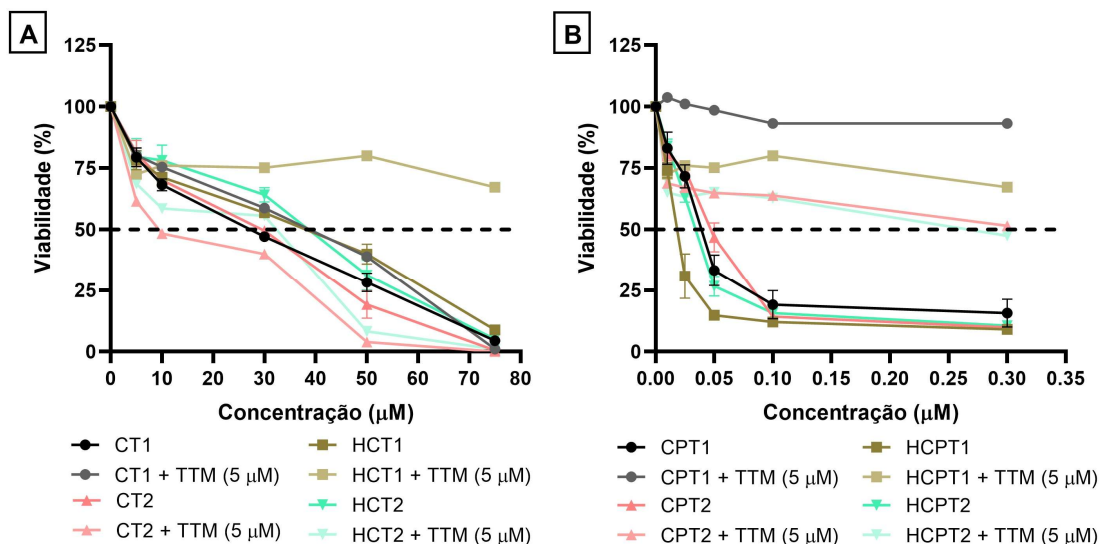


Figura 2.33. Influência do tetratiomolibdato de amônio (TTM) sob a ação citotóxica das tiossemicarbazonas não piridínicas (A) e piridínicas (B) contra células Huh-7. Cerca de $1,3 \times 10^4$ células Huh-7 (placa de 48 poços) foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%), **CT1-2**, **HCT1-2** (5-75 μM) ou **CPT1-2**, **HCPT1-2** (0,01-0,30 μM), na ausência ou presença de TTM (5 μM). Após 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT ($n \geq 1$). Os resultados representam a média \pm erro-padrão da média.

Do ponto de vista estrutural, os derivados de chalconas possuem apenas dois pontos de coordenação em sua estrutura: o enxofre da tiocarbonila e o nitrogênio imínico (Figura 2.34). Os derivados de azachalconas, por sua vez, possuem um ponto de coordenação adicional, fornecido pelo anel piridínico. Pelo efeito quelato, era esperado que **CPT1-2** e **HCPT1-2** apresentassem maior propensão a formar complexos com metais de transição que seus análogos não piridínicos, tornando seu mecanismo de ação mais dependente de cobre.

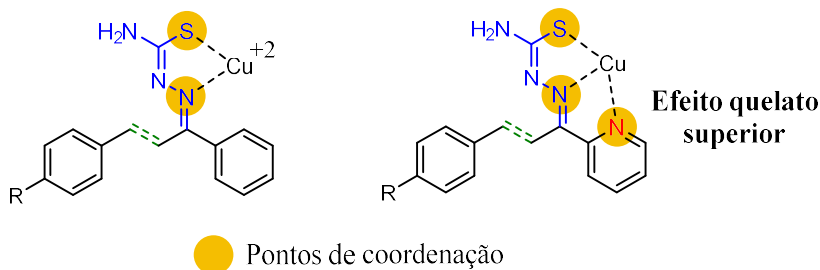


Figura 2.34. Representação dos pontos de coordenação presentes nos híbridos **CT1-2**, **HCT1-2**, **CPT1-2** e **HCPT1-2**.

No caso das tiossemicarbazonas não piridínicas, ainda que possuam um ponto de coordenação a menos, não seria correto descartar que seu mecanismo envolva, ao menos parcialmente, a formação de complexos citotóxicos com cobre em meio celular. Contudo,

devido ao efeito quelato reduzido, seria razoável propor que concentrações mais altas desses ligantes seriam necessárias para que se formassem complexos em quantidade suficiente para influenciar seu mecanismo de ação. No entanto, na faixa em que esses híbridos (**CT1-2** e **HCT1-2**) apresentam alguma atividade citotóxica (5-75 μM), a presença de TTM não influenciou a sua potência, indicando que, mesmo em concentrações elevadas, seu mecanismo não parece depender da complexação com íons cobre.

Recentemente, um grupo liderado por Des R. Richardson tem trabalhado com azachalconas-tiossemicarbazonas bastante similares (Dharmasivam et al., 2023, 2025; Kaya et al., 2024; Wijesinghe et al., 2023). No entanto, no lugar dos hidrogênios do grupo NH_2 terminal, seus compostos possuem cadeias alquila ou anéis aromáticos. A azachalcona-tiossemicarbazona **PPP44mT** (Figura 2.35), que do ponto de vista estrutural corresponde ao análogo mais similar a **CPT1-2**, apresentou valores de IC_{50} de 80 nM e 40 nM (48 h de tratamento) contra células de neuroblastoma (SK-N-MC) e carcinoma pancreático (AsPC-1) (Dharmasivam et al., 2023). Ainda, os autores alegam que seu análogo saturado, **SPPP44mT**, apresentou atividade similar, apesar desses resultados não serem mostrados na publicação. Por fim, foi proposto que o mecanismo dessa classe envolve complexação com íons cobre. Em nenhum de seus trabalhos, no entanto, essas moléculas são avaliadas contra células de hepatocarcinoma.

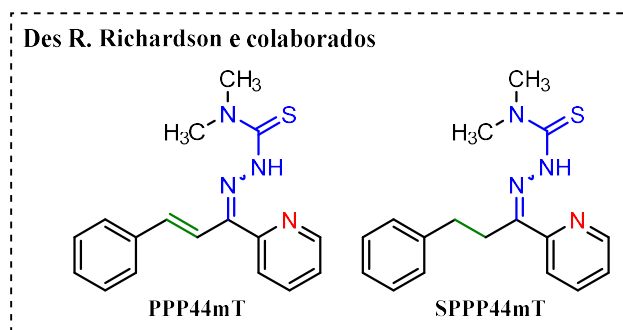


Figura 2.35. Azachalconas-tiossemicarbazonas exploradas pelo grupo de Des R. Richardson (Dharmasivam et al., 2023).

Resumidamente, no presente trabalho, duas classes de tiossemicarbazonas foram avaliadas contra a linhagem de hepatocarcinoma Huh-7. As tiossemicarbazonas piridínicas apresentaram citotoxicidade ~mil vezes superior a seus análogos não piridínicos. A substituição da piridina por um anel benzênico parece alterar completamente o mecanismo de ação dessas substâncias, tornando-o independente da complexação com íons cobre. Pelo ensaio na presença de TTM fica evidente a dependência do cobre para a atividade dos derivados de azachalconas,

confirmando a proposta feita anteriormente para **PPP44mT** e **SPPP44mT**. Devido à similaridade estrutural de **CPT1-2** e **HCPT1-2** com os compostos de Des R. Richardson era esperado que sua atividade e o mecanismo de ação fossem similares. Apesar disso, o presente trabalho demonstra pela primeira vez que essa classe de substâncias (azachalconas-tiossemicarbazonas e di-hidroazachalconas-tiossemicarbazonas) é extremamente potente contra hepatocarcinomas. Além disso, foi demonstrado pela primeira vez que a dupla ligação olefínica dos análogos não piridínicos tem pouca influência para sua atividade citotóxica.

2.3.2.5. Previsão de parâmetros de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção dos híbridos CT1-2, HCT1-2, CPT1-2 e HCPT1-2

Os parâmetros físico-químicos, de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e fármacossimilaridade das tiossemicarbazonas avaliadas biologicamente foram preditos utilizando a plataforma SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017). De acordo com o modelo BOILED-egg (*Brain Or IntestinaL EstimateD permeation*), as tiossemicarbazonas devem possuir boa absorção intestinal e nenhuma delas deve atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (Figura 2.36). Os valores de log $P_{O/W}$ consensual (Tabela 2.10), na faixa de 2,80 a 3,55, indicam que essas substâncias devem ser capazes de atravessar facilmente as membranas celulares.

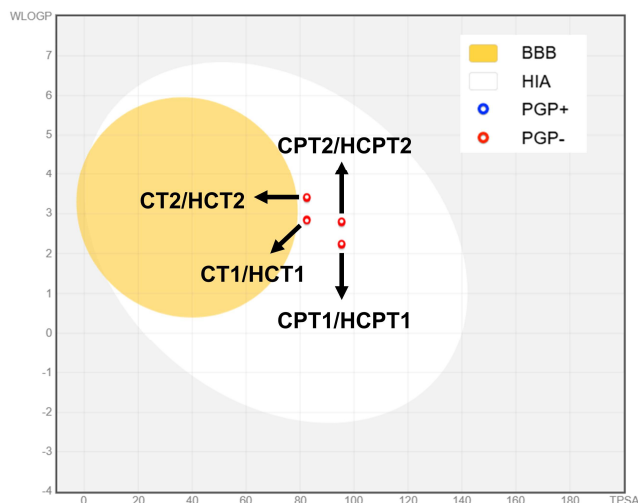


Figura 2.36. Modelo BOILED-egg para as tiossemicarbazonas. BBB: absorção pela barreira hematoencefálica. HIA: absorção intestinal humana. PGP+: substrato para a P-gp. PGP- : não é substrato para a P-gp. Região amarela indica boa permeabilidade pela barreira hematoencefálica. Região branca indica boa absorção gastrointestinal.

Uma vez que essas substâncias possuem uma dupla ligação carbono-nitrogênio em sua estrutura, pode ser questionado se seriam estáveis no ambiente estomacal ácido, já que iminas são relativamente propensas a hidrólise nessas condições. No entanto, este grupo não é uma imina qualquer. Trata-se, na verdade, de uma hidrazona. Hidrazonas e outros compostos similares possuem maior resistência a hidrólise que iminas. Uma das possíveis razões para a sua maior estabilidade envolve a participação do par de elétrons livre do NH central em uma ressonância que deve aumentar a densidade eletrônica negativa no carbono sp^2 , reduzindo a sua eletrofilicidade e, como consequência, aumentando a estabilidade à hidrólise (Kalia; Raines, 2008). Inclusive, a tiossemicarbazona **COTI-2**, que já foi avaliada clinicamente, apresenta biodisponibilidade quando administrada oralmente (Westin et al., 2018).

As tiossemicarbazonas obedecem a todos os critérios de cinco diferentes modelos de fármacossimilaridade (Tabela 2.10), indicando que possuem características estruturais e físico-químicas compatíveis com fármacos. Foi previsto, no entanto, que essas substâncias possuem potencial para atuarem como inibidoras de algumas isoformas do citocromo P450 (CYP), sendo possível, portanto, que causem efeitos medicamentosos adversos (Guengerich, 2024).

Tabela 2.10. Algumas propriedades físico-químicas e adequação a regras de *fármacossimilaridade* previstas pela plataforma da web SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017).

	Log $P_{o/w}$ ^a	Inibição da CYP (Isoforma)	Fármacossimilaridade (n° de violações)				
			Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge
CT1	2,80	✓ (CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9)	✓	✓	✓	✓	✓
HCT1	3,23	✓ (CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9)	✓	✓	✓	✓	✓
CT2	3,23	✓ (CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9)	✓	✓	✓	✓	✓
HCT2	3,55	✓ (CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9)	✓	✓	✓	✓	✓
CPT1	3,55	✓ (CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9)	✓	✓	✓	✓	✓
HCPT1	2,49	✓ (CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9)	✓	✓	✓	✓	✓
CPT2	2,49	✓ (CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9)	✓	✓	✓	✓	✓
HCPT2	2,80	✓ (CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9)	✓	✓	✓	✓	✓

^a log $P_{o/w}$ consensual: coeficiente de partição octanol/água calculado como a média aritmética de cinco modelos preditivos distintos de log P.

2.3.3. Conclusões e perspectivas

No presente trabalho, 25 derivados de chalconas e azachalconas, 11 dos quais inéditos (CT10-11; CPT2; CPT5-CPT8; HCT2 e HCPT1-2), foram preparados e caracterizados com sucesso. Oito dessas substâncias prosseguiram para os ensaios biológicos (CT1-2, HCT1-2, CPT1-2 e HCPT1-2). Os derivados não piridínicos apresentaram moderada à baixa atividade contra células Huh-7, com valores de IC_{50} entre 29,86 e 37,00 μ M. A presença da piridina aumentou a potência dessa classe em cerca de mil vezes ($IC_{50} = 17,51$ -41,76 nM). Avaliações preliminares na presença de tetratimolibidato de amônio demonstraram que a atividade dos derivados piridínicos deve estar em parte associada à formação de complexos de cobre citotóxicos no meio de cultura celular. Ainda, este trabalho fornece indícios de que o mesmo mecanismo não deve ocorrer para as tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e di-hidro-chalconas e mostra pela primeira vez que a dupla ligação olefínica não influencia de maneira significativa a citotoxicidade da classe, ao contrário de quando está presente o anel piridínico.

Cálculos de mecânica molecular e DFT forneceram geometrias moleculares que explicam alguns padrões de deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de 1H das tiossemicarbazonas. Além disso, o método EDF2/6-31G*, com as correções implementadas no programa Spartan'24, previu muito bem os espectros de RMN de ^{13}C , confirmando as atribuições dos sinais observadas nos espectros experimentais. Os espectros previstos também auxiliaram na identificação das espécies majoritária (isômero *E*) e minoritária (isômero *Z*) observadas experimentalmente. Esse estudo mostra que além do singlete referente ao grupo NH central, os sinais dos carbonos C1, C2, C8 e C9 podem ser utilizados para identificar facilmente os isômeros *E* e *Z*.

2.3.4. Materiais e métodos

Todos os solventes e reagentes foram adquiridos da Neon e Sigma-Aldrich, respectivamente, e usados como recebidos. Os espectros de infravermelho foram obtidos pela técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance*), na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , em um espectrofotômetro *Brüker*, modelo *FT-IR Vertex 70*. Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (500 MHz ou 400 MHz) e carbono (125 MHz ou 100 MHz) foram realizados em um espectrômetro *Bruker Ultrashield Plus*, utilizando DMSO- d_6 como solvente. A referência interna foi o próprio solvente. Os deslocamentos

químicos (δ) foram reportados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades foram designadas da seguinte forma: s, singlete; d, duplete; dd, duplo duplete; t, tripleto; td, triplo duplete; m, multiplete. Em alguns casos, a atribuição completa dos sinais foi realizada com auxílio de experimentos bidimensionais (COSY, NOESY HMBC E HSQC). Os pontos de fusão (P.F.) foram obtidos em um aparelho da marca Gehaka, modelo PF1500 FARMA, e não foram corrigidos. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD) em cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (Merck) e reveladas em lâmpada UV (254 nm). Espectrometria de Massas de Alta Resolução dos híbridos **CPT**, **HCT** e **HCPTs** inéditos foi realizada no modo positivo, em um equipamento de cromatografia líquida (zorbax C18, 2,1mm x 50 mm x 1,8 μ m) acoplada a espectrômetro de massas *QTOF-6530* (Agilent, *Thermo Scientific*) com uma fonte de ionização por electrospray.

Os reagentes e produtos tiveram suas massas aferidas na balança analítica ATX-224 SHIMADZU ou na balança semi-analítica BEL ENGINEERING MARK S 203. As reações e recristalizações foram realizadas com uma placa de agitação e aquecimento C-MAG HS7 (IKA). Para a aferição do pH das soluções foram utilizadas fitas de pH universal da marca Macherey-Nagel.

2.3.4.1. Procedimentos sintéticos e caracterização.

2.3.4.2. Síntese das chalconas e azachalconas.

As chalconas e azachalconas foram preparadas pela clássica reação de condensação de Claisen-Schmidt, como reportado anteriormente (Mendes et al., 2019). Para tanto, uma solução contendo 14 mmols de acetofenona (1,63 mL) em 12 mL de etanol foi resfriada em banho de gelo e sal. Em seguida, 7,0 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 10% foi adicionada gota a gota ao frasco. A mistura foi agitada a 0 °C por 10 minutos. Em seguida, 14 mmol do aldeído desejado foi adicionado gota a gota. A mistura foi mantida em agitação a 0 °C por 15-20 minutos e, em seguida, por mais 1 h e 30 minutos a temperatura ambiente. Por fim, a mistura foi resfriada e neutralizada com adição de HCl 10% v/v. Os sólidos foram filtrados e levados com água destilada gelada. As chalconas foram purificadas por recristalização em etanol. As azachalconas, por sua vez, foram lavadas com uma mistura metanol:água (4:6 v/v).

2.3.4.3. Síntese das di-hidrochalconas (HC1-2) e di-hidroazachalconas (HCP1-2)

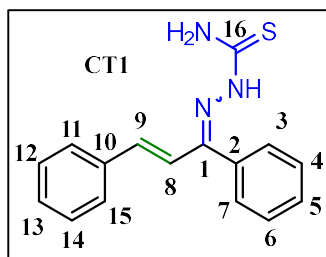
As di-hidrochalconas (HC1-2) e di-hidroazachalconas (HCP1-2) foram sintetizadas pela hidrogenação da ligação olefínica em atmosfera de H₂ e catálise heterogênea (Pd/C) (Soto; Soengas; Rodríguez-Solla, 2020). A reação se deu em um balão de fundo redondo de duas bocas contendo uma mistura da chalcona adequada (3 mmol) e do catalizador (Pd/C 10%, 63 mg) em diclorometano (30 mL). A mistura foi mantida sob agitação constante, a temperatura ambiente, em atmosfera de H₂. O progresso da reação foi acompanhado por CCF com eluentes adequados. Para isolar o produto, a mistura foi filtrada em funil de vidro sinterizado contendo uma pequena camada de terra de infusório. O solvente da solução obtida foi eliminado em pressão reduzida. O produto bruto obtido foi utilizado na próxima etapa sem purificação prévia (HC1-2) ou foi previamente purificado por cromatografia em coluna (HCP1-2). Para a cromatografia, a coluna foi empacotada com sílica gel (70-230 mesh) pelo método úmido (hexano) e então eluída em modo gradiente com misturas hexano:acetato de etila de polaridade crescente.

2.3.4.4. Síntese das tiossemicarbazonas finais

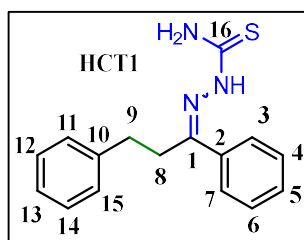
Uma mistura do precursor carbonilado adequado (2 mmol) e tiossemicarbazida (2,4 mmol) em etanol (15 mL) contendo algumas gotas de ácido clorídrico concentrado, foi mantida em refluxo e agitação, sendo monitorada por CCF (Mendes et al., 2019). Após o período de 4-6 h a mistura foi resfriada e o precipitado filtrado, lavado com hexano e purificado por recristalização em etanol (CT1-14), em uma mistura de etanol:THF (CPT1; CPT10) ou lavado com etanol quente (CPT2-9). Os derivados hidrogenados, por sua vez, após o seu isolamento na forma bruta, foram lavados exaustivamente com hexano e, em seguida, recristalizados em uma mistura de etanol:água.

A atribuição completa dos sinais observados nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C foi feita somente para as substâncias que prosseguiram para as etapas de avaliação biológica. Para as demais substâncias, somente os sinais mais característicos e que comprovam diretamente a presença do substituinte (C13), da dupla ligação olefínica (H8 e H9; C8 e C9), da tiocarbonila (C16), do carbono da hidrazona (C1) e dos grupos NH e NH₂ foram atribuídos.

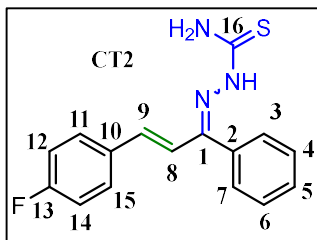
Derivados investigados em ensaios biológicos:



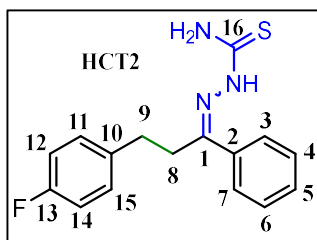
CT1. Cristais amarelo pálidos, rendimento: 40%; P.F.: 137–138 °C (133–135 °C, Mendes et al., 2019). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3466, 3284, 3178, 3151 (νNH); 3036 ($\nu\text{C-H}$); 1581-1443 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$), 966 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 824 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 11,12 (s, 1H, NH), 8,33 (s, 1H, (NH)-H), 7,81 (m, 2H, H8 e (NH)-H), 7,72 (d, 2H, 3J 7,3 Hz, H11+15), 7,63 (m, 2H, H3+7), 7,45 (m, 3H, H4+6 e H5), 7,40 (m, 2H, H12+14), 7,36 (m, 1H, H13), 6,77 (d, 3J 16,09 Hz, 1H, H9). Isômero minoritário (*Z*): 8,63 (s, 1H, (NH)-H), 8,48 (s, 1H, NH), 8,14 (s, 1H, (NH)-H), 7,63 (m, 3H, H4+6 e H5), 7,45 (m, 1H, H11+15), 7,40 (m, 2H, H12+14), 7,36 (m, 2H, H3+7), 7,30 (t, 3J 7,22 Hz, H13), 7,17 (d, 1H, 3J 16,37 Hz, H8), 6,42 (d, 1H, 3J 16,37 Hz, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 148,2 (C1), 136,8 (C2), 129,2 (C3+7), 128,26 (C4+6), 129,04 (C5), 118,73 (C8), 139,63 (C9), 135,81 (C10), 127,95 (C11+15), 128,62 (C12+14), 129,3 (C13), 178,9 (C16). Isômero minoritário (*Z*): 150,5 (C1), 130,3 (C2), 128,2 (C3+7), 129,8 (C4+6), 130,0 (C5), 128,3 (C8), 136,6 (C9), 135,7 (C10), 126,9 (C11+15), 128,9 (C12+14), 128,8 (C13), 177,8 (C16).



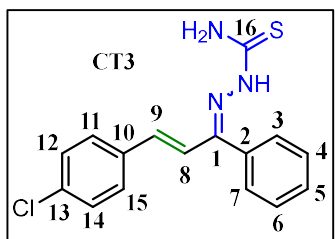
HCT1. Sólido branco, rendimento: 28%; P.F.: 117–119 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3414, 3342, 3230, 3144 (νNH); 3063, 3032 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 2955, 2868 ($\nu\text{C-H}_{\text{alifático}}$); 1593-1454 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$), 849 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 10,58 (s, 1H, NH), 8,29 (s, 1H, (NH)-H), 7,90 (m, 3H, H3+7 e (NH)-H), 7,39 (m, 3H, H4+6 e H5), 7,30 (m, 4H, H11+15 e H12+14), 7,19 (t, 1H, 3J 7,02 Hz, H13), 3,19 (t, 2H, 3J 8,10 Hz, H8), 2,70 (t, 2H, 3J 8,10 Hz, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 150,1 (C1), 136,7 (C2), 126,8 (C3+7), 128,4 (C4+6), 129,1 (C5), 27,6 (C8), 31,5 (C9), 140,6 (C10), 128,4 (C11+15), 128,2 (C12+14), 126,1 (C13), 179,1 (C16). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{S}^+$: 284,1216. Encontrado: 284,1211.



CT2. Cristais amarelo pálidos, rendimento: 46%; P.F.: 153–154 °C (152–154 °C, Mendes et al., 2019). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3468, 3412, 3340, 3252, 3151 (νNH); 3041 ($\nu\text{C-H}$); 1595-1412 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$), 966 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 827 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 11,08 (s, 1H, NH), 8,27 (s, 1H, (NH)-H), 7,78 (m, 2H, H11+15 e (NH)-H), 7,71 (d, 1H, 3J 16,10 Hz, H8), 7,60 (m, 2H, H3+7), 7,44 (m, 3H, H4+6 e H5), 7,24 (m, 2H, 3J 8,80 Hz, H12+14), 6,75 (d, 3J 16,10 Hz, 1H, H9). Isômero minoritário (*Z*): 8,59 (s, 1H, (NH)-H), 8,46 (s, 1H, NH), 8,14 (s, 1H, (NH)-H), 7,78 (m, 1H, H5), 7,64 (t, 2H, 3J 6,98 Hz, H4+6), 7,53 (dd, 2H, 3J 8,79, 4J 5,69, H11+15), 7,32 (d, 2H, 3J 6,98, H3+7), 7,18 (t, 2H, 3J 8,79 Hz, H12+14), 7,12 (d, 1H, 3J 16,34 Hz, H8), 6,41 (d, 1H, 3J 16,34 Hz, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 148,4 (C1), 136,9 (C2), 129,4 (C3+7), 128,5 (C4+6), 129,4 (C5), 118,7 (C8), 139,6 (C9), 132,6 (C10), 130,3 (C11+15), 115,8 (C12+14), 162,9 (C13), 179,0 (C16). Isômero minoritário (*Z*): 150,9 (C1), 130,8 (C2), 128,4 (C3+7), 130,0 (C4+6), 130,3 (C5), 128,4 (C8), 135,7 (C9), 132,5 (C10), 129,3 (C11+15), 116,1 (C12+14), 162,5 (C13).

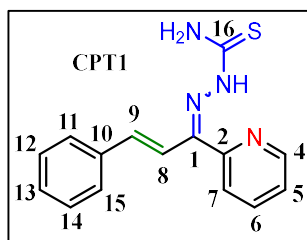


HCT2. Sólido branco, rendimento: 37%; P.F.: 97–98 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3414, 3344, 3232, 3146 (νNH); 3061, 3032 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 2976, 2876 ($\nu\text{C-H}_{\text{alifático}}$); 1593-1450 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$), 849 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 10,60 (s, 1H, NH), 8,30 (s, 1H, (NH)-H), 7,89 (m, 3H, H3+7 e (NH)-H), 7,38 (m, 3H, H4+6 e H5), 7,34 (dd, 2H, 3J 8,44 Hz, 4J 5,75 Hz, H11+15), 7,10 (t, 2H, 3J 8,44 Hz, H12+14), 3,18 (t, 2H, 3J 8,42 Hz, H8), 2,69 (t, 2H, 3J 8,42 Hz, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 149,7 (C1), 136,6 (C2), 126,9 (C3+7), 128,4 (C4+6), 129,2 (C5), 27,7 (C8), 30,7 (C9), 136,8 (C10), 130,3 (C11+15), 114,9 (C12+14), 160,8 (C13), 179,0 (C16). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{S}^+$: 302,1122. Encontrado: 302,1119.

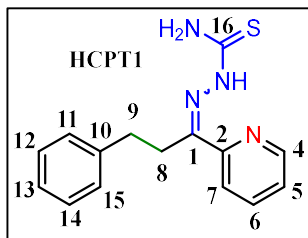


CT3. Cristais amarelo pálidos, rendimento: 57%; P.F.: 162–164 °C (163–164 °C, Mendes et al., 2019). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3412, 3341, 3248, 3140 (νNH); 3042 ($\nu\text{C-H}$); 1597, 1473, 1441 ($\nu\text{C=C}$); 1556 ($\nu\text{C=N}$) 833 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 11,09 (s, 1H, NH), 8,25 (s, 1H,

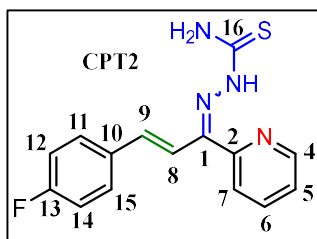
NH), 7,78–7,73 (m, 4H, NH, H8 e H11+15), 7,60 (m, 2H, H3+7), 7,45 (m, 5H, H4+6, H5 e H12+14), 6,75 (d, 3J 16,11 Hz, 1H, H9). Isômero minoritário (Z): 8,57 (s, 1H, NH), 8,50 (s, 1H, NH), 8,14 (s, 1H, NH), 7,65 (t, 3J 6,94 Hz, 2H, H4+6), 7,6 (m, 1H, H5), 7,5 (d, 2H, 3J 8,53 Hz, H11+15), 7,40 (d, 2H, 3J 8,53 Hz, H12+14), 7,32 (d, 2H, 3J 8,13 Hz, H3+7), 7,19 (d, 3J 16,36 Hz, H8), 6,40 (d, 3J 16,36 Hz, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (E): 148,5 (C1), 137,1 (C2), 129,6 (C3+7), 129,1 (C4+6), 129,6 (C5), 119,9 (C8), 138,7 (C9), 135,2 (C10), 130,1 (C11+15), 128,8 (C12+14), 134,3 (C13), 179,3 (C16). Isômero minoritário (Z): 151,0 (C1), 130,6 (C2), 128,6 (C3+7), 130,3 (C4+6), 130,5 (C5), 129,6 (C8), 135,7 (C9), 135,1 (C10), 129,1 (C11+15), 129,4 (C12+14), 133,6 (C13), 178,25 (C16). HRMS: m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_3\text{S}$: 314,05242. Encontrado: 314,05226. Análise elementar, calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{S}$ (%): C, 60,85; H, 4,47; N, 13,31. Encontrado: C, 61,11; H, 4,42; N, 13,47. UV–Vis (DMSO; λ/nm): 278, 356.



CPT1. Cristais incolores, rendimento: 87%; P.F.: 199–203 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3414, 3248, 3157 (νNH); 3090, 3059 ($\nu\text{C-H}$); 1599–1446 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$), 966 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 835 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (E): 11,23 (s, 1H, NH), 8,62 (d, 1H, 3J 4,70 Hz, H4) 8,44 (s, 1H, (NH)-H), 7,96 (m, 2H, H7 e (NH)-H), 7,87 (td, 1H, 3J 7,82 Hz, 4J 1,95 Hz, H6), 7,75 (d, 1H, 3J 16,06 Hz, H8), 7,71 (d, 2H, 3J 7,31, H11+15), 7,45 (dd, 1H, $3J = 7,82$ Hz, 4,70 Hz, H5), 7,41–7,28 (m, 3H, H12+14 e H13), 7,14 (d, 3J 16,06 Hz, H9). Isômero minoritário (Z): 12,86 (s, 1H, NH), 8,66 (s, 1H, (NH)-H), 8,29 (s, 1H, NH), 8,83 (d, 1H, 3J 4,2 Hz, H4), 8,11 (td, 1H, 3J 7,91, 4J 1,95, H6), 7,95 (m, 1H, H7), 7,65 (d, 2H, 3J 7,44 Hz, H11+15), 7,61 (dd, 1H, 3J 7,91 Hz, 4J 4,2 Hz, H5), 7,41–7,28 (m, 4H, H9, H12+14 e H13), 7,29 (d, 1H, 3J 16,12 Hz, H8). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (E): 146,1 (C1), 155,4 (C2), 148,4 (C4), 123,8 (C5), 136,9 (C6), 124,0 (C7), 117,2 (C8), 140,1 (C9), 136,3 (C10), 127,9 (C11+15), 128,7 (C12+14), 129,3 (C13), 179,1 (C16). Isômero minoritário (Z): 140,4 (C1), 151,3 (C2), 148,7 (C4), 124,9 (C5), 138,6 (C6), 124,8 (C7), 124,4 (C8), 134,7 (C9), 136,4 (C10), 127,2 (C11+15), 128,8 (C12+14), 128,6 (C13), 178,2 (C16).

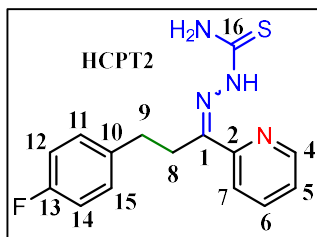


HCPT1. Sólido branco, rendimento: 55%; P.F.: 146–147 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3485, 3414, 3396, 3340, 3240, 3144 (νNH); 3057, 3022 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 2951, 2893 ($\nu\text{C-H}_{\text{alifático}}$), 1598-1441 ($\nu\text{C}=\text{C}$ e $\nu\text{C}=\text{N}$), 827 ($\nu\text{C}=\text{S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 10,73 (s, 1H, NH), 8,59 (d, 1H, 3J 4,86 Hz, H4), 8,40 (m, 2H, H7 e (NH)-H), 8,12 (s, 1H, (NH)-H), 7,78 (t, 1H, 3J 8,18 Hz, H6), 7,38 (t, 1H, 3J 4,86 Hz, 8,18 Hz, H5), 7,31-7,26 (m, 4H, H11+15 e H12+14), 7,18 (t, 1H, H13), 3,38 (H8+H₂O), 2,72 (t, 3J 8,35 Hz, H9). Isômero minoritário (*Z*): 13,99 (s, 1H, NH), 8,77 (d, 1H, 3J 4,69 Hz, H4), 8,49 (s, 1H, (NH)-H), 8,06 (t, 1H, 3J 7,97 Hz, H6), 7,92 (s, 1H, (NH)-H), 7,89 (d, 1H, 3J 7,97 Hz, H7), 7,56 (dd, 1H, 3J 4,69, 7,97 Hz, H5), 7,31-7,26 (m, 4H, H11+15 e H12+14), 7,18 (t, 1H, H13), 3,07 (t, 2H, 3J 7,07 Hz, H8), 2,96 (t, 2H, 3J 7,07 Hz, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 150,1 (C1), 154,3 (C2), 148,5 (C4), 123,8 (C5), 136,4 (C6), 121,3 (C7), 26,0 (C8), 31,2 (C9), 141,08 (C10), 128,2 (C11+15), 128,1 (C12+14), 125,9 (C13), 179,2 (C16). Isômero minoritário (*Z*): 140,9 (C1), 151,9 (C2), 148,0 (C4), 124,6 (C5), 138,5 (C6), 124,1 (C7), 35,7 (C8), 32,7 (C9), 141,4 (C10), 128,4 (C11+15), 128,2 (C12+14), 125,8 (C13), 178,4 (C16). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{S}^+$: 285,1168. Encontrado: 285, 1164.



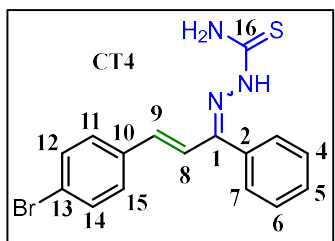
CPT2. Cristais amarelo pálidos, rendimento: 89%; P.F.: 208–209 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3412, 3246, 3163 (νNH); 3049 ($\nu\text{C-H}$); 1599-1454 ($\nu\text{C}=\text{C}$ e $\nu\text{C}=\text{N}$), 960 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 818 ($\nu\text{C}=\text{S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 11,2 (s, 1H, NH), 8,62 (d, 1H, 3J 4,08 Hz, H4), 8,43 (s, 1H, (NH)-H), 7,96 (m, 2H, H7 e (NH)-H), 7,87 (td, 1H, 3J 7,67 Hz, 4J 1,76 Hz, H6), 7,79 (dd, 1H, 3J 8,67 Hz, 4J 5,67 Hz, H11+15), 7,71 (m, 1H, H8), 7,43 (m, 1H, H5), 7,27-7,22 (m, 2H, H12+14), 7,17 (d, 3J 16,06 Hz, H9). Isômero minoritário (*Z*): 12,99 (s, 1H, NH), 8,82 (d, 1H, 3J 4,68 Hz, H4), 8,65 (s, 1H, (NH)-H), 8,26 (s, 1H, (NH)-H), 8,10 (td, 1H, 3J 7,53 Hz, 4J 1,73 Hz, H6), 7,96 (m, 1H, H7), 7,71 (m, 2H, H11+15), 7,60 (dd, 1H, 4J 0,72 Hz, 3J 4,68 Hz, 3J 7,53 Hz, H5), 7,42 (m, 1H, H9), 7,27-7,28 (m, 1H, H8 e H12+14). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 145,9 (C1), 155,3 (C2), 148,3 (C4), 123,7 (C5), 136,9 (C6), 123,9 (C7), 117,0 (C8), 138,8 (C9), 132,9 (C10), 130,0 (C11+15), 115,6 (C12+14), 162,6 (C13), 179,1 (C16). Isômero minoritário (*Z*): 140,0 (C1), 151,3 (C2), 148,6 (C4), 124,9 (C5), 138,5 (C6), 124,7 (C7), 124,1 (C8), 133,4 (C9), 133,1 (C10), 129,2 (C11+15), 115,7 (C12+14), 162,2

(C13), 178,3 (C16). HRMS: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{15}H_{14}FN_4S^+$: 301,0918. Encontrado: 301,0918.



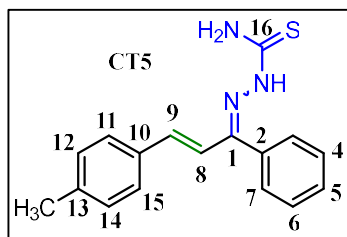
HCPT2. Sólido branco, rendimento: 67%; P.F.: 160–162 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3506, 3377 (ν NH); 3097, 3090, 3053 (ν C- $H_{aromático}$); 2949, 2920 (ν C- $H_{alifático}$), 1599-1456 (ν C=C e ν C=N), 822 (ν C=S). RMN de 1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 10,77 (s, 1H, NH), 8,61 (d, 1H, 3J 3,43 Hz, H4), 8,43 (s, 1H, (NH)-H), 8,38 (d, 1H, 3J 8,07 Hz, H7), 8,17 (s, 1H, (NH)-H), 7,86 (m, 1H, H6), 7,42 (m, 1H, H5), 7,32 (t, 2H, H11+15), 7,08 (t, 2H, H12+14), 3,34 (t, 2H, 3J 7,85 Hz, H8), 2,71 (t, 3J 7,85 Hz, H9). Isômero minoritário (*Z*): 13,99 (s, 1H, NH), 8,77 (d, 1H, 3J 3,75 Hz, H4), 8,48 (s, 1H, (NH)-H), 8,06 (t, 1H, 3J 8,10 Hz, H6), 7,93 (s, 1H, (NH)-H), 7,86 (m, 1H, H7), 7,55 (t, 2H, 3J 5,63 Hz, H5), 7,32 (t, 2H, H11+15), 7,08 (t, 2H, H12+14), 3,05 (t, 2H, 3J 7,13 Hz, H8), 2,96 (t, 2H, 3J 7,13 Hz, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): Isômero majoritário (*E*): 148,8 (C1), 153,7 (C2), 148,2 (C4), 124,1 (C5), 137,3 (C6), 121,7 (C7), 26,2 (C8), 30,5 (C9), 137,1 (C10), 130,2 (C11+15), 114,8 (C12+14), 160,8 (C13), 179,3 (C16). Isômero minoritário (*Z*): 140,8 (C1), 151,9 (C2), 148,1 (C4), 124,8 (C5), 138,6 (C6), 124,2 (C7), 35,73 (C8), 31,77 (C9), 137,6 (C10), 130,22 (C11+15), 114,9 (C12+14), 160,7 (C13), 178,4 (C16). HRMS: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{15}H_{16}FN_4S^+$: 303,1074. Encontrado: 303,1070.

Derivados ainda não avaliados em ensaios biológicos:



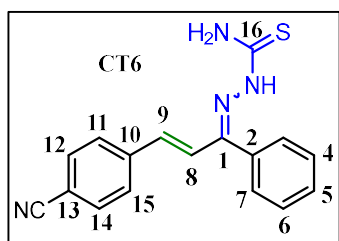
CT4. Cristais amarelo pálidos, rendimento: 70%; P.F.: 166–168 °C (166–168 °C, Mendes et al., 2019). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3412, 3340, 3250, 3151 (ν NH); 3041 (ν C-H); 1597-1441 (ν C=C e ν C=N); 968 (γ CH_{olefina trans}), 831 (ν C=S). RMN de 1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 11,13 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,63 (s, 1H, (NH)-H, isômero *Z*), 8,52 (s, 1H, NH, isômero *Z*), 8,32 (s, 1H, (NH)-H, isômero *E*), 8,13 (s, 1H, (NH)-H, isômero *Z*), 7,82 (d, 2 H, H8 e (NH)-H, isômero *E*), 7,70 (d, 2H, 3J 8,43 Hz, H11+15, isômero *E*), 7,66-7,59 (m, H aromático, isômeros *E* e *Z*), 7,54 (d, 2H, 3J 8,48 Hz, H11+15, isômero *Z*), 7,45-7,42 (m, H aromático, isômeros *E* e *Z*), 7,34 (d, 2H, 3J 7,05 Hz, H3+7, isômero *Z*), 7,18 (d, 1H, 3J 16,38 Hz, H8, isômero *Z*), 6,75 (d, 1H, 3J 16,06 Hz, H9, isômero *E*), 6,41 (d, 1H, 3J 16,35 Hz, H9, isômero *Z*). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 ,

ppm): 179,0 (C16, *E*), 177,8 (C16, *Z*), 150,5 (C1, *Z*), 147,9 (C1, *E*), 138,3 (C9, *E*), 136,7 (C2, *E*), 135,22 (C10, *E*), 135,20 (C9, *Z*), 135,11 (C10, *Z*), 131,9, 131,65, 130,2 (C2, *Z*), 130,1, 130,0, 129,9, 129,3, 129,2 (C8, *Z*), 128,9, 128,4, 128,3, 122,6 (C13, *E*), 121,9 (C13, *Z*), 119,6 (C8, *E*).



CT5. Cristais amarelo pálidos, rendimento: 51%; P.F.: 151–152 °C (138–140 °C, Mendes et al., 2019). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3404, 3340, 3225, 3138 (νNH); 3030 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 2995 ($\nu\text{C-H}_{\text{alifático}}$), 1595-1438 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$); 964 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 839 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 11,08 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,59 (s, 1H, (NH)-H, isômero *Z*), 8,43 (s, 1H, NH, isômero *Z*), 8,28 (s, 1H, (NH)-H, isômero *E*), 8,10 (s, 1H, (NH)-H, isômero *Z*), 7,77 (m, 2 H, H8 e (NH)-H, isômero *E*), 7,66-7,59 (m, H aromático, isômeros *E* e *Z*), 7,44 (m, H aromático), 7,34 (t, 4H, isômero *Z*), 7,21 (d, 2H, 3J 7,90 Hz, H11+15, isômero *E*), 7,16 (d, 2H, 3J 7,91 Hz, H11+15, isômero *Z*), 7,12 (d, 1H, 3J 16,35 Hz, H8, isômero *Z*), 6,73 (d, 1H, 3J 16,04 Hz, H9, isômero *E*), 6,39 (d, 1H, 3J 16,35 Hz, H9, isômero *Z*), 2,32 (s, 3H, CH₃, isômero *E*), 2,28 (s, 3H, CH₃, isômero *Z*).

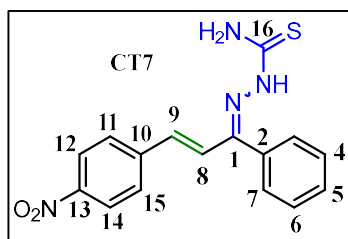
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 178,9 (C16, *E*), 177,7 (C16, *Z*), 150,8 (C1, *Z*), 148,5 (C1, *E*), 139,8 (C9, *E*), 139,2 (C13, *E*), 138,6 (C13, *Z*), 136,9 (C2, *E*), 136,7, 133,1 (C10, *E*), 133,0 (C10, *Z*), 130,4 (C2, *Z*), 130,0, 129,8, 129,6, 129,29, 129,26, 129,0, 128,3, 128,2, 128,0, 127,4, 126,9, 117,7 (C8, *E*), 21,0 (CH₃, *E*), 20,9 (CH₃, *Z*).



CT6. Cristais amarelos, rendimento: 70%; P.F.: 188–191 °C (195–196 °C, Mendes et al., 2019). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3421, 3340, 3234, 3142 (νNH); 3041 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 2222 (νCN), 1597-1473 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$); 964 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 839 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 11,19 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,68 (s, 1H, (NH)-H, isômero *Z*), 8,63 (s, 1H, NH, isômero *Z*), 8,36 (s, 1H, (NH)-H, isômero *E*), 8,16 (s, 1H, (NH)-H, isômero *Z*), 7,92 (m, 2 H, H8 e H11+15, isômero *E*), 7,86 (d, H12+14 e (NH)-H, isômero *E*), 7,80 (d, 2H, $3J$ 8,37 Hz, H12+14, isômero *Z*), 7,67 (d, 2H, $3J$ 8,37 Hz, H11+15, isômero *Z*), 7,64-7,59 (m, H aromático), 7,46-7,42 (m, H aromático), 7,35 (d, 2H, 3J 6,75 Hz, H3+7 isômero *Z*), 7,32 (d, 1H, 3J 16,35 Hz, H8, isômero *Z*), 6,83 (d, 1H, 3J 16,13 Hz, H9, isômero *E*), 6,52 (d, 1H, $3J$ 16,35 Hz, H9, isômero *Z*).

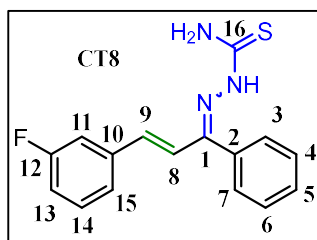
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 179,0 (C16, *E*), 178,0 (C16, *Z*), 149,7 (C1, *Z*), 147,2 (C1, *E*), 140,6 (C10, *E*), 139,8 (C9, *E*), 139,2 (C13, *E*), 138,6 (C13, *Z*), 136,9 (C2, *E*), 136,7, 133,1 (C10, *E*), 133,0 (C10, *Z*), 130,4 (C2, *Z*), 130,0, 129,8, 129,6, 129,29, 129,26, 129,0, 128,3, 128,2, 128,0, 127,4, 126,9, 117,7 (C8, *E*), 21,0 (CH₃, *E*), 20,9 (CH₃, *Z*).

140,5 (C10, *Z*), 137,4 (C9, *E*), 136,5 (C2, *E*), 134,32 (C9, *Z*), 132,8, 132,5, 131,9 (C8, *Z*), 130,1, 130,0 (C2, *Z*), 129,9, 129,2, 129,2, 128,6, 128,4, 128,3, 127,6, 122,1 (C8, *E*), 118,9 (-CN, *E*), 118,8 (-CN, *Z*), 111,0 (C13, *E*), 110,6 (C13, *Z*).



CT7. Cristais laranjas, rendimento: 82%; P.F.: 185–186 °C (188–190 °C, Mendes et al., 2019). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3423, 3338, 3234, 3124 (νNH); 3041 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 1591-1472 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$); 1342 (νNO_2) 951 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 829 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 11,3 (s, 1H, NH, isômero *E*),

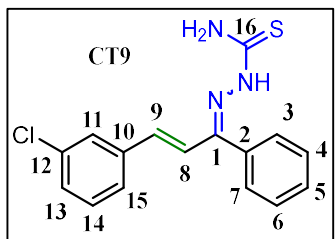
8,68 (bd, 2H, NH e (NH)-**H**, isômero *Z*), 8,38 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *E*), 8,25 (d, 2H, 3J 8,84 Hz, H12+14, isômero *E*), 8,21 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 8,19 (d, 1H, 3J 8,86 Hz, H12+14, isômero *Z*), 8,00 (d, 2H, 3J 8,84 Hz, H11+15, isômero *E*), 7,96 (d, 1H, 3J 16,13 Hz, H8, isômero *E*), 7,87 (s, 1H, NH, isômero *E*), 7,75 (d, 2H, 3J 8,86 Hz, H11+15, isômero *Z*), 7,67-7,60 (m, H aromático), 7,46-7,43 (m, H aromático), 7,37 (m, H3+7 e H8, isômero *Z*), 6,90 (d, 1H, 3J 16,13 Hz, H9, isômero *E*), 6,58 (d, 1H, 3J 16,37 Hz, H9, isômero *Z*). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 179,1 (C16, *E*), 178,0 (C16, *Z*), 149,6 (C1, *Z*), 147,3 (C13, *E*), 147,1 (C1, *E*), 146,8 (C13, *Z*), 142,6 (C10, *E*), 142,5 (C10, *Z*), 136,9 (C9, *E*), 136,5 (C2, *E*), 133,8 (C9, *Z*), 132,8 (C8, *Z*), 130,2, 130,0 (C2, *Z*), 129,9, 129,23, 129,21, 128,9, 128,4, 128,3, 127,9, 124,1, 123,8, 123,0 (C8, *E*).



CT8. Cristais incolores, rendimento: 59%; P.F.: 161–163°C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3470, 3313, 3184 (νNH); 3057, 3039 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 1580-1441 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$); 964 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 841 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 11,1 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,67 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 8,56 (s, 1H, NH, isômero *Z*), 8,36

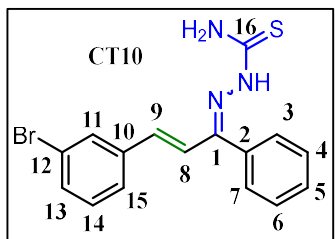
(s, 1H, (NH)-**H**, isômero *E*), 8,13 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 7,84 (m, 2H, (NH)-**H** e H8, isômero *E*), 7,73 (d, 1H, 3J 10,5 Hz, H11, isômero *E*), 7,66-7,59 (m, H aromático), 7,49 (d, 1H, 3J 7,69 Hz, H15, isômero *E*), 7,45-7,34 (m, H aromático), 7,31 (d, 3J 7,75 Hz, H15, isômero *Z*), 7,23-7,18 [m, H aromático e H8 (*Z*)], 7,13 (t, H13, isômero *Z*), 6,78 (d, 1H, 3J 16,07 Hz, H9, isômero *E*), 6,46 (d, 1H, 3J 16,31 Hz, H9, isômero *Z*). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 179,0 (C16, *E*), 177,9 (C16, *E*), 162,5 (C12, *E*), 150,0 (C1, *Z*), 147,5 (C1, *E*), 138,5 (C10, *E*), 138,4 (C10, *Z*), 138,14 (C9, *E*), 136,7 (C2, *E*), 135,0 (C9, *Z*), 130,8 (H14, *Z*), 130,5 (C14,

E), 130,2 (C2, *Z*), 130,0, 129,84 (C8, *Z*), 129,8, 129,2, 129,1, 128,3, 128,2, 124,72 (C15, *E*), 123,15 (C15, *Z*), 120,1 (C8, *E*), 115,9 (C13, *E*), 115,4 (C13, *Z*), 113,7 (C11, *E*), 113,2 (C11, *Z*).



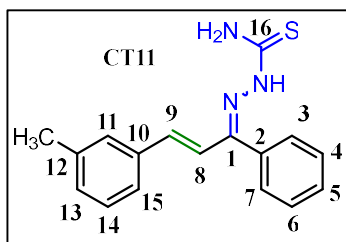
CT9. Cristais amarelo pálidos, rendimento: 70%; P.F.: 152–154°C (lit. 140–143°C, Kaur; Raghav, 2020). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3468, 3304, 3074 (νNH); 3041 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 1581–1450 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$); 966 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 835 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 11,1 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,67 (s, 1H, (NH)-

H, isômero *Z*), 8,58 (s, 1H, NH, isômero *Z*), 8,36 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *E*), 8,14 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 7,93 (s, 1H, H11, isômero *E*), 7,83 (d, 2H, H8 e (NH)-**H**, isômero *E*), 7,66–7,57 (m, H aromático), 7,45–7,34 (m, H aromático), 7,22 (d, 1H, 3J 16,41 Hz, H, isômero *Z*), 6,76 (d, 3J 16,12 Hz, H15, isômero *E*), 6,46 (d, 1H, 3J 16,41 Hz, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 178,9 (C16, *E*), 177,9 (C16, *Z*), 149,9 (C1, *Z*), 147,6 (C1, *E*), 138,1 (C10, *E*), 138,07 (C10, *Z*), 137,9 (C9, *E*), 136,6 (C2, *E*), 134,7 (C9, *Z*), 133,7 (C12, *Z*), 133,6 (C12, *E*), 130,7, 130,4, 130,1 (C2, *Z*), 130,02 (C8, *Z*), 129,96, 129,8, 129,2, 129,1, 128,9, 128,33, 128,3, 128,2, 127,1, 126,9, 126,5, 125,5, 120,2 (C8, *E*).

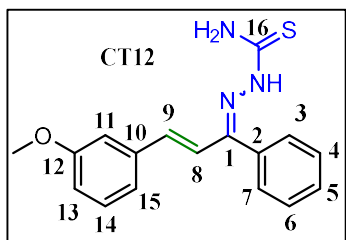


CT10. Cristais amarelo pálidos, rendimento: 75%; P.F.: 155–156°C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3470, 3311, 3176 (νNH); 3041 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 1580–1445 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$); 966 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 837 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 11,1 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,67 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 8,58 (s, 1H,

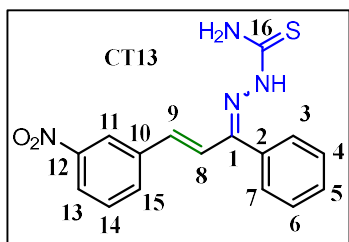
NH, isômero *Z*), 8,36 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *E*), 8,15 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 8,04 (s, 1H, H11, isômero *E*), 7,84 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *E*), 7,81 (d, 1H, 3J 16,11 Hz, H8, isômero *E*), 7,71 (s, 1H, H11, isômero *Z*), 7,67–7,59 (m, H aromático), 7,54 (d, 3J 7,96 Hz, H13, isômero *E*), 7,49–7,42 (m, H aromático), 7,36–7,29 (m, H aromático), 7,21 (d, 1H, 3J 16,33 Hz, H8, isômero *Z*), 6,75 (d, 1H, 3J 16,11 Hz, H9, isômero *E*), 6,44 (d, 1H, 3J 16,33 Hz, H9, isômero *Z*). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 178,9 (C16, *E*), 149,9 (C1, *Z*), 147,6 (C1), 138,4 (C10, *E*), 137,8 (C9, *E*), 136,7 (C2, *E*), 134,6 (C9, *Z*), 131,8, 131,2, 131,0, 130,7, 130,1, 130,0, 129,9 (C8, *Z*), 129,8, 129,4, 129,2, 129,1, 128,3, 128,2, 127,4, 125,8, 122,3 (C12, *Z*), 122,2 (C12 *E*), 120,2 (C8, *E*).



CT11. Cristais incolores, rendimento: 52%; P.F.: 149–151°C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3470, 3308, 3182 (νNH); 3041 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 2958, 2918 ($\nu\text{C-H}_{\text{alifático}}$), 1580-1450 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$); 966 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 841 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (obtido imediatamente após dissolução, 500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 11,1 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,61 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 8,48 (s, 1H, NH, isômero *Z*), 8,31 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *E*), 8,11 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 7,78 (m, 2H, isômero *E*), 7,66-7,59 (m, 3H, isômero *Z*), 7,51 (m, 2H, isômero *E*), 7,44 (m, 3H, isômero *Z*), 7,33 (d, 2H, 3J 6,91 Hz, H3+7, isômero *Z*), 7,27-7,21 (m, H aromático), 7,15 (d, 1H, 3J 16,35 Hz, H, isômero *Z*), 7,12 (d, 1H, isômero *Z*), 6,72 (d, 1H, 3J 16,08 Hz, H9, isômero *E*), 6,39 (d, 1H, 3J 16,35 Hz, H9, isômero *Z*), 2,33 (s, 3H, CH_3 , isômero *E*), 2,28 (s, 3H, CH_3 , isômero *Z*). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 178,9 (C16, *E*), 177,7 (C16, *Z*), 150,5 (C1, *Z*), 148,3 (C1, *E*), 139,9 (C9, *E*), 138,0, 137,8, 136,9, 136,7, 136,65 (C9, *Z*), 135,7, 135,6, 130,3, 130,0, 129,9, 129,7, 129,5, 129,2, 129,0, 128,8, 128,5, 128,4, 128,22, 128,15, 128,1, 127,5, 125,2, 124,0, 118,5 (C8, *E*), 20,90 (CH_3 , *E*), 20,81 (CH_3 , *Z*).

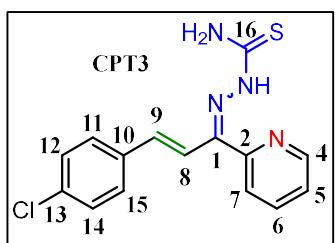


CT12. Cristais incolores, rendimento: 74%; P.F.: 141-142°C (lit. 136-140°C, Kaur; Raghav, 2020). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3464, 3273, 3200, 3151 (νNH); 3032, 3009 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 2958, 2839 ($\nu\text{C-H}_{\text{alifático}}$), 1580-1454 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$); 968 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 843 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 11,03 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,61 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 8,48 (s, 1H, NH, isômero *Z*), 8,31 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *E*), 8,12 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 7,78 (d, 2H, H8 e (NH)-**H**, isômero *E*), 7,67-7,59 (m, H aromático), 7,44 (m, H aromático), 7,34-7,25 (m, H aromático), 7,18 (d, 1H, 3J 16,33 Hz, H8, isômero *Z*), 7,04 (m, H aromático, isômero *Z*), 6,94 (dt, 1H, isômero *E*), 6,88 (dd, 1H, isômero *Z*), 6,75 (d, 1H, 3J 16,08 Hz, H9, isômero *E*), 6,42 (d, 1H, 3J 16,33 Hz, H9, isômero *Z*), 3,79 (s, 3H, CH_3 , isômero *E*), 3,75 (s, 3H, CH_3 , isômero *Z*). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 178,9 (C16, *E*), 177,8 (C16, *Z*), 159,61 (C12, *Z*), 159,6 (C12, *E*), 150,5 (C1, *Z*), 148,2 (C1, *E*), 139,6 (C9, *E*), 137,2 (C10, *E*), 136,8 (C10, *Z*), 136,5 (C9, *Z*), 130,3 (C2, *Z*), 130,0, 129,9, 129,8, 129,6, 129,2, 129,0, 128,6 (C8, *Z*), 128,3, 128,2, 120,5, 119,3, 119,0 (C8, *E*), 115,0, 113,1, 111,6, 55,3 (CH_3 , *E*), 55,1 (CH_3 , *Z*).



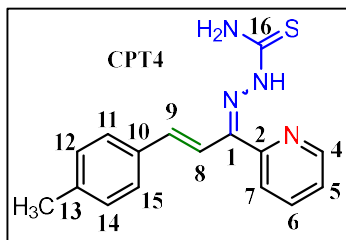
CT13. Cristais amarelo-alaranjados, rendimento: 94%; P.F.: 191-193°C (lit. 134-136°C, Kaur; Raghav, 2020). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3468, 3311, 3174 (νNH); 3065, 3034 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 1582-1452 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$); 1522, 1352 (νNO_2), 970 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina-trans}}$), 820 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (obtido imediatamente após

dissolução, 500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 11,2 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,64 [m, (NH)-**H** (*Z*), NH (*Z*), H11 (*E*)], 8,35 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,33 (s, 1H, H11, isômero *Z*), 8,21-8,11 (H aromático + (NH)-**H**), 7,93 (m, H, H8 (*E*) + H aromático), 7,86 (s, 1H, NH, isômero *E*), 7,71-7,60 (m, H aromático), 7,46 (m, H aromático), 7,36 (m, H8 (*Z*) e H aromático), 6,94 (d, 1H, 3J 16,18 Hz, H9, isômero *E*), 6,63 (d, 1H, 3J 16,39 Hz, H9, isômero *Z*). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 179,0 (C16, *E*), 149,7 (C1, *Z*), 148,3, 147,4 (C1, *E*), 137,8 (C10, *E*), 137,7 (C10, *Z*), 137,1 (C9, *E*), 136,6 (C2, *E*), 134,4, 133,8 (C9, *Z*), 133,1, 131,1 (C8, *Z*), 130,4, 130,1, 130,0 (C2, *Z*), 129,9, 129,2, 128,4, 128,2, 123,5, 123,0, 122,0, 121,5 (C8, *E*), 121,1.

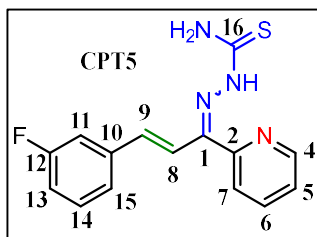


CPT3. Sólido amarelo, rendimento: 57%; P.F.: 185–186 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3419, 3255, 3153 (νNH); 3045 ($\nu\text{C-H}$); 1593-1468 ($\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$), 955 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 839 ($\nu\text{C=S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 13,09 (s, 1H, NH, isômero *Z*), 11,27 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,82 (d, 1H, 3J 4,16 Hz, H4, isômero *Z*),

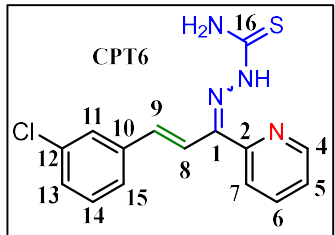
8,68 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 8,62 (d, 1H, 3J 4,23 Hz, H4, isômero *E*), 8,46 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *E*), 8,29 (s, 1H, (NH)-**H**, isômero *Z*), 8,10 (td, 1H, 3J 7,90 Hz, 4J 1,65 Hz, H6, isômero *Z*), 7,97 (m, H aromático e (NH)-**H**), 7,87 (td, 1H, 3J 7,68 Hz, 4J 1,67 Hz, H6, isômero *E*), 7,75 (m, H8 (*E*) e H aromático), 7,79 (d, 2H, 3J 8,51 Hz, H aromático, isômero *Z*), 7,61 (dd, 3J 5,1 Hz, 7,18 Hz, H5, isômero *Z*), 7,47-7,43 [m, H aromático e H9 (*Z*)], 7,33 (d, 3J 16,05 Hz, H8, isômero *Z*), 7,17 (d, 3J 16,04 Hz, H9, isômero *E*). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 179,1 (C16, *E*), 178,3 (C16, *Z*), 155,3 (C2, *E*), 151,3 (C2, *Z*), 148,6 (C4, *Z*), 148,3 (C4, *E*), 145,6 (C1, *E*), 139,6 (C1, *Z*), 138,6 (C9, *E*), 138,5 (C6, *Z*), 136,9 (C6, *E*), 135,5, 135,3, 133,6, 133,1 (C9, *Z*), 132,8, 129,5, 128,9, 128,8, 128,7, 124,9 (C8, *Z*), 124,7, 123,9, 123,7, 117,9 (C8, *E*).



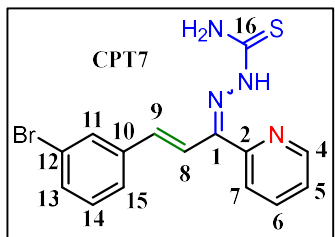
CPT4. Cristais incolores, rendimento: 70%; P.F.: 182–183 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3417, 3262, 3149 (νNH); 3055, 3018 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 2941 ($\nu\text{C-H}_{\text{alifático}}$), 1593-1468 ($\nu\text{C}=\text{C}$ e $\nu\text{C}=\text{N}$), 957 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 841 ($\nu\text{C}=\text{S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 12,81 (s, 1H, NH, isômero Z), 11,21 (s, 1H, NH, isômero E), 8,82 (d, 1H, 3J 4,37 Hz, H4, isômero Z), 8,63 [d, 2H, (NH)-H (Z) e H4 (E)], 8,41 (s, 1H, (NH)-H, isômero E), 8,29 (s, 1H, (NH)-H, isômero Z), 8,10 (td, 1H, 3J 7,89 Hz, 4J 1,63 Hz, H6, isômero Z), 7,95-7,92 (m, H aromático e (NH)-H), 7,87 (td, 1H, 3J 7,66 Hz, 4J 1,63 Hz, H6, isômero E), 7,72 (d, 1H, 3J 16,01 Hz, H8, isômero E), 7,60 (m, H aromático), 7,54 (d, 2H 3J 8,03 Hz, H aromático, isômero Z), 7,44 (dd, H aromático), 7,33 (d, 3J 16,09 Hz, H9, isômero Z), 7,24-7,19 [m, H aromático e H8 (Z)], 7,11 (d, 3J 16,01 Hz, H8, isômero E), 2,32 (s, 3H, CH_3 , isômero E), 2,31 (s, 3H, CH_3 , isômero Z). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 179,1 (C16, E), 178,2 (C16, Z), 155,5 (C2, E), 151,33 (C2, Z), 148,71 (C4, Z), 148,30 (C4, E), 146,3 (C1, E), 140,7 (C1, Z), 140,2, 139,0, 138,5, 138,2, 136,9, 134,7, 133,7, 133,6, 129,4, 129,3, 127,9, 127,2, 124,9, 124,8, 124,0, 123,7, 123,4, 116,2, 21,01 (CH_3 , E), 20,96 (CH_3 , Z). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{S}^+$: 297,1168. Encontrado: 297,1172.



CPT5. Sólido amarelo pálido, rendimento: 58%; P.F.: 187–188 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3419, 3261, 3157 (νNH); 3092, 3057 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 1599-1472 ($\nu\text{C}=\text{C}$ e $\nu\text{C}=\text{N}$), 964 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 841 ($\nu\text{C}=\text{S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 13,22 (s, 1H, NH, isômero Z), 11,26 (s, 1H, NH, isômero E), 8,82 (d, 1H, 3J 4,70 Hz, H4, isômero Z), 8,71 (s, 1H, (NH)-H, isômero Z), 8,63 (d, 1H, 3J 4,61 Hz, H4, isômero E), 8,48 (s, 1H, (NH)-H, isômero E), 8,30 (s, 1H, (NH)-H, isômero Z), 8,10 (td, 1H, 3J 7,94 Hz, 4J 1,55 Hz, H6, isômero Z), 8,03-7,97 (m, H aromático e (NH)-H), 7,87 (td, 1H, 3J 7,76 Hz, 4J 1,61 Hz, H6, isômero E), 7,77 (d, 1H, 3J 16,05 Hz, H8, isômero E), 7,72 (d, 3J 10,6 Hz, H11, isômero E), 7,62-7,57 (m, H aromático), 7,50-7,42 [m, H aromático e H9 (Z)], 7,39 (d, 3J 16,02 Hz, H8, isômero Z), [7,16 (m, H aromático e H9 (E))]. RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 179,2 (C16, E), 178,3 (C16, Z), 162,6 (C12, E), 162,59 (C12, Z), 155,2 (C2, E), 151,4 (C2, Z), 148,6 (C4, Z), 148,4 (C4, E), 145,35 (C1, E), 139,2 (C10), 139,0 (C10), 138,74 (C9, E), 138,6, 136,9, 133,16 (C9, Z), 130,66, 130,62, 125,5, 125,0, 124,74, 124,73, 124,7, 124,0, 123,8, 118,4 (C8, E), 115,88, 115,13, 113,45, 113,19. HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FN}_4\text{S}^+$: 301,0918. Encontrado: 301,0921.

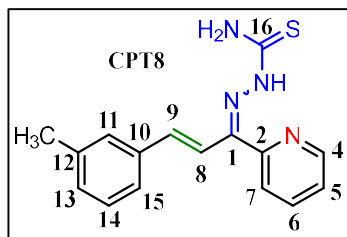


CPT6. Sólido amarelo pálido, rendimento: 64%; P.F.: 189–190 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3423, 3234, 3153 (νNH); 3061 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 1603-1454 ($\nu\text{C}=\text{C}$ e $\nu\text{C}=\text{N}$), 951 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 837 ($\nu\text{C}=\text{S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 13,28 (s, 1H, NH, isômero Z), 11,26 (s, 1H, NH, isômero E), 8,82 (d, 1H, 3J 4,19 Hz, H4, isômero Z), 8,71 (s, 1H, (NH)-H, isômero Z), 8,62 (d, 1H, 3J 4,17 Hz, H4, isômero E), 8,48 (s, 1H, (NH)-H, isômero E), 8,31 (s, 1H, (NH)-H, isômero Z), 8,10 (td, 1H, 3J 7,97 Hz, 4J 1,67 Hz, H6, isômero Z), 8,04 (d, 3J 8,07, H aromático, isômero E), 7,98 [d, 2H, H aromático (Z) e (NH)-H (E)], 7,90 (s, 1H, H11), 7,87 (td, 1H, 3J 7,70 Hz, 4J 1,72 Hz, H6, isômero E), 7,80 (s, 1H, H11), 7,77 (d, 1H, 3J 16,05 Hz, H8, isômero E), 7,64-7,60 (m, H aromático), 7,49 (d, 3J 15,99 Hz, H9, isômero Z), 7,46-7,36 [m, H aromático e H8 (Z)], 7,17 (d, 3J 16,05 Hz, H9, isômero E). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 179,2 (C16, E), 178,3 (C16, Z), 155,2 (C2, E), 151,40 (C2, Z), 148,5 (C4, Z), 148,3 (C4, E), 145,4 (C1, E), 139,0, 138,8, 138,6 (C6, Z), 138,5 (C9, Z), 136,9 (C6, E), 133,65, 133,62, 132,8 (C9, Z), 130,5, 130,5, 128,8, 128,1, 127,1, 126,69, 126,68, 126,0, 125,5, 124,9, 124,7, 123,9, 123,8, 118,5 (C8, E). HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClN}_4\text{S}^+$: 317,0622. Encontrado: 317,0623.



CPT7. Sólido amarelo, rendimento: 58%; P.F.: 190-192 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3417, 3225, 3136 (νNH); 3089, 3057 ($\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$); 1599-1454 ($\nu\text{C}=\text{C}$ e $\nu\text{C}=\text{N}$), 951 ($\gamma\text{CH}_{\text{olefina trans}}$), 837 ($\nu\text{C}=\text{S}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 13,27 (s, 1H, NH, isômero Z), 11,25 (s, 1H, NH, isômero E), 8,81 (d, 1H, 3J 4,48 Hz, H4, isômero Z), 8,71 (s, 1H, (NH)-H, isômero Z), 8,62 (d, 1H, 3J 4,40 Hz, H4, isômero E), 8,47 (s, 1H, (NH)-H, isômero E), 8,31 (s, 1H, (NH)-H, isômero Z), 8,10 (td, 1H, 3J 7,99 Hz, 4J 1,60 Hz, H6, isômero Z), 8,01 [m, H aromático e (NH)-H (E)], 7,93 (s, 1H, H11), 7,88 (td, 1H, 3J 7,73 Hz, 4J 1,57 Hz, H6, isômero E), 7,74 (d, 1H, 3J 16,06 Hz, H8, isômero E), 7,69-7,65 (m, 2H, H aromático), 7,61 (dd, 1H, H aromático), 7,53 (d, 1H, H aromático), 7,48 (m, H9 (Z) e H aromático), 7,39 (d, 1H, 3J 16,02 Hz, H8, isômero Z), 7,35 (t, 2H, H aromático), 7,15 (d, 1H, 3J 16,06, H9, isômero E). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 179,2 (C16, E), 178,4 (C16, Z), 155,1 (C2, E), 151,3 (C2, Z), 148,5 (C4, Z), 148,3 (C4, E), 145,4 (C1, E), 139,1 (C1, Z), 139,05 (C10, Z), 138,8 (C10, E), 138,5, 138,4 (C9, E), 136,9, 132,8 (C9, Z), 131,7, 130,9, 130,7,

130,7, 129,6, 127,3, 126,2, 125,5 (C8, *Z*), 124,9, 124,7, 123,9, 123,7, 122,2, 118,5 (C8, *E*). HRMS: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{15}H_{14}BrN_4S^+$: 363,0097. Encontrado: 363,0092.



CPT8. Cristal incolor, rendimento: 83%; P.F.: 188-189 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3419, 3269, 3155 (ν NH); 3055, 3034 (ν C-H_{aromático}); 1595-1448 (ν C=C e ν C=N), 962 (γ CH_{olefina trans}), 839 (ν C=S). RMN de 1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 12,87 (s, 1H, NH, isômero *Z*), 11,18 (s, 1H, NH, isômero *E*), 8,82 (d, 1H, 3J 4,44 Hz, H4, isômero *Z*), 8,65 (s, 1H, (NH)-H, isômero *Z*), 8,62 (d, 1H, 3J 4,50 Hz, H4, isômero *E*), 8,43 (s, 1H, (NH)-H, isômero *E*), 8,28 (s, 1H, (NH)-H, isômero *Z*), 8,11 (td, 1H, 3J 7,89 Hz, 4J 1,53 Hz, H6, isômero *Z*), 7,95 [m, H aromático e (NH)-H (*E*)], 7,87 (td, 1H, 3J 7,72 Hz, 4J 1,58 Hz, H6, isômero *E*), 7,72 (d, 1H, 3J 16,07 Hz, H8, isômero *E*), 7,61 (dd, 1H, H aromático), 7,50 (m, H aromático), 7,45 (m, H aromático), 7,35 (d, 1H, 3J 16,9 Hz, H9, isômero *Z*), 7,30-7,26 [m, H aromático e H8 (*Z*)], 7,17 (d, 1H, H aromático), 7,13 (d, 1H, H aromático), 7,10 (d, 1H, 3J 16,07 Hz, H9, isômero *E*), 2,33 (d, CH₃, isômeros *E* e *Z*). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 179,1 (C16, *E*), 178,2 (C16, *Z*), 155,4 (C2, *E*), 151,3 (C2, *Z*), 148,7 (C4, *Z*), 148,3 (C4, *E*), 146,2 (C1, *E*), 140,4, 140,3 (C9, *E*), 138,5, 137,9, 136,9, 136,4 (C10, *Z*), 136,2 (C10, *E*), 134,8 (C9, *Z*), 130,0, 129,3, 128,7, 128,6, 128,3, 127,7, 125,1, 124,9, 124,8, 124,5, 124,2 (C8, *Z*), 124,0, 123,7, 117,0 (C8, *E*), 21,0 (CH₃, *E* e *Z*). HRMS: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{16}H_{17}N_4S^+$: 297,1169. Encontrado: 297,1168.

2.3.4.5. Cultivo das células

As avaliações biológicas dos híbridos chalconas- e azachalconas-tiossemicarbazonas foram realizadas pelo próprio autor, sob orientação e supervisão da Professora Doutora Ana Paula Pereira da Silva, do Departamento de Bioquímica da UFRRJ. Os ensaios foram realizados com o auxílio dos alunos de iniciação científica Isabelly Lourenço Santos e Iury Pitassi Zanon, ambos graduandos em Farmácia na UFRRJ.

Células Huh-7 foram mantidas em uma câmara de incubação a 37 °C e 5% de CO₂. A cultura celular foi feita em frascos apropriados, com superfície tratada para a cultura de células e tecidos [*Tissue Culture (TC)-treated surface*]. O meio utilizado para o cultivo (DMEM, *Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco®), contendo 5 mM de glicose, foi suplementado com 10% em volume de soro fetal bovino (SFB), bicarbonato de sódio 0,22% e tampão HEPES

0,2% [4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfonato], em pH 7,4. As células foram subcultivadas a cada 3-4 dias. Para o subcultivo, o meio era removido, as células aderidas eram lavadas com solução de tampão fosfato (pH 7,4) e em seguida removidas da superfície do frasco pelo tratamento com uma solução de tripsina-EDTA 0,25% (p/v). A suspensão de células era então transferida para novos frascos contendo um novo meio de cultura.

2.3.4.6. Solução estoque das substâncias testadas

Soluções estoque das substâncias foram preparadas em DMSO na concentração de 50 mM ou 25 mM e filtradas por um filtro com poros de 0,22 µm para garantir a sua esterilidade. A solução estoque foi distribuída em alíquotas de 10-20 µL e congeladas à -20 °C. Essas alíquotas foram descongeladas quando necessário.

2.3.4.7. Avaliação biológica das tiossemicarbazonas contra células Huh-7

Para os ensaios de viabilidade, as células foram colhidas por tripsinização e semeadas em placas de cultura de 48 poços (250 µL/poço) em uma densidade de $1,3 \times 10^4$ células. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias (**CT1-2** e **HCT1-2**: 5, 10, 30, 50 e 75 µM; **CPT1-2** e **HCPT1-2**: 0,010, 0,025, 0,050, 0,100 e 0,300 µM) mantendo a concentração de DMSO fixa em 0,2%. Após incubação adicional de 48 horas a 37 °C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas uma vez com solução de tampão fosfato (PBS), e 250 µL de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, 1,2 mM) em PBS (pH 7,4) foi adicionada a cada poço (Sladowski et al., 1993). A placa foi incubada novamente nas mesmas condições, por um período de 3 h. O sobrenadante foi retirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em 250 µL de uma solução de isopropanol ácida. O formazan foi quantificado por colorimetria (570 nm) em leitor de microplaca ELISA (Kasuki, DR-200BN-BI). A absorção em 690 nm foi utilizada como referência. Os resultados foram reportados como a média de pelo menos três experimentos independentes ± erro-padrão da média.

2.3.4.8. Predição de ADMET

Parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos, e de fármacossimilaridade foram estimados pela ferramenta online e gratuita SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017), disponível em: <http://www.swissadme.ch>.

2.3.4.9. Previsão do RMN de ^{13}C por DFT

As estruturas das tiosemicarbazonas CT1-2, HCT1-2, CPT1-2, HCPT1-2 foram construídas no programa Spartan'24. Suas energias foram minimizadas por mecânica molecular (MMFF) e uma busca pelos confôrmeros mais estáveis foi feita pela ferramenta *Conformer Distribution*, utilizando a função MMFF corrigida por rede neural (Hehre et al., 2025; Wavefunction, Inc., 2025). A energia relativa do confôrmero mais estável foi assumida como 0,0 kJ/mol. Foram considerados para próxima etapa somente os confôrmeros com energia relativa ≥ 20 kJ/mol. A geometria de todos eles foi então otimizada por EDF2/6-31G*. Os confôrmeros com energia relativa ≥ 10 kJ/mol (em relação ao mais estável), tiveram seus espectros de RMN de ^{13}C previstos por EDF2/6-31G*. Para cada átomo de carbono foi realizada uma média ponderada dos deslocamentos químicos em cada confôrmero, considerando a distribuição de Boltzmann fornecida pelo próprio software. Então, os deslocamentos químicos dos isômeros *E* e *Z* calculados por DFT foram comparados com os deslocamentos químicos das espécies majoritária e minoritária observadas nos espectros experimentais. Para a comparação, a ferramenta estatística RMSD foi utilizada.

2.4. Complexo de zinco com uma chalcona-tiossemicarbazona

2.4.1. Justificativas e Objetivos

Nas últimas duas décadas, muitos compostos orgânicos apresentaram resultados promissores em estudos pré-clínicos contra o vírus HTLV-1 e a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) (Dos Santos et al., 2020; Houssein et al., 2020; Sousa-Pereira et al., 2020). O mesmo não pode ser dito sobre os compostos metálicos. Embora complexos com metais de transição tenham demonstrado excelentes atividades antivirais (Abate et al., 2022; De Paiva et al., 2020) e anticancerígenas (Mjos; Orvig, 2014), pouquíssimos foram investigados em linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1. De fato, até onde sabemos, apenas dois relatos sobre esse tema foram feitos até hoje. Em 2010, Pelosi e colaboradores (Pelosi et al., 2010) testaram dois complexos contra retrovírus, um de níquel e outro de cobre, preparados com diferentes tiossemicarbazonas (Figura 2.37). Os complexos exibiram propriedades antivirais contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), mas não contra o HTLV-1 e HTLV-2. Pouco tempo depois, Guimarães-Corrêa e colaboradores (Guimaraes-Correa et al., 2011) demonstraram a atividade de um composto bifosfínico ciclopaladado (**C7a**) contra células leucêmicas. **C7a** foi eficaz *in vitro*, tanto contra às células infectadas, como não infectadas por HTLV-1. Ainda, foi capaz de aumentar a sobrevida de camundongos enxertados com a linhagem celular leucêmica RV-ATL, derivada de um paciente infectado pelo HTLV-1.

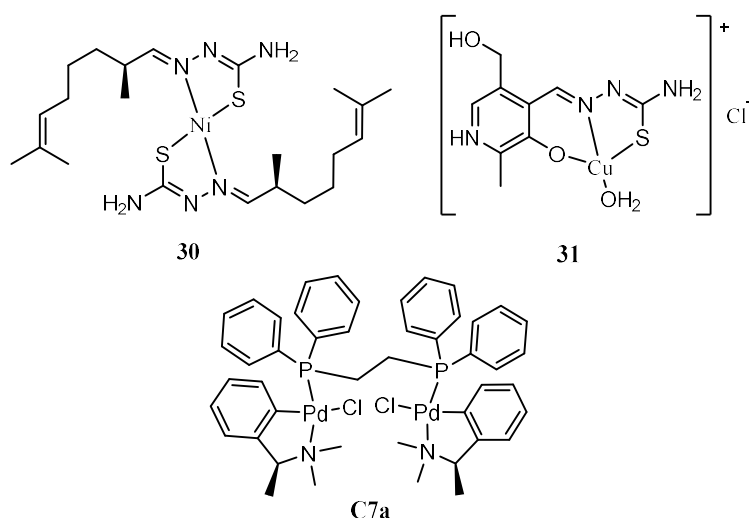


Figura 2.37. Estrutura de complexos metálicos investigados em células infectadas pelo vírus HTLV-1.

Considerando o reduzido número de complexos metálicos investigados contra essas linhagens celulares infectadas, este trabalho buscou avaliar a ação de um complexo de zinco preparado com um dos híbridos chalcona-tiossemicarbazona (**CT3**, ou **CTCI** – Figura 2.38). A literatura demonstra que a complexação com íons de metais de transição é capaz de potencializar a atividade anticâncer de diversos agentes citotóxicos, como as tiossemicarbazonas (Hassan et al., 2025; Stacy et al., 2016). Assim, esperava-se observar aumento da ação anti-leucêmica desse ligante, a partir da complexação com o zinco (II). O ligante *p*-cloro substituído foi escolhido por ter apresentado a maior citotoxicidade contra células HepG2 em trabalho anterior do grupo (Rodrigues et al., 2022).

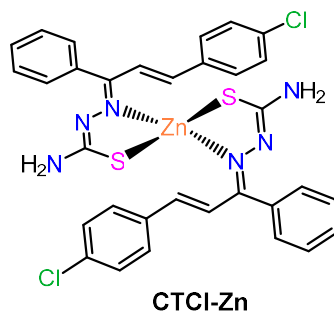


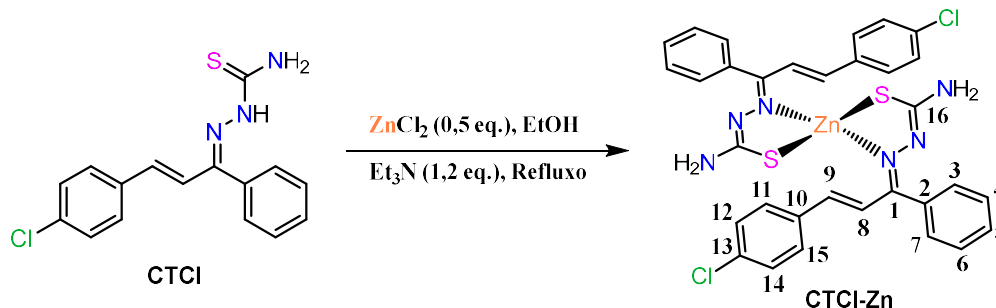
Figura 2.38. Estrutura de complexos de Zn (II) planejado (**CTCl-Zn**).

Assim, os objetivos dessa parte do trabalho foram:

- Sintetizar e purificar um novo complexo de Zn (II) com a chalcona-tiossemicarbazona **CTCl**;
- Caracterizar o complexo por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , HRMS, espectroscopia de absorção no UV-Vis e análise elementar;
- Investigar a toxidez do complexo e de seu ligante livre frente à *Artemia salina*;
- Investigar a atividade anticâncer em célula leucêmica infectada pelo HTLV-1 (MT-2);
- Investigar o mecanismo de ação desses compostos.

2.4.2. Resultados e discussão

2.4.2.1. Síntese do complexo de Zinco (II)



Esquema 2.4. Síntese do complexo de Zinco a partir da chalcona-tiossemicarbazona **CTCl** (ou **CT3**). A reação foi realizada em refluxo por 1 h. Numeração utilizada para as atribuições nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

Para a síntese do complexo de zinco (Esquema 2.4), uma solução de ZnCl_2 em etanol foi adicionada à uma suspensão etanólica do ligante **CTCl** (**CT3**) contendo excesso de trietilamina (Et_3N). A trietilamina foi usada com o intuito de desprotonar o ligante, e dois equivalentes da chalcona-tiossemicarbazona foram usados para gerar um complexo de Zn (II) na proporção 2:1 (ligante:metal). Todo o sólido foi dissolvido ao aquecer a mistura reacional em refluxo. Após o término da reação, a solução foi deixada em repouso à temperatura ambiente para resfriar. No entanto, nenhuma precipitação foi observada. Cristais amarelos do complexo formaram mediante evaporação lenta do solvente à temperatura ambiente. Ao lavar os cristais com etanol e metanol, o produto puro foi obtido com rendimento de 79%. O ligante chalcona-tiossemicarbazona exibiu um pico em m/z 314,05226 no modo de ionização negativa da HRMS, correspondendo ao fragmento $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_3\text{S}$: 314,05242). Não foram observados picos atribuídos ao íon molecular do complexo nos modos negativo ou positivo da análise de HRMS. Entretanto, a análise elementar indicou a formação do complexo desejado (**CTCl**, calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{S}$ (%): C, 60,85; H, 4,47; N, 13,31. Observado: C, 61,11; H, 4,42; N, 13,47; **CTCl-Zn**, calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{S}_2\text{Zn}$ (%): C, 55,30; H, 3,77; N, 12,09. Observado: C, 54,86; H, 3,75; N, 12,04).

O espectro de IV do ligante exibiu absorções na faixa de $3150\text{--}3414\text{ cm}^{-1}$ devido às vibrações de estiramento axial N-H (Barbosa et al., 2018) (Figura 2.39). Após a complexação com o Zn (II), uma das bandas de $\nu(\text{N}-\text{H})$ desapareceu, indicando a coordenação do ligante na forma aniônica (Barbosa et al., 2018). Uma banda fraca em 1556 cm^{-1} , tentativamente atribuída à vibração $\nu(\text{C}=\text{N})$, sofreu uma mudança no espectro do complexo para 1541 cm^{-1} , sugerindo coordenação do átomo de nitrogênio imínico. Ainda, o espectro de IV do ligante **CTCl** apresentou uma absorção de $\nu(\text{C}=\text{S})$ em 833 cm^{-1} , ausente no espectro do complexo, indicando coordenação através do átomo de enxofre. Uma nova banda apareceu em 795 cm^{-1} e foi

atribuída ao estiramento axial da ligação C-S, agora com maior caráter de ligação simples no complexo de Zn (II). A Figura 34 mostra a sobreposição dos espectros de IV do complexo **CTCl-Zn** e ligante **CTCl**.

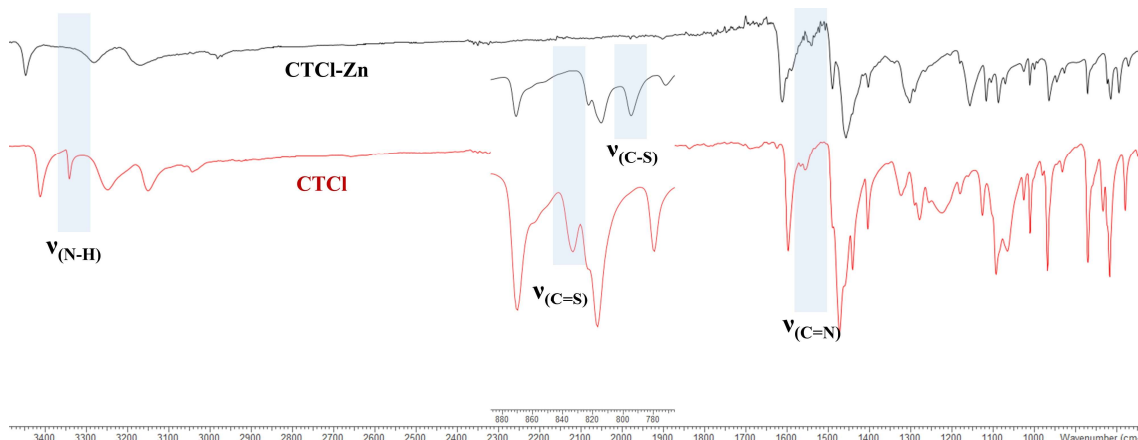


Figura 2.39. Sobreposição dos espectros de IV do **CTCl-Zn** (superior, preto) e **CTCl** (inferior, vermelho). A expansão da região de estiramento axial C=S é mostrada. Foram destacadas em azul algumas das bandas que sofrem mudanças mediante complexação com o Zn(II).

Espectros de UV-Vis e fluorescência do ligante **CTCl** e de seu complexo de Zn (II) foram obtidos em DMSO (Figura 2.40). O espectro do ligante exibiu dois máximos de absorção em 278 e 356 nm, característicos de transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$, respectivamente, como previamente descrito na literatura para compostos similares (DA SILVA et al., 2013). O espectro de absorção do complexo apresentou diferenças significativas, sendo a mais notável o deslocamento da transição $n-\pi^*$ para menor energia (deslocamento batocrômico), possivelmente devido a um sistema mais conjugado após a desprotonação do ligante (DA SILVA et al., 2013). Uma vez que o íon Zn(II) possui configuração d^{10} , é difícil que as alterações no espectro de absorção estejam relacionadas a transições de transferência de carga ligante-metal, embora a literatura não exclua completamente essa possibilidade no caso de complexos envolvendo tiossemicarbazonas (Türkkan; Ülküseven; Eroğlu, 2015). Nota-se também que o complexo absorve mais na região do visível do que o ligante livre. Os espectros de fluorescência de ambos, ligante e complexo de Zn(II), foram medidos em DMSO após excitação nos respectivos máximos de absorção. Ambos os compostos mostraram praticamente o mesmo comportamento fluorescente (um pico emissivo na região verde), com emissão máxima em torno de 455 nm.

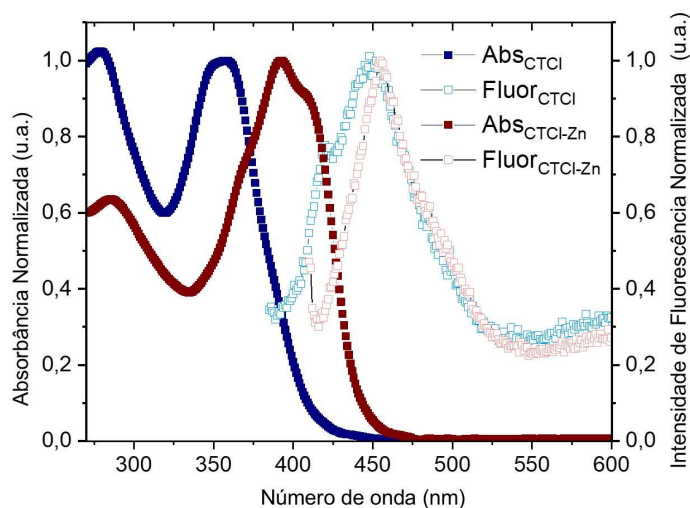


Figura 2.40. Espectros de UV-Vis normalizados e de fluorescência do estado estacionário normalizado do ligante (CTCl) e do complexo de Zn(II) (CTCl-Zn).

Os espectros de RMN do ligante CTCl foram obtidos imediatamente após a dissolução e dois dias após o composto já ter sido dissolvido, o que permitiu que a isomerização ocorresse em grande extensão, levando à observação de quantidades significativas das duas formas isoméricas da tiossemicarbazona CTCl. A Figura 2.41 apresenta os espectros de RMN de ^1H do ligante obtido imediatamente após a dissolução e o espectro obtido dois dias depois. É notável que o isômero mais abundante (*Z*) se tornou o menos abundante ao longo do tempo. Para definir a configuração correta dos isômeros principal e secundário, um experimento NOESY foi registrado dois dias após a dissolução. Um sinal cruzado que correlaciona o N-H em 11,08 ppm e o sinal de H8 em 7,77 ppm foi observado no espectro, indicando que o isômero principal adota uma configuração *E* em relação à ligação imínica. Além disso, os hidrogênios 8 e 9 de ambos os isômeros apareceram como dupletos com altos valores de constantes de acoplamento (<16 Hz), indicando uma configuração *trans*.

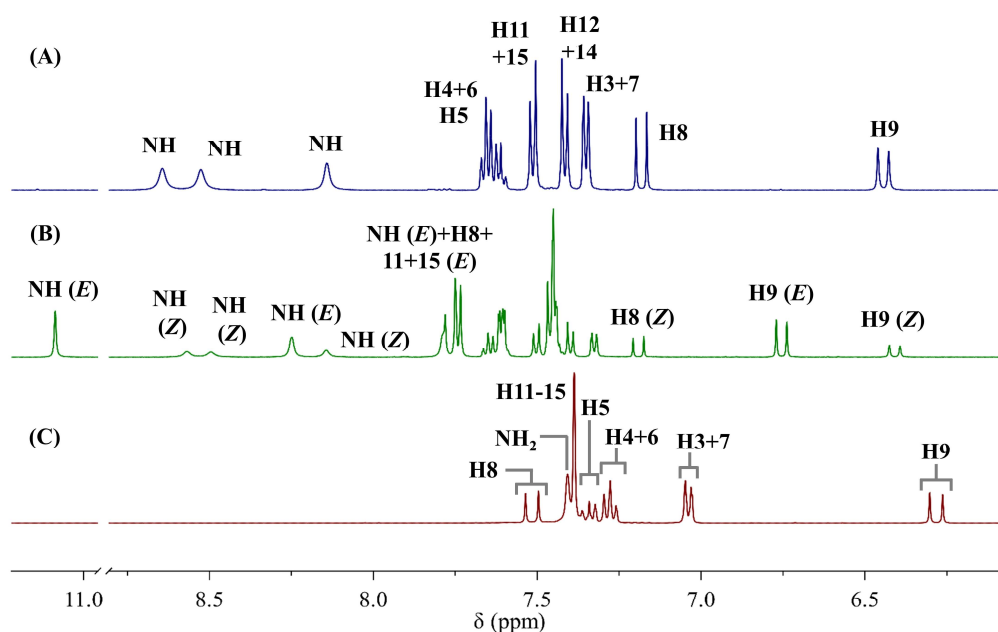


Figura 2.41. RMN de ^1H de CTCl e CTCl-Zn em DMSO- d_6 . (A) RMN de ^1H de CTCl imediatamente após dissolução: os sinais correspondem ao isômero Z. (B) RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de CTCl dois dias após ser dissolvido: sinais dos isômeros E e Z são observados – para melhor clareza, somente alguns deles foram atribuídos na imagem. (C) RMN de ^1H do CTCl-Zn (400 MHz, DMSO- d_6).

O sinal referente ao NH central da tiossemicarbazona não foi observado no espectro de RMN de ^1H do complexo, indicando a desprotonação e coordenação do ligante na forma aniônica, de acordo com os dados de IV descritos acima. Conforme discutido anteriormente, para todas as tiossemicarbazonas preparadas neste trabalho os hidrogênios do grupo NH_2 apareceram como simpletos bem distintos no RMN de ^1H , provavelmente devido a rotação impedida da ligação C-N (Mendes et al., 2019). O par de elétrons livre desse nitrogênio encontra-se conjugado com o tiocarbonila, o que dá à ligação C-N certo caráter de dupla (Figura 2.42A). Além disso, é provável que um de seus hidrogênios realize ligação de hidrogênio intramolecular com o nitrogênio imínico, representando mais uma dificuldade para o giro da ligação C-N (Figura 2.42B).

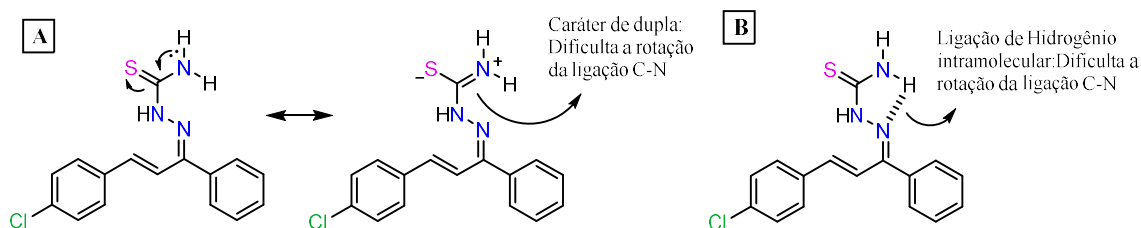


Figura 2.42. Fatores que devem contribuir para a não equivalência dos hidrogênios do grupo NH_2 no ligante (A e B).

Esperava-se identificar os hidrogênios do grupo NH_2 no espectro do complexo por meio do experimento HMBC, que mostraria um acoplamento entre esses hidrogênios e o núcleo do carbono **C16**. No entanto, esse acoplamento não foi observado. Para tentar realizar essa atribuição, água deuterada foi adicionada ao tubo de RMN e um novo espectro de ressonância foi obtido (Figura 2.43B). É possível observar que o singlete em 7,41 ppm reduziu em intensidade, indicando troca com o deutério. Este sinal foi então atribuído aos hidrogênios trocáveis do grupo NH_2 .

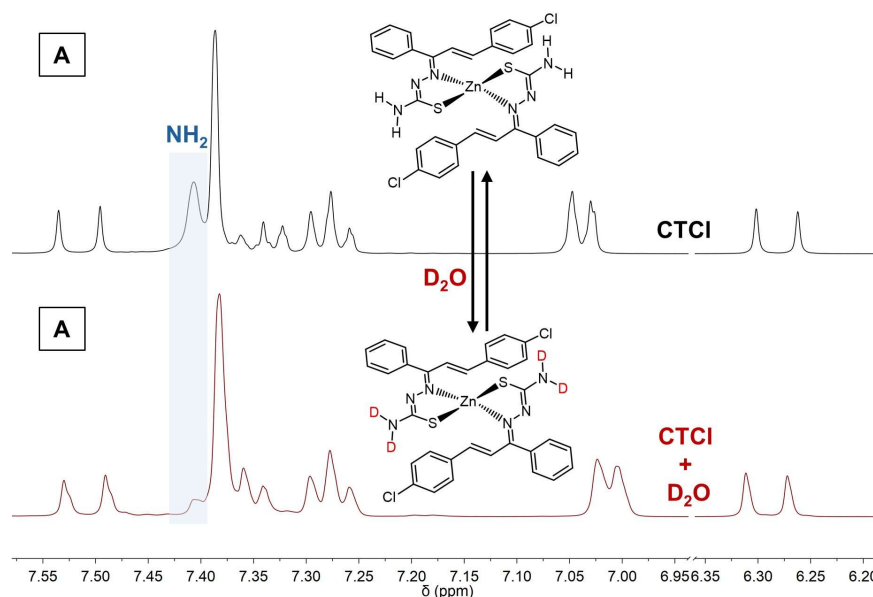


Figura 2.43. RMN de ^1H (400 MHz) do complexo **CTCl-Zn** em DMSO-d_6 na ausência (A) ou presença de gotas de água deuterada (B).

Portanto, após a complexação (**CTCl-Zn**), os hidrogênios do grupo NH_2 apareceram como um sinal simpleto em campo mais alto, parcialmente sobreposto pelos sinais de H11+15 e H12+14 (Figura 2.41C e 2.43A). Essa mudança indica que, no complexo, os hidrogênios do grupo NH_2 são magneticamente equivalentes. A ligação C-N deve girar mais livremente. A rotação facilitada pode ter relação com uma ressonância reduzida do par de elétrons livre do nitrogênio, já que, à princípio, a tiocarbonila deixou de existir, dando lugar a uma ligação C-S simples. No entanto, o par de elétrons desse nitrogênio pode, em teoria, ser deslocalizado pela molécula através da nova ligação $\text{C}=\text{N}$ formada após a desprotonação (Figura 2.44A). Essa deslocalização, se significativa, deve dificultar a rotação da ligação C-N. Além disso, a mudança dos sinais do NH_2 também pode ser reflexo da participação do nitrogênio imínico na coordenação, impedindo que a ligação de hidrogênio intramolecular citada anteriormente

aconteça (Figura 2.44B) – isso deve facilitar a rotação da ligação C-N e tornar os hidrogênios equivalentes.

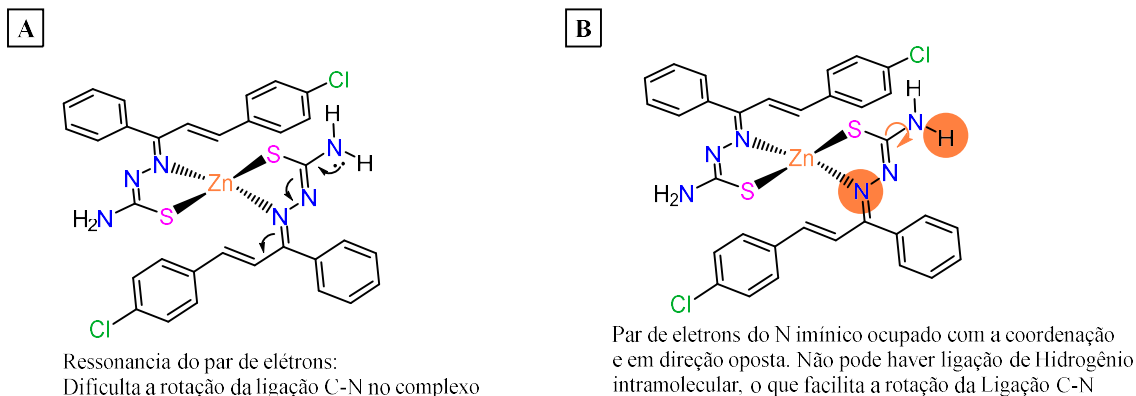


Figura 2.44. Mudanças no complexo que devem tornar os hidrogênios do grupo NH_2 equivalentes.

Os sinais de C1 e C16 no RMN de ^{13}C sofreram mudanças significativas em comparação aos sinais correspondentes no ligante livre [C1, ppm: 148,5 (CTCI-forma *E*); 158,3 (CTCI-**Zn**). C16, ppm: 179,3 (CTCI-forma *E*); 173,7 (CTCI-**Zn**)], sugerindo coordenação por meio do nitrogênio imínico e do enxofre, como esperado. A Figura 2.45 mostra a sobreposição dos espectros do ligante e do complexo.

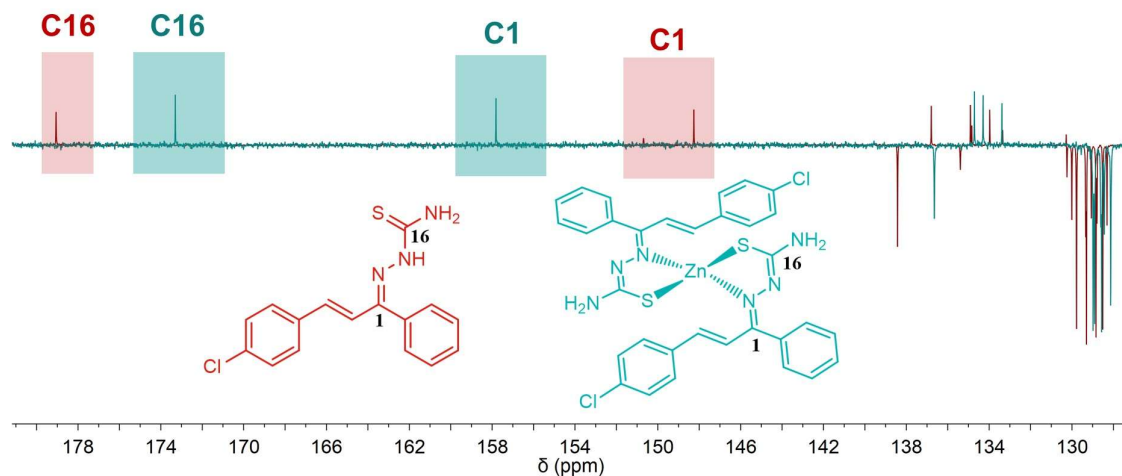


Figura 2.45. Sobreposição dos espectros de RMN de ^{13}C do ligante livre (vermelho) (125 MHz, DMSO-d_6) e do complexo (ciano) (100 MHz, DMSO-d_6), destacando os carbonos 1 e 16.

Um tubo de RMN contendo uma solução de **CTCI-Zn** em DMSO-d_6 foi mantido aberto durante alguns meses. Neste período, monocristais cresceram dentro do tubo. Supostamente, o

DMSO-d₆ adquiriu umidade da atmosfera lentamente, devido à sua alta higroscopicidade – isso pode ter reduzido a solubilidade do complexo, causando a sua separação da solução na forma de cristais. Os monocristais foram então analisados por difração de raio-X. A Figura 2.45A mostra a estrutura resolvida. O íon Zn (II) encontra-se tetra-coordenado a dois ligantes chalcona-tiossemicarbazonato em um modo bidentado envolvendo o nitrogênio da azometina (N1 e N4) e o átomo de enxofre (S1 e S2) na forma de tiolato, levando a dois quelatos de 5 membros na esfera de coordenação, concordando com a estrutura proposta sugerida pelas caracterizações espectroscópicas.

As distâncias de ligação Zn-S (~ 2,26-2,28 Å) e Zn-N (~ 2,06-2,10 Å) (Figura 2.45B) estão na faixa típica de compostos semelhantes relatados anteriormente na literatura (Barbosa et al., 2018). A desprotonação do ligante **CTCl** levaria a um aumento no comprimento da ligação C=S e ao encurtamento da ligação N-C adjacente. Uma comparação direta entre os comprimentos de ligação do complexo e do ligante não é possível devido à falta da estrutura cristalina do ligante livre. Entretanto, a estrutura molecular de uma chalcona-tiossemicarbazona similar foi descrita anteriormente: as ligações N-C (ligação simples) e C=S (ligação dupla) eram aproximadamente 1,36 Å e 1,66 Å (Zhang et al., 2011). No complexo **CTCl-Zn** as ligações N2-C1 e N5-C17 possuem distâncias em torno de 1,30 Å, mais curtas que uma ligação C-N simples. Esse comprimento evidencia o caráter de dupla ligação e sugere que ambas as moléculas de ligante estão conectadas ao íon metálico em uma forma aniônica. Além disso, a desprotonação também afetou os comprimentos das ligações S1-C1 e S2-C17, que são 1,750(4) e 1,750(4) Å, indicando a formação do tiolato (ligação C-S simples). Por fim, a rede cristalina é estabilizada por uma série de ligações de hidrogênio e contatos curtos envolvendo o complexo principal [Zn(CTCl)₂] e as moléculas de DMSO presentes na rede cristalina. As interações intermoleculares bifurcadas do tipo NH₂...DMSO levam à formação de uma cadeia supramolecular unidimensional, como pode ser observado na Figura 2.45C.

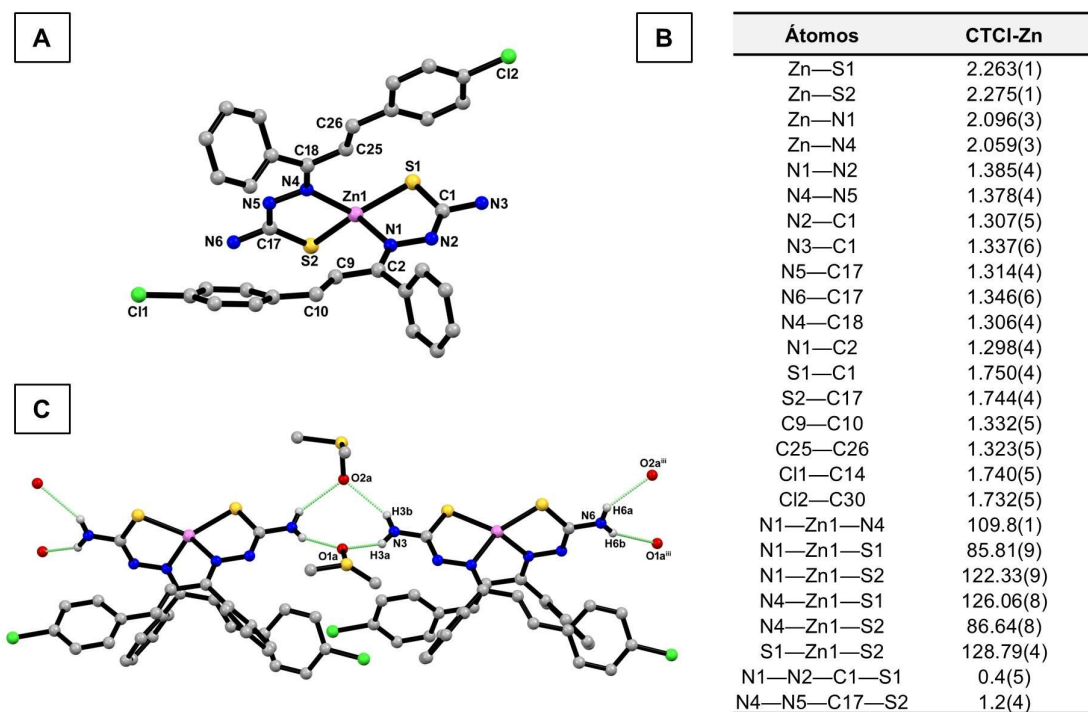


Figura 2.45. (A) Estrutura cristalográfica de **CTCl-Zn**: átomos de hidrogênio e DMSO de cristalização foram omitidos para melhor clareza. (B) Comprimentos de ligação (Å) e ângulos (°) para o complexo **CTCl-Zn**. (C) Detalhes do empacotamento cristalino mostrando a cadeia supramolecular 1D. Código de cores: C (cinza), N (azul), S (amarelo), Cl (verde) e Zn (rosa). Linhas pontilhadas verdes indicam ligações de hidrogênio envolvendo o complexo e moléculas de DMSO.

2.4.2.2. Avaliação biológica do complexo de zinco **CTCl-Zn** e de seu ligante **CTCl**

A toxicidade dos compostos foi avaliada pelo ensaio de *Artemia salina*. Os náuplios de desse microcrustáceo foram mantidos em solução salina artificial com ou sem DMSO (0,4%), **CTCl** ou **CTCl-Zn** (25, 50, 100 e 200 µM). Após 24 h em temperatura ambiente, uma avaliação de sobrevivência foi realizada usando um microscópio estereoscópico. Nestes ensaios, a cisplatina foi utilizada para comparar o **CTCl** e **CTCl-Zn** com um complexo metálico usado clinicamente no tratamento de algumas formas de câncer (Floreas; Büsselberg, 2011). Conforme ilustrado na Figura 2.46A, o ligante e o complexo exibiram perfis semelhantes, com baixa toxicidade. A cisplatina não exibiu efeitos de toxicidade nos náuplios de *A. salina* nas concentrações testadas (Figura 2.46B).

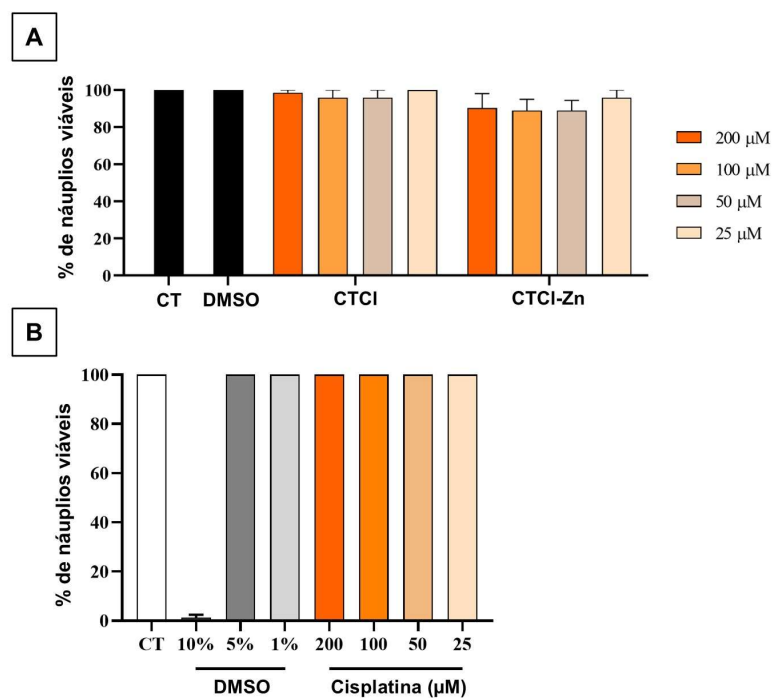


Figura 2.46. Efeito dos compostos na viabilidade dos náuplios de *Artemia Salina*. Doze náuplios foram transferidos para cada poço (placa de 24 poços) com ou sem (A) CTCI, CTCI-Zn ou (B) cisplatina (25, 50, 100 e 200 μM). Náuplios mantidos apenas em água salina artificial (CT) ou tratados com DMSO (0,4%) foram usados como controles negativos, e DMSO 10% foi usado como controle positivo de morte dos náuplios. Após 24 h em temperatura ambiente, foi realizada avaliação de sobrevivência usando microscópio estereoscópico, considerando náuplios mortos aqueles que não apresentavam movimentos.

A citotoxicidade dos compostos foi investigada contra a linhagem leucêmica MT-2, infectada pelo HTLV-1. Após 48 horas de exposição, ambos os compostos reduziram a viabilidade celular de maneira dose-dependente (Figura 2.47A) com valores de IC_{50} de 47,06 μM (CTCI) e 30,01 μM (CTCI-Zn). Em um estudo anterior realizado pelo grupo NUSQUIMED, CTCI apresentou IC_{50} de 20,90 μM contra uma linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2), com um período de incubação de apenas 24 h (Rodrigues et al., 2022). Esses resultados sugerem que células leucêmicas infectadas pelo HTLV-1 são menos sensíveis ao tratamento com essa chalcona-tiossemicarbazona que células de hepatocarcinoma. Apesar disso, a complexação de CTCI com o Zn(II) resultou em uma redução de ~36% no valor do IC_{50} , indicando ter sido uma estratégia eficaz para aumentar a citotoxicidade contra essa linhagem celular. O valor de IC_{50} para a cisplatina, por sua vez, foi calculado como 2,29 μM - até o momento, não foram encontrados dados publicados sobre avaliações da cisplatina contra essa linhagem celular pelo método do MTT.

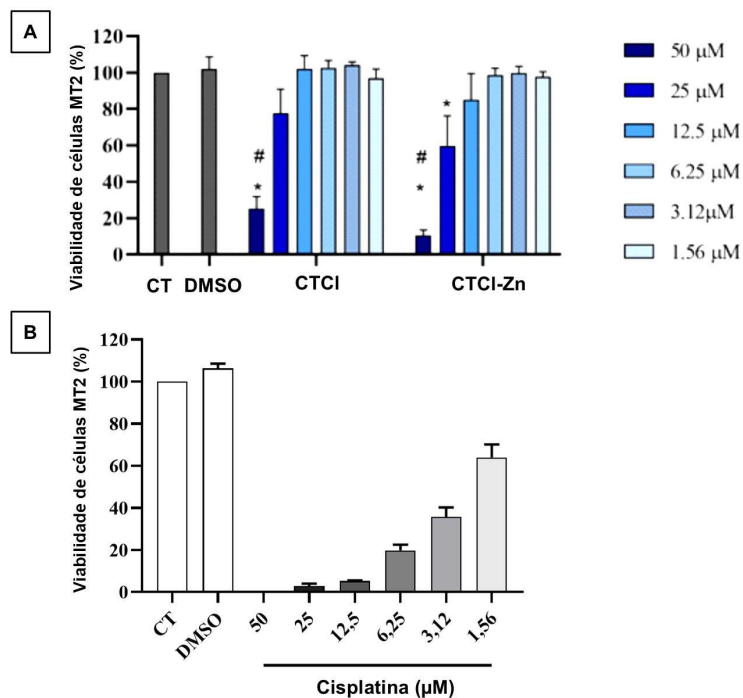


Figura 2.47. O tratamento com **CTCl** e seu complexo de **Zn** reduziu a viabilidade das células MT-2. 2×10^5 células/ml foram incubadas com ou sem (A) DMSO (0,2%), **CTCl**, **CTCl-Zn** ou (B) cisplatina em concentrações na faixa de 1,56–50 μM. Após 48 h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT. * $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação aos controles negativos (CT e DMSO). # $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação com **CTCl** (25–1,56 μM) ou **CTCl-Zn** (25–1,56 μM).

Em seguida, o mecanismo de ação dessas substâncias foi investigado. Para avaliar a capacidade da tiossemicarbazona **CTCl** e do complexo **CTCl-Zn** de induzir apoptose ou necrose, as células MT-2 foram coradas com Anexina-V/ 7AAD e analisadas por citometria de fluxo. Esse ensaio se baseia em duas características das células que mudam durante a morte. Em células vivas, o fosfolípídeo conhecido como fosfatidilserina (PS) está restrito a face interna da membrana plasmática e durante o processo de apoptose é externalizado para a superfície, ficando exposto ao meio extracelular. A Anexina V, marcada com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína, é uma proteína com alta afinidade pela PS. Células em início de apoptose ou em apoptose tardia são marcadas por essa proteína e detectadas no citômetro de fluxo (Figura 2.48A) (Vermes et al., 1995). A 7-Amino-actinomicina D (7AAD), por sua vez, é um corante que se intercala no DNA e só é capaz de entrar em células com a membrana danificada. A marcação pela 7AAD indica apoptose mais avançada, já que danos à membrana são observados em um período mais tardio desse processo de morte celular (Figura 2.48A) (Zembruski et al., 2012). Os resultados do ensaio mostram que **CTCl** e **CTCl-Zn**, ambos a 50 μM, apresentaram

efeito pró-apoptótico após 24 h de incubação, com 36,1% e 38,7% de células apoptóticas, respectivamente (Figura 2.48B). Anteriormente, foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa que o derivado metilado **CT5** (Figura 2.19, página 137) altera significativamente o consumo de oxigênio de células HepG2, mesmo quando avaliado em uma condição que antecipa perdas mais significativas de viabilidade celular (10 μ M e 1 h de incubação) (Rodrigues et al., 2022). Os efeitos sob a função mitocondrial foram interpretados na época como possíveis sinais de apoptose. O ensaio com Anexina-V/7AAD realizado com **CTCI** e **CTCI-Zn** confirmam a capacidade das chalconas-tiossemicarbazonas induzirem morte celular por apoptose em células cancerígenas.

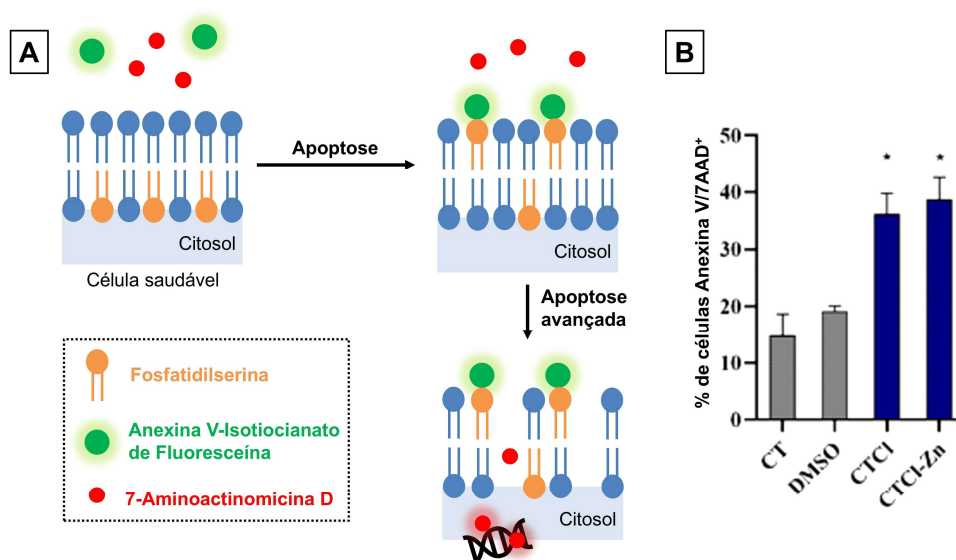


Figura 2.48. (A) Ilustração dos eventos característicos de apoptose e função das sondas fluorescentes. (B) 2×10^5 células/ml foram incubadas com ou sem DMSO (0,1%), **CTCI** ou **CTCI-Zn** (50 μ M). Após 24 h a 37 °C em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂, a viabilidade celular foi avaliada por meio de uma coloração de Anexina V/7AAD. * $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação aos controles negativos (CT e DMSO).

Para avaliar a relação entre perfil citotóxico e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), células MT-2 foram incubadas na presença de **CTCI** ou **CTCI-Zn** (25 e 50 μ M), utilizando a DHR123 como sonda fluorogênica. Na presença de ROS, essa sonda é oxidada e convertida em uma espécie fluorescente, detectada por citometria de fluxo (Figura 2.49A) (Jávega et al., 2023; Kiani-Esfahani et al., 2012; Pioch; Blomgran, 2022). O ensaio foi realizado com um período bem curto de incubação na presença dos compostos – apenas 1,5 h (1 hora de incubação na presença de **CTCI** ou **CTCI-Zn** + 30 minutos na presença da sonda DHR123). A intenção foi avaliar se o tratamento com essa substância é capaz de causar elevação do nível de

ROS em condições em que as células ainda não sofreram tanto dano. Após esse período, no entanto, não foi observada diferença na produção de ROS (Figura 2.49B), indicando que o mecanismo de ação principal desses compostos não deve envolver, em um primeiro momento, a produção de ROS. O resultado desse ensaio permite supor que as alterações no consumo de oxigênio em células HepG2, observadas para **CT5** após uma hora de incubação (Rodrigues et al., 2022), não devem envolver espécies reativas de oxigênio. Uma perspectiva interessante para esse trabalho, seria verificar se as chalconas-tiossemicarbazonas atuam diretamente sobre algum complexo da cadeia transportadora de elétrons.

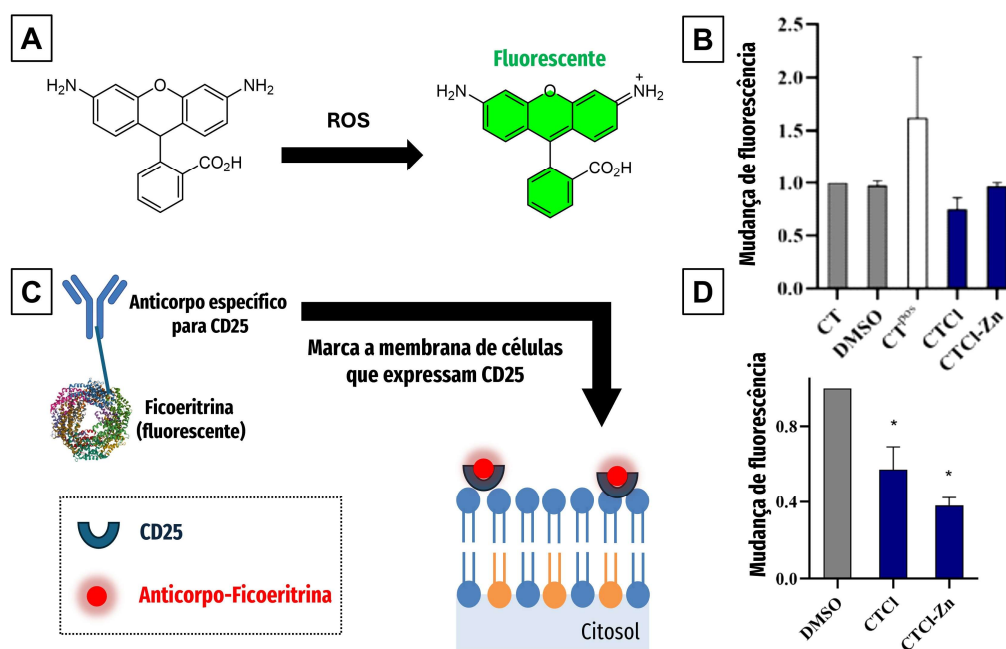


Figura 2.49. (A) Ilustração exemplificando o comportamento fluorogênico da sonda DHR-123 na presença de ROS. (B) 2×10^5 células/ml foram incubadas com ou sem DMSO (0,1%), CTCI ou CTCI-Zn (50 μ M) por 1 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram coradas com a sonda DHR-123 (1 μ M) por 30 min nas mesmas condições. Células tratadas com 3% de H₂O₂ foram usadas como controle positivo (CT^{pos}). A intensidade de fluorescência (IF) foi determinada por citometria de fluxo e o valor da mudança de fluorescência foi calculado pela razão entre o IF do controle e IF dos tratamentos. (C) Processo de marcação de CD25 pelo anticorpo conjugado à Ficoeritrina. (D) O tratamento com chalcona-tiossemicarbazonas reduziu a expressão de CD25 em células MT-2. 2×10^5 células/ml foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%), CTCI ou CTCI-Zn (50 μ M). Após 24 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, a expressão de CD25 foi determinada utilizando um anticorpo específico por citometria de fluxo. O valor da variação de fluorescência foi determinado conforme descrito anteriormente, utilizando como valor de referência a fluorescência na presença de DMSO. *p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos em comparação com DMSO.

O processo e mecanismo exatos pelos quais a infecção pelo HTLV-1 promove a transformação em células de câncer ainda não é completamente compreendido. No entanto,

parece que a expressão constitutiva da cadeia alfa do receptor interleucina 2 (IL-2), conhecido também como CD25, em células infectadas pelo vírus pode estar implicado no crescimento e desenvolvimento das células (Maeda et al., 2020). Por esse motivo, a expressão de CD25 foi medida em células tratadas com os compostos. O tratamento de células MT-2 com **CTCI-Zn** (50 μ M) por 24 h induziu uma diminuição significativa na expressão de CD25 (Figura 2.49D). Conforme ilustrado na Figura 2.49D, observou-se que o **CTCI-Zn** reduz aproximadamente 50% da expressão de CD25, enquanto o ligante **CTCI** é menos eficaz (\approx 30%).

2.4.3. Conclusões e perspectivas.

Um novo complexo de Zn (II) (**CTCI-Zn**) foi facilmente preparado em bom rendimento (79%) a partir de um híbrido chalcona-tiossemicarbazona. Análises de Infravermelho, espectroscopia de absorção no UV-Vis, RMN de ^1H e ^{13}C , análise elementar e difração de raio-X confirmaram a obtenção dessa substância. O ensaio de viabilidade mostrou que **CTCI-Zn** é mais citotóxico que o ligante livre contra as células leucêmicas MT-2, possuindo baixa toxidez em modelo de *A. salina*. Ligante e complexo causaram morte celular por apoptose sem envolver a produção de ROS nos primeiros instantes após o início do tratamento. Seria interessante, no futuro, averiguar se o ligante e o complexo inibem diretamente algum complexo da cadeia transportadora de elétrons, ou se as alterações respiratórias anteriormente observadas para a classe de chalconas-tiossemicarbazonas tratam-se, na verdade, de um efeito indireto/secundário.

2.4.4. Materiais e métodos

Todos os reagentes e solventes foram adquiridos da Sigma-Aldrich/Merck e Neon, respectivamente, e utilizados sem qualquer purificação adicional. Os pontos de fusão (p.f.) foram determinados em um aparelho Gehaka PF 1500 Farma e não foram corrigidos. Os espectros de infravermelho foram registrados na região 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} por meio da técnica de refletância total atenuada (ATR), utilizando um espectrofotômetro Bruker FTIR Vertex 70. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram obtidos em temperatura ambiente em um espectrômetro Bruker Avance III Ultrashield Plus, utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os experimentos bidimensionais (COSY, NOESY, HSQC e HMBC) foram realizados

nas mesmas condições. Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). As análises de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) foram realizadas em um espectrômetro de massas Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific), com fonte de ionização por electrospray. Os espectros de absorção no UV-visível (faixa de 250–600 nm) e de fluorescência em estado estacionário (faixa de 410–600 nm, com excitação no comprimento de onda de máxima absorção correspondente) foram registrados em um espectrofotômetro JASCO J-815, com 3 mL de uma solução de cada composto em DMSO (5 μ M), em cubetas de quartzo de 1 cm. As análises elementares foram realizadas em um analisador Perkin Elmer 2400 série II CHNS/O, com detector de condutividade térmica.

2.4.4.1. Procedimentos sintéticos e caracterização

2.4.4.2. Síntese do complexo CTCl-Zn

O ligante CTCl (80,0 mg, 0,25 mmol) foi suspenso em 6 mL de etanol. Trietilamina (Et_3N) foi adicionada (42,5 μ L, 0,30 mmol) e a suspensão foi agitada por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, uma solução de cloreto de zinco (ZnCl_2 , 17,3 mg, 0,13 mmol) previamente preparada em 3 mL de etanol foi adicionada à suspensão. A mistura resultante foi mantida em refluxo por 1 h. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a solução límpida foi deixada em repouso por alguns dias, permitindo que aproximadamente dois terços do solvente evaporassem. Finalmente, os cristais formados foram separados por centrifugação e lavados com etanol e metanol. Monocristais adequados para análise de difração de raios-X foram obtidos cerca de dois meses após uma solução de DMSO- d_6 do complexo ter sido deixada em repouso em um tubo de RMN aberto.

CTCl-Zn. Cristais amarelos, rendimento: 79%; P.F.: 212–214 °C. Análise elementar, calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{S}_2\text{Zn}$ (%): C, 55.30; H, 3.77; N, 12.09. Experimental: C, 54.86; H, 3.75; N, 12.04. UV-Vis (DMSO; λ/nm): 285, 392. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3447, 3282, 3171 ($\nu_{\text{N-H}}$); 1611, 1490, 1457 ($\nu_{\text{C=C}}$); 1541 ($\nu_{\text{C=N}}$) 795 ($\nu_{\text{C-S}}$). RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 7,52 (d, 3J 15,77 Hz, 1H, H8), 7,41 (s, 2H, NH_2), 7,39 (s, 4H, H11 + 15 e H12 + 14), 7,34 (tt, 4J 2,52, 3J = 7,3, 1H, H5), 7,28 (t, 3J 7,6 Hz, 2H, H4 + 6), 7,04 (d, 3J 6,97 Hz, 2H, H3 + 7), 6,28 (d, 3J 15,77 Hz, 1H, H9). RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 158,3 (C1), 135,1 (C10), 129,0

(C3 + 7), 128,6 (C4 + 6), 129,1 (C5), 128,9 (C8), 137,1 (C9), 134,7 (C2), 129,3 (C11 + 15), 129,4 (C12 + 14), 133,8 (C13), 173,7 (C16).

2.4.4.3. Difração de raio-X de monocristal

A análise de difração de raio-X foi realizada pelo Professor Doutor Guilherme Pereira Guedes, do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense (UFF). Os dados de difração de raio-X do composto **CTCI-Zn** foram coletados em um difratômetro Bruker D8-Venture, utilizando radiação Mo K α monocromatizada por grafite ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) à temperatura ambiente. A coleta de dados, o refinamento da cela unitária e a redução dos dados foram realizados utilizando, respectivamente, os programas *APEX2* (Bruker AXS Inc., 2012a) e *SAINT* (Bruker AXS Inc., 2012b) do *Bruker Instrument Service*. A correção de absorção, com base em reflexões equivalentes, foi feita com o software *SADABS* (Bruker AXS Inc., 2001). A solução da estrutura e o refinamento por mínimos quadrados em matriz completa, baseado em F^2 , foram conduzidos com os programas *SHELXS* e *SHELXL* (Sheldrick, 2015). Todos os átomos, exceto os de hidrogênio, foram refinados anisotropicamente. Os átomos de hidrogênio foram tratados por refinamento misto. Duas moléculas de DMSO desordenadas foram encontradas na rede cristalina, modeladas em duas posições com ocupações de 0,60:0,40 e 0,73:0,27, respectivamente. As ilustrações da estrutura foram geradas com o software Mercury (Macrae et al., 2006), e a Tabela 2.11 resume os dados cristalográficos, de coleta e de refinamento para o complexo **CTCI-Zn**.

Tabela 2.11. Resumo dos dados cristalográficos e de refinamento da estrutura do complexo **CTCl-Zn**.

Fórmula química	C ₃₆ H ₃₈ Cl ₂ N ₆ O ₂ S ₄ Zn
Massa molecular	851.23
Sistema cristalino	Monoclinic
Grupo espacial	<i>P</i> ₂₁ / <i>n</i>
<i>a</i> /Å	11.6653(5)
<i>b</i> /Å	15.9258(7)
<i>c</i> /Å	22.0977(10)
α /°	90
β /°	91.196(2)
γ /°	90
Volume da célula/Å ³	4104.4(3)
Temperatura/K	298
Unidades de fórmulas por célula <i>Z</i>	4
Tipo de radiação	MoK α
Coefficiente de absorção, μ/mm^{-1}	0.97
Nº. de reflexões coletadas	58405
Nº. de reflexões independentes	7240
<i>R</i> _{int}	0.051
Valor final de <i>R</i> _{<i>I</i>} (<i>F</i> ² > 2 σ (<i>F</i> ²))	0.050
Valor final de <i>wR</i> (<i>F</i> ²) (<i>F</i> ² > 2 σ (<i>F</i> ²))	0.112
Valor final de <i>R</i> _{<i>I</i>} (todos os dados)	0.075
Valor de <i>wR</i> (<i>F</i> ²) final (todos os dados)	0.133
Qualidade de ajuste <i>F</i> ²	1.06
Maior pico/bole/e Å ⁻³	0.67/-0.52
Número CCDC	2209190

2.4.4.4. Ensaios Biológicos

Todas as avaliações biológicas envolvendo os compostos **CTCl (CT3)** e **CTCl-Zn** foram realizadas pela mestrandia Maria Clara Campos (Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ – atual doutoranda na mesma universidade), sob orientação da Profa Dra. Juliana Echevarria-Lima.

2.4.4.5. Ensaio de toxidez em *Artêmia salina*

O ensaio de toxidez em *Artêmia salina* é um método rápido e de baixo custo. Esse ensaio foi realizado seguindo um protocolo adaptado descrito por Rajabi e colaboradores (2015). Os ovos (3 g) foram colocados para eclodir em uma solução salina artificial [NaCl (48 g), CaCl₂·2 H₂O (3 g), KBr (0.20 g), KCl (1.40 g), Na₂SO₄ (8 g), NaHCO₃ (0,4 g), MgCl₂·6H₂O (22 g), e 1 L de H₂O Milli-Q®], com pH ajustado em 8 ± 0,5. Após 48 h à temperatura ambiente, as larvas de *A. salina* (aproximadamente 10-20) foram transferidas para placas de 6 poços na presença ou ausência dos compostos. O número de náuplios sobreviventes foi registrado após 24 horas

de incubação. Para o cálculo da dose letal para 50% da população (DL_{50}), considera-se baixa toxicidade quando a DL_{50} for superior a 100 μ M, e alta toxicidade quando for inferior a 25 μ M.

2.4.4.6. Cultura de células

A linhagem celular transformada pelo HTLV-1 (MT-2) foi generosamente cedida pelo Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Brasil. As células foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Lonza) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco/Thermo Fisher), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/ml; LGC Biotechnology, Brasil). Células foram cultivadas à 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , e duas passagens foram realizadas por semana.

2.4.4.7. Ensaios de citotoxicidade

Cerca de 2×10^5 células/mL (MT-2) foram incubadas na presença ou ausência dos compostos em concentrações entre 1,56 e 50 μ M. O veículo dos compostos (DMSO) também foi avaliado. As células foram cultivadas à 37 °C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Após 48 h, a viabilidade foi avaliada pelo ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; Sigma-Aldrich/Merck). Antes de atingir 48 h de incubação, uma solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e as placas foram incubadas por 3 horas nas mesmas condições já descritas. Então, os cristais de formação foram dissolvidos com DMSO e as absorbâncias medidas em 490 nm com espectrofotômetro leitor de placas (SpectraMax® SoftMax® Pro, Molecular Devices). Esses ensaios foram realizados em triplicatas independentes.

Para avaliar se os compostos testados induzem apoptose, inicialmente as células foram incubadas na presença dos compostos conforme descrito acima. Após 24 horas, as células foram lavadas uma vez com solução salina de PBS (Sigma-Aldrich/Merck) e então marcadas com o kit de Anexina V-isotiocianato de fluoresceína (FITC)/7-aminoactinomicina D (7AAD) (BD Pharmingen™), seguindo as instruções do fabricante. Dez mil eventos foram coletados usando FACSCalibur™ e CellQuest™ (BD). As análises de porcentagem celular em estágio inicial de apoptose (Annexin-V⁺/7AAD⁻) e estágio avançado (Annexin-V⁺/7AAD⁺) foi realizada pelo software FlowJo 10.0.

2.4.4.8. Detecção de espécies reativas de oxigênio

A di-hidrorodamina 123 (DHR-123) é um reagente capaz de atravessar a membrana celular, onde é oxidada por espécies reativas de oxigênio à rodamina 12, composto fluorescente. A análise da produção de ROS foi realizada após 1,5 do início do tratamento com **CTCI** e **CTCI-Zn**. As células foram incubadas com 25 ou 50 μM de **CTCI** ou **CTCI-Zn** e nos últimos 30 minutos, 1 μM de DHR-123 (Sigma-Aldrich/Merck) foi adicionado a todas as amostras, exceto no controle negativo. H_2O_2 (3% diluído em PBS estéril) foi utilizado como controle positivo. Após 30 minutos, as células foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur™ and CellQuest™). Dez mil eventos foram adquiridos utilizando o gate baseado nas propriedades de espalhamento frontal (forward scatter) versus espalhamento lateral (*sideward scatter*) para excluir detritos e dupletos. A análise da porcentagem de células e da intensidade média de fluorescência (IF) foi realizada com o software FlowJo 10.0.

2.4.4.9. Análise de expressão de CD25

A expressão de CD25 foi avaliada após 24 h de tratamento com 50 μM dos compostos (a cultura das células foi realizada conforme descrito anteriormente). Células MT-2 foram lavadas com PBS e tampão FACS (PBS com 5% de SFB), respectivamente. Então, as células foram incubadas com um anti-CD25 humano conjugado a Ficoeritrina diluído 1:1 (v/v) em tampão FACS. Após 30 minutos no escuro e à temperatura ambiente, as células foram lavadas novamente com tampão FACS e resuspendidas em PBS. Dez mil eventos foram adquiridos usando FACSCalibur™ and CellQuest™ (BD)

2.5. Piridazinonas e compostos relacionados - foco nas ftalazinonas: atividades biológicas

Os compostos heterocíclicos estão presentes em mais de 85% das substâncias bioativas conhecidas, sendo componentes estruturais em diversos candidatos promissores e fármacos já aprovados. A inserção de heteroátomos em anéis aromáticos e não aromáticos, em substituição a átomos de carbono, dá a essas estruturas propriedades muito distintas, que são amplamente exploradas no planejamento racional de fármacos. Essa troca permite modular a lipofilicidade, solubilidade, acidez e basicidade, bem como conferir a capacidade dessas substâncias interagirem com seus alvos moleculares por meio de ligações de hidrogênio (Jampilek, 2019; Qadir et al., 2022). Entre os núcleos mais relevantes na Química Medicinal, destacam-se as piridazinas (Figura 2.50), anéis aromáticos de 6 membros com dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 2 (He et al., 2021; Meanwell, 2023; Wermuth, 2011). Um subgrupo de igual interesse inclui os derivados oxigenados conhecidos como piridazin-3(2*H*)-onas e ftalazin-1(2*H*)-onas (Akhtar et al., 2016; Vila et al., 2015), os quais possuem uma carbonila diretamente conectada a um dos nitrogênios do anel. Esses núcleos e seus análogos estruturais estão presentes em moléculas com atividades biológicas diversas, sendo algumas delas candidatos que avançaram para alguma etapa de ensaios clínicos ou que já são fármacos aprovados para o tratamento de alguma condição, como: câncer (olaparibe e talazoparibe), diabetes (zopolrestat), alergias (azelastina – anti-histamínico), insuficiência cardíaca em cães (pimobendan), depressão (minaprina), inflamação e dor (emorfazona) (Figura 2.50) (Asif et al., 2018; Vila et al., 2015).

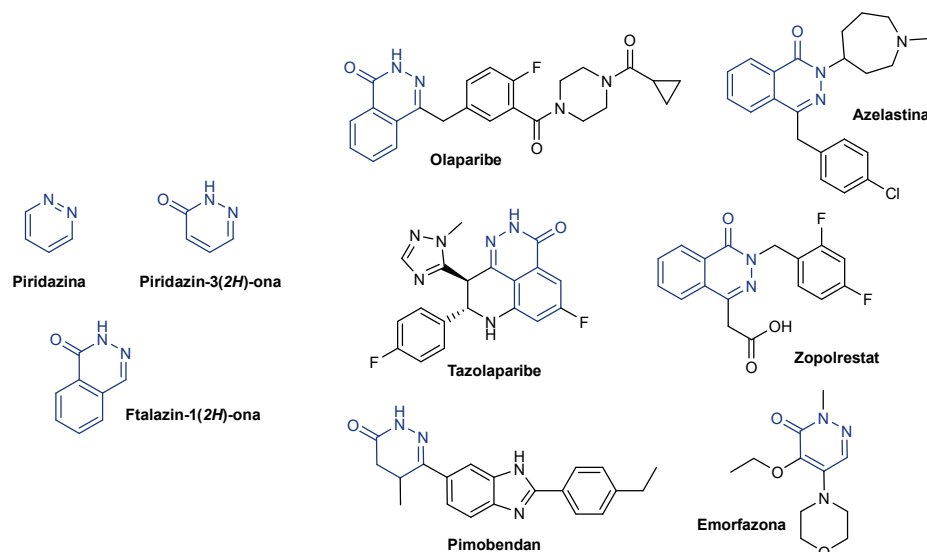


Figura 2.50. Estrutura do núcleo piridazínico e seus derivados oxigenados. Estrutura de algumas substâncias aprovadas como fármacos ou que alcançaram alguma etapa em estudos clínicos.

Uma busca pelos termos (“*phthalazinone* OR *phthalazinones* OR “*phthalazin-1(2H)-one*” OR “*phthalazin-1(2H)-ones*” OR *pyridazinone* OR *pyridazinones* OR “*pyridazin-3(2H)one*” OR “*pyridazin-3(2H)ones*”) na plataforma Scopus resultou em 3262 artigos originais entre 1954 e 2025, evidenciando o grande interesse por essas subclasses de piridazinas. Quando os termos “AND (cancer OR anticancer)” foram incluídos na pesquisa, somente 228 artigos originais foram encontrados, alguns dos quais serão discutidos brevemente a seguir.

Elagawany e colaboradores (2013) desenvolveram três novos inibidores de proteínas quinases baseados no núcleo ftalazinona (**32-34**, Figura 2.51). Todos eles foram capazes de inibir a quinase DYRK1A com valores de IC_{50} abaixo de 10 μ M. Os compostos **32** e **33** também demonstraram inibição da quinase GSK3. Essas substâncias foram citotóxicas contra quatro linhagens tumorais, com valores de IC_{50} abaixo de 16 μ M. Para a obtenção de **32** e **33**, inicialmente, a piridazin-3,6-ona **35** foi preparada pela reação de sulfato de hidrazina com anidrido fenilmaleico. O composto dicarbonilado foi então tratado com cloreto de fosforila para a formação do derivado diclorado **36**. Este foi reagido com hidróxido de amônio e forneceu dois isômeros aminados que foram separados por cromatografia em coluna (**37** e **38**). Uma mistura de **38** e acetato de sódio em ácido acético foi mantida em refluxo à 130 °C para a formação da piridazina **32**. A hidrólise de seu grupo ácido foi realizada em uma mistura dioxano:NaHCO_{3(aq)} (1:1) em refluxo por 48 h fornecendo o produto **33**. A ftalazinona **34** foi preparada de maneira similar, no entanto, partindo da 2,3-di-hidroftalazina-1,4-diona (**39**).

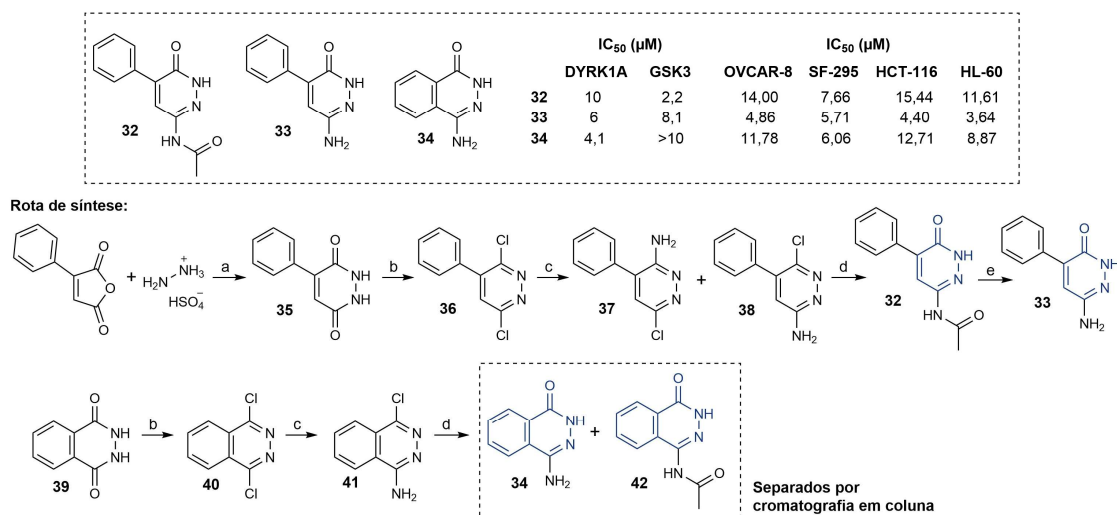


Figura 2.51. Inibidores de quinases **33-34**. Condições das reações: (a) H₂O, refluxo (b) POCl₃, refluxo; (c) NH₄OH, 130°C; (d) CH₃CO₂H, CH₃CO₂Na, refluxo; (e) dioxano, NaHCO₃, H₂O, 120°C, 48 h (Elagawany et al., 2013).

Em 2018, Wang e colaboradores (Wang et al., 2018b) prepararam novas ftalazinonas inibidoras das auroras quinases A e B. A substância mais promissora, (**43**, Figura 2.52) foi capaz de inibir essas enzimas com IC₅₀ de 118 e 80 nM, respectivamente. Além disso, foi citotóxica em cinco linhagens celulares de câncer, com IC₅₀ entre 2,2 a 4,6 μM. Inicialmente, a 2,3-di-hidroftalazina-1,4-diona (**39**) foi obtida a partir do anidrido ftálico. Em seguida, **37** foi tratada com POBr₃ em dicloroetano (DCE), levando à formação de **44**, que ao ser aquecido em meio aquoso ácido, forneceu o derivado carbonilado **45**. Este foi então reagido com o cloreto de alquila **46**, previamente preparado, na presença de NaH e DMF. Por fim, uma reação de acoplamento entre **47** e o éster de pinacol do ácido 1-metilpirazol-4-borônico foi conduzida para gerar a ftalazinona **43**.

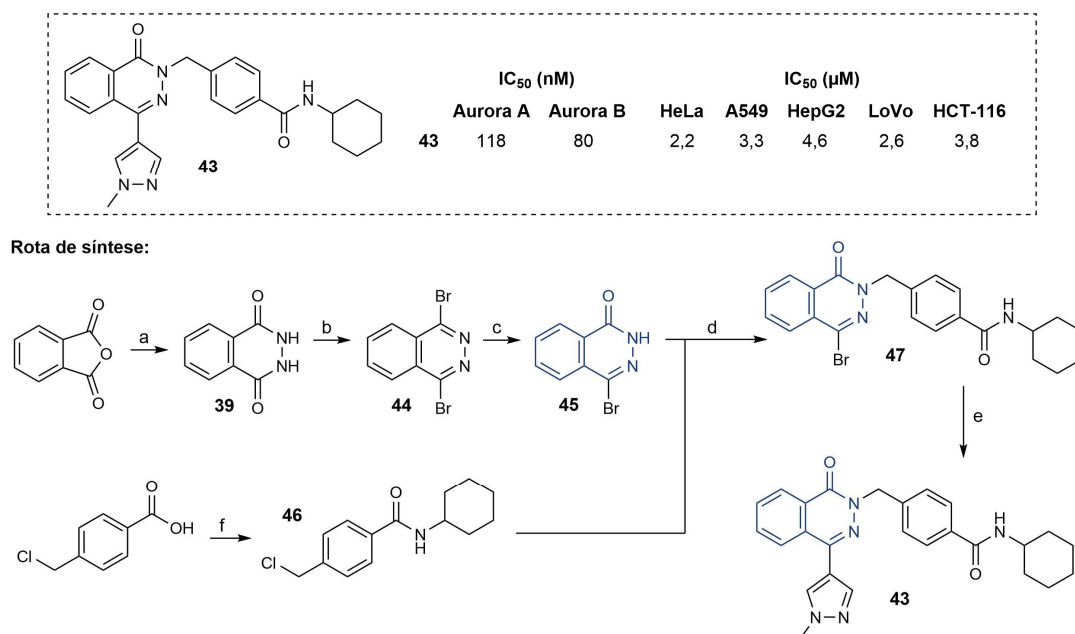


Figura 2.52. Síntese da ftalazinona **43**. Condições das reações: (a) NH_2NH_2 , $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, 120°C (b) POBr_3 , DCE, refluxo; (c) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, 120°C ; (d) NaH , DMF, temperatura ambiente; (e) éster de pinacol do ácido 1-metilpirazol-4-borônico, $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$, Na_2CO_3 , H_2O , dioxano, N_2 , refluxo; (e) dioxano, NaHCO_3 , H_2O , 120°C , 48 h (Wang et al., 2018b).

A imunoterapia é uma das estratégias mais atraentes atualmente para o combate ao câncer. Neste sentido, os inibidores de *checkpoint* imunológicos, por exemplo aqueles que atuam como anti-PD-1 e anti-PD-L1, demonstram algum sucesso contra vários cânceres, apesar da ainda baixa taxa de resposta. Acredita-se que o ambiente tumoral imunossupressivo, contendo poucos linfócitos T citotóxicos infiltrados, contribua para essa baixa resposta. Para melhorar a resposta a esses tipos de inibidores, seria ideal promover a migração de células imunes para o ambiente tumoral, tornando-o mais imunorreativo. Esse efeito pode ser naturalmente promovido pela ativação do estimulador de genes do interferon (STING, *Stimulator of interferon genes*) pelo ligante 2',3'-GMP-AMP cíclico (cGAMP). No entanto, o ligante cGAMP está sujeito à degradação pela enzima ecto-nucleotídeo pirofosfatase fosfodiesterase 1 (ENPP1). Desse modo, Cho e colaboradores (2023) planejaram novos inibidores da ENPP1, com o intuito de promover alguma melhora na resposta aos inibidores de *checkpoint*. A ftalazinona **48** (Figura 2.53) foi a molécula mais potente obtida pelo grupo ($\text{IC}_{50} = 68 \text{ nM}$ frente a enzima). Em modelo animal de câncer de cólon (CT26), **48** sozinho ou em combinação com um anti-PD-L1 suprimiu substancialmente o crescimento tumoral em 55% e 69%, respectivamente. Ainda, um dia após o último tratamento, os camundongos foram novamente inoculados com as células tumorais. A partir deste momento, as substâncias **não** foram

novamente administradas, com o intuito de verificar se os animais haviam adquirido alguma memória imune. Surpreendentemente, não foi observado crescimento de tumores.

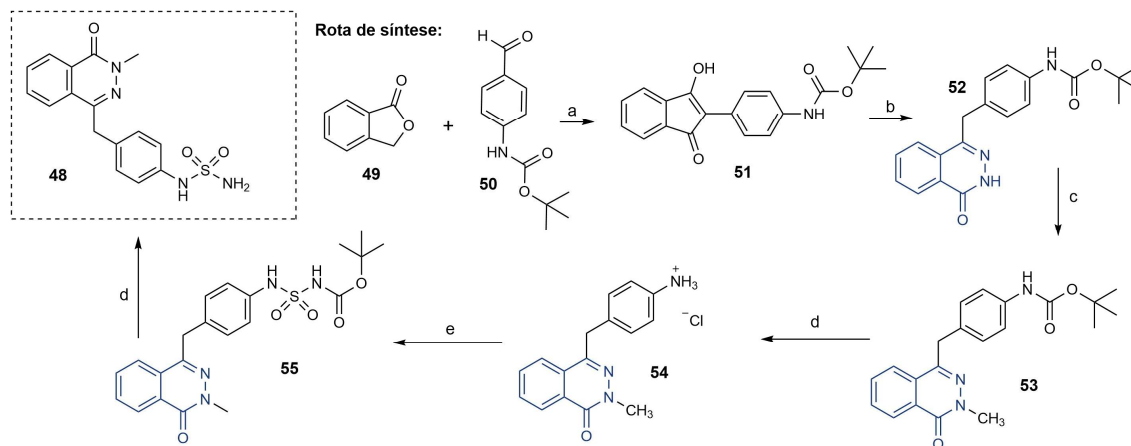


Figura 2.53. Síntese da ftalazinona **48**. Condições das reações: (a) NaOMe, MeOH, EtOAc, 70°C-refluxo; (b) Hidrazina monohidrato, H₂O, refluxo; (c) MeI, K₂CO₃, MeCN, 80 °C; (d) HCl, 1,4-dioxano/CH₂Cl₂, 0°C-temperatura ambiente; (e) isocianato de clorosulfonila, t-BuOH, NEt₃, CH₂Cl₂, 0°C-temperatura ambiente (Cho et al., 2023).

Na primeira etapa, a isobenzofuranona **49** foi condensada ao aldeído **50**. A 3-hidroxi-fenil indenona formada (**51**) foi tratada com hidrazina, gerando o núcleo ftalazinônico (**52**). O nitrogênio amídico desse anel foi alquilado com iodeto de metila e, após essa etapa, o grupo Boc de **53** foi retirado por hidrólise ácida. O grupo amino livre do intermediário **54** foi então reagido por S_N2 com o isocianato de clorosulfonila – nesta etapa, o isocianato reage com o terc-butanol, gerando um novo grupo BoC em **55**, que é retirado por hidrólise ácida na etapa seguinte.

2.5.1. Justificativas e objetivos

Conforme discutido na introdução deste capítulo, diversos estudos já demonstraram o potencial anticâncer das ftalazinonas. Diante disso, pensou-se em utilizar a estratégia de hibridização molecular e desenvolver ftalazinonas derivadas de chalconas-tiossemicarbazonas (série **B**, Figura 2.54) e di-hidrochalconas-tiossemicarbazonas (série **C**), introduzindo um grupo carboxílico em posição estratégica que permitisse uma reação de acilação intramolecular para a formação do núcleo da ftalazinona. Com o intuito de ampliar a estrutura dessas moléculas e melhorar a sua estabilidade em solução (discutido posteriormente), planejou-se converter o grupo tioamida terminal em um anel tiazólico, por meio da reação de Hantzsch (**B3** e **C3**).

Compostos contendo outros grupos na posição 2 da ftalazinona (nitrogênio amídico) foram planejados para avaliar a real importância do feniltiazol para a atividade biológica. As primeiras ftalazinonas planejadas continham uma unidade estiril ou feniletila em R, como já mencionado. A fim de gerar derivados mais solúveis, ftalazinonas contendo uma cadeia carbônica reduzida nesta posição (grupo metila, série A) foram incluídos nas investigações.

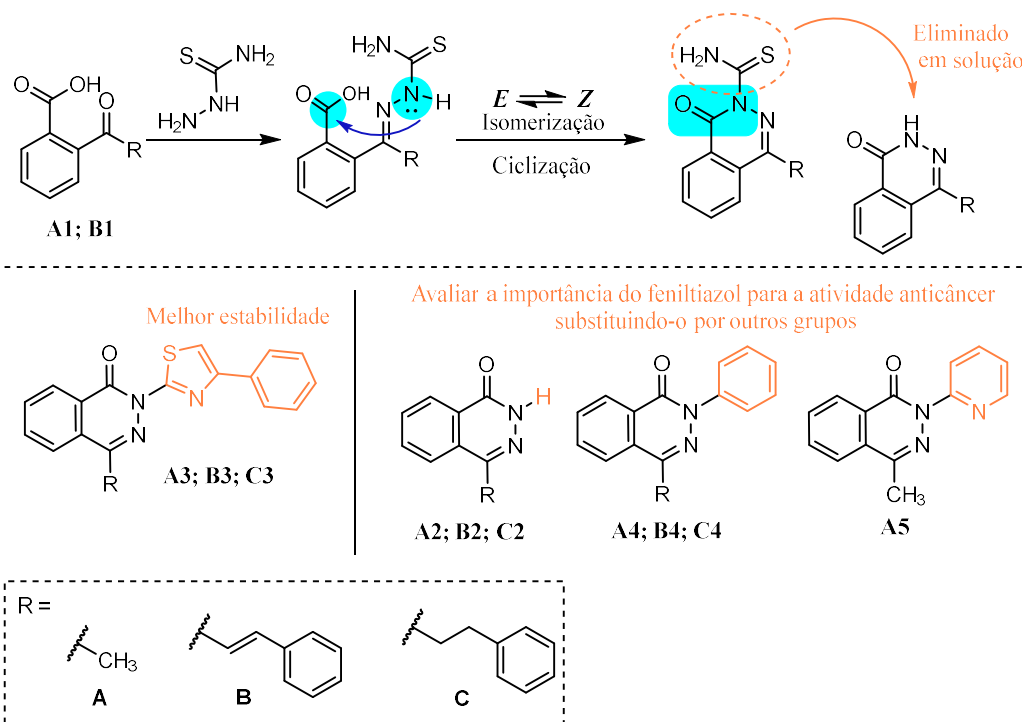


Figura 2.54. Estrutura das ftalazinonas preparadas no presente trabalho.

A Figura 2.55 apresenta a análise retrosintética completa para a obtenção de todas as ftalazinonas propostas. Os principais precursores desses heterociclos são o ácido 2-acetilbenzóico (**A1**) e a chalcona **B1**. Para **A1** propôs-se a desconexão C-C. Para a construção dessa ligação, seria necessário, por exemplo, uma espécie carbonilada que atuasse como eletrófilo (como um anidrido) em uma reação de substituição e um carbânion que atuasse como nucleófilo. Portanto, dois possíveis precursores correspondem ao anidrido ftálico e ao ácido malônico. A desconexão C-O do anidrido, indica o ácido ftálico como precursor direto. A chalcona **B1**, por sua vez, conforme indicado pela desconexão C=C, pode ser preparada pela condensação de Claisen-Schmidt e é utilizada para preparar as ftalazinonas da série **B**. Para preparar a série **C**, uma das possíveis rotas exigiria o uso do derivado hidrogenado de **B1** (di-hidrochalcona). Porém, seu preparo por meio da hidrogenação catalítica poderia ocasionar a

redução não seletiva de sua carbonila, necessitando de cromatografia em coluna para a separação dos diferentes produtos de hidrogenação. Por esse motivo, propôs-se a obtenção da série **C** pela hidrogenação dos compostos da série **B** – nessas substâncias, a carbonila do anel possui caráter de amida, sendo, por esse motivo, mais difícil de ser reduzida.

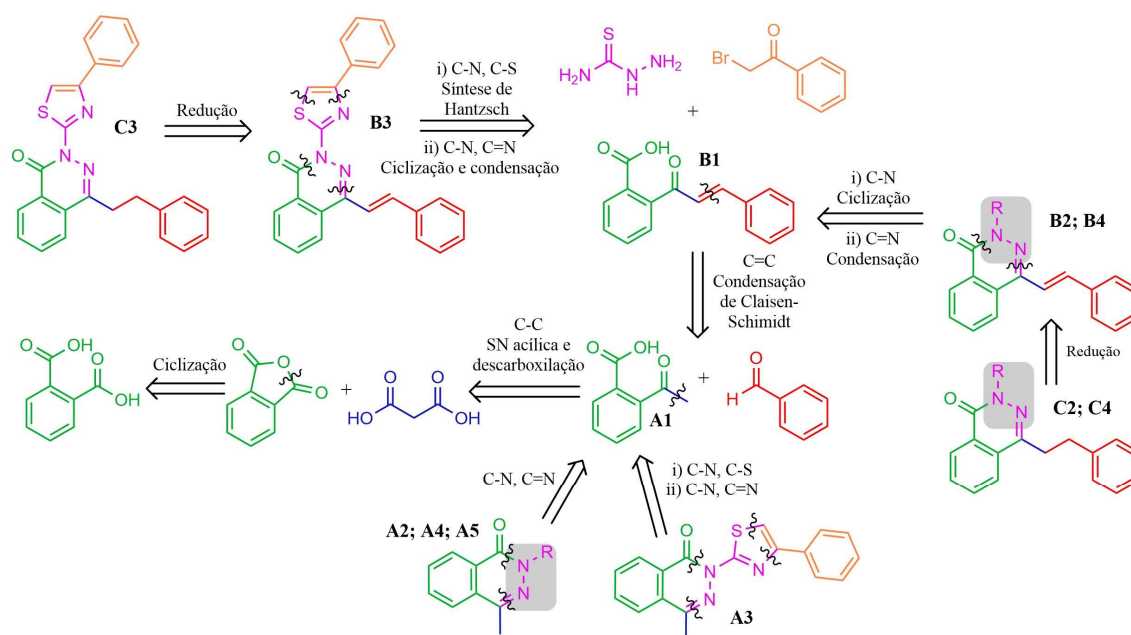


Figura 2.55. Análise retrossintética completa para a obtenção das ftalazinonas e seus principais precursores.

Assim, os objetivos foram:

- Sintetizar e purificar as 10 ftalazinonas apresentadas na Figura 2.54. No total, cinco desses compostos são inéditos (**A3**, **A5**, **B3**, **C3**, **C4**);
- Caracterizar as substâncias por IV, RMN de ^1H e ^{13}C ;
- Investigar a atividade anticâncer em linhagem de hepatocarcinoma (Huh-7);
- Investigar a influência do composto mais ativo sob a função mitocondrial da linhagem celular Huh-7;
- Investigar a toxidez das substâncias ativas em células renais embrionárias humanas (HEK293T);
- Avaliar a interação da substância mais ativa com a albumina sérica humana;
- Prever parâmetros de ADME e fármacossimilaridade pela plataforma SwissADME;
- Investigar o mecanismo de ação do composto mais ativo por *Docking Molecular*.

2.5.2. Resultados e discussão

2.5.2.1. Síntese das ftalazinonas

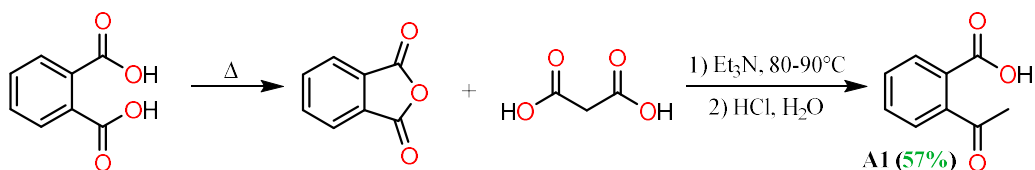


Figura 2.56. Síntese do ácido 2-acetil-benzóico. Formação do anidrido ftálico: 3 ciclos de aquecimento e homogeneização (20 minutos cada). Etapa final: 6 h.

Em um primeiro momento, uma amostra de anidrido ftálico foi preparada pelo aquecimento lento do ácido ftálico em um béquer (Figura 2.56). O rendimento foi quantitativo e o ponto de fusão do sólido branco (131-134°C) confirmou a obtenção do anidrido ftálico. Essa reação consiste em uma substituição acílica intramolecular entre os grupos carboxílicos do ácido (Figura 2.57). Dois fatores importantes devem favorecer essa reação em altas temperaturas. O primeiro deles, consiste no aumento de entropia do sistema devido a conversão de uma molécula de ácido ftálico, em duas moléculas distintas: anidrido ftálico e água. Outro fator crucial deve ser a perda de água devido a sua evaporação na temperatura da reação (> 134 °C). A evaporação da água deve deslocar o equilíbrio para a formação de mais produtos, de acordo com o Princípio de Le Chatelier.

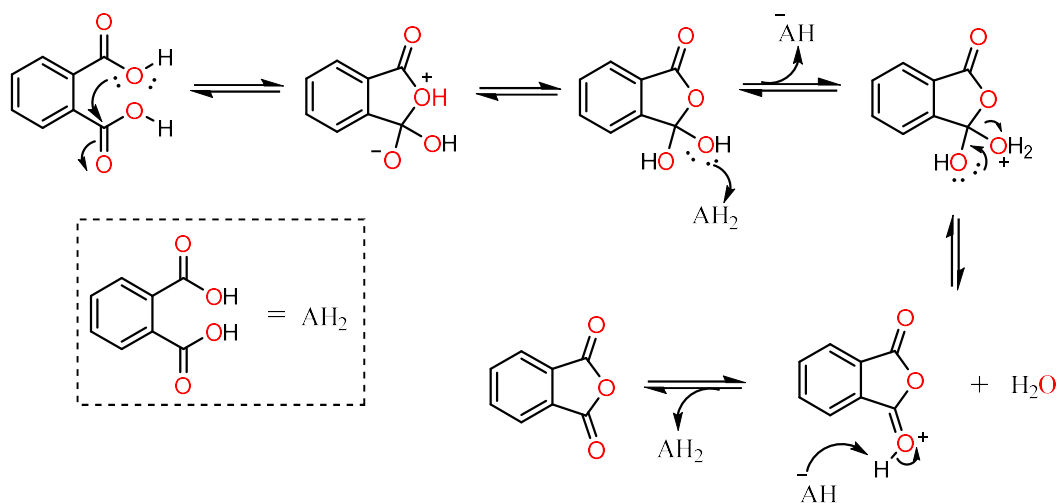


Figura 2.57. Mecanismo sugerido para a formação do anidrido ftálico.

Através de uma busca na literatura, foram encontradas duas metodologias para a obtenção do ácido 2-acetilbenzóico, a partir do anidrido ftálico. Ambas empregam o ácido malônico como agente nucleofílico, responsável por introduzir um grupo metila no substrato (Figura 2.58). As metodologias divergem pela amina empregada como solvente e catalizador. Em uma delas, utiliza-se piridina e o meio reacional é mantido em refluxo durante todo o período de reação (Wang et al., 2024). Ao empregar esta metodologia, não foi possível obter **A1**. Possivelmente: 1) a temperatura empregada - próxima ao ponto de ebulição da piridina (115 °C) – deve ter causado a decomposição do ácido malônico antes que pudesse reagir com o anidrido ftálico (Figura 2.58) (Newman, 1977); 2) a piridina, uma base fraca ($pK_{aH} \sim 5,14$, Portenkirchner et al., 2014), deve ter sido incapaz de desprotonar o ácido malônico em quantidade suficiente para garantir uma reação rápida com o anidrido, antes que o próprio ácido malônico sofresse descarboxilação.

Assim, a segunda metodologia encontrada na literatura foi empregada como alternativa. Nela, a trietilamina é utilizada no lugar da piridina e a reação é mantida em ~ 80 °C (Britton et al., 2012). Essa amina é uma base muito mais forte ($pK_{aH} \sim 10,78$, Riddick; Bunger; Sakano, 1985) e na temperatura empregada, a velocidade de decomposição do ácido malônico deve ser menor (Newman, 1977). Nesta síntese, o ácido malônico deve ser convertido em uma espécie nucleofílica após desprotonação pela trietilamina (Figura 2.58). O carbânion formado, parcialmente estabilizado pela deslocalização da carga entre as carboxilas, ataca uma das carbonilas do anidrido ftálico, levando a abertura do anel e formação de uma espécie que, após duas descarboxilações consecutivas, é convertida no ácido 2-acetilbenzóico (Figura 2.58). A liberação de CO_2 torna essa reação irreversível e em teoria deveria fornecer **A1** em alto rendimento. No entanto, com essa metodologia, foi possível obter **A1** como um sólido castanho claro com 57% de rendimento, após purificação por recristalização em tolueno. A temperatura do banho de glicerina ultrapassou 80 °C em diversos momentos durante a reação, tendo alcançando até 90 °C. Um melhor controle da temperatura, mantendo-a mais próxima de 80 °C, deve aumentar o rendimento da reação por reduzir a decomposição do ácido malônico.

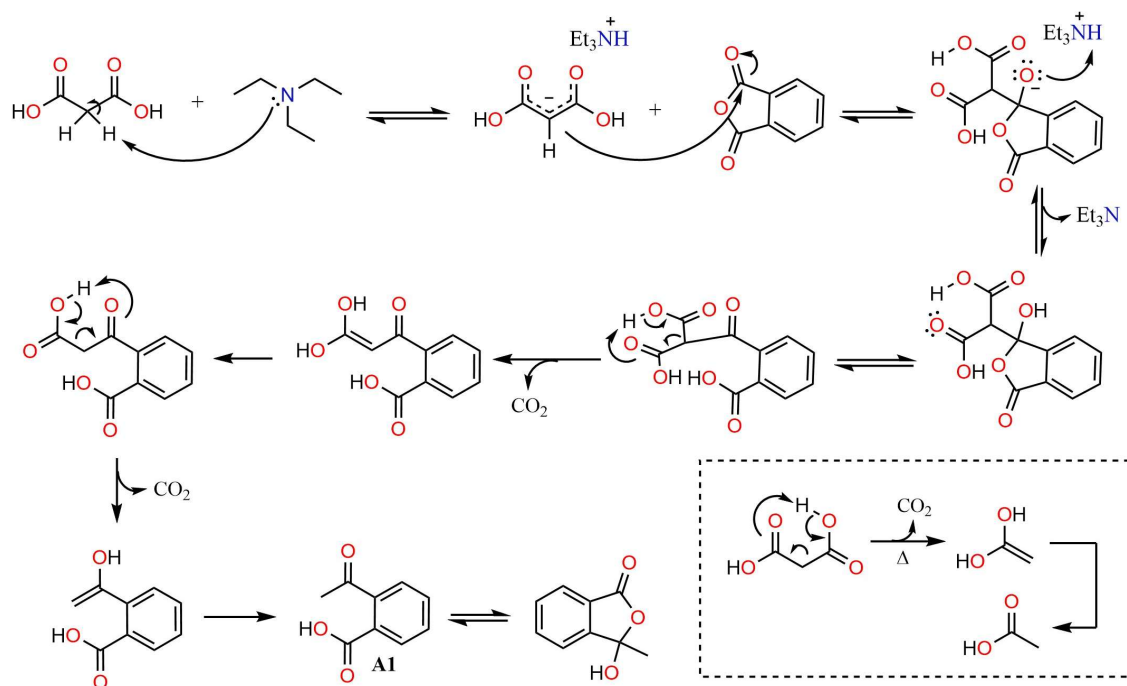


Figura 2.58. Mecanismo proposto para a formação de **A1** e decomposição do ácido malônico sob aquecimento.

O sólido aparentava estar puro por CCD e a sua identidade foi confirmada pelo ponto de fusão (P.F. encontrado: 114-115 °C; P.F. literatura: 114-115 °C, Yale, 1947). O RMN de ^1H em CDCl_3 confirmou a presença de uma metila e de uma hidroxila no produto (Figura 39), indicando que **A1** foi obtido. A literatura mostra que, na verdade, **A1** encontra-se predominantemente na forma de uma lactona em estado sólido (Jagadeeswara Rao et al., 2019) e em soluções de clorofórmio (Santos et al., 2004). A forma aberta é observada em maior quantidade em solução aquosa neutra que em clorofórmio (Tyman; Najam, 1977). Já em soluções aquosas alcalinas somente o isômero de cadeia aberta parece existir, na forma de carboxilato (Tyman; Najam, 1977). É possível que alguns dos sinais extras bem tênues observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 2.59) sejam devido a sua forma aberta, mas a presença de impurezas não pode ser descartada, já que uma análise mais minuciosa não foi realizada. O sólido foi utilizado em diversas sínteses seguintes sem purificações adicionais. Posteriormente, uma amostra do ácido 2-acetilbenzóico (25 g, sólido branco) foi adquirida pela Sigma-Aldrich para finalizar algumas reações.

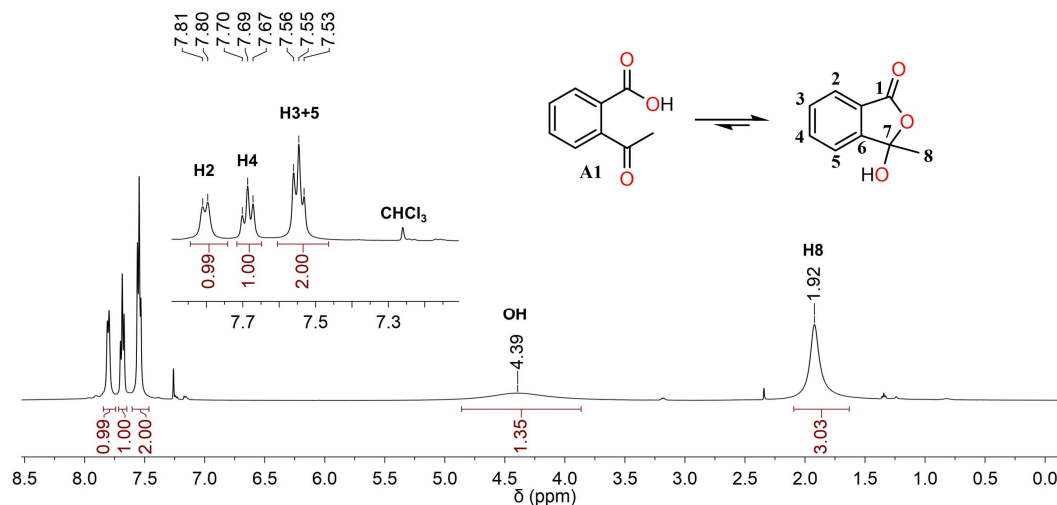


Figura 2.59. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do ácido 2-acetilbenzóico. Espectro corresponde majoritariamente a forma cíclica (3-hidroxi-3-metil-ftalida).

Em seguida, o ácido 2-acetilbenzóico foi reagido com a tiossemicarbazida, na intenção de formar a ftalazinona **A2-TAM** (**A2-TioAMida**, Figura 2.60). Em um primeiro teste, a reação foi realizada com aquecimento em micro-ondas convencional (11 minutos), na presença de sílica gel (70-230 mesh) como suporte. O produto foi extraído da sílica por lavagens com clorofórmio e acetona.

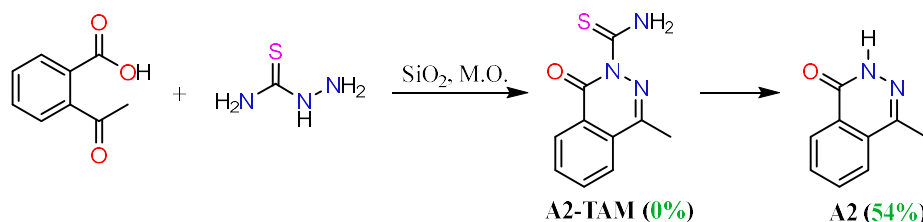


Figura 2.60. Primeira tentativa de síntese de **A2-TAM** por irradiação em microondas (M.O.) convencional. 11 minutos de aquecimento em micro-ondas convencional.

O composto extraído tratava-se, na realidade, de **A2**, não de **A2-TAM**. Provavelmente, o grupo tioamida foi eliminado devido ao rápido e potente aquecimento no micro-ondas. O RMN de ^1H dessa amostra isolada e purificada por recristalização em etanol (Figura 2.61), possui integração total para 8 hidrogênios (**A2**), ao invés de 9 hidrogênios, como deveria ser, caso o produto se tratasse de **A2-TAM**. Além disso, o espectro de RMN de ^{13}C apresenta o sinal correspondente à carbonila amídica em 160,0 ppm, enquanto o sinal da tiocarbonila, esperado em torno de 180 ppm, não foi observado (Figura 2.62). O singlete em 12,45 ppm foi então atribuído ao hidrogênio amídico de **A2**. O HMBC confirma essa atribuição ao mostrar

correlações entre este próton e os carbonos quaternários C1, C2 e C8 (Figura 2.63). Essa análise também mostra uma correlação a duas ou três ligações de distância entre H9 e dois carbonos quaternários. Um deles, em 143,8 ppm, corresponde a C8, enquanto o outro carbono, em 130,3 ppm só poderia ser C7.

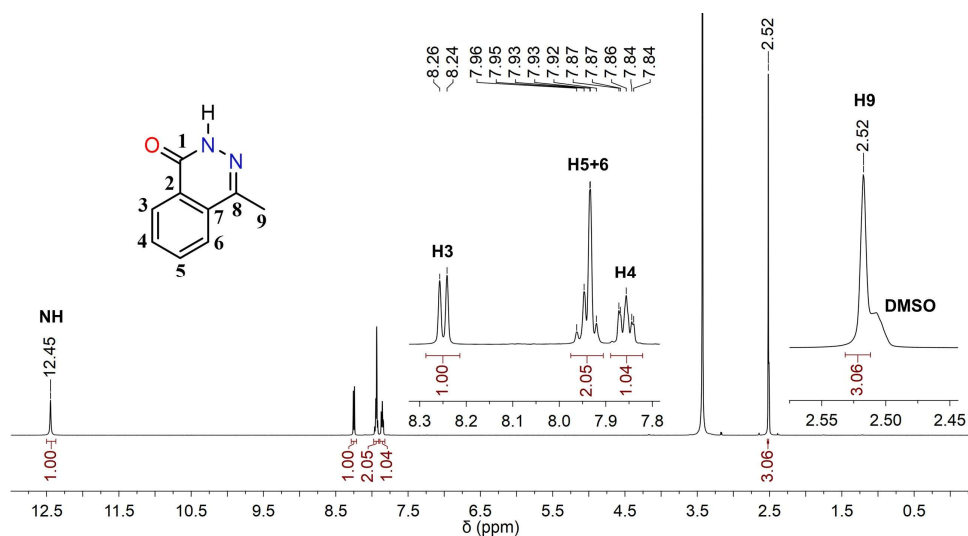


Figura 2.61. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de A2 obtido pela reação entre o ácido 2-acetilbenzóico e tiossemicarbazida em microondas.

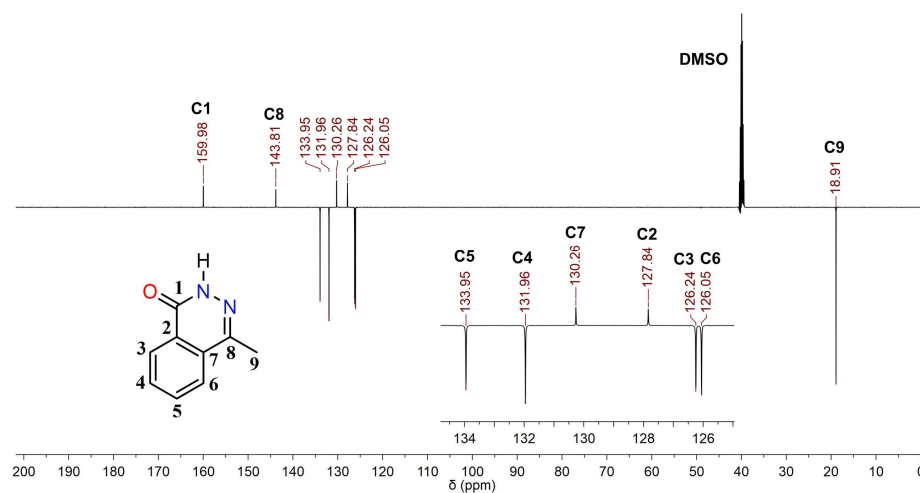


Figura 2.62. RMN de ^{13}C de A2 (125 MHz, DMSO-d_6) obtido pela reação entre o ácido 2-acetilbenzóico e tiossemicarbazida em microondas.

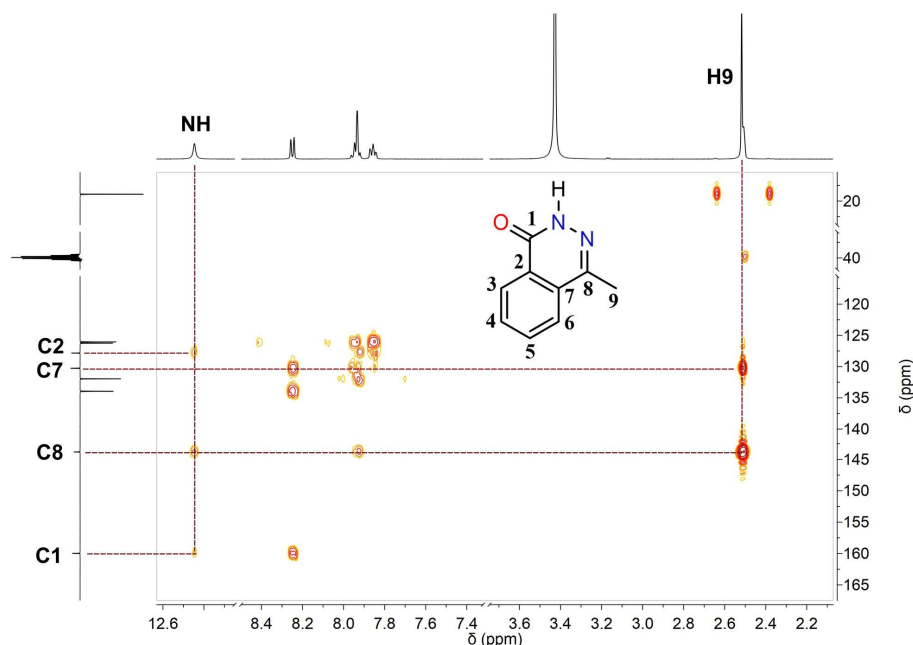


Figura 2.63. HMBC de **A2** (125 MHz, DMSO- d_6) obtido pela reação entre o ácido 2-acetilbenzóico e tiossemicarbazida em micro-ondas. Para maior clareza, somente algumas correlações encontram-se destacadas pelas linhas pontilhadas vermelhas.

O ponto de fusão do sólido (220-222 °C) é muito similar ao relatado na literatura para **A2** (222 °C, Boltze; Dell, 1966), corroborando que a amostra obtida na reação em micro-ondas trata-se dessa substância e não de **A2-TAM**.

A reação entre **A1** e tiossemicarbazida foi repetida em etanol sob refluxo, com o intuito de verificar se, em uma temperatura menor que a alcançada em micro-ondas, seria possível formar **A2-TAM**, sem provocar sua decomposição. Nesta reação, espera-se que inicialmente a tiossemicarbazona **A2-TSC** fosse formada (Figura 2.64). Em seguida, em sua configuração *Z*, **A2-TSC** deve sofrer uma acilação intramolecular, originando **A2-TAM**. Só então, **A2** poderia ser formado pela decomposição de **A2-TAM**. Para acompanhar esse processo, observando a formação de todas essas espécies, alíquotas da reação foram coletadas em tempos específicos e analisadas por CCD [Hexano:EtOAc:AcOH (75:24,5:0,5 v/v/v), duas corridas sequenciais]. Na placa cromatográfica, a amostra coletada da reação (indicada como R na Figura 2.64) foi comparada com padrões de tiossemicarbazida (**TSC**), **A1** e **A2** (obtido pela síntese em micro-ondas). Observou-se que **A1** percorreu um longo caminho pela placa, maior que a distância percorrida pela **TSC** e por **A2**. Este comportamento sugere que, nas condições da cromatografia, **A1** provavelmente encontra-se na forma fechada (3-hidroxi-3-metil-ftalida), que é menos polar do que a sua forma aberta contendo o ácido carboxílico livre.

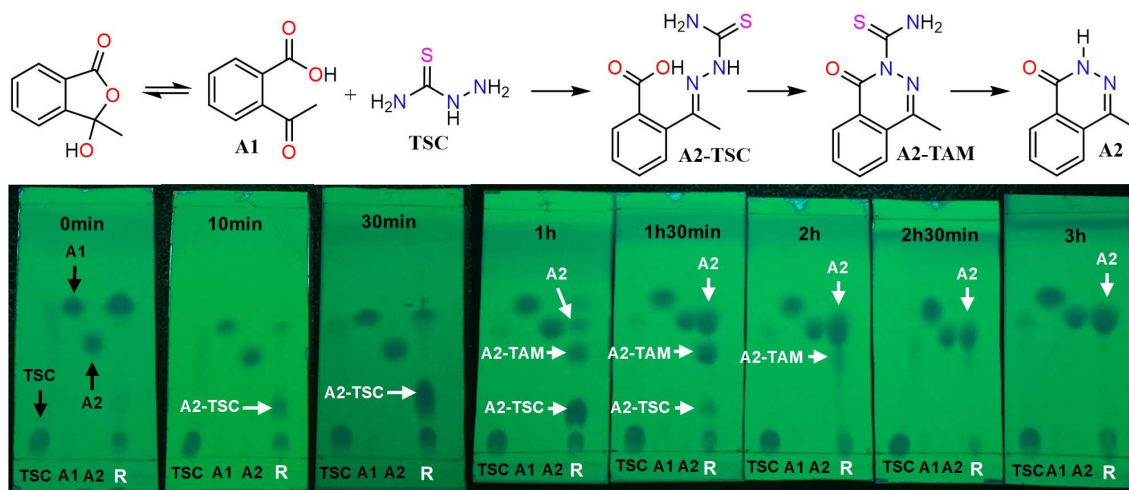


Figura 2.64. Síntese de **A2** em etanol sob refluxo, na presença de quantidade catalítica de ácido acético glacial. Aliquotas da reação foram coletadas nos tempos indicados e a CCD foi realizada em Hexano:EtOAc:AcOH (75:24,5:0,5 v/v/v, duas corridas sequenciais). R corresponde a alíquota coletada na reação. Setas e letras brancas indicam os produtos formados durante a reação. O tempo 0 min corresponde a alíquota coletada com 15 minutos de reação à temperatura ambiente, sem qualquer aquecimento; o tempo indicado nas demais placas correspondem ao tempo em que a reação permaneceu em refluxo.

Com apenas 15 minutos de reação à temperatura ambiente (0 minutos em refluxo), não foi possível observar a presença de nenhum produto em quantidade apreciável. Em 10 minutos de refluxo (banho de glicerina à 86 °C) foi possível observar uma nova mancha, que muito provavelmente corresponde à tiossemicarbazona (**A2-TSC**). Essa atribuição foi feita com base em dois fatores importantes: a tiossemicarbazona deve ser o primeiro produto a ser formado, e o mais polar de todos, devido a presença do grupo carboxílico e do NH central e NH₂ terminal. Em uma hora de reação, **A1** havia praticamente esgotado e a solução da reação, antes incolor, adquiriu coloração amarela. Ao mesmo tempo, surgiram duas novas manchas, uma delas com o mesmo R_f de **A2**. A outra mancha, mais intensa que **A2**, foi atribuída a seu precursor **A2-TAM**. Com mais 30 minutos de reação (1 h e 30 min), já não era possível identificar **A1**, indicando que se esgotou por completo. A mancha atribuída à tiossemicarbazona (**A2-TSC**) encontrava-se muito tênue, enquanto a mancha referente a **A2** aumentou consideravelmente em intensidade. Neste tempo de reação (1 h e 30 min), a solução apresentava cor amarela ainda mais intensa. Com 2 horas de reação, toda a tiossemicarbazona foi esgotada e **A2-TAM** estava presente em pequena quantidade, de acordo com a CCD. A coloração amarela da solução desbotou consideravelmente. Essas mudanças de coloração – amarela, quando **A2-TAM** surge no meio, e incolor, quando **A2-TAM** não é mais observado –, sugere que **A2-TAM**, ou um produto de sua decomposição, seja o responsável pela cor amarela observada nos tempos de 1

h e 1,5 h. Em 2 h de reação, **A2** era praticamente o único produto presente no meio reacional. Em 2 horas e 30 minutos de reação, somente **A2** estava presente no meio, além, é claro, da tiossemicarbazida, utilizada em 10% de excesso – neste tempo, a solução encontrava-se praticamente incolor. Após 3 h de refluxo, a mistura foi resfriada e os cristais formados foram coletados por filtração à vácuo, fornecendo **A2** como cristais incolores em 63% de rendimento.

Considerou-se que o intermediário **A2-TSC**, devido à sua alta polaridade, seria bem solúvel em etanol, assim como a tiossemicarbazida utilizada em excesso na reação. Já se sabia pela etapa de recristalização da reação anterior, que **A2** não apresentava boa solubilidade em etanol à temperatura ambiente. Pelas corridas cromatográficas, **A2-TAM** parecia possuir polaridade bem similar à **A2** – por esse motivo, estimou-se que suas solubilidades também seriam semelhantes. Assim, foi antecipado que no intervalo de 1 h-1,5 h seria possível separar uma mistura formada por **A2** e **A2-TAM** de seus precursores que ainda restavam em solução (**TSC**, **A2-TSC**, **A1**). A reação foi então repetida nas mesmas condições, mantendo o aquecimento (refluxo) por cerca de 1h e 10 min. Após esse tempo, a solução amarela foi resfriada à temperatura ambiente por 10 min antes de ser colocada no freezer. Neste intervalo, foi observada a formação de um precipitado amarelo (provavelmente uma mistura de **A2** e **A2-TAM**). A mistura gelada foi filtrada à vácuo e lavada com etanol gelado. A análise de cromatografia em camada fina, realizada em dois eluentes diferentes, revelou que o sólido amarelo isolado correspondia a uma mistura contendo **A2** e outra substância, presumivelmente **A2-TAM** (Figura 2.65A). Após seco, uma amostra do sólido foi enviada para análise de RMN, cujos espectros confirmam a presença de **A2** na mistura (Figura 2.65B). O espectro de RMN de ^1H apresenta dois simpletos em 10,52 e 9,92 ppm, que foram atribuídos aos hidrogênios do grupo NH_2 de **A2-TAM**. Esses hidrogênios não são magneticamente equivalentes provavelmente devido a rotação impedida da ligação N-C. Os motivos dessa rotação impedida, devem ser similares aqueles apresentados para as tiossemicarbazonas. O par de elétrons desse nitrogênio está conjugado com o sistema π da tiocarbonila – o que confere certo caráter de dupla a ligação C-N e dificulta sua rotação. Além disso, um dos hidrogênios do grupo NH_2 deve realizar ligação de hidrogênio com o nitrogênio imínico presente no anel da ftalazinona. Os sinais referentes à H3, H4, H5, H6 e H9 foram observados em campo mais baixo que seus correspondentes em **A2**. O ambiente mais desprotegido dos hidrogênios de **A2-TAM** pode ser reflexo da natureza retiradora de elétrons do grupo tioamida. O par de elétrons do nitrogênio amídico deve ser também compartilhado com a tiocarbonila (Figura 2.65C), reduzindo a sua doação para o anel benzênico e tornando os hidrogênios menos protegidos.

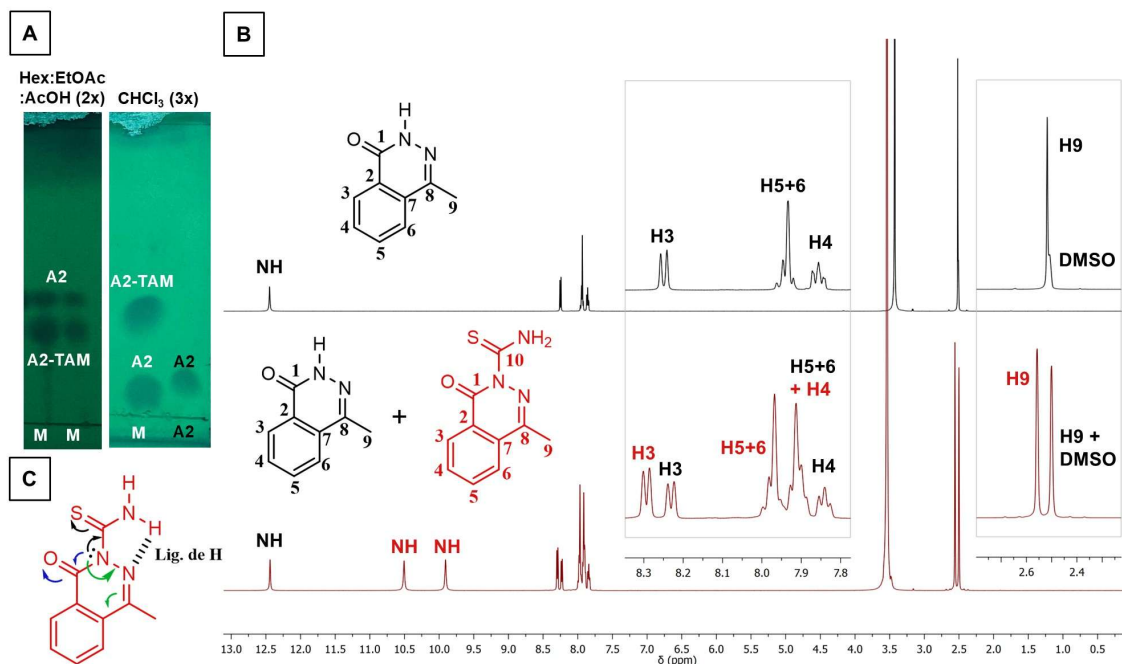


Figura 2.65. Análise do sólido isolado na reação entre **A1** e tiossemicarbazida. (A) Placa à esquerda: duas corridas sequenciais em Hexano:EtOAc:AcOH (75:24,5:0,5 v/v/v) – nesta placa, ambas as corridas são referentes a mesma mistura, sendo à esquerda mais concentrada e à direita mais diluída; Placa à direita: três corridas sequenciais em clorofórmio. (B) RMN de ¹H de uma amostra pura de **A2** (espectro superior) e da mistura isolada na reação (espectro inferior). Os sinais de **A2** foram atribuídos em preto e os sinais de **A2-TAM** em vermelho. (C) Ligação de hidrogênio intramolecular esperada para **A2-TAM** e ressonâncias do par de elétrons do nitrogênio amídico.

A Figura 2.66 apresenta a sobreposição dos espectros de RMN de ¹³C de uma amostra pura de **A2** e da mistura composta por **A2** e **A2-TAM**. Nem todos os sinais observados no espectro de **A2** puro se sobrepõem perfeitamente com os sinais atribuídos a esse composto no espectro da mistura. Essa diferença pode ser devido a concentração, temperatura ou até mesmo a alteração dos deslocamentos químicos devido a presença de **A2-TAM** no meio. Apesar disso, a presença de **A2** na mistura é evidente. Um sinal em 185,5 ppm confirma a presença de uma tiocarbonila (C10), atribuída à **A2-TAM**. Observa-se também os demais sinais de **A2-TAM**, referentes aos carbonos quaternários, CH e CH₃, todos bem deslocados se comparados aos sinais do **A2**.

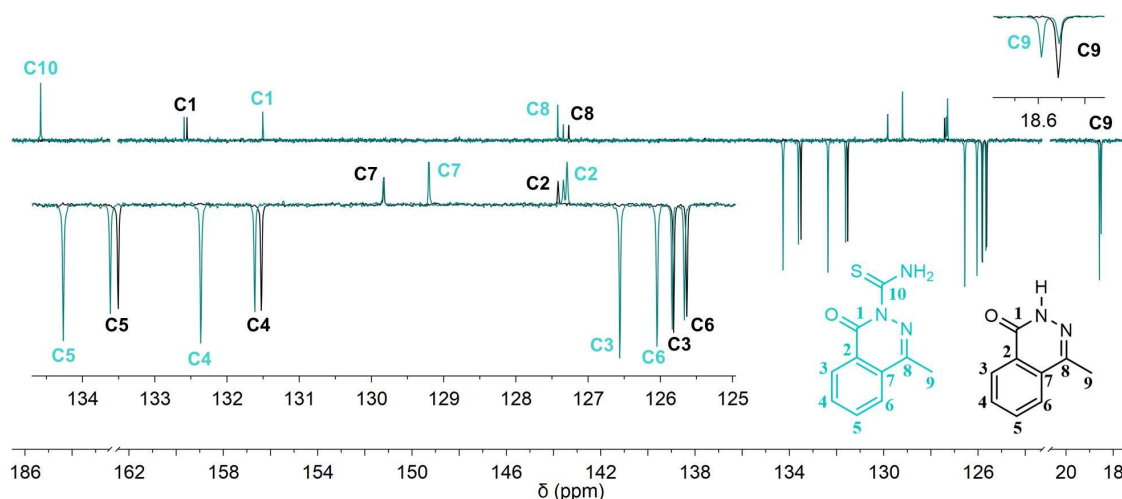


Figura 2.66. RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO- d_6) de **A2** puro (espectro preto) e da mistura composta por **A2** + **A2-TAM** (espectro ciano).

A reação realizada em etanol foi bem esclarecedora. Mostrou que, mesmo na temperatura de refluxo do etanol ($\sim 78^\circ\text{C}$), **A2-TAM** decompõem rapidamente, formando **A2**. O pico de sua concentração deve ocorrer entre 1 h e 1,5 h de reação. Em 2,5 h essa substância já foi completamente decomposta. Um questionamento foi então levantado. Em temperatura ambiente, seria possível formar **A2-TAM** sem sua decomposição? Para responder a essa pergunta, a reação foi repetida à temperatura ambiente (28°C , na ocasião, Figura 2.67). Mesmo com 24 h de reação, o único produto observado por CCD foi **A2-TSC**. A reação foi mantida por 40 h nesta condição (placa de CCD não foi fotografada) e, mesmo assim, nenhum indício de **A2-TAM** ou **A2** foi notado. Sendo assim, à temperatura ambiente, a tiossemicarbazona é formada, mas não é capaz de ciclizar para formar o anel da ftalazinona. Por esse motivo, a reação foi aquecida à 45°C e acompanhada periodicamente. Em 2 h já foi possível notar a mudança de coloração da solução, que foi de incolor a amarelo, indício de que **A2-TAM** estaria sendo formado. Conforme esperado, a CCD confirmou a formação de certa quantidade de **A2-TAM** e **A2**. Ainda havia, no entanto, quantidade apreciável de **A1**, **A2-TSC** e **TSC**. Com 10 h de aquecimento, a solução havia adquirido coloração amarela ainda mais intensa e a quantidade de **A2-TAM** e **A2**, verificada por CCD, aumentou consideravelmente. A CCD em 10 h de reação foi repetida utilizando outro eluente (CHCl_3) que permitiu observar com maior clareza a presença de **A2-TAM** e **A2** – na ocasião, a alíquota da reação foi comparada com a mistura de **A2** e **A2-TAM** isolada na reação anterior. Esse experimento mostrou que embora a reação de ciclização intramolecular não possa ocorrer em baixa temperatura (28°C), o aquecimento brando (45°C) é suficiente para permitir a ciclização, promovendo a conversão lenta da

tiossemicarbazona na ftalazinona **A2-TAM**. Ainda, mostrou que **A2-TAM** é mais instável do que se imaginava, já que à 45 °C sua decomposição foi observada.

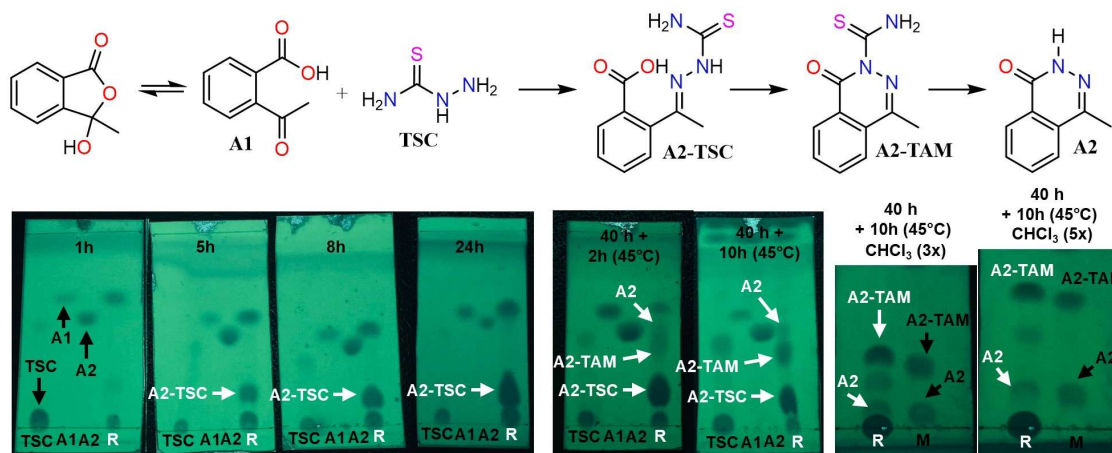


Figura 2.67. Reação entre **A1** e tiossemicarbazida em etanol, na presença de quantidade catalítica de ácido acético glacial. A reação foi realizada à temperatura ambiente por 40 horas (CCD fotografada somente até 24 h). Em seguida a reação foi aquecida à 45 °C e a CCD realizada nos tempos de 2 h e 10 h [Hexano:EtOAc:AcOH (75:24,5:0,5 v/v/v), duas corridas sequenciais). No tempo de 10 h, a CCD foi repetida utilizando CHCl₃ como eluente (três corridas consecutivas).

A reação foi repetida em maior quantidade e a mistura de **A2** e **A2-TAM** foi isolada após 1 h de refluxo. A cromatografia preparativa foi empregada na tentativa de separar as duas substâncias. Para tanto, 50 mg de material foram transferidos para uma placa preparativa (22 cm x 22 cm) contendo 25 g de sílica e foram realizadas 5 eluições consecutivas com clorofórmio (Figura 2.68). A região contendo **A2-TAM** foi retirada da placa e a ftalazinona foi extraída com MeOH:THF (3:4 v/v). Essa mistura de eluentes foi escolhida por ser facilmente eliminada à pressão reduzida sem exigir aquecimento. No entanto, após eliminar o solvente, uma análise de CCD do sólido obtido, revelou que tratava-se de uma mistura de **A2-TAM** e **A2**. Durante o período entre a última eluição e a extração do material com MeOH:THF, **A2-TAM** deve ter decomposto enquanto adsorvido na sílica. A separação dessas substâncias, por tanto, não é tão simples. A própria sílica pode ter sido responsável por facilitar a decomposição do material. Futuramente, seria interessante tentar realizar a separação utilizando outra fase estacionária, como a C18.

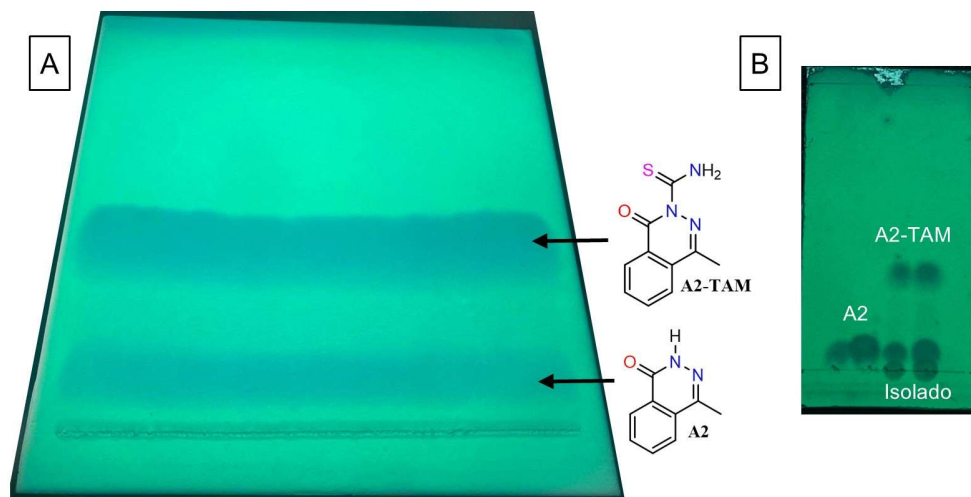


Figura 2.68. (A) Imagem da cromatografia preparativa após 5 corridas em clorofórmio (B) CCD após extração do material presente na mancha atribuída à **A2-TAM**. Após a última eluição com clorofórmio o material foi mantido na sílica por ~12 h a temperatura ambiente e mais ~60 h a -20 °C antes de ser extraído com MeOH:THF.

A conformação mais estável de **A2-TAM** deve ser a mostrada na Figura 2.69, onde um dos hidrogênios do grupo NH_2 realiza ligação de hidrogênio intramolecular com o nitrogênio imínico da ftalazinona, e o enxofre interage com o oxigênio da carbonila (interação intramolecular enxofre-cavidade σ , Koebel et al., 2016; Zhang et al., 2015). A decomposição de **A2-TAM** deve envolver a rotação da ligação N-C_{tiocarbonila}, gerando um conformero em que a carbonila amídida realiza uma ligação de hidrogênio com o NH. Em seguida, uma reação similar à descarboxilação de β -ceto-ácidos deve ocorrer. O ácido tiociânico pode ser a espécie liberada durante a decomposição. Uma vez que **A2-TAM** apresenta estabilidade limitada em solução, decompondo até mesmo a 45°C (Figura 2.67), pensou-se em converter a tiocarbonila em um grupo fenil-tiazol (**A3**, Figura 2.69). Sem o grupo NH_2 , a reação de decomposição mostrada na Figura 2.69 não deve ser possível. Além disso, a introdução desse grupo torna a estrutura da molécula mais extensa, possivelmente potencializando interações com alvos biológicos. Estruturas análogas à **A3** (**A4** e **A5**) também foram preparadas, com o intuito de avaliar a real importância do fenil-tiazol para a atividade anti-câncer.

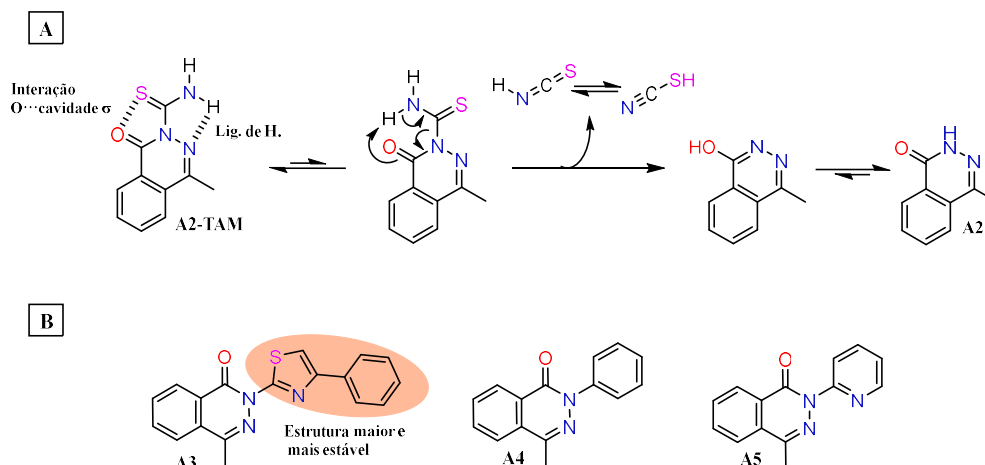


Figura 2.69: (A) Mecanismo proposto para a decomposição de **A2-TAM**. (B) Estrutura das demais moléculas planejadas para a série A.

O híbrido ftalazinona-feniltiazol foi preparado por uma reação *one-pot* entre a **A1**, TSC e 2-bromo-acetofenona, em etanol sob refluxo. Já **A4** e **A5** foram facilmente obtidos pela reação entre **A1** e fenil-hidrazina ou 2-hidrazino-piridina, respectivamente (Figura 2.70). Todas as ftalazinonas da série **A** foram obtidas com sucesso, com rendimentos entre 46 e 75%. O ponto de fusão de **A4** (95-97 °C) confirmou a sua obtenção, já que se encontra próximo do valor reportado na literatura (97-98 °C, Vaughan; McCane; Sloan, 1951). **A3** e **A5** são inéditos, por esse motivo, não foi possível utilizar os pontos de fusão para confirmar a formação dessas substâncias.

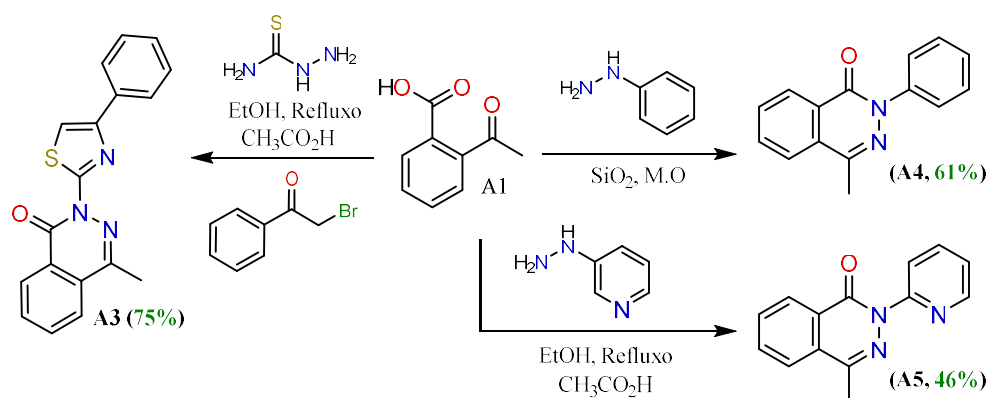


Figura 2.70. Rota para a síntese de **A3** (4 h em refluxo), **A4** (3 min em micro-ondas) e **A5** (5 h em refluxo).

Os espectros de infravermelho de todas as ftalazinonas da série A (Figura 2.71) apresentam uma banda intensa em 1651-1661 cm^{-1} , atribuída ao estiramento axial da carbonila

amídica. Além disso, bandas de estiramento C-H aromático (3014-3090 cm^{-1}) e C=C (1607-1412 cm^{-1}) também foram observadas, como esperado. A presença da metila é confirmada por uma banda de intensidade fraca a média em 1377-1379 cm^{-1} , que corresponde ao dobramento angular C-H desse grupo alquila.

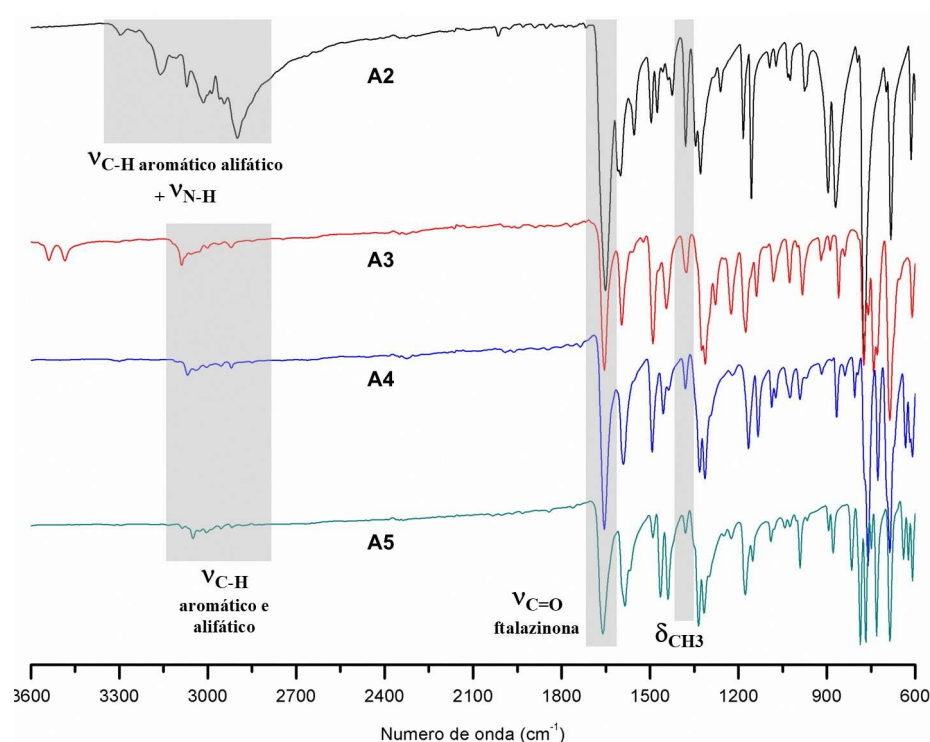


Figura 2.71. Espectros de infravermelho de A2-A5.

O espectro de RMN de ^1H , por sua vez, também confirmou a obtenção dessas ftalazinonas (Figura 2.72). Nos derivados A3-A5, o hidrogênio H3 aparece em campo mais baixo, possivelmente devido ao efeito retirador de elétrons dos grupos introduzidos no nitrogênio amídico. O mesmo comportamento é claramente observado para o hidrogênio H9, referente a metila dessas substâncias.

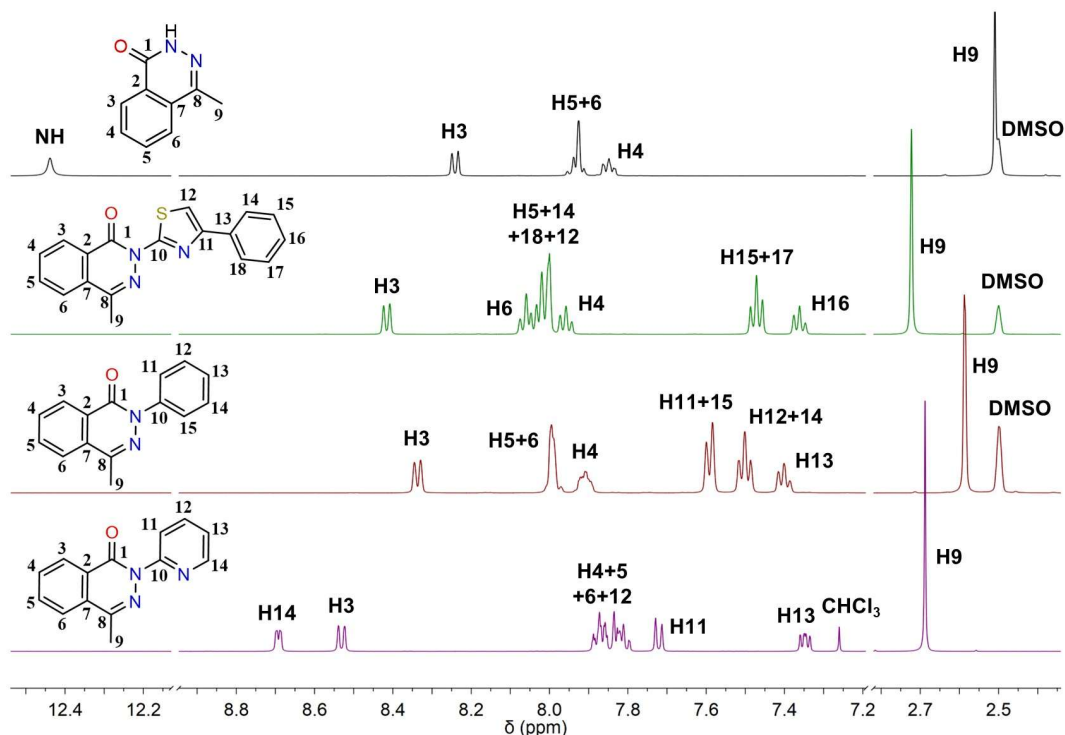
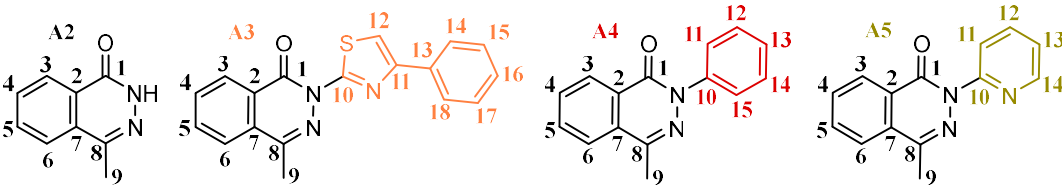


Figura 2.72. Comparação dos espectros de RMN de ^1H de todas as ftalazinonas da série A. **A2**, **A3** e **A4** foram obtidos em DMSO-d_6 (500 MHz) e **A5** em CDCl_3 (500 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C , a metila aparece como um sinal em 18,7-19,1 ppm (Tabela 2.12). O núcleo C1 foi observado em 157,9-160,0 ppm, região esperada para a carbonila amídica das ftalazinonas (Abdelgawad et al., 2023). Para as ftalazinonas **A2-A5**, o carbono azometínico (C8) foi observado em 143,8-146,7 ppm. No espectro do híbrido **A3**, os sinais em 157,2 ppm (C10), 149,9 ppm (C11) e 112,6 ppm (C12) confirmam a formação do anel tiazólico (Arzuk et al., 2024; Pricopie et al., 2019). Além disso, no espectro desse composto não foi observado nenhum sinal próximo a 180 ppm, confirmando que a tioamida de **A2-TAM** foi convertida no tiazol. Por fim, os espectros de **A4** e **A5** apresentam os sinais esperados para o anel benzênico e piridínico, respectivamente. Destaca-se nesses compostos o sinal referente ao carbono quaternário C10, diretamente conectado ao nitrogênio amídico da ftalazinona. Este sinal aparece em 142,2 ppm (**A4**) e em 153,5 ppm (**A5**). Experimentos bidimensionais foram realizados somente para **A2** e **A3**. A tabela 2.12 mostra os deslocamentos químicos atribuídos nos espectros de RMN de ^{13}C para os compostos **A2-A5**.

Tabela 2.12. Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de ^{13}C das ftalazinonas **A2-A5**.

									
Carbono	A2	A3	A4	A5*	Carbono	A2	A3	A4	A5*
1	160,0	157,9	158,3	159,5	10	-	157,2	-	-
2	127,8	126,4	127,6	128,4	11	-	149,9	-	-
3	126,2	126,9	127,5	127,7	12	-	112,6	-	-
4	132,0	132,7	132,2	131,9	13	-	134,2	-	-
5	134,0	134,7	133,9	133,7	14+18	-	126,0	-	-
6	126,1	126,3	126,7	125,2	15+17	-	128,8	-	-
7	130,3	128,6	129,3	130,0	16	-	128,1	-	-
8	143,8	146,7	144,2	145,1	10	-	-	142,2	-
9	18,9	19,1	18,7	19,3	11+15	-	-	126,1	-
					12+14	-	-	128,6	-
					13	-	-	125,9	-
					10	-	-	-	153,5
					11	-	-	-	123,3
					12	-	-	-	138,0
					13	-	-	-	121,7
					14	-	-	-	149,6

*Espectro do composto A5 foi obtido em CDCl_3 . Os espectros de A2, A3 e A4 foram obtidos em $\text{DMSO}-d_6$

A estrutura de **A3** foi também confirmada por espectrometria de massas de alta resolução (Figura 2.73). O espectro exibiu um pico em m/z 320,0850 no modo de ionização positivo, correspondendo ao íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ [calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{OS}^+$, $(\text{A3}+\text{H})^+$: 320,0852].

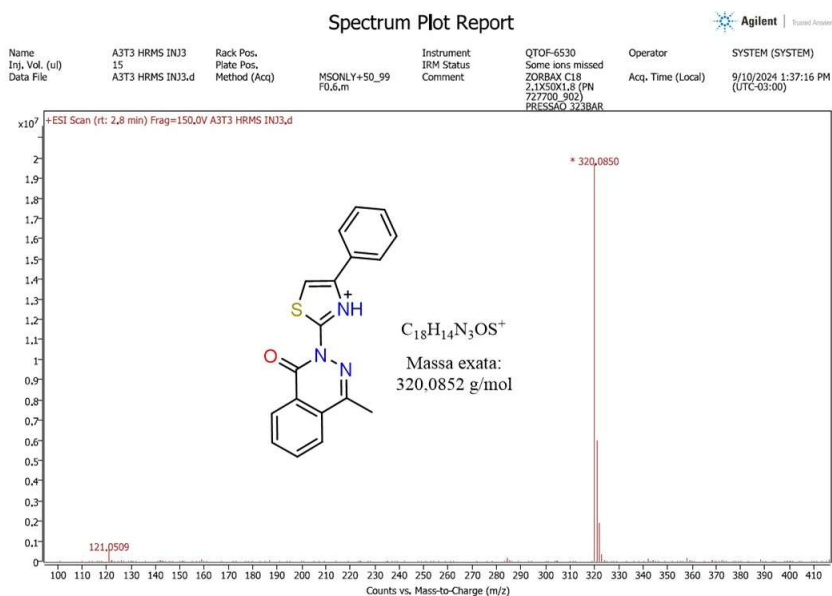


Figura 2.73. Análise de **A3** por espectrometria de massas de alta resolução.

Uma solução de **A3** em metanol:clorofórmio forneceu monocristais ao ser resfriada. A solução foi deixada por mais alguns dias no freezer para permitir a evaporação lenta do solvente e o crescimento dos cristais. Os cristais incolores foram então analisados por difração de raio-X, que confirmou, mais uma vez, a estrutura do híbrido ftalazinona-feniltiazol **A3**. A unidade assimétrica da estrutura cristalina está representada na Figura 2.74A. Além de duas moléculas de **A3**, a unidade conta com duas moléculas de metanol desordenadas, das quais somente uma é mostrada na imagem, para melhor clareza. O metanol de cristalização realiza ligação de hidrogênio com um dos nitrogênios sp^2 da ftalazinona, com distância de 2,987 Å. Uma interação intramolecular de distância média 2,593 Å foi observada entre o átomo de enxofre do anel tiazol e o oxigênio da ftalazinona, que corresponde a uma interação do tipo oxigênio...cavidade sigma – muito provavelmente responsável por manter a planaridade entre as duas unidades estruturais da molécula (ftalazinona e tiazol), uma vez que esse tipo de interação pode ser tão forte quanto ligações de hidrogênio (Koebel et al., 2016). Com relação ao anel da ftalazinona, os comprimentos de ligação são bem próximos daqueles observados em compostos similares contendo esse grupo (Lynch; McClenaghan, 2002). As distâncias em C1-O1 (1,234 Å) e C8-N2 (1,286 Å), destacadas na Figura 2.74B, caracterizam uma ligação dupla entre os átomos (Allen et al., 1987; Lynch; McClenaghan, 2002), conforme esperado para a carbonila amídica e para a ligação azometínica presentes no anel da ftalazinona. C1-N1 e N1-N2, por sua vez, possuem comprimentos típicos de ligações de caráter majoritariamente simples, envolvendo os respectivos átomos com hibridização sp^2 (Allen et al., 1987). Em relação ao núcleo tiazol, os comprimentos observados são os esperados, quando comparados a compostos muito similares, como a 2-cloro-*N*-(4-fenil-1,3-tiazol-2-il)acetamida (Saravanan et al., 2016).

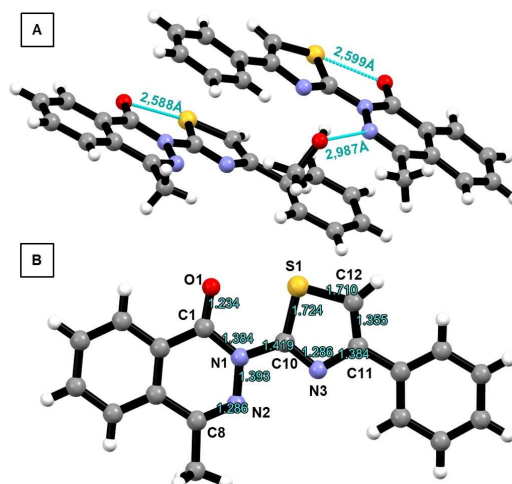


Figura 2.74. (A) Unidade assimétrica do cristal obtido em solução de metanol:clorofórmio. Linhas pontilhadas em ciano indicam interações intermoleculares ou intramoleculares. (B) Estrutura cristalina do composto **A3** com identificação de alguns átomos e comprimento de algumas ligações. Código de cores: C (cinza), N (azul), S (amarelo), O (vermelho) e H (branco).

O ácido 2-acetil-benzóico (ou 3-hidroxi-3-metil-ftalida, conforme a literatura indica) foi utilizado para o preparo da chalcona **B1**. Para tanto, a clássica reação de condensação de Claisen-Schmidt foi empregada (Figura 2.75A). Em meio alcalino aquoso, **A1** deve se apresentar na forma aberta, com um carboxilato livre e a metil cetona disponível para a reação de condensação. Após a purificação por recristalização em etanol:água (6:4 v/v), a chalcona foi obtida na forma de cristais incolores com 68% de rendimento. Em seguida, foi reagida, em etanol sob refluxo, com a tiossemicarbazida ou a fenilhidrazina para a formação das ftalazinonas **B2** (44%) e **B4** (58%), respectivamente (Figura 2.75B). Por fim, **B3** foi preparada pela reação *one-pot* entre a chalcona **B1**, tiossemicarbazida e 2-bromoacetofenona. Uma tentativa de recristalização em iso-PrOH:EtOAc forneceu **B3** como um sólido amorfo amarelo em 32% de rendimento e pureza adequada.

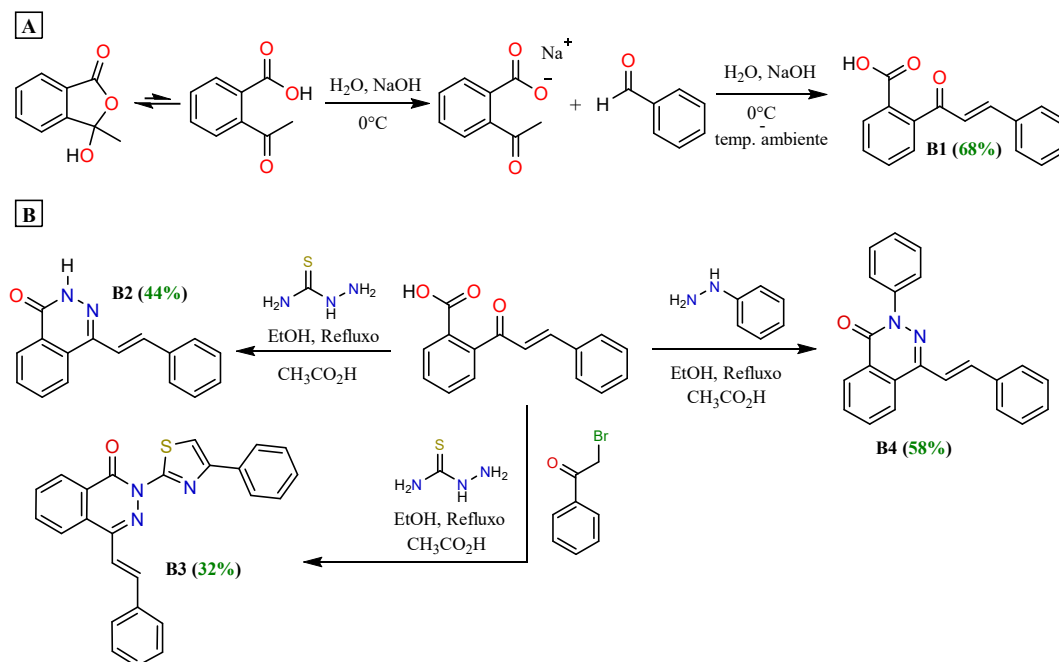


Figura 2.75. Síntese da chalcona **B1** (A, condensação de Claisen-Schmidt: 1 h à 0°C e 3 h à temperatura ambiente) e das ftalazinonas da série **B** (B; **B2**: 20 h em refluxo; **B3**: 3 h em refluxo; **B4**: 1 h em refluxo).

A análise de infravermelho de **B1** mostra uma banda larga em $\sim 3300\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ [$\nu(\text{O-H})$] e uma banda intensa em 1688 cm^{-1} [$\nu(\text{C=O})$] que sugerem a presença de um ácido carboxílico conjugado, como era esperado. Além disso, outra banda de estiramento de carbonila foi identificada, em 1643 cm^{-1} (Figura 2.76). Essa banda foi atribuída à carbonila cetônica duplamente conjugada da chalcona. A presença de uma banda de média intensidade em 976 cm^{-1} , confirma a presença do alceno em configuração *trans* – a absorção é referente ao dobramento angular fora do plano dos hidrogênios desse grupo [$\gamma(\text{C-H})$]. As ftalazinonas derivadas de **B1** (**B2-B4**) apresentam somente uma banda de estiramento axial C=O . Essa banda foi observada ($1651\text{--}1659\text{ cm}^{-1}$) em região característica de carbonilas de amidas, o que confirma a formação do núcleo ftalazinona. A ftalazinona **B2** possui um ligação N-H e, por esse motivo, era esperado observar uma banda intensa por volta de 3300 cm^{-1} , referente ao estiramento axial dessa ligação. No entanto, assim como ocorreu para **A2**, múltiplas bandas foram observadas entre 3300 e 2880 cm^{-1} . Esse padrão de absorções pode ocorrer, possivelmente, pela existência de ligações de hidrogênio intramolecular no estado sólido (Hansen et al., 2021). Assim, a atribuição de uma banda específica para o estiramento N-H das ftalazinonas **A2** e **B2** é difícil. Por fim, **B2-B4**, assim como **B1**, possuem uma ligação dupla com configuração *trans*, cujo dobramento C-H

fora do plano foi observado na região característica ($957\text{--}976\text{ cm}^{-1}$), na forma de uma banda de intensidade média.

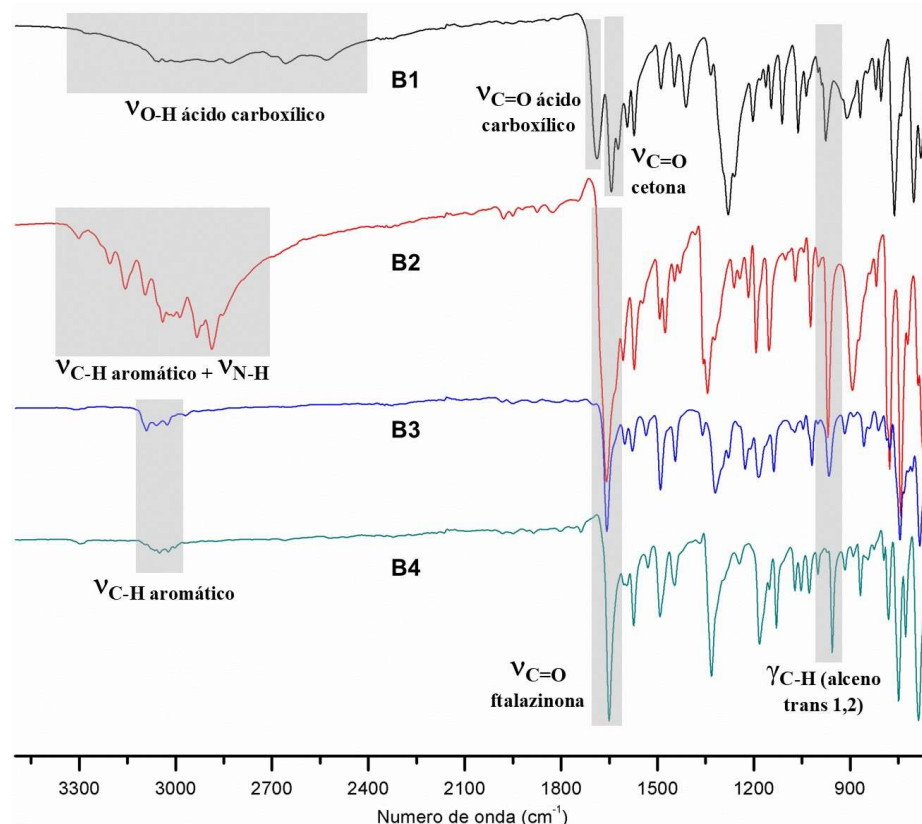


Figura 2.76. Espectros de infravermelho das ftalazinonas da série **B**.

O espectro de RMN de ^1H de **B1** apresenta um singlete largo em 13,25 ppm referente ao hidrogênio ácido do grupo carboxílico (Figura 2.77). Alguns dos hidrogênios do anel benzênico dissustituído (H3, H4 e H6) aparecem como as multiplicidades esperadas. No entanto, os demais hidrogênios aparecem sobrepostos, tornando a atribuição mais complicada. Além disso, não foram observados dupletos de alta constante de acoplamento, esperados para os hidrogênios da olefina. É possível que em DMSO- d_6 , H9 e H10 sejam equivalentes magneticamente, aparecendo como um singlete 7,19 ppm. O espectro de RMN de ^{13}C , por sua vez, confirma a presença da carbonila cetônica e carboxílica pela presença de sinais em 195,7 (C8) e 167,6 ppm (C1), respectivamente. A presença dos carbonos olefínicos é confirmada pelos sinais em 144,0 ppm (C10) e 127,4 ppm (C9). A Figura 2.77 mostra os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de **B1**.

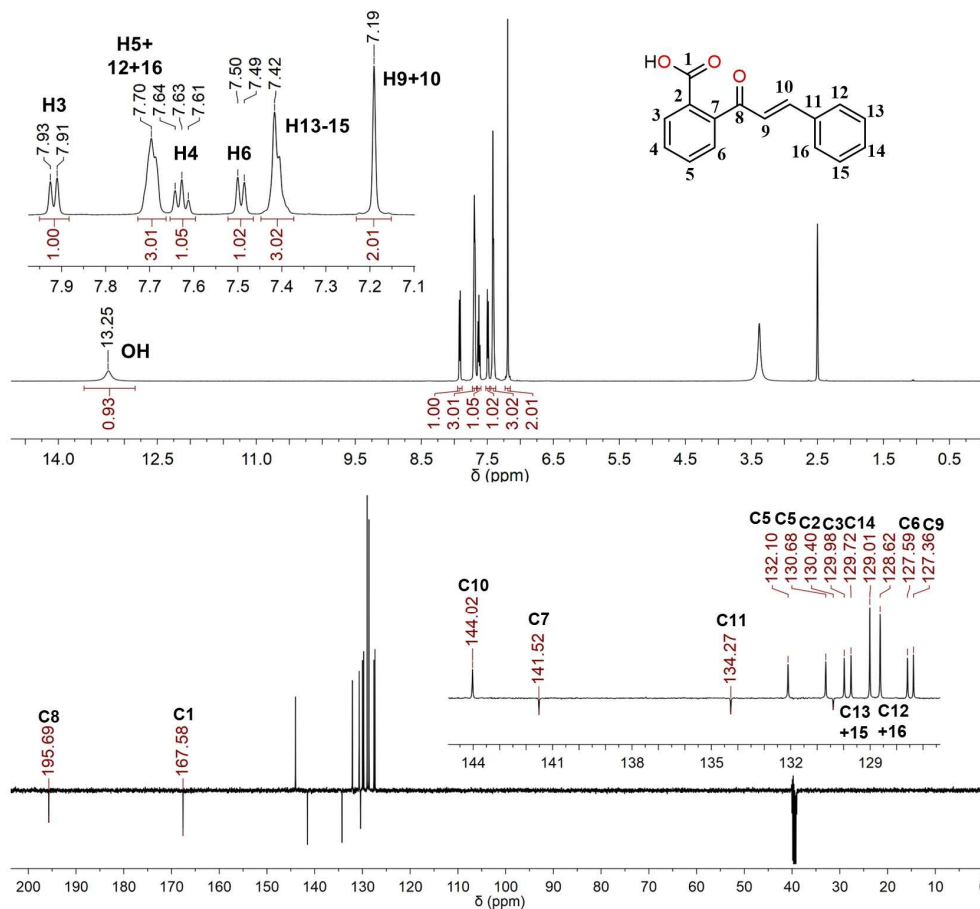


Figura 2.77. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de **B1** (espectro superior) e RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) de **B1**.

O espectro de RMN de ^1H de **B2** (Figura 2.78) apresenta um singlete em 12,83 ppm, característico do NH da ftalazinona. Os núcleos mais desprotegidos das ftalazinonas **B2-B4** aparecem como dupletos em 8,29-8,49 ppm e 8,40-8,55 ppm, atribuídos a H3 e H6, respectivamente. O alceno trans-1,2 é confirmado pela presença de dupletos em 7,88-7,95 ppm (H9) e 7,47-7,74 ppm (H10), com constante de acoplamento em torno de 15,8 Hz. Para **B2**, H9 aparece parcialmente sobreposto ao sinal de H12+16 em 7,79 ppm. O hidrogênio do anel tiazol de **B3** (H19) foi observado em um multipletto devido à sobreposição com o H5 e H21+25.

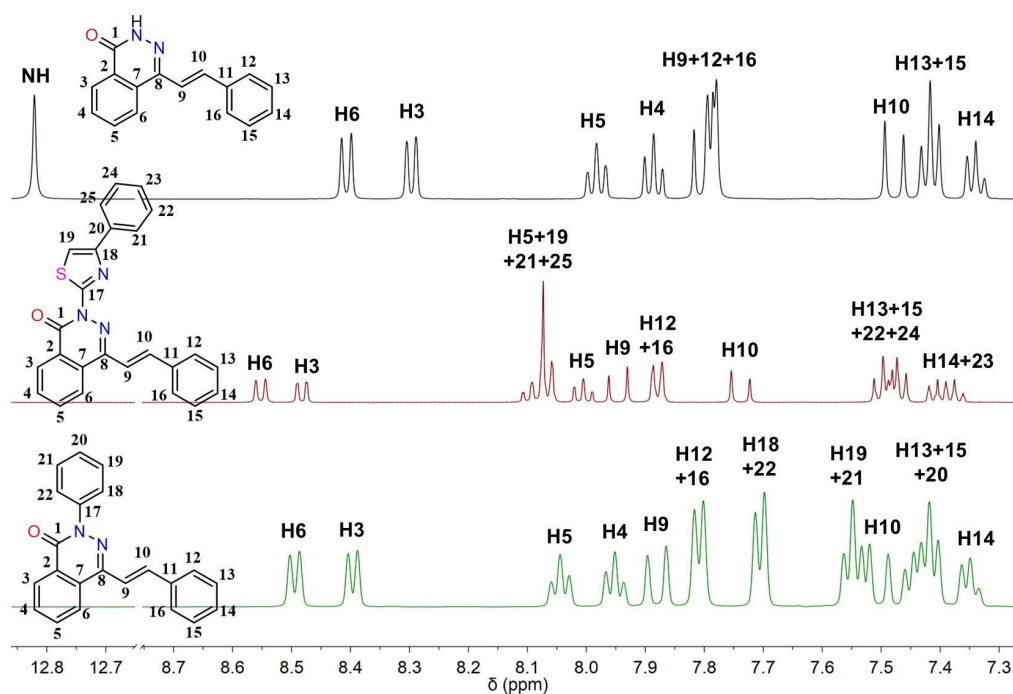
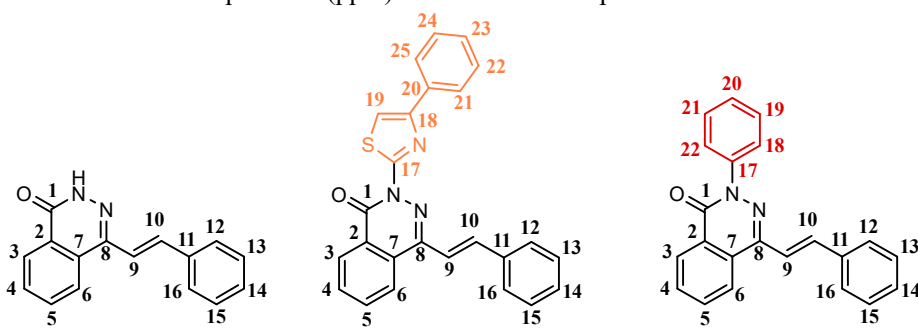


Figura 2.78. Comparação dos espectros de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de todas as ftalazinonas da série **B**.

O espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ, Tabela 2.13) confirma a presença do núcleo ftalazinona pelos sinais de carbonos quaternários referentes a C1, C2, C7 e C8, observados em 157,7-159,5 ppm, 126,7-127,6 ppm, 128,1-129,1 ppm e 141,7-143,9 ppm, respectivamente. Os carbonos do alceno trans foram observados em 119,5-120,0 ppm (C9) e 134,4-136,0 ppm (C10). A presença do tiazol na estrutura de **B3** é comprovada pelos sinais de carbonos quaternários em 157,4 ppm (C17) e 150,0 ppm (C18), como também pelo carbono mais protegido, observado em 113,0 ppm (C19).

Tabela 2.13. Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de ^{13}C das ftalazinonas **B2-B4**.

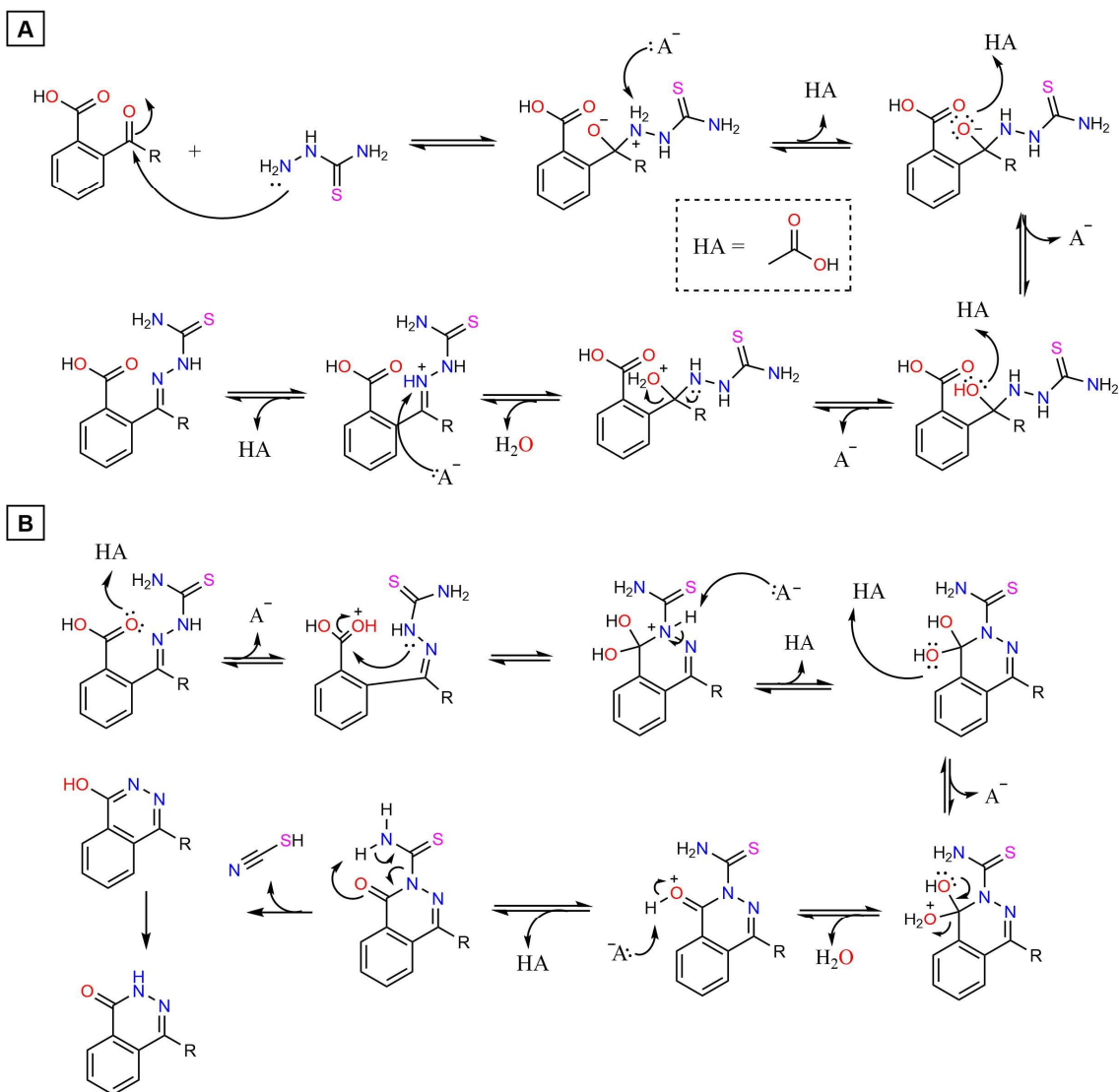


Carbono	B2	B3	B4	Carbono	B2	B3	B4
1	159,5	157,7	158,2	17	-	157,4	-
2	127,4	126,7	127,6	18	-	150,0	-
3	126,1	127,1	126,9	19	-	113,0	-
4	131,7	132,7	132,1	20	-	134,1	-
5	133,7	134,7	133,9	21+25	-	126,0	-
6	125,1	125,8	125,3	22+24	-	128,9	-
7	129,1	128,1	128,7	23	-	128,1	-
8	141,7	143,9	142,0	17	-	-	142,1
9	120,0	119,5	119,6	18+22	-	-	126,2
10	135,5	136,0	134,4	19+21	-	-	128,6
11	136,3	135,9	136,1	20	-	-	127,6
12+16	127,5	128,1	127,5				
13+15	128,8	128,9	128,8				
14	128,7	129,1	128,8				

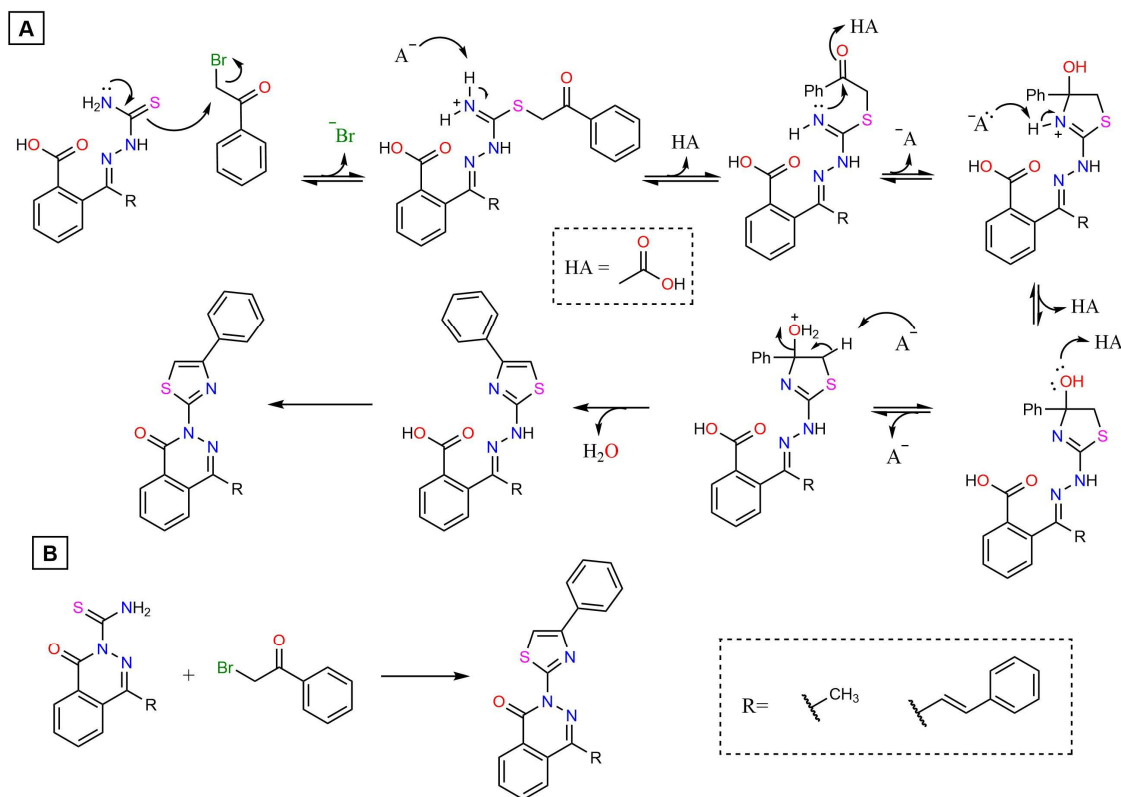
Espectros obtidos em DMSO- d_6 (125 MHz)

O mecanismo das reações envolvidas na formação das moléculas das séries **A** e **B** é apresentado nos esquemas 2.5 e 2.6. Conforme já mencionado, a tiossemicarbazida deve atacar a carbonila cetônica de **A1**, formando um hemiaminal, que em uma etapa lenta catalisada por ácido elimina água formando a ligação imínica (Clayden; Greeves; Warren, 2012). A tiossemicarbazona formada, provavelmente em sua configuração E deve sofrer isomerização para a forma Z, permitindo o ataque intramolecular do nitrogênio central da tiossemicarbazona à carboxila. Este ataque deve ser catalisado por ácido. Após algumas etapas de transferência de próton, uma molécula de água é eliminada e o anel da ftalazinona é formado (Clayden; Greeves; Warren, 2012). Em seguida, é razoável propor que o grupo tioamida seja eliminado por um mecanismo semelhante a descarboxilação de β -ceto-ácidos. O anel tiazol (**A3** e **B3**) é formado pela reação de Hantzsch, cujo mecanismo envolve o ataque nucleofílico do átomo de enxofre da tioamida ao carbono-alfa de uma alfa-halo-cetona (no caso, a 2-bromoacetofenona). O carbono da carbonila possui hibridização sp^2 e se encontra ligado ao oxigênio. Por esses motivos, sua nuvem eletrônica é menos polarizável, tratando-se de um centro eletrofílico de maior dureza que o carbono ligado ao halogênio. Assim, o enxofre, centro nucleofílico mole, ataca preferencialmente o carbono-alfa ligado ao halogênio. O carbono alfa deve possuir o

maior coeficiente do orbital luno e o enxofre da tioamida deve possuir o maior coeficiente do orbital homo (Clayden; Greeves; Warren, 2012). Em seguida, a imina – que também é formada mediante o primeiro ataque nucleofílico – atua como nucleófilo e ataca a carbonila cetônica. Essa é uma etapa com componente eletrostático significativo. O ataque gera um anel de cinco membros que passa por uma etapa de eliminação (E_2), formando o anel aromático tiazol. A 2-bromo-acetofenona foi adicionada somente após 10 minutos de refluxo. Neste tempo, de acordo com a CCD, ainda não há no meio ftalazinona formada (Figura 2.64). Portanto, é possível que grande parte do tiazol seja formado a partir da tiossemicarbazona (Esquema 2.6A) e não a partir da ftalazinona (Figura 2.6B).



Esquema 2.5. Mecanismo proposto para a formação da ftalazinona.



Esquema 2.6. Formação do anel tiazol pela reação de Hantzsch.

A ligação olefínica das ftalazinonas **B2-B4** foi então seletivamente reduzida por hidrogênio (H_2), na presença de Pd/C como catalizador (Figura 2.79). Inicialmente, foi realizado um teste com **B4**, para verificar se a hidrogenação do alceno ocorreria sem que qualquer outro grupo fosse reduzido. No entanto, as tentativas de acompanhar a reação por CCD foram frustradas. Uma única mancha com o mesmo R_f do precursor **B4** foi observada em todos os tempos avaliados. Isso poderia indicar que a reação não estaria ocorrendo, ou, mais provável, que **B4** e **C4** possuem o mesmo R_f nos eluentes avaliados. Por esse motivo, com 2 h e 15 minutos de reação, uma alíquota foi analisada por CG/MS. O cromatograma (*Total Ion Chromatogram*, TIC) apresentou somente um pico em 23,83 minutos de eluição (Figura 2.80), cujo espectro de massas apresentou um pico para o íon molecular (m/z 326), confirmando a obtenção de **C4** (Massa molecular: 326,40 g/mol). Uma amostra pura do precursor **B4** também foi avaliada por CG/MS. Seu tempo de eluição, nas mesmas condições, foi de 26,77 minutos, o que confirma que o pico observado no cromatograma da amostra reacional (23,83 minutos) não poderia tratar-se de **B4**, só podendo ser atribuído ao produto desejado. Além disso, a presença de somente um pico no cromatograma indica que nenhum outro produto de hidrogenação foi formado e que **B4** já havia se esgotado.

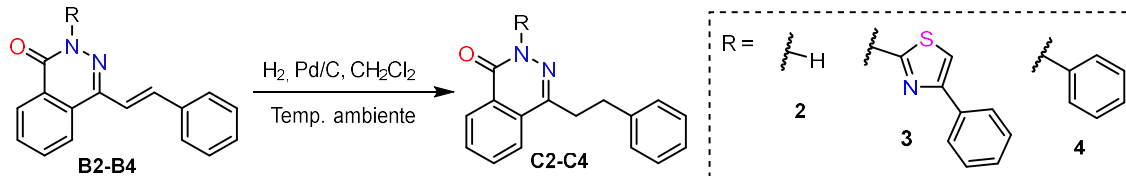


Figura 2.79. Rota de síntese dos compostos da série **C**. Tempo de reação: **C2** (15 h), **C3** (72 h), **C4** (2 h).

No espectro de massas de **C4** (Figura 2.80) a perda de um radical metil-benzeno deve ser responsável pelo pico em m/z 235. Além disso, o cátion fenila (m/z 77), comumente observado na fragmentação de compostos aromáticos, aparece nos espectros do reagente (**B4**) e produto (**C4**). Por fim, **B4** foi obtido na forma de um sólido cristalino em 61% de rendimento, após isolamento e recristalização em isopropanol:hexano.

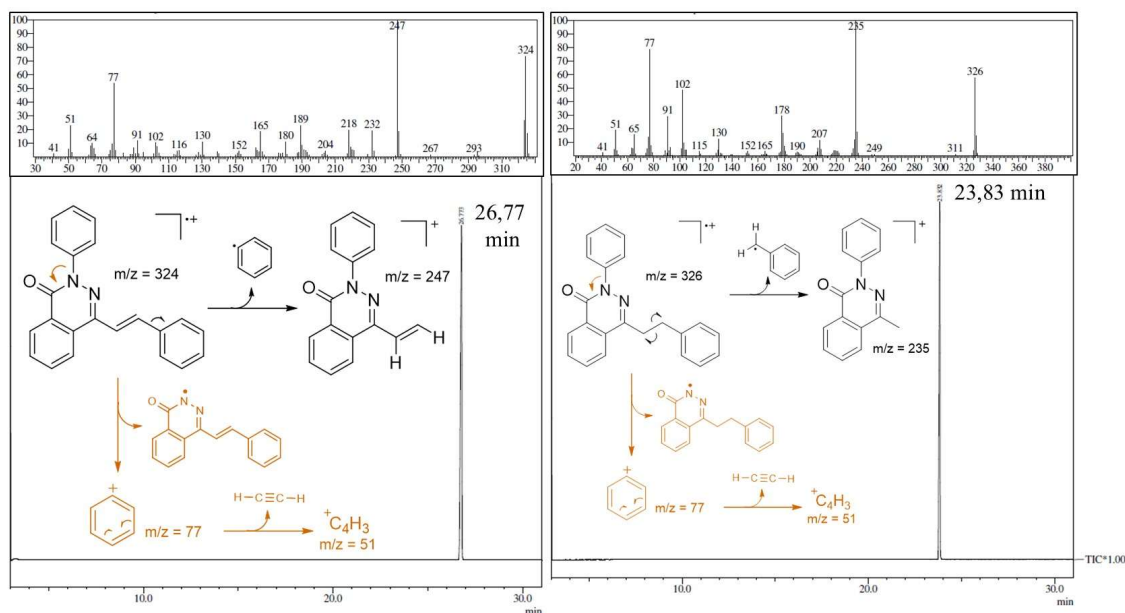


Figura 2.80. Espectros de CG/MS para **B4** e **C4**.

B3 foi então reagido nas mesmas condições. Imaginou-se que a solução amarela contendo essa ftalazinona perderia a cor conforme a hidrogenação ocorre-se. A introdução de uma saturação entre o anel da ftalazinona e o anel benzênico tornaria a molécula menos conjugada e menos colorida. **C3** deve possuir um espectro de absorção mais similar ao de **A3** (incolor) que de **B3** (amarelo). De fato, a coloração da solução desbotou ao longo da reação, mas em nenhum momento ficou incolor. Em 15 h de reação, a solução ainda possuía cor

levemente amarelada, possivelmente indicando que ainda havia **B3** em solução. A CCD, assim como na síntese de **C4**, não foi útil. Uma alíquota da reação foi então analisada por CLAE (Figura 2.81). Em 15 h, havia cerca de 76% de produto, enquanto 20% correspondiam a **B3**. Em 72 h de reação, a proporção não havia mudado significativamente (**C3**: 82% e **B3**: 14%). É possível que o produto formado (**C3**), cuja estrutura não possui nenhum grupo que possa ser hidrogenado nestas condições, adsorva na superfície do catalisador, saturando os sítios reativos e impedindo que as moléculas de **B3** continuassem a reagir. Comparado a **C4**, **C3** possui um anel aromático a mais em sua estrutura. A superfície da molécula que corresponde ao anel da ftalazinona e ao fenil-tiazol deve ser relativamente linear, permitindo boa interação com a superfície metálica do catalizador. **B3** foi então isolado após 72 h de reação, na forma de um sólido amarelo pálido. Duas recristalizações em isopropanol:acetonitrila resultaram em um sólido branco de pureza adequada, com 52% de rendimento.

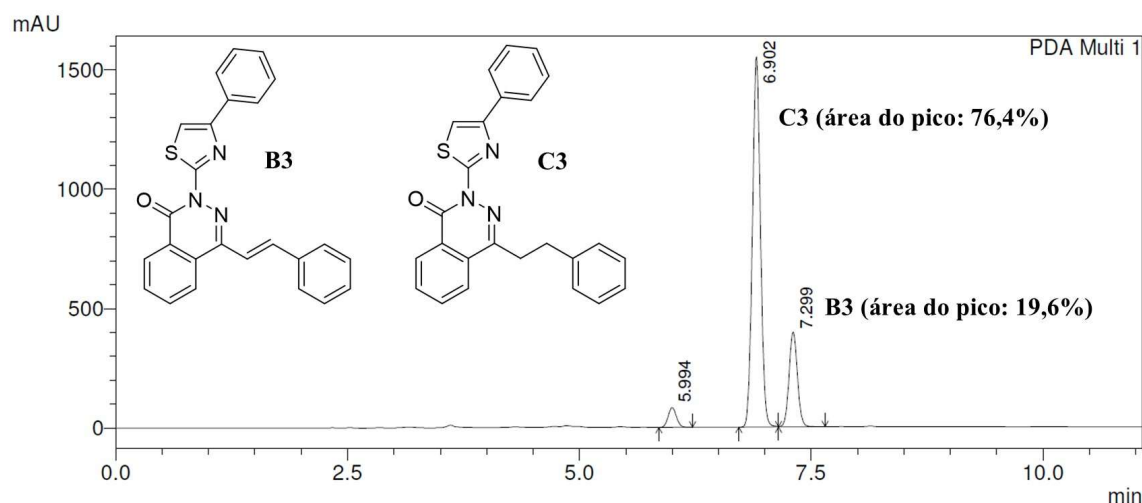


Figura 2.81. Cromatograma (HPLC) de uma alíquota coletada 15 h após início da hidrogenação.

Por fim, **B2** foi hidrogenado nas mesmas condições. A estrutura do produto, **C2**, é muito menor que **C3** e **C4**. A região plana da molécula deve corresponder somente ao núcleo ftalazinona. Por esse motivo, para este composto, a adsorção na superfície do catalizador não deve ser um problema. Porém, devido a impossibilidade de realizar HPLC ou CG/MS na ocasião, a reação foi mantida por 15 h para garantir que todo **B2** havia sido consumido. Após isolamento e recristalização em EtOH:H₂O, **C2** foi obtido como cristais incolores com 80% de rendimento.

Os espectros de infravermelho de **C2-C4** (Figura 2.82) apresentam bandas entre 3057-2901 cm⁻¹, características de estiramento C-H aromático e alifático. No caso de **C2**, a banda de

estiramento N-H foi observada em 3180 cm^{-1} . Devido à baixa frequência dessa banda, é provável que esse hidrogênio esteja envolvido em ligação de hidrogênio intermolecular (Hansen et al., 2021). Uma banda intensa em $1641\text{-}1651\text{ cm}^{-1}$ [$\nu(\text{C}=\text{O})$] confirma a presença da carbonila das ftalazinonas.

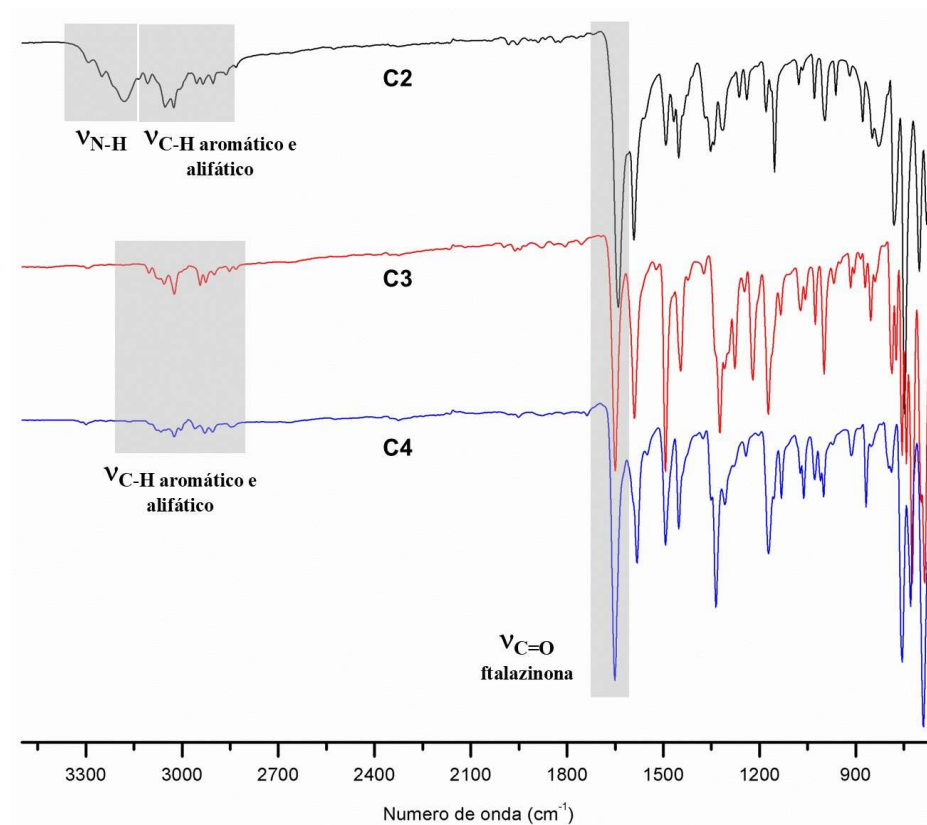


Figura 2.82. Espectro de infravermelho das ftalazinonas **C2-C4**.

A banda de dobramento angular C-H de alcenos *trans*, observada em $957\text{-}970\text{ cm}^{-1}$ para **B2-B4**, encontra-se ausente ou significativamente suprimida no espectro de **C2-C4**, confirmando a hidrogenação dessa função. A Figura 2.83 apresenta a ampliação dos espectros de IV, destacando essa importante alteração.

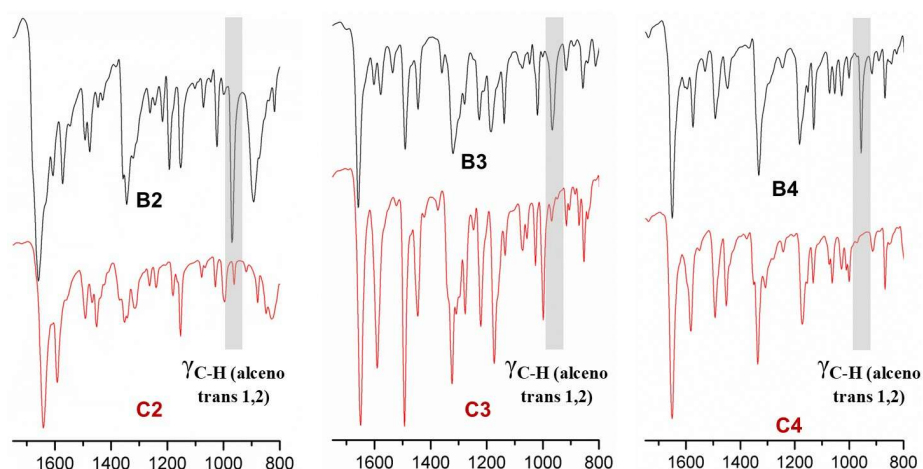


Figura 2.83. Comparação dos espectros de IV de **B2-B4** e **C2-C4**, destacando a supressão da absorção referente ao dobramento angular C-H de alceno *trans*-1,2.

A hidrogenação do alceno *trans* é confirmada pela presença de tripletos em 3,21-3,50 ppm e 3,01-3,37 ppm referentes aos hidrogênios dos grupos metilenos formados, H9 e H10, respectivamente (Figura 2.84). O NH de **C2** foi observado em 12,52 ppm, conforme esperado. Notou-se que ao hidrogenar as ftalazinonas da série **B**, sinais de H3 e H6 invertem em posição, com H3 aparecendo em campo mais baixo que H6 nos espectros de **C2-C4**.

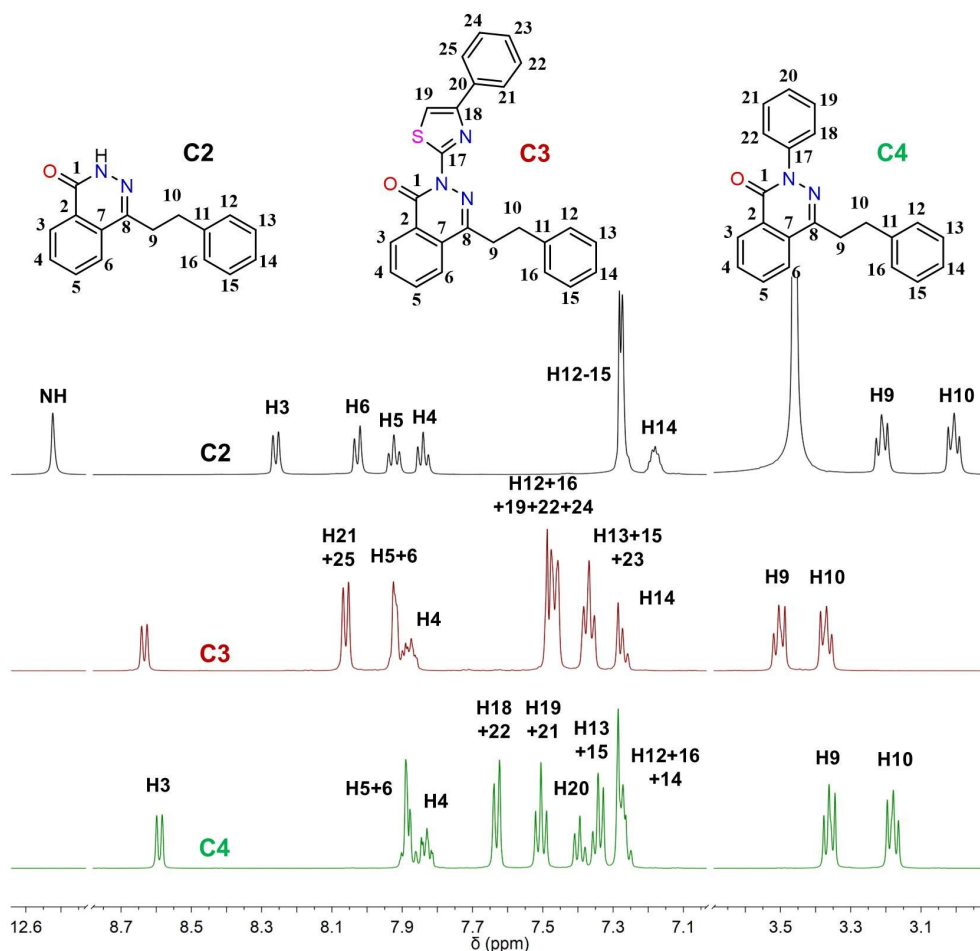
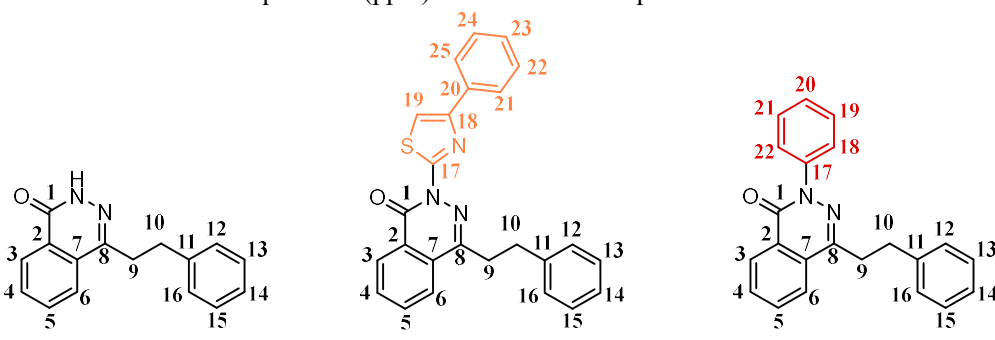


Figura 2.84. Comparação dos espectros de RMN de ^1H de todas as ftalazinonas da série **B**. Espectro de **C2** obtido em $\text{DMSO}-d_6$ (500 MHz) e de **C3** e **C4** obtido em CDCl_3 (500 MHz).

Por fim, o RMN de ^{13}C (Tabela 2.14) corrobora os dados indicados nos espectros de IV e RMN de ^1H , confirmando a hidrogenação seletiva da ligação olefínica: C9 e C10, aparecem em 33,14-34,6 ppm e 33,1-33,8 ppm, região característica de hidrogênios alifáticos secundários adjacentes a anéis aromáticos. O anel tiazol de C3 é confirmado pelos sinais em 158,0 ppm (C17), 151,4 (C18) e 111,3 ppm (C19).

Tabela 2.14. Deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de ^{13}C das ftalazinonas **A2-A5**.



Carbono	C2*	C3**	C4**	Carbono	C2*	C3**	C4**
1	159,5	158,4	159,1	17	-	158,0	-
2	127,6	127,5	n.o.	18	-	151,4	-
3	126,0	128,2	127,9	19	-	111,3	-
4	131,5	132,3	131,5	20	-	134,6	-
5	133,6	134,6	133,3	21+25	-	126,4	-
6	125,2	124,9	124,3	22+24	-	128,7	-
7	129,3	128,7	129,2	23	-	128,1	-
8	145,5	148,5	146,1	17	-	-	142,0
9	33,14	34,6	33,9	18+22	-	-	125,7
10	33,07	33,2	33,8	19+21	-	-	128,7
11	141,3	141,4	141,1	20	-	-	127,5
12+16	128,5	128,8	128,5				
13+15	128,4	128,9	128,6				
14	126,0	126,5	126,3				

*Espectro obtido em DMSO- d_6 (500 MHz). **Espectros obtidos em CDCl_3 (500 MHz).

2.5.2.2. Avaliação biológica das ftalazinonas.

A citotoxicidade de todas as ftalazinonas, bem como de seus precursores (**A1** e **B1**), foi inicialmente avaliada em uma concentração de 50 μM , contra a linhagem de hepatocarcinoma humano Huh-7 (Figura 2.85). No ensaio de MTT, **A3** destacou-se como a substância mais ativa, reduzindo a viabilidade celular em cerca de 85%. A introdução do grupo estiril nas ftalazinonas (série **B**) comprometeu a solubilidade, ocasionando a precipitação de **B3** e **B4** no meio de cultivo, quando testadas a 50 μM . Por esse motivo, foram avaliadas em uma concentração cinco vezes menor (10 μM). Contudo, mesmo nesta concentração bem reduzida, precipitaram ao serem adicionadas. Dessa série, **B2** foi a única ftalazinona que não precipitou. Apesar disso, exibiu baixa atividade, com redução de apenas ~31% na viabilidade. Curiosamente, **B3**, por mais que tenha precipitado no meio, causou um discreto aumento da viabilidade dessas células (~16%).

A redução da dupla ligação olefínica parece ter favorecido tanto a solubilidade, quanto a atividade da classe. **C2**, por exemplo, apresentou atividade superior a seu análogo insaturado

(**B2**), causando uma redução de 46% na viabilidade. **C4**, por sua vez, mostrou-se mais solúvel que **B4**, permitindo sua avaliação na concentração de 50 μM . A perda da insaturação deve reduzir a sua planaridade e dificultar o seu empacotamento cristalino – o que possivelmente explica a maior solubilidade de **C4**. Nesta concentração, **C4** reduziu a viabilidade em ~59%. A baixa solubilidade de **B3**, **B4**, e **C3**, limita a avaliação do real impacto da introdução dos grupos estiril e etilbenzeno, já que a ausência de atividade dessas substâncias provavelmente foi resultado de sua baixa biodisponibilidade, causada pela precipitação. Neste contexto, a decisão de incluir no planejamento das ftalazinonas uma série de compostos com cadeia carbônica reduzida (série **A**) mostrou-se acertada, uma vez que resultou em moléculas com maior solubilidade em meio aquoso – sendo uma delas (**A3**) excepcionalmente mais ativa que as demais.

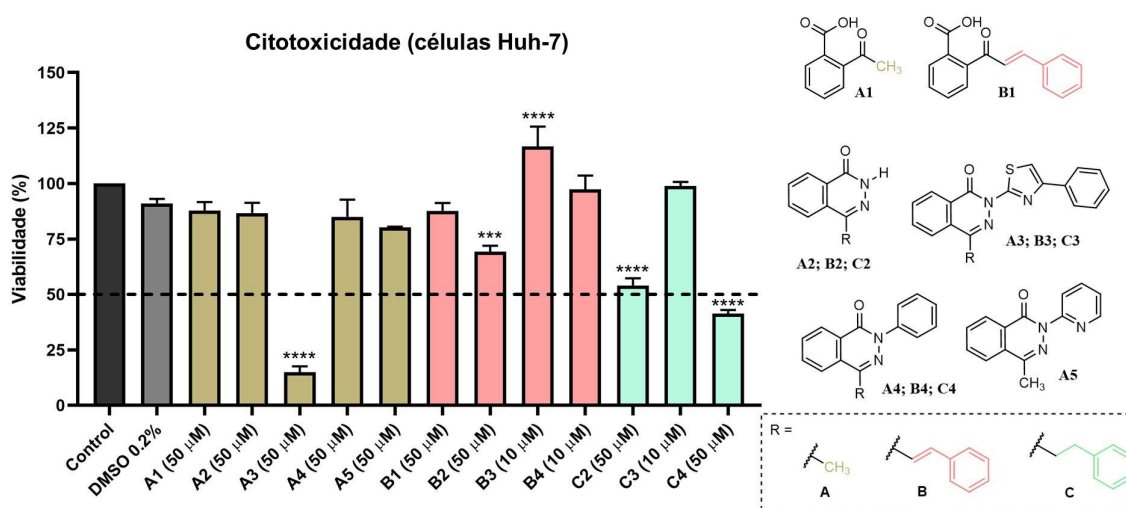


Figura 2.85. **A3** é a ftalazinona mais ativa contra células Huh-7. Cerca de $1,3 \times 10^4$ células (placa de 48 poços) foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%) ou as ftalazinonas à 50 μM (**A1-A5**, **B1**, **B2**, **C2**, **C4**) ou 10 μM (**B3**, **B4**, **C3**). Após 48 h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT ($n \geq 3$). Os resultados representam a média \pm erro-padrão da média e **** $P = 0,0001$ e ***** $P < 0,0001$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação ao controle de células tratadas com DMSO (0,2%).

Das 10 ftalazinonas avaliadas no presente trabalho, cinco já haviam sido reportadas na literatura (**A2**, **A4**, **B2**, **B4** e **C2**). Entre elas, **C2** foi descrita em uma patente como inibidora da enzima PARP [poli-(ADP-ribose) polimerase 1], com valor de IC_{50} inferior a 5 μM (Douglas et al., 2006). No entanto, na rota de síntese apresentada pelos autores da patente, o rendimento foi baixíssimo (9%) e a pureza inadequada (70%). O ponto de fusão informado (124-126 °C),

diverge significativamente do determinado nesta tese (159-160 °C), diferença essa possivelmente relacionado à impureza do sólido obtido pelos autores da patente.

A2, análogo estrutural de **C2**, já havia sido investigado como inibidor das enzimas PARP, apresentando valores de IC₅₀ de 41,5 µM para a PARP1 e 77,3 µM para a PARP2 (Perkins et al., 2001). Esses dados indicam o grande potencial do núcleo ftalazin-1(2*H*)-ona para o desenvolvimento racional de novos inibidores dessa classe de enzimas. De fato, essa estrutura possui características comumente observadas em inibidores de PARPs: um grupo carboxamida e um anel aromático, responsáveis pela formação de ligações de hidrogênio e interações de empilhamento π com essas enzimas (Balachandran et al., 2025).

Além do ensaio enzimático que demonstrou a inibição da PARP por **C2**, não há qualquer outro estudo biológico envolvendo essa substância. Dessa forma, o presente trabalho traz, pela primeira vez, uma avaliação preliminar de **C2** frente a uma linhagem celular cancerígena, sendo possível que o efeito observado na viabilidade das células Huh-7 esteja relacionado, ao menos em parte, à inibição da PARP.

Adicionalmente, uma nova rota sintética mais eficiente – composta por três etapas consecutivas simples (**A1**→**B1**(68%) →**B2**(44%) →**C2**(80%), 24% de rendimento global) – é descrita neste trabalho. Inibidores da enzima PARP são, muitas vezes, empregados em conjunto com outros agentes quimioterápicos (Matulonis; Monk, 2017). Essa enzima faz parte do sistema de reparo do DNA, sendo crucial para as etapas de identificação e sinalização da presença de danos nas bases nitrogenadas do material genético. Portanto, sua inibição é muitas vezes utilizada como estratégia para aumentar a sensibilidade de algumas células a agentes quimioterápicos que atuam gerando modificações no DNA, como é o caso da temozolomida, principal quimioterápico em uso clínico para o tratamento de Glioblastomas (Higuchi et al., 2020; Sha et al., 2025). Assim, apesar de **C2** ter apresentado baixa citotoxicidade isoladamente, é possível que possa potencializar o efeito citotóxico de outras moléculas, principalmente daquelas que atuam sob o DNA.

A4 e B2, embora conhecidos na literatura (Boltze; Dell; Lehwaide, 1963), nunca foram avaliados biologicamente. Uma busca na plataforma Scifinder revelou que **B4** é relatado em um artigo que descreve a atividade hipnótica e anticonvulsiva de 4-quinazolinonas (Boltze; Dell; Lehwaide, 1963). No entanto, não foi possível obter acesso a esse trabalho.

Na sequência, a viabilidade de células Huh-7 foi avaliada na presença de diferentes concentrações de **A3** (Figura 2.86A), com o intuito de determinar aquela capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC₅₀). O IC₅₀ para essa substância foi calculado como 14,79 µM ±

0,65 μM . Embora **A3** tenha apresentado apenas atividade moderada, trata-se de um esqueleto químico inédito com potencial anticâncer, que pode ser empregado como protótipo em futuros estudos de otimização estrutural. Dado esse resultado, **A3** foi então avaliado em outra linhagem celular cancerígena, desta vez, em células leucêmicas transformadas pelo vírus HTLV-1 (linhagem MT2), tendo também demonstrado atividade moderada, com IC_{50} de $20,91 \mu\text{M} \pm 2,97 \mu\text{M}$ (Figura 2.86B). Ao comparar com as demais moléculas avaliadas na tese, **A3** mostrou-se mais potente contra Huh-7 que as chalconas-tiossemicarbazonas ($\text{IC}_{50} = 29,86\text{-}31,00 \mu\text{M}$) e di-hidrochalconas-tiossemicarbazonas ($\text{IC}_{50} = 36,33\text{-}37,02 \mu\text{M}$), além de ter sido mais ativa que **CTCI** e **CTCI-Zn** contra as células MT2. Esses dados reforçam o caráter promissor deste novo híbrido ftalazinona-feniltiazol.

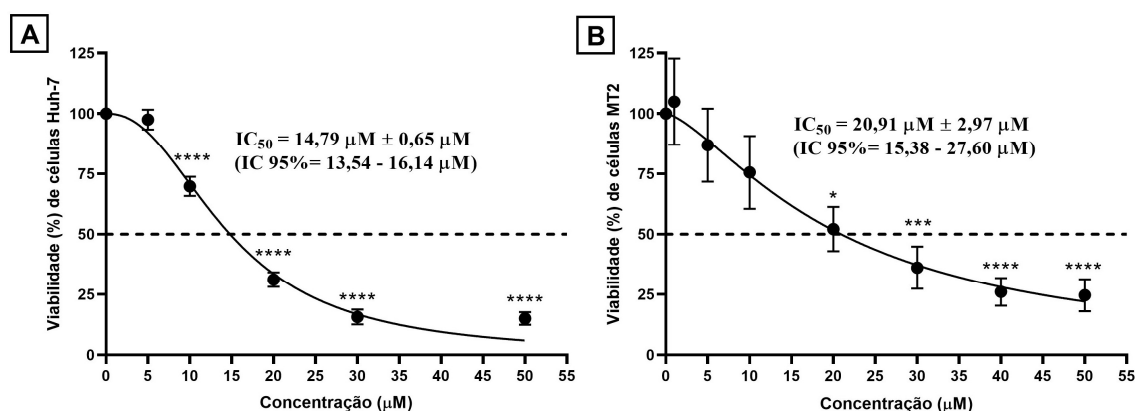


Figura 2.86. Determinação do IC_{50} de **A3** contra células Huh-7 e MT2. (A) Cerca de $1,3 \times 10^4$ células Huh-7 (placa de 48 poços) foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%), ou **A3** em concentrações na faixa de 5–50 μM . Após 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT ($n = 7$). (B) Cerca de 4×10^4 células MT2 (placa de 96 poços) foram incubadas com ou sem DMSO (0,2%), ou **A3** em concentrações na faixa de 1–50 μM . Após 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT ($n = 6$). Os resultados representam a média \pm erro-padrão da média e * $P < 0,05$, *** $P = 0,0005$, **** $P < 0,0001$ foram considerados estatisticamente significativos em comparação ao controle, considerado 100% de viabilidade.

Sabe-se que o ensaio de bio-redução do MTT está relacionado a atividade catalítica de enzimas presentes na mitocôndria e no plasma celular, como desidrogenases, oxidases, peroxidases e oxiredutases (Präbst et al., 2017). Assim, é possível que os efeitos do **A3** na viabilidade celular estivessem relacionados a disfunções mitocondriais capazes de comprometer a atividade de suas desidrogenases. Por esse motivo, decidiu-se verificar como o tratamento com o **A3** afeta a respiração das células Huh-7. Para tanto, as células foram tratadas com 7,5 μM de **A3**. Nesta concentração, essa substância reduz a viabilidade celular em apenas ~18%, de acordo com o gráfico de regressão não-linear do ensaio de MTT (Figura 2.86A).

Portanto, nesta concentração, é possível avaliar como o consumo de oxigênio é afetado em condições que antecipam danos celulares muito significativos.

A mitocôndria é principalmente conhecida por seu papel na geração de ATP, por meio da respiração celular. Essa organela possui duas membranas: uma externa, que isola o espaço intermembrana do meio citoplasmático; e uma interna, que separa o espaço intermembrana da matriz mitocondrial, região mais interna da organela. Na matriz mitocondrial, moléculas de NADH e FADH₂, geradas no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), são oxidadas pelos complexos da cadeia transportadora de elétrons (Complexos I e II, respectivamente), levando a formação de NAD⁺ e FAD. Os elétrons envolvidos nessa reação redox, são transferidos até o complexo IV, onde são utilizados para reduzir o oxigênio molecular e formar água ($2\text{H}^+ + \frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$). Durante o transporte de elétrons pelos complexos da cadeia transportadora, prótons são bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, criando um gradiente eletroquímico: o espaço intermembrana adquire carga positiva, enquanto a matriz mitocondrial torna-se negativamente carregada. Para que o transporte de elétrons e o consumo de O₂ tenha continuidade, é necessário que os prótons retornem para a matriz mitocondrial, a fim de reduzir o gradiente formado. O retorno dos prótons ocorre principalmente pela ATP sintase. Ao retornar pelo canal de prótons da ATP sintase, essa enzima catalisa a conversão de ADP em ATP. Dessa forma, diz-se que a cadeia transportadora de elétrons, e consequentemente o consumo de oxigênio, é acoplada a síntese de ATP. Uma porção normalmente muito inferior de prótons consegue retornar para a matriz mitocondrial por outros meios (como pelas proteínas desacopladoras), dissipando o potencial de membrana de maneira independente da síntese de ATP (Nolfi-Donagan; Braganza; Shiva, 2020).

Após 48 h de tratamento na presença de **A3**, o consumo de oxigênio foi verificado em três condições distintas. A primeira delas, conhecida como respiração basal, corresponde a respiração que é sustentada apenas por substratos endógenos, sem a adição de qualquer outra substância, além do **A3** – pode ser entendida como a respiração em condições normais, ou a respiração utilizada para garantir a demanda celular usual por ATP. É possível observar pela Figura 2.87 que **A3** não causou mudanças estatisticamente significativas nesta condição. Após a medição da respiração basal, a oligomicina foi adicionada ao meio contendo as células. Essa substância se liga à subunidade F₀ da ATP-sintase, bloqueando o canal de prótons da enzima e inibindo a síntese de ATP (Omelchuk et al., 2021). Uma vez que os prótons não são mais capazes de retornar para a matriz mitocondrial pela ATP sintase, era esperado observar redução significativa da taxa de consumo de O₂. De fato, uma redução de 51% no consumo de oxigênio

foi notada no grupo controle. A respiração residual se deve à dissipação do potencial de membrana em virtude do retorno dos prótons para a matriz mitocondrial por meio de outras regiões da membrana interna. No entanto, no grupo tratado com **A3** não houve diferença entre a taxa nesta condição e na condição basal. Esse resultado indica que o tratamento das células com **A3**, desacoplou a cadeia transportadora de elétrons da síntese de ATP. Os prótons devem estar retornando para o espaço intermembrana por meios independentes da ATP sintase.

A diferença entre a taxa de respiração Basal e respiração na presença de Oligomicina (Basal-Oligomicina), fornece o consumo de oxigênio associado a síntese de ATP. O tratamento com **A3** reduziu a respiração associada a síntese de ATP em 99% ($1,698 \pm 0.081$ vs 0.018 ± 0.248 nmol O₂ min⁻¹ 10⁶ células; $p < 0.0005$). Assim, **A3** compromete significativamente a síntese de ATP mitocondrial dessas células. Uma vez que na concentração avaliada a viabilidade celular ainda é muito alta, de acordo com o ensaio de MTT, é possível que as células tenham sido capazes de compensar o baixo nível de ATP mitocondrial por meio de maiores taxas da via glicolítica (efeito Warburg). Dessa forma, futuramente, seria interessante dosar tanto os níveis de ATP, como os níveis de lactato liberado por essas células, a fim de verificar se elas foram ou não capazes de realizar essa compensação energética.

Por fim, o carbonilcianeto 4-(trifluorometoxi)fenil-hidrazona (FCCP) foi adicionado ao meio. Essa substância corresponde a uma hidrazona com próton moderadamente ácido (pKa 6,2, Bertholet et al., 2022). No espaço intermembrana, essa substância encontra-se em sua forma neutra, que é capaz de atravessar passivamente a membrana interna e alcançar a matriz mitocondrial. Nesta região da organela, o pH é maior devido ao bombeamento de prótons que ocorre ativamente durante o processo de transporte de elétrons. Então, as moléculas de FCCP presentes na matriz mitocondrial ionizam, liberando íons H⁺. Em sua forma negativa, ainda capaz de atravessar a membrana interna, o FCCP retorna para o espaço intermembrana, região carregada positivamente. No espaço intermembrana, o FCCP em sua forma aniônica é protonado e retorna à sua forma neutra, repetindo o processo (Terada H, 1990). Assim, o FCCP permite dissipar o potencial de membrana rapidamente, sem depender do retorno dos prótons pela ATP sintase. Por esse motivo, as células tratadas com FCCP consomem muito mais oxigênio (respiração Máxima), conforme observado na Figura 2.87. **A3**, no entanto, não causou alteração da respiração nesta condição.

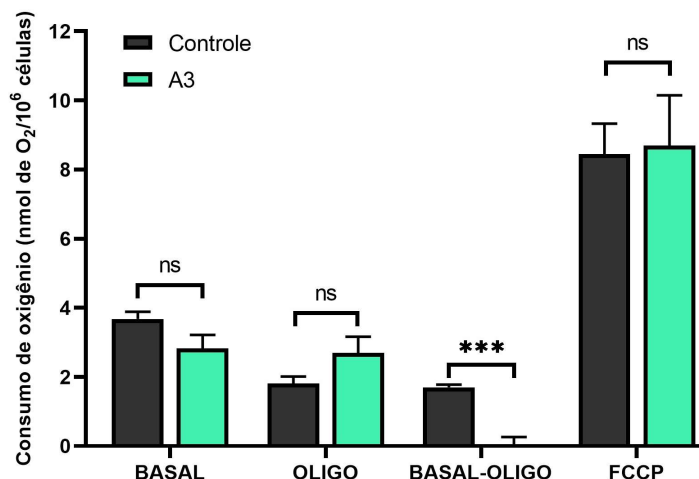


Figura 2.87. A3 afeta a função mitocondrial de células Huh-7. (A) Cerca de $6,24 \times 10^5$ células (placa de petri, 60 cm²) foram incubadas com ou sem A3 (7,5 µM). Após 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, as células foram re-suspendidas e $3 \sim 5 \times 10^6$ foram transferidas para o oxígrafo. As colunas representam as taxas de consumo de oxigênio em condições distintas [Basal: sem adição de qualquer substância; respiração em estado *leak* (OLIGO): adição de oligomicina (1 µg/mL); respiração máxima (FCCP): adição de FCCP (1 µM)]. Os resultados representam a média \pm erro-padrão da média. ns= diferença não significativa. ***P< 0,0005 foram considerados estatisticamente significativos em comparação ao controle.

Uma vez que as taxas de respiração basal e máxima não foram alteradas significativamente, o tratamento das células com A3 nas condições já descritas parece prejudicar a síntese de ATP sem interromper a cadeia transportadora de elétrons. Este perfil pode estar associado a um estado de permeabilização parcial da membrana mitocondrial interna (PMMI) em fases iniciais de apoptose (Baev et al., 2024; Vieira et al., 2000), embora, durante esse processo de morte celular, normalmente o evento indispensável corresponda a permeabilização da membrana mitocondrial externa (PMME), não interna. Apesar da crença de que quase sempre em casos de morte por apoptose a membrana mitocondrial interna permaneça intacta, já foi demonstrado que após a PMME, a PMMI é possível e permite a liberação de DNA mitocondrial para o citosol, o que desencadeia um processo inflamatório danoso responsável por uma forma de morte apoptótica independente das caspases. Outra possibilidade mecanística, é de que A3, ao induzir a permeabilização da membrana interna, cause inchaço mitocondrial e morte celular independente de apoptose (Quarato et al., 2022). O consumo de oxigênio superior observado na presença de oligomicina em células tratadas com A3 sugere vazamento de próton pela membrana interna, o que permite dissipar o potencial de membrana e manter a cadeia transportadora de elétrons funcionando mesmo sem a síntese de ATP. Sendo assim, um próximo passo importante a ser realizado em estudos futuros é averiguar se o tratamento com A3 de fato induz morte celular por apoptose – seja por meio de citometria de

fluxo, que utiliza Anexina-V/7AAD para identificar modificações celulares decorrentes do processo de apoptose e necrose (Mentzel et al., 2024), ou por meio de ensaios em microplacas que, na presença de formas ativas das caspases, proteínas apoptóticas, geram um sinal luminescente detectável (como o kit comercial “*Caspase-Glo® 3/7 Assay System*” da Promega, Madison, WI, USA) (Napiórkowska et al., 2025). Além disso, é importante que o segundo mecanismo proposto (inchaço mitocondrial seguido de morte independente de apoptose), também seja verificado, uma vez que mais de uma via pode ser responsável pelos efeitos citotóxicos, como parece ser o caso do agonista de fosfolipase C putativa, 3M3FBS (Jung et al., 2008; Quarato et al., 2022). Esse inchaço mitocondrial é muitas vezes dependente de íons Ca^{+2} e, nestes casos, pode ser inibido por algum quelante seletivo para este íon, como o BAPTA-AM, e também por bloqueadores dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (Ciclosporina A, a exemplo). Assim, caso a adição de BAPTA-AM ou Ciclosporina A logo após a adição de **A3** (co-incubação) seja capaz de inibir a morte celular, mantendo a viabilidade pelo ensaio de MTT, o mecanismo certamente envolverá a participação de inchaço mitocondrial induzido por níveis elevados de cálcio na mitocôndria (Quarato et al., 2022).

2.5.2.3. Estudo *in silico*: investigando o mecanismo de ação do híbrido **A3**

Uma busca na literatura identificou os compostos **BAM-7** e **16** – dois ativadores conhecidos da proteína BAX, descritos por Stornaiuolo e colaboradores (Stornaiuolo et al., 2015) – como estruturalmente relacionados ao **A3** (Figura 2.88). Essas moléculas mimetizam a ação da proteína BIM, um regulador pró-apoptótico que se liga à proteína BAX, ativando a via de morte celular por apoptose. Uma vez que essa via foi considerada a partir do resultado preliminar de respiração celular, a interação de **A3** com a proteína BAX foi investigada por Docking Molecular e comparada com os ativadores conhecidos. A Figura 2,88 mostra as estruturas químicas dos ativadores da proteína Bax e do híbrido **A3**, observando-se a similaridade estrutural entre essas moléculas.

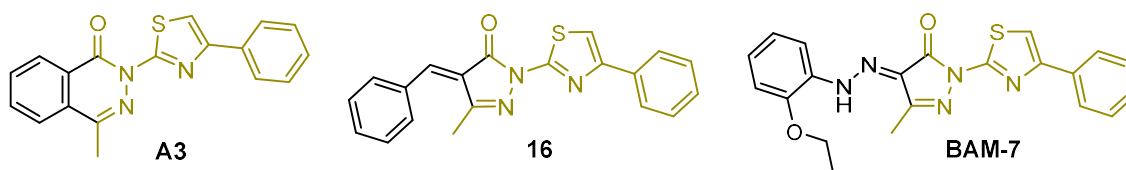


Figura 2.88. Estruturas do **A3** e dos ativadores de Bax **16** e **BAM-7**.

No entanto, antes do *docking* ser realizado, a plataforma online e gratuita *ChemMine Tools* foi empregada para avaliar em maior detalhe a similaridade entre **BAM-7** e **16** e o novo híbrido ftalazinona-feniltiazol **A3** (Backman; Cao; Girke, 2011). Para o cálculo de similaridade, a plataforma utiliza o método de Pares Atômicos (*Atom Pair*) e o coeficiente de Tanimoto. O método de Pares Atômicos foi proposto pela primeira vez por Carhart, Smith e Venkataraghavan (1985). Ele representa a molécula como um conjunto de pares de átomos conectados, cada par sendo descrito pelo: tipo de átomo diferente de hidrogênio (C, N, O, S, Cl), pela hibridização dos átomos envolvidos e pela distância entre esses átomos, expressa seja pelo número de ligações que os separam ou pelo número de átomos que os separam. A Figura 2.89 mostra os casos da acetona e 2-metilpropeno, cujos Pares Atômicos são descritos conforme a proposta inicial feita por Carhart e colaboradores. É possível, no entanto, descrevê-los de maneiras ligeiramente diferentes e mais simplificadas. A descrição da molécula por esse método de Pares Atômicos, gera uma espécie de impressão digital, que pode ser comparada com a impressão digital de outras moléculas.

O coeficiente de Tanimoto, por sua vez, é uma medida de similaridade entre dois conjuntos de características (no caso em questão, os Pares Atômicos) (Bajusz; Rácz; Héberger, 2015). A fórmula utilizada para o cálculo do índice de Tanimoto é:

$$T = \frac{c}{a + b - c}$$

Onde:

- a = número de Pares Atômicos presentes na molécula A
- b = número de Pares Atômicos presentes na molécula B
- c = número de Pares Atômicos comuns a ambas as moléculas

O valor do índice de Tanimoto (T) varia de 0 a 1. No caso da Figura 64, acetona e 2-metilpropeno possuem, cada um, seis Pares Atômicos (a = 6; b = 6). Além disso, essas moléculas possuem três Pares Atômicos em comum (c = 3). Dessa forma, o cálculo do índice de Tanimoto fica:

$$T = \frac{3}{6 + 6 - 3} = 0,33$$

Portanto, o coeficiente de Tanimoto para a acetona e 2-metilpropeno, calculado utilizando o conjunto de Pares Atômicos de cada molécula, é de 0,33 – esse valor mostra que a similaridade estrutural entre essas substâncias é baixa. Este é exatamente o mesmo valor calculado pela plataforma *ChemMine Tools*, validando a automatização desse cálculo implementado no sistema web gratuito.

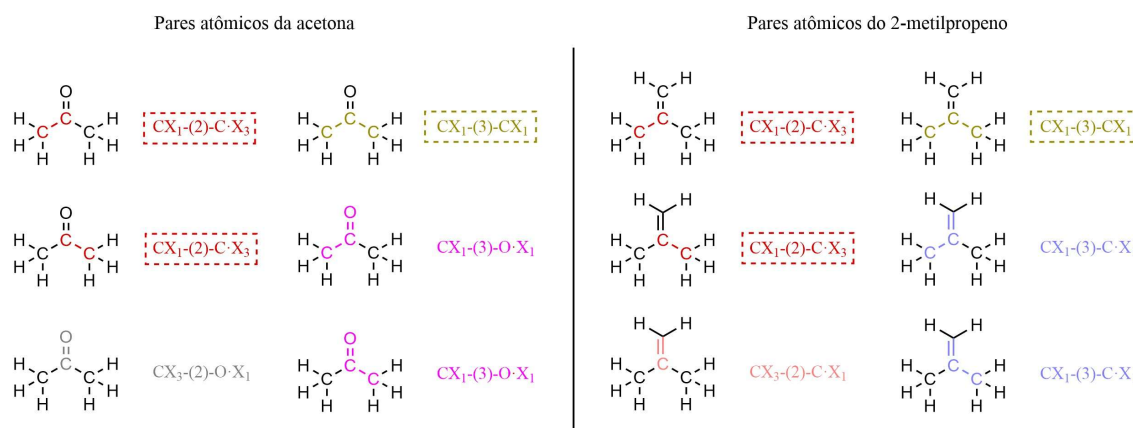


Figura 2.89. Método dos Pares Atômicos para a Acetona e 2-metilpropeno, de acordo com a publicação original de Carhart e colaboradores (1985). Um ponto (“.”) após o símbolo de um átomo indica a presença de um elétron π ligante. O sufixo X_n após o símbolo de um átomo indica a presença de n átomos diferentes de hidrogênio conectados ao átomo em questão. O número em parênteses, por sua vez, indica a distância entre os átomos do Par Atômico, representada pelo número de átomos que os separam, somados de 2. Por exemplo, na acetona, o carbono da metila está ligado a um átomo diferente de hidrogênio (CX_1) e o carbono da carbonila está ligado a três átomos diferentes de hidrogênio, além de possuir um elétron π ligante ($C\cdot X_3$) – não há átomos separando-os, portando o número em parênteses é $(0+2 = 2)$ e o Par atômico entre esses dois átomos é descrito como $CX_1-(2)-C\cdot X_3$. As caixas tracejadas indicam os Pares Atômicos em comum entre a acetona e o 2-metilpropeno.

Os coeficientes de similaridade de Tanimoto (Backman; Cao; Girke, 2011) calculados a partir dos Pares Atômicos de **A3**, **BAM-7** e **16** foram de 0,68 (**A3** vs. **16**) e 0,46 (**A3** vs. **BAM-7**), confirmando sua semelhança (Tabela 2.15). Já era esperado pela estrutura dessas moléculas que o coeficiente de Tanimoto seria superior entre **A3** e **16**. Apesar do valor consideravelmente inferior entre **A3** e **BAM-7**, a similaridade ainda é notável, próxima, inclusive, da similaridade calculada entre **BAM-7** e **16** (0,51).

Tabela 2.15. Coeficientes de similaridade de Tanimoto calculados pela plataforma *ChemMine Tools* (Backman; Cao; Girke, 2011).

	BAM-7	16
A3	0,46	0,68
BAM-7	1,00	0,51

Os membros da família BCL-2 são proteínas de caráter pró- ou anti-apoptótico. São definidas estruturalmente pela presença de até quatro domínios conservados conhecidos como domínios de homologia BCL-2 – todos correspondendo a segmentos de α -hélices. As proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2 e BCL-X_L, apresentam sequências conservadas em três ou quatro de seus domínios (BH1-4). As proteínas pró-apoptóticas, por sua vez, podem possuir múltiplos domínios homólogos, como é o caso da BAX e BAK, que contêm cada uma três desses domínios (BH1-3), ou somente o domínio BH3, caso das proteínas BIM e BID.

Há muito tempo, já era conhecido que os membros anti-apoptóticos desempenham seu mecanismo de sobrevivência por meio do sequestro da α -hélice de domínios BH3 presentes nas proteínas de ação contrária, as pró-apoptóticas. A região dessas proteínas responsáveis por realizar a interação também já eram conhecidas. No entanto, o exato estímulo que ativa a proteína BAX e como membros pró-apoptóticos da família BCL-2 se aproximam, interagem e desencadeiam a ativação dessa proteína só passou a ser melhor compreendido em 2008 (Gavathiotis et al., 2008). No estudo em questão, os autores investigaram a interação da proteína BAX com o peptídeo BIM- Δ SAHB, que corresponde a uma α -hélice grampeada baseada no domínio BH3 da proteína BIM. Foi definido que esse peptídeo interage em uma região composta pelas α -hélices 1 e 6 da proteína BAX. Essa região é definida por uma cavidade hidrofóbica composta pelos aminoácidos Ala-24, Leu-25, Leu-141, Leu-27, Met-137, entre outros. A cavidade também possui alguns aminoácidos carregados positivamente, como a Lys-21 e a Arg-134. Essa cavidade logo passou a ser chamada pelo termo *trigger site* (“sítio de gatilho”) (Gavathiotis et al., 2012).

A interação com a α -hélice do domínio BH3 da proteína BIM causa uma sequência de eventos: mudanças conformacionais ativam a proteína BAX, que se desloca do citoplasma até a membrana externa da mitocôndria, onde sofre oligomerização e causa disfunção mitocondrial, devido a permeabilização da membrana mitocondrial externa e, fatalmente, culmina em morte por apoptose (Gavathiotis et al., 2008). Este estudo desvendou a estrutura da proteína BAX associada por meio de seu sítio gatilho ao domínio BH3 de uma proteína pró-apoptótica, fornecendo informações importantes para o desenvolvimento dos primeiros compostos capazes de atuarem como ativadores (ao invés de inibidores) de um membro da família BCL-2 (Gavathiotis et al., 2012; Stornaiuolo et al., 2015). Estudos subsequentes demonstraram que outras regiões da proteína Bax também podem ser exploradas para o desenvolvimento de agentes capazes de ativar sua ação pró-apoptótica (Zhang et al., 2024). No entanto, as demais regiões dessa proteína não são o foco da presente tese.

A estrutura de RMN da BAX em complexo com a α -hélice BH3 de BIM foi obtida do PDB (2K7W). As estruturas dos ligantes (**A3**, **BAM7** e **16**) foram construídas e suas energias minimizadas por DFT (Spartan'24, Wavefunction, Inc.). O *docking* com a função ChemScore (GOLD 2023.2.0, CCDC) mostrou que **A3**, em sua pose de maior pontuação, se encaixa bem na cavidade conhecida como sítio gatilho (Figura 2.90A), formando uma ligação de hidrogênio e uma interação cátion- π com a Lys-21, além de contatos hidrofóbicos com esse mesmo resíduo e com a Leu-141. Nota-se que a fenila do grupo feniltiazol se sobrepõe muito bem ao resíduo de fenilalanina do peptídeo (Phe-159) e que, assim como **A3**, BIM realiza uma interação importante com a Lys-21 da BAX – ligação de hidrogênio entre seu resíduo Glu-158 e a Lys-21 (Figura 2.90B). Ainda, os anéis da ftalazinona ocupam a mesma região na cavidade que o resíduo do peptídeo Ile-155 e uma das metilas da Leu-152.

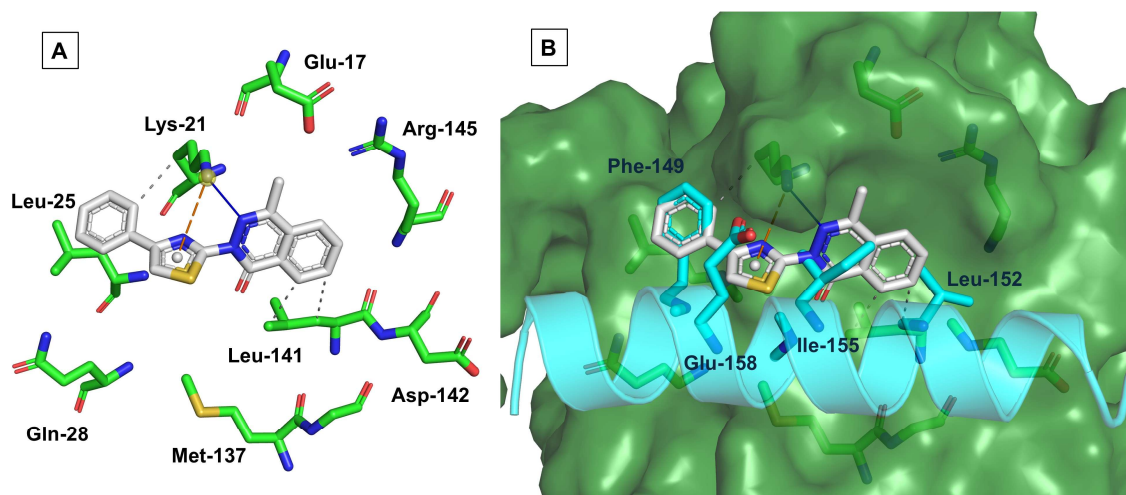


Figura 2.90. (A) Perfil de interação entre **A3** (branco) e a proteína BAX (2K7W, verde), analisado via PLIP (Schake et al., 2025). (B) Sobreposição de **A3** e α -hélice de BIM (ciano) em sua pose original obtida do PDB. A superfície da proteína BAX é mostrada em verde e os resíduos de aminoácidos do peptídeo BIM estão nomeados em preto. Imagens geradas com o software PyMOL Molecular Graphics (Delano Scientific LLC software, Schrodinger, New York, USA, Yuan; Chan; Hu, 2017). Linha tracejada laranja indica interação do tipo cátion- π ; ligação de hidrogênio é indicada por linha azul; interações hidrofóbicas são indicadas por linhas tracejadas cinzas.

As estruturas das ftalazinonas da série **A** são muito similares. Apesar disso, somente **A3** demonstrou atividade anticâncer contra a linhagem Huh-7. Desse modo, as poses das substâncias inativas também foram previstas (Figura 2.91). Nota-se que **A2**, **A4** e **A5**, apesar de adotarem poses similares entre si, realizando ligação de hidrogênio com a Lys-21, e interações hidrofóbicas com outros resíduos, não se sobrepõem bem à pose assumida por **A3**. Essas substâncias, além de não realizarem interação cátion- π com a Lys-21, não possuem algum

anel benzênico que ocupe a mesma posição do resíduo Phe-149 da proteína BIM. **A2**, **A4** e **A5**, ocupam apenas uma pequena região que também é ocupada pelo peptídeo de BIM. Essas diferenças talvez sejam suficientes para impedir que as mudanças conformacionais necessárias para a ativação da BAX ocorram. Talvez, nessas poses, **A2**, **A4** e **A5**, não sejam capazes de estabilizar a Bax em sua forma ativa. Os valores de pontuação das substâncias inativas estão todos abaixo de 19,50, enquanto **A3** alcançou pontuação de 22,23 (Tabela 2.16). Assim, embora a diferença de score não seja tão grande, o resultado do *docking* indica que **A3** deve interagir de maneira muito diferente dos compostos inativos: os resíduos envolvidos na interação não são os mesmos.

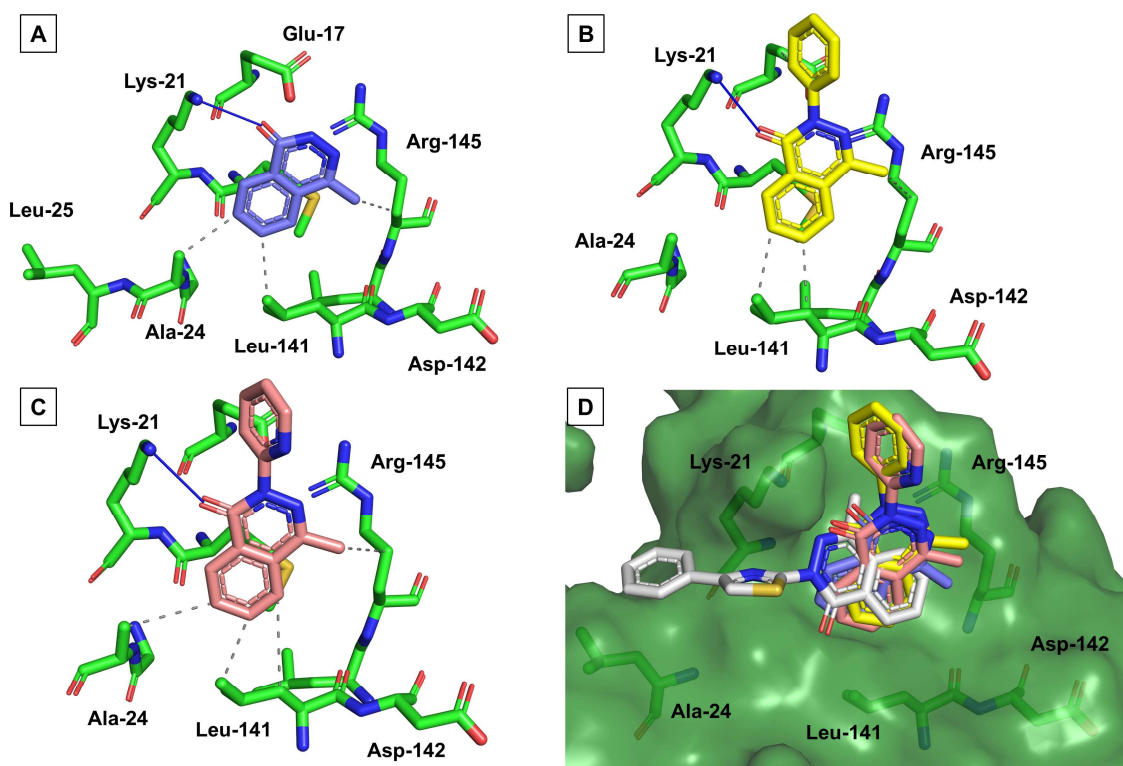


Figura 2.91. As fthalazinonas inativas contra Huh-7 (**A2**, **A4**, **A5**) assumem uma pose preferencial diferente de **A3**. Perfil de interação entre a proteína BAX (PDB: 2K7W, verde), **A2** (A, roxo), **A4** (B, amarelo) e **A5** (C, salmão). (D) Sobreposição das melhores poses de **A2-A5** na proteína BAX, com sua superfície em verde. Interações analisadas via PLIP. Imagens geradas com o software PyMOL Molecular Graphics (Delano Scientific LLC software, Schrodinger, New York, USA). Ligações de hidrogênio são indicadas por uma linha azul e interações hidrofóbicas por linhas tracejadas cinzas.

Tabela 2.16. Valores de pontuação (adimensional) obtidos pela análise de docking molecular entre BAX (PDB: 2K7W) e as ftalazinonas **A1-A5** ou os ativadores conhecidos, **BAM-7** e **16**.

Pose principal*		Pose secundária**	
Substância	Pontuação	Substância	Pontuação
A2	18,88	A2	-
A3	22,23	A3	21,29
A4	19,48	A4	-
A5	19,23	A5	-
BAM-7	21,89	BAM-7	20,63
16	24,33	16	-

*Corresponde a pose de maior pontuação determinada pelo docking utilizando a função ChemScore do Software GOLD. **Corresponde a outra pose também observada nos cálculos, sendo mais similar à pose reportada por Gavathiotis e colaboradores para o ativador **BAM-7** (Gavathiotis et al., 2012). Os resultados correspondem à média de pelo menos três cálculos independentes, todos realizados nas mesmas condições.

Em seguida, as estruturas de **16** e **BAM-7** também foram avaliadas por *docking*, a fim de comparar suas poses de maior pontuação com a de **A3** (Figura 2.92). De acordo com os cálculos, essas substâncias realizam ligação de hidrogênio com o resíduo de Lys-21 através do nitrogênio imínico do núcleo pirazolona, de maneira similar ao que ocorre com **A3**. Seus anéis benzênicos, por sua vez, realizam interações hidrofóbicas com alguns resíduos, como Lys-21 e Leu-141. Ao sobrepor suas estruturas com a de **A3**, a semelhança de suas interações e ocupação da cavidade tornam-se bem evidentes (Figura 2.92C). Essas poses serão tratadas como as poses principais dessas moléculas, por corresponderem ao maior valor de pontuação.

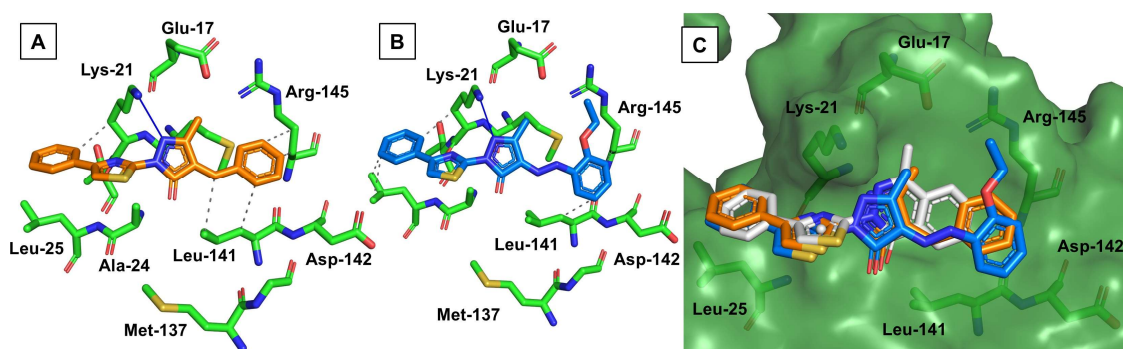


Figura 2.92. **A3** assume uma pose semelhante à dos ativadores conhecidos da proteína BAX (**16** e **BAM-7**). Perfil de interação entre a proteína BAX (PDB: 2K7W, verde), **16** (A, laranja), **BAM-7** (B, azul). (C) Sobreposição das melhores poses de **16**, **BAM-7** e **A3** na proteína BAX, com a superfície da proteína em verde. Interações analisadas via PLIP. Imagens geradas com o software PyMOL Molecular Graphics (Delano Scientific LLC software, Schrodinger, New York, USA). Ligações de hidrogênio são indicadas por uma linha azul e interações hidrofóbicas por linhas tracejadas cinzas.

O programa GOLD fornece as dez poses de maior pontuação previstas. Além da pose já apresentada, considerada principal (ou pose I), outra se destaca por aparecer frequentemente nos cálculos (pose secundária, ou pose II). Nesta pose, o grupo feniltiazol de **A3** encontra-se

voltado para a direção aposta, realizando interações hidrofóbicas com a Arg-145 e Leu-141 (Figura 2.93). Além disso, a ligação de hidrogênio com a Lys-21 é feita através da carbonila do grupo ftalazinona, ao invés de seu nitrogênio imínico. Outra diferença importante a ser destacada é de que, nesta pose, **A3** assume uma conformação mais planar, em que a interação intramolecular do tipo oxigênio...cavidade-sigma do enxofre possivelmente ocorre. Uma pose secundária similar à de **A3** também foi prevista para **BAM-7**. Nela, o grupo feniltiazol também adota direção oposta, e a carbonila do anel pirazolona é a responsável por realizar a ligação de hidrogênio com a Lys-21. Apesar da grande semelhança, a sobreposição de **A3** e **BAM-7**, revelam que, nesta pose secundária, **A3** não é capaz de ocupar a posição da Phe-149 do peptídeo BIM, enquanto **BAM-7** ocupa essa região através de seu grupo etoxifenila (Figura 2.93F). Essa diferença pode ser importante e talvez tenha impacto negativo na ativação da BAX pelo híbrido **A3**, uma vez que essa região, de acordo com Gavathiotis e colaboradores, parece ser importante no processo de mudança conformacional e ativação da BAX. Cabe destacar que a pose secundária de **BAM-7**, ao invés da pose primária, é a que mais se assemelha ao modo de interação previsto por Gavathiotis e colaboradores em sua publicação original (Gavathiotis et al., 2012). Apesar disso, os tipos de interação que **A3** e **BAM-7** realizam com a proteína são semelhantes em ambas as poses e os valores de pontuação são próximos (Tabela 2.16). Dessa forma, à princípio, ambas as poses são possíveis para **A3** e **BAM-7**.

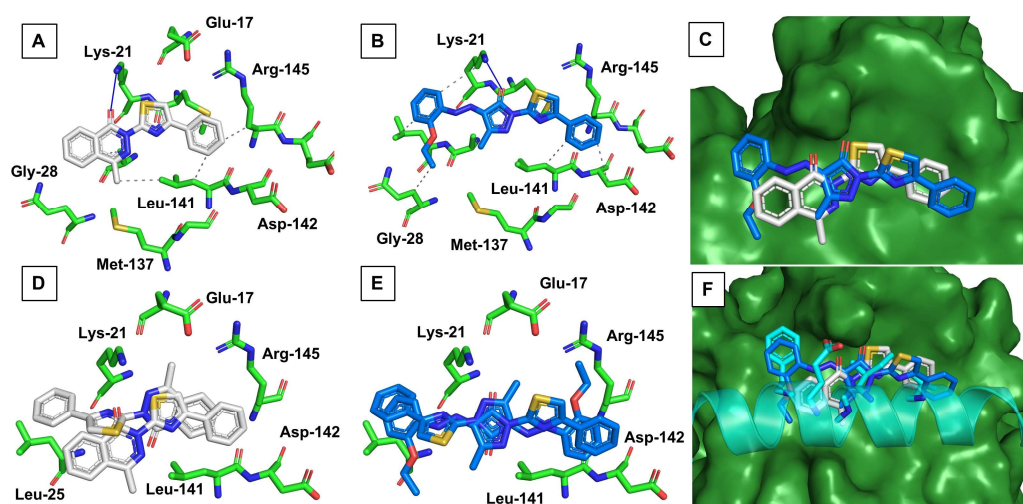


Figura 2.93. **A3** e **BAM-7** também podem assumir outra pose na cavidade da BAX. Perfil de interação entre a proteína BAX (PDB: 2K7W, verde), **A3** (A, branco), **BAM-7** (B, azul). (C) Sobreposição de **A3** e **BAM-7** em suas poses secundárias, com a superfície da proteína em verde. (D) Sobreposição de **A3** em suas poses principal e secundária. (E) Sobreposição de **BAM-7** em suas poses principal e secundária. (F) Sobreposição de **A3** e **BAM-7** em suas poses secundárias com o peptídeo de BIM. Interações analisadas via PLIP. Imagens geradas com o software PyMOL Molecular Graphics (Delano Scientific

LLC software, Schrodinger, New York, USA). Ligações de hidrogênio são indicadas por uma linha azul e interações hidrofóbicas por linhas tracejadas cinzas.

Para avaliar a estabilidade dos complexos **Bax-A3** e **Bax-BAM-7**, em ambas as poses dos ligantes (principal e secundária), uma abordagem mais robusta foi empregada. Essas poses foram completamente otimizadas no nível semiempírico PM7 para o cálculo dos valores das entalpias envolvidas no processo de interação (ΔH_{int}), conforme descrito em materiais e métodos. Neste cálculo, no entanto, a estrutura da proteína foi mantida fixa, sem otimização. Os valores de entalpia de formação calculados para os ligantes (em cada pose, $H_{ligante}$), para a proteína livre ($H_{proteína\ livre}$) e para os complexos proteína-ligante ($H_{complexo}$) são mostrados na tabela 2.17. A equação 3 foi então empregada para o cálculo da variação de entalpia de interação.

$$\text{Equação 3: } \Delta H_{int} = H_{complexo} - (H_{proteína\ livre} + H_{ligante})$$

Onde:

- $H_{complexo}$: entalpia de formação do complexo proteína-ligante;
- $H_{proteína\ livre}$: entalpia de formação da proteína livre;
- $H_{ligante}$: entalpia de formação do ligante livre.

Tabela 2.17: Valores de entalpia de interação (ΔH_{int}), variação de energia das ligações de hidrogênio ($\Delta E_{lig.H}$) e variação de energia das forças de dispersão de London (ΔE_{disp}).

	Bax livre	A3		BAM-7		BAX-A3		BAX-BAM-7	
		I	II	I	II	I	II	I	II
H_f	-15054,47	70,15	70,99	67,74	69,01	-15017,45	-15008,44	-15022,12	-15017,42
$E_{lig.H}$	-667,02	0,00	0,00	-0,10	-0,14	-671,14	-669,95	-672,70	-671,83
E_{disp}	-2008,45	-8,61	-8,66	-11,59	-11,67	-2056,90	-2052,56	-2068,30	-2068,24
ΔH_{int}						-33,13	-24,97	-35,39	-31,96
$\Delta E_{lig.H}$						-4,12	-2,92	-5,58	-4,67
ΔE_{disp}						-39,84	-35,45	-48,26	-48,13

Todos os valores em kcal/mol

De acordo com a abordagem semiempírica empregada, os complexos proteína-ligante em que **A3** e **BAM-7** assumem a pose **I** prevista no *docking* molecular, são entalpicamente mais estáveis do que aqueles em que os ligantes assumem a pose **II**. Esse resultado, portanto, reforça as previsões iniciais do *docking* molecular, que indicaram a pose **I** como mais favorável. Porém,

ao contrário do que é mostrado pelos valores de pontuação obtidos no *docking*, a interação da proteína Bax parece ser entalpicamente mais vantajosa com **BAM-7**, independente da pose avaliada. Quando a pose **I** de cada ligante é comparada, a diferença energética é pequena: apenas 2,26 kcal/mol a favor do complexo **Bax-BAM-7**. Essa pequena diferença deve ser reflexo do perfil interativo similar das duas moléculas nessa orientação, demonstrado pela excelente sobreposição observada na Figura 2.92C. No entanto, ao comparar a pose secundária (**II**), a diferença torna-se mais significativa, favorecendo o complexo **BAX-BAM-7** em 6,99 kcal/mol. Na pose **II**, **A3** deve interagir mais fracamente com a proteína devido a perda da interação cátion- π , observada na pose **I**, que não deve ser totalmente compensada pelo contato hidrofóbico adicional na pose **II** (Figuras 2.90A e 2.93A). Em contrapartida, **BAM-7** mantém um padrão de interação muito similar em ambas as poses (Figura 2.92 e 2.93).

A ligação de hidrogênio entre **BAM-7** e o resíduo de Lys-21 parece ser ligeiramente mais intensa quando comparada a mesma interação realizada por **A3**, conforme sugerem os valores de $\Delta E_{\text{lig.H}}$ (Tabela 2.7). A diferença entre as interações hidrofóbicas é mais notável, conforme indicado pelos valores de ΔE_{disp} . Essas interações são consideravelmente maiores com **BAM-7**, provavelmente devido ao seu tamanho superior, que deve ampliar a superfície de interação com a proteína.

Resumidamente, apesar da interação de **BAM-7** com a proteína BAX na pose **I** ser entalpicamente mais favorável, a diferença em relação a **A3** é pequena, indicando que **A3** também deve ser capaz de interagir com o sítio gatilho dessa proteína. O tamanho reduzido de **A3**, comparado a **BAM-7**, parece ser o principal fator que deve limitar sua interação com a BAX, devendo ser levado em consideração para a otimização estrutural desta molécula em estudos futuros.

Nos cálculos de *docking* molecular, nenhuma pose secundária similar à observada para **A3** e **BAM-7** foi prevista para o composto **16**. Em todas as 10 poses geradas, o grupo feniltiazol de **16** aparece na direção da Leu-25, realizando uma interação hidrofóbica com a Lys-21. No trabalho de Stornaiuolo e colaboradores, verificou-se que **16** é inativo em fibroblastos embrionários de camundongo incapazes de expressar a proteína pró-apoptótica BAX (MEF BAX^{-/-}) ou BAK (MEF BAK^{-/-}), sugerindo que o alvo de **16** pode ser não somente a BAX, como também a BAK (Stornaiuolo et al., 2015). **BAM-7**, no entanto, só é inativa contra células MEF BAX^{-/-}, devendo, portanto, apresentar maior seletividade.

Uma vez que **A3** possui maior semelhança estrutural com **16**, é possível supor que sua ação não se restrinja somente a BAX, como também foi suposto para **16**. Ainda, a apoptose

desencadeada por **BAM-7** e **16** em células Huh-7 foi acompanhada por Stornaiuolo e colaboradores, por um ensaio que identifica a permeabilização da membrana mitocondrial externa (causada pela ativação da BAX). Neste ensaio, a sonda fluorogênica *Mitotracker Red* foi empregada para marcar as mitocôndrias saudáveis. Mitocôndrias em processo de apoptose encontram-se mais permeabilizadas e são menos marcadas pela sonda. Os valores de EC₅₀ para a inibição do acúmulo da sonda foram de 8,2 µM para **BAM-7** e 21,2 µM para **16** (Stornaiuolo et al., 2015). Curiosamente, o IC₅₀ de **A3** na redução da viabilidade celular pelo ensaio de MTT (14,79 µM) é bem próximo desses dois valores. Uma vez que o ensaio de MTT depende de desidrogenases mitocondriais, esses valores próximos podem indicar que o tratamento dessas células com **A3** causa dano mitocondrial similar.

2.5.2.4. Interação de **A3** com a Albumina Sérica Humana

Dentre as ftatazinonas sintetizadas neste trabalho, **A3** destacou-se como a mais promissora. Por esse motivo, sua interação com ASH foi avaliada através de métodos biofísicos. Em um primeiro momento, os espectros de absorção e emissão de fluorescência dessa substância foram obtidos em tampão fosfato (pH 7,4). O espectro de absorção apresenta linearidade somente até 8,3 µM (curvas vermelhas no espectro de absorção da Figura 2.94A). A partir de 9,9 µM, a linearidade é perdida. Além disso, a partir desta concentração, é observada elevação da linha de base do espectro em uma região em que **A3** não absorve (acima de 390 nm) - essa elevação inesperada é indicativa de precipitação da amostra. O sólido em suspensão causa dispersão da luz pelo fenômeno de reflexão – assim, uma parte do feixe luminoso é desviado do caminho óptico e não chega ao detector, dando a falsa impressão de que a amostra está absorvendo em comprimentos em que, na realidade, não absorve.

Em seguida, espectros de emissão de **A3** foram obtidos irradiando a amostra em 295 nm (Figura 2.94B), o comprimento de onda utilizado para a excitação da albumina nos experimentos de supressão de fluorescência. Esses espectros foram obtidos com o intuito de averiguar se **A3** emite fluorescência no mesmo comprimento de onda da emissão da albumina (~342 nm). A amostra não emite entre 310 nm e ~380 nm e o máximo de fluorescência é observado por volta de 456 nm. Até 5,8 µM a fluorescência aumenta de maneira linear com a concentração. A partir de 6,62 µM essa linearidade é perdida e o máximo de fluorescência sofre deslocamento hipsocrômico, indicando precipitação. Em solução, a amostra deve apresentar fluorescência reduzida devido a dissipação da energia do estado excitado pela rotação facilitada

de suas ligações de caráter simples. No entanto, ao precipitar, ocorre agregação molecular, que limita os movimentos rotacionais da molécula, causando um aumento expressivo de fluorescência, como foi observado para **A3** acima de $5,8 \mu\text{M}$. A técnica de fluorescência, por ser mais sensível, foi capaz de detectar a precipitação em uma concentração inferior àquela observada no experimento de absorção. Sendo assim, **A3** possui baixa solubilidade em meio aquoso ($\sim 5,8 \mu\text{M}$). Nos ensaios biológicos, a precipitação dessa substância só foi visível acima de $50 \mu\text{M}$ – razão pela qual **A3** só foi testado contra as células de câncer na faixa de $1\text{-}50 \mu\text{M}$. O meio de cultivo utilizado nos ensaios é suplementado com 10% em volume de soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum, qualified, Brazil*, código do produto: 12657029) que, de acordo com as especificações do fornecedor (Gibco, Thermo Fisher Scientific), possui albumina sérica bovina na concentração de $2,33\text{g}/100\text{mL}$, além de diversas outras proteínas em sua composição (certificado de análise do lote utilizado neste trabalho em anexo). Considerando a massa molecular da albumina sérica bovina como 66463 g/mol (Babcock; Brancalion, 2013), a concentração dessa proteína no soro é de $35,06 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Uma vez que o meio de cultivo apresenta somente 10% de soro em sua composição, a concentração de albumina no meio de cultivo pronto é de $\sim 3,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ – 3,5 vezes superior à concentração de albumina sérica humana empregada nos ensaios biofísicos de supressão de fluorescência (apresentados a seguir). Assim, provavelmente essas proteínas presentes no meio de cultivo foram capazes de interagir com **A3**, mantendo-o em solução em concentrações superiores a $5,8 \mu\text{M}$.

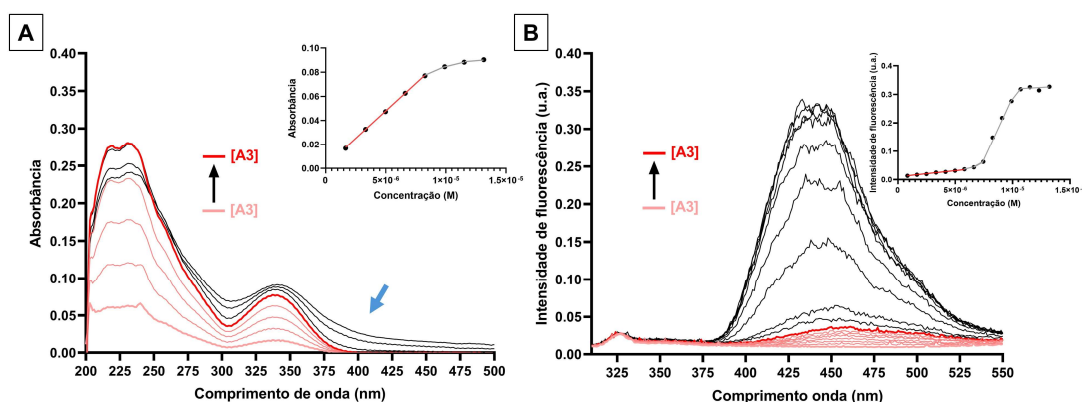


Figura 2.94. Espectros de absorção (A) e emissão (B, ex. 295nm) de **A3** ($1,7 \mu\text{M}$ - $13,2 \mu\text{M}$) em tampão fosfato (pH 7,4). Os espectros em vermelho estão dentro da faixa de linearidade da relação concentração vs absorbância (conforme gráfico inserido). As concentrações em que o comportamento linear não é mais observado são apresentadas por espectros em preto. Seto azul indica aumento na leitura de absorbância devido à dispersão do feixe luminoso pela amostra precipitada.

O espectro de absorção no UV-VIS da albumina foi obtido na presença de diferentes concentrações de **A3** (0,0 μM – 13,2 μM , Figura 2.95A). Observa-se aumento gradual da absorção em duas regiões do espectro – uma centrada em 340 nm, região em que a albumina pura não absorve, e a outra em ~290 nm, região em que tanto a albumina como **A3** absorvem. Em nenhuma concentração empregada foi observada precipitação do **A3**. A ausência de precipitação já é um indício de que a albumina é capaz de interagir com essa substância, mantendo-a em solução. Esse resultado é importante do ponto de vista farmacocinético, já que a ASH é uma das principais proteínas responsáveis por transportar substâncias de baixa solubilidade pela corrente sanguínea. A absorção da albumina em ~280 nm é decorrente, principalmente, da absorção do triptofano, com contribuição menor dos resíduos de tirosina e fenilalanina (Ferreira et al., 2024; Lakowicz, 2006). Neste trabalho, o espectro de emissão foi obtido excitando seletivamente o resíduo de triptofano em 295 nm (Lakowicz, 2006). Na ausência de **A3**, somente um máximo de fluorescência foi observado (343 nm), conforme esperado. Adições de **A3** causaram supressão dessa fluorescência e formação de uma segunda banda emissiva, com máximo em ~442 nm (Figura 2.95B). Esses dados indicam interação de **A3** com a proteína. A presença de um ponto isobéstico deve ser reflexo da formação de um equilíbrio entre a albumina livre e a albumina associada ao **A3** (Rio et al., 2024). Uma vez que o deslocamento do espectro de emissão com a adição de **A3** foi ínfimo (de 343 para 341 nm), esse híbrido ftalazinona-feniltiazol parece interagir com a albumina sem perturbar de maneira significativa o microambiente ao redor do resíduo de triptofano.

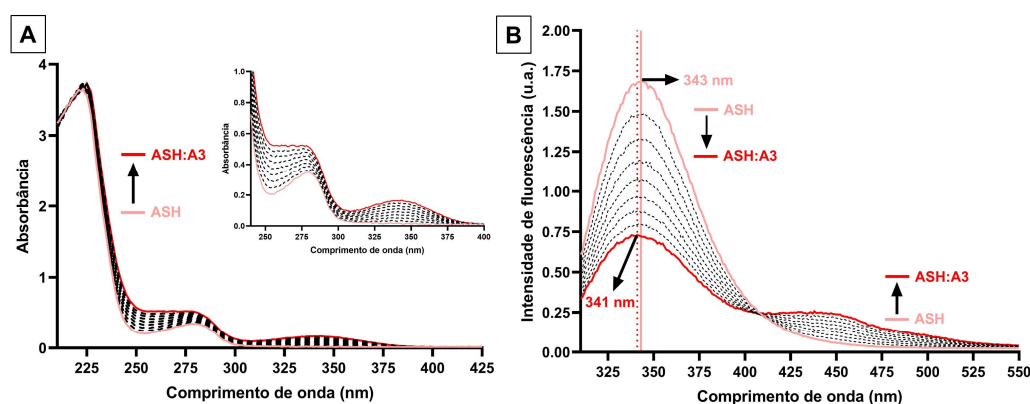


Figura 2.95. Espectros de absorção (A) e fluorescência (B) da albumina em tampão fosfato (pH 7,4) na presença de diferentes concentrações de **A3** (0,0 μM – 13,2 μM).

A amostra (**A3**) absorve nos comprimentos de onda em que a albumina é excitada (295 nm) e em seu comprimento de emissão (343 nm). Portanto, **A3** deve reduzir o número de fótons

que chegam à proteína, bem como o número de fótons emitidos – o efeito geral é uma redução da intensidade de fluorescência da proteína. Para reduzir esse fenômeno, conhecido como efeito do filtro interno, uma correção foi aplicada, conforme a equação 4 (Zhang et al., 2020).

$$F_{cor} = F_{obs} 10^{\frac{(A_{ex}+A_{em})}{2}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

- F_{cor} = fluorescência corrigida;
- F_{obs} = fluorescência observada (sem correções);
- A_{ex} e A_{em} = diferenças nos valores de absorção da amostra após a adição de **A3** nos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente.

Medidas de fluorescência em estado estacionário foram utilizadas para determinar os parâmetros quantitativos da interação entre a ASH e **A3**, empregando a equação de Stern-Volmer (Equação 5 e Figura 2.96A) (Lakowicz, 2006). Os parâmetros obtidos estão resumidos na Tabela 2.18. Os valores da constante diminuíram ligeiramente com o aumento da temperatura, indicando que o mecanismo de supressão de fluorescência deve ser estático. O valor de K_{sv} na ordem de 10^4 M^{-1} indica que a interação entre albumina e **A3** é moderada (Da Silva Moreira et al., 2024). Assim, a proteína deve ser capaz de interagir com essa molécula e distribuí-la aos tecidos sem retê-la apreciavelmente, liberando-a no local de interesse e garantindo certo nível de biodisponibilidade e tempo de vida plasmática (Bijari et al., 2018).

$$\frac{F_0}{F} = K_{sv}[Q] + 1 = K_q\tau_0[Q] + 1 \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

- F_0 = Fluorescência inicial (na ausência de supressor);
- F = Fluorescência na presença de supressor;
- K_{sv} = constante de Stern-Volmer;
- K_q = constante de velocidade de supressão bimolecular;
- τ_0 = tempo de vida médio de fluorescência da albumina
- Q = supressor de fluorescência, no caso **A3**.

Tabela 2.18. Parâmetros de fluorescência em estado estacionário para a interação ASH:A3 em quatro temperaturas diferentes.

T (K)	$K_{sv} (x10^4)$ (M ⁻¹)	$K_q (x10^{13})^*$ (M ⁻¹ S ⁻¹)	n	ΔH° (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔS° (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
300	6,31 ± 0,10	1,15 ± 0,02	1,02	-9,93 ± 0,75 (IC= -6,71 / - 13,14)	0,059 ± 0,002 (IC= 0,048 - 0,069)	-27,56
305	5,87 ± 0,05	1,07 ± 0,01	1,01			-27,85
310	5,46 ± 0,06	1,00 ± 0,01	1,04			-28,14
315	5,24 ± 0,03	0,96 ± 0,01	1,04			-28,44

* Considerando o tempo de vida de fluorescência da albumina = 5,47 ns. IC = intervalo de confiança.

Em seguida, o número de sítios de ligação envolvidos na interação ASH:A3 foi calculado pela equação do duplo logaritmo (equação 6 e Figura 2.96B). Essa equação, também fornece uma constante de associação (K_b), que não foi considerada, uma vez que a equação de Stern-Volmer não modificada já forneceu um valor de constante de associação. Os valores de n (tabela XX), próximos a 1, indicam que a interação ocorre em somente um sítio da ASH.

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

- K_b = constante de associação;
- n = número de sítios de interação.

Os valores de K_{sv} foram então empregados para o cálculo da constante aparente de supressão bimolecular (k_q). Conforme a equação 5, K_{sv} é igual à $K_q \tau_0$. Assim, K_q foi calculado multiplicando os valores de K_{sv} pelo tempo de vida médio de fluorescência da albumina obtido nos experimentos de fluorescência resolvida no tempo (5,47 ns, Figura 2.96D). Os valores da constante foram cerca de mil vezes maiores do que a constante máxima de difusão em água ($k_{diff} \approx 7,40 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 298K, segundo a teoria de Smoluchowski-Stokes-Einstein) (Wenskowsky et al., 2020), indicando uma associação no estado fundamental, característica de um mecanismo de supressão do tipo estático. Assim, tanto o padrão de variação da constante de Stern-Volmer com a temperatura, como os valores das constantes de supressão bimolecular indicam que a supressão deve ocorrer majoritariamente por um mecanismo estático.

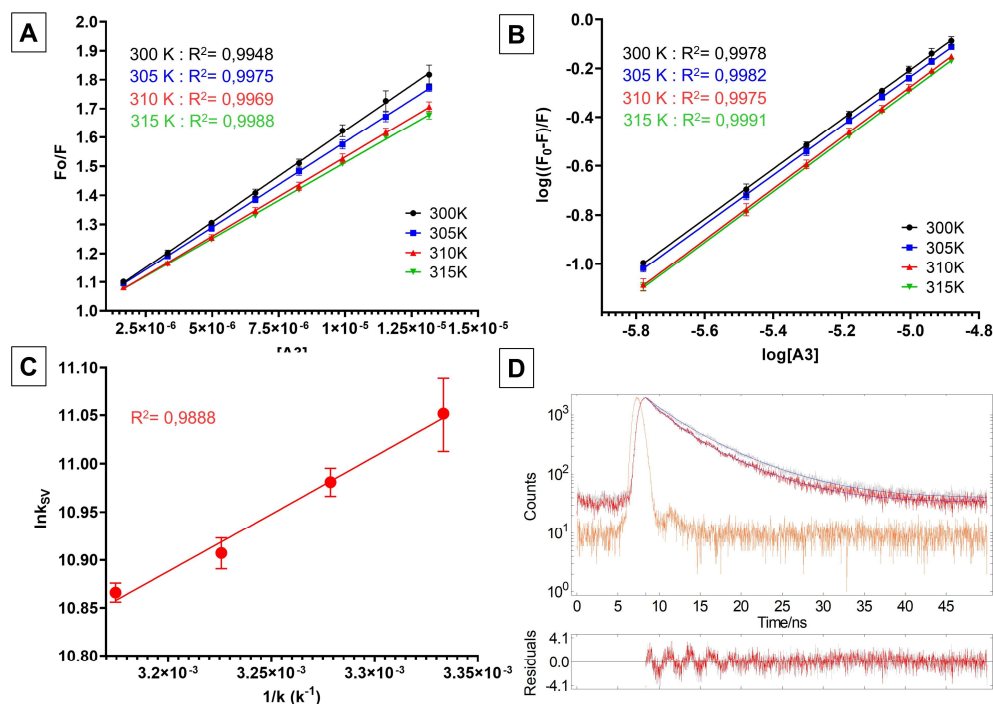


Figura 2.96. (A) Gráficos de Stern-Volmer para a interação ASH(10^{-5} M):**A3** em PBS (pH 7,4) a 300, 305, 310 e 315 K. (B) Gráfico do $\log [(F_0-F)/F]$ vs. $\log [\text{A3}]$ para ASB:**A3** a 300, 305, 310 e 315 K. (C) Gráfico de Van't Hoff baseado nos valores de K_{SV} para ASH:**A3**. (D) Decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo a 298 K para a ASH (10^{-5} M) na ausência (cinza) e na presença de **A3** (13,2 μM , vermelho); a curva em laranja corresponde à resposta temporal do equipamento ao pulso de excitação em 280 nm (IRF, *Instrument Response Function*).

A fim de definir com maior certeza o mecanismo de supressão, os decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo para a ASH livre e na presença de **A3** foram obtidos. A albumina apresentou dois tempos de vida de fluorescência (τ_1 e τ_2), que resultaram em um tempo de vida médio ($\tau_{\text{médio}}$) de 5,47 ns (Tabela 2.19), em concordância com a literatura (Soares et al., 2024). Observou-se que os decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo, na ausência e na presença da maior concentração de **A3**, são bem semelhantes. O valor de $\tau_{\text{médio}}$ sofreu apenas uma pequena redução na presença de **A3** (13%) evidenciando que o mecanismo de supressão é majoritariamente estático, com uma contribuição muito pequena da supressão dinâmica (Da Silva Moreira et al., 2024).

Tablela 2.19. Parâmetros de fluorescência resolvida no tempo para a interação ASH:**A3** (296 K). Ensaios realizados em PBS (pH 7,4) com a ASH na concentração de 1×10^{-5} M, excitação em 280 nm e emissão em 343.

[A3] (μM)	τ_1 (ns)	Rel. %	τ_2 (ns)	Rel. %	$\tau_{\text{médio}}$ (ns)	τ_0/τ	χ^2
0,0	2,82	28,4	6,52	71,63	5,47	1,0	1,28
13,2	2,30	33,0	6,09	67,0	4,84	1,13	1,17

Os valores das constantes de Stern-Volmer nas quatro temperaturas foram empregados para o cálculo dos parâmetros físico-químicos pelas equações de Van'tHoff (equação 7) e energia livre de Gibbs ($\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$). As variações de entalpia (ΔH°), entropia (ΔS°) e energia livre de Gibbs (ΔG°) são importantes pois, além de evidenciar a espontaneidade (ou não espontaneidade) do processo de associação proteína-ligante, permitem levantar hipóteses quanto aos tipos de interação envolvidas (Ross; Subramanian, 1981). Os valores de $\Delta G^\circ < 0$ revelam que a associação ASH:**A3** é espontânea. Essa espontaneidade é promovida tanto pela entalpia ($\Delta H^\circ = -9,93 \pm 0,75 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), como pela entropia ($\Delta S^\circ = -0,059 \pm 0,002 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) e deve estar relacionada a interações favoráveis do tipo ligação de hidrogênio e Van der Waals, além do deslocamento de moléculas de água da cavidade da proteína.

$$\ln K_{sv} = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

- ΔH° = variação padrão de entalpia;
- ΔS° = variação padrão de entropia;
- T = temperatura em Kelvin;
- R = constante universal dos gases perfeitos ($0,008314 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}$).

Para identificar o principal sítio de interação do híbrido **A3** ensaios de competição foram realizados na presença de varfarina (**VAR**), ibuprofeno (**IBU**) e digitoxina (**DIG**) – ligantes seletivos dos subdomínios IIA (sítio I), IIIA (sítio II) e IB (sítio III), respectivamente (Costa-Tuna et al., 2024; Zsila, 2013). A presença de varfarina causou a maior redução na constante de Sten-Volmer de **A3** (24,3%), indicando que o sítio I deve ser seu local preferencial de interação (Figura 2.97). O sítio III também deve ser ocupado por **A3**, embora em menor extensão, já que a presença de digitoxina causou uma redução de apenas 15,1% no valor de K_{sv} . As Figuras 2.97A e B mostram os resultados obtidos para a identificação do principal sítio de interação do **A3** em competição com os ligantes seletivos dos subdomínios da ASH.

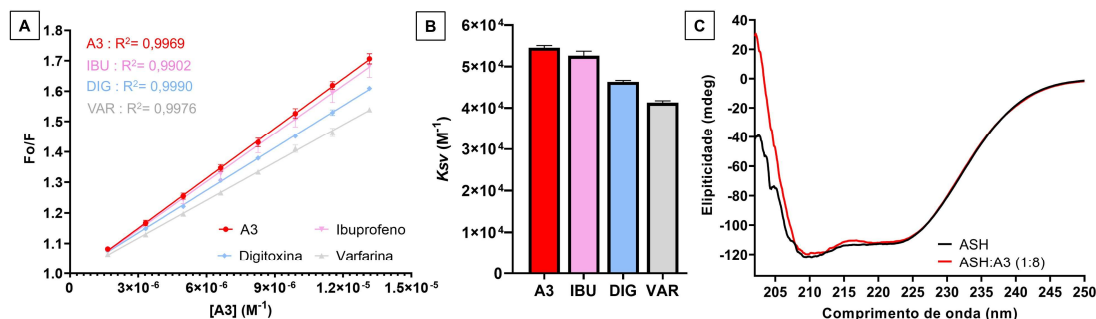


Figura 2.97. (A) Gráfico de Stern-Volmer para a interação ASH (1×10^{-5} M):**A3** em PBS (pH 7,4) a 310K na ausência (**A3**) ou presença de 1×10^{-5} M de ibuprofeno (IBU), digitoxina (DIG) ou varfarina (VAR). (B) Constantes de Stern-Volmer obtidas nos ensaios de competição na ausência (**A3**) ou presença de ibuprofeno (IBU), digitoxina (DIG) ou varfarina (VAR). (C) Espectro de dicroísmo circular da albumina (10^{-6} M, 310 K) na ausência ou presença de **A3** (8×10^{-6} , proporção 1:8 de ASH:**A3**).

A albumina possui dois mínimos no espectro de dicroísmo circular, normalmente reportado em 208 e 222 nm, que são atribuídos a transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ dos grupos amida das ligações peptídicas. Os mínimos no presente trabalho para a albumina livre foram observados em 209,5 nm e 220,7 nm (Figura 2.97C). Os cálculos indicam que, na razão 1:8 de albumina:**A3**, **A3** causa pouca perturbação no conteúdo de estrutura secundária da proteína (Ferreira et al., 2024) (Tabela 2.20).

Tabela 2.20. Porcentagem de hélice- α calculada a 209,5 e 220,7 nm para a ASH livre (PBS, pH = 7,4, 310 K) e na presença de **A3** na temperatura de 310 K. $[ASH] = 10^{-6}$ M; $[A3] = 8 \times 10^{-6}$ M.

	α -hélice (209,5 nm)	$\Delta \alpha$ -hélice (209,5 nm)	α -hélice (220,7 nm)	$\Delta \alpha$ -hélice (220,7 nm)
ASH	57,92%	-	55,94	-
ASH: A3	56,81	1,11	55,20	0,74

O modo de interação de **A3** em seu sítio preferencial de ligação na albumina (sítio I, subdomínio IIA) foi então investigado por *docking* molecular. Para tanto, a função ChemPLP do programa GOLD foi utilizada nos cálculos. A tabela 2.21 apresenta as principais interações com ASH (PDB 1N5U) e a Figura 2.98 mostra em detalhe a pose de **A3** na cavidade. **A3** realiza ligações de hidrogênio com resíduos de arginina e histidina. Além disso, diversos contatos hidrofóbicos foram encontrados, indicando que a interação entre **A3** e a ASH deve ter grande contribuição de Forças de Dispersão de London. Embora **A3** não realize interações diretas com o Tyr-214, fluoróforo irradiado nos experimentos de fluorescência, encontra-se na mesma cavidade desse resíduo. O distanciamento razoável entre **A3** e o Tyr-214 está condizente com o experimento de supressão (Figura 2.95B), que confirma a capacidade supressora de **A3**, sem grandes alterações no microambiente ao redor do fluoróforo.

Tabela 2.21. Principais interações para a pose de maior pontuação de **A3** no sítio I da ASH.

Interação	Resíduo	Distância (Å)	Interação	Resíduo	Distância (Å)
Hidrofóbica	Tyr-150	3,59	Hidrofóbica	Arg-257	3,79
Hidrofóbica	Lys-199A	3,94	Hidrofóbica	Leu-260	3,50
Hidrofóbica	Val-241	3,27	Lig. de H	His-242	3,27
Hidrofóbica	Arg-257	3,64	Lig. de H	Arg-257	2,58

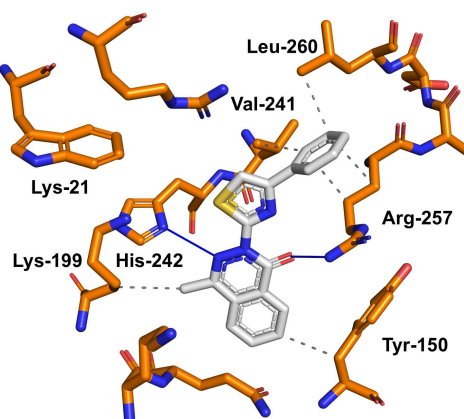


Figura 2.98. Docking do híbrido-feniltiazol no sítio I (subdomínio IIA) da albumina sérica humana (PDB: 1N5U). Interações analisadas via PLIP. Imagens geradas com o programa PyMOL Molecular Graphics (Delano Scientific LLC software, Schrodinger, New York, USA). Ligações de hidrogênio são indicadas por uma linha azul e interações hidrofóbicas por linhas tracejadas cinzas.

2.5.2.5. Previsão de Parâmetros de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção do híbrido A3

Entre as moléculas avaliadas nos ensaios *in vitro*, **A3** foi a única que apresentou atividade anticâncer expressiva. A sua atividade *in vivo*, no entanto, dependerá de diversos fatores que não foram acessados experimentalmente. Os ensaios de fluorescência já indicaram que a albumina sérica humana interage bem com **A3** e deve ser capaz de carrear essa molécula pela corrente sanguínea. Porém, outras características também são importantes para uma boa resposta em modelos animais. Neste contexto, os parâmetros físico-químicos, de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e fármacossimilaridade do híbrido **A3** foram preditos utilizando a plataforma gratuita SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017).

O modelo BOILED-egg (*Brain Or Intestinal EstimateD permeation*), baseado em dois descritores físico-químicos (WLOGP, indicador de lipofilicidade; e TPSA, área de superfície polar topológica) previu que **A3** deve possuir boa absorção intestinal e boa permeabilidade pela barreira hematoencefálica (Figura 2.99). Essa previsão já era esperada, tendo em vista a estrutura dessa substância. Além desse modelo, o valor alto do $\log P_{O/W}$ consensual (3,70,

Tabela 2.22), calculado pela média de cinco diferentes métodos preditivos, também indica que essa substância deve ser capaz de atravessar as membranas biológicas facilmente.

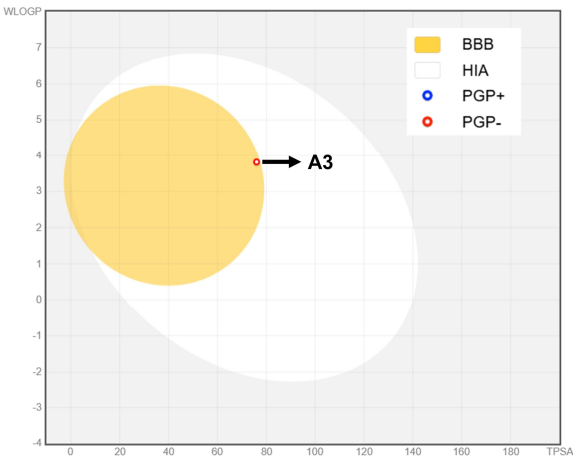


Figura 2.99. Modelo BOILED-egg para **A3**. BBB: absorção pela barreira hematoencefálica. HIA: absorção intestinal humana. PGP+: substrato para a P-gp. PGP- : não é substrato para a P-gp.

A plataforma verificou que **A3** obedece a todos os critérios de cinco diferentes modelos de fármacossimilaridade, indicando que possui características estruturais e físico-químicas compatíveis com aquelas observadas em fármacos. Ainda, de acordo com a plataforma, **A3** não deve se comportar como substrato da glicoproteína-P, sendo por isso, possivelmente ativa contra células que expressam essa bomba de efluxo em grande quantidade (Lin; Yamazaki, 2003; Morishita et al., 2020). Apesar de todas essas previsões favoráveis, **A3** parece possuir bom potencial para atuar como inibidor de três das principais isoformas do citocromo P450 (CYP), o que pode ser problemático, uma vez que a inibição dessas enzimas pode aumentar os níveis de outros fármacos que estejam sendo administrados concomitantemente, além de comprometer o processamento dos próprios substratos endógenos. Assim, é esperado por essas previsões que **A3** possa causar efeitos medicamentosos adversos (Guengerich, 2024).

Tabela 2.22. Algumas propriedades físico-químicas e adequação a regras de fármacossimilaridade previstas pela plataforma da web SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017).

Log $P_{o/w}$ ^a		Inibição da CYP (Isoforma)	Fármacossimilaridade (nº de violações)				
			Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge
A3	3,70	✓ (CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9)	✓	✓	✓	✓	✓

^a log $P_{o/w}$ consensual: coeficiente de partição octanol/água calculado como a média aritmética de cinco modelos preditivos distintos de log P .

2.5.3. Conclusões e perspectivas

No presente trabalho, 10 ftalazinonas foram preparadas com sucesso, uma das quais (**A3**) apresentou atividade moderada ($IC_{50} = 14,79 \pm 0,65 \mu M$) contra uma linhagem celular de hepatocarcinoma humano (Huh-7). Essa mesma molécula teve potência similar contra células leucêmicas transformadas pelo vírus HTLV-1 (linhagem MT2), com IC_{50} de $20,91 \pm 2,97 \mu M$. Ensaio de respiração celular (Huh-7), mostraram que o tratamento com **A3** reduz consideravelmente o consumo de oxigênio associado a síntese de ATP, sem interromper a cadeia transportadora de elétrons. Esses efeitos podem estar associados a um estado de permeabilização parcial da membrana mitocondrial interna durante um processo de apoptose. Por tanto, é necessário averiguar se esse novo híbrido ftalazinona-feniltiazol é realmente capaz de induzir morte celular por apoptose, seja por meio de ensaios de citometria de fluxo com Anexina-V/7AAD ou por kits comerciais de ensaios em microplacas para a detecção de caspases em suas formas ativas. Além disso, é importante investigar em maior detalhe seus efeitos sob o metabolismo celular, especialmente com o intuito de verificar se as células de hepatocarcinoma passam por mudança metabólica para compensar a síntese reduzida de ATP mitocondrial.

Cálculos baseados em pares atômicos revelaram que **A3** é estruturalmente similar a ativadores conhecidos da proteína pró-apoptótica BAX. Os resultados de docking molecular e cálculos semi-empíricos sugerem a interação com a proteína BAX como um possível mecanismo de ação para **A3**, ao indicar que seu modo de interação deve ser similar ao de ativadores conhecidos. Embora esse mecanismo não tenha sido comprovado, este trabalho descreve um novo composto químico com potencial interativo promissor, que pode ser utilizado como protótipo para o planejamento e obtenção de novos ativadores da proteína BAX.

Por fim, ensaios foto-físicos demonstraram que a albumina sérica humana apresenta interação moderada com **A3**, indicando que seria capaz de transportar essa substância pela corrente sanguínea e entregá-la para os tecidos. No entanto, estes estudos revelaram que a solubilidade de **A3** em meio aquoso isento de proteínas é muito baixa. Futuras modificações estruturais devem levar isso em consideração, com o intuito de gerar ativadores mais promissores da proteína BAX que apresentem também solubilidades adequadas.

2.5.4. Materiais e métodos

Todos os solventes e reagentes foram adquiridos da Neon e Sigma-Aldrich, respectivamente, e usados como recebidos. Os espectros de infravermelho foram obtidos pela técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance*), na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , em um espectrofotômetro *Brüker*, modelo *FT-IR Vertex 70*. Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (500 MHz ou 400 MHz) e carbono (125 MHz ou 100 MHz) foram realizados em um espectrômetro *Bruker Ultrashield Plus*, utilizando DMSO- d_6 ou CDCl_3 como solvente. A referência interna foi o próprio solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades foram designadas da seguinte forma: s, singleto; d, duplete; dd, duplo duplete; t, tripleto; td, triplo duplete; m, multiplete. Em alguns casos, a atribuição completa dos sinais foi realizada com auxílio de experimentos bidimensionais (COSY, NOESY HMBC E HSQC). Os pontos de fusão (P.F.) foram obtidos em um aparelho da marca Gehaka, modelo PF1500 FARMA, e não foram corrigidos. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD) em cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (Merck) e reveladas em lâmpada UV (254 nm). Espectrometria de Massas de Alta Resolução do composto **A3** foi realizada no modo positivo, em um equipamento de cromatografia líquida (zorbax C18, 2,1mm x 50 mm x 1,8 μm) acoplada a espectrômetro de massas *QTOF-6530* (Agilent, *Thermo Scientific*) com uma fonte de ionização por electrospray. A análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de **A3** foi realizada a 26°C, em um equipamento *Prominance* (*Shimadzu*), equipado com uma coluna C18 *BetaSil* (25cm x 4,6mm x 5 μm). Foi utilizado sistema de solventes MeOH (90%): 10% H_2O (1% AcOH) e o fluxo foi ajustado em 1,0 mL por minuto. A detecção foi feita por Detector de Arranjo de Diodos (DAD) em 280 nm.

Os reagentes e produtos tiveram suas massas aferidas na balança analítica ATX-224 SHIMADZU ou na balança semi-analítica BEL ENGINEERING MARK S 203. As reações e recristalizações foram realizadas com uma placa de agitação e aquecimento C-MAG HS7 (IKA). Para a aferição do pH das soluções foram utilizadas fitas de pH universal da marca Macherey-Nagel.

2.5.4.1. Procedimentos sintéticos e caracterização

2.5.4.2. Síntese do A1

Em um primeiro momento, 15 g de ácido ftálico foi lentamente aquecido em um béquer. Um vidro de relógio com gelo e água foi mantido em cima do béquer, para coletar o anidrido ftálico que sublimava. Quando o sólido no fundo do béquer fundiu, a quantidade de material sublimado no vidro de relógio aumentou consideravelmente. Após a fusão do sólido, o aquecimento foi mantido por mais 20 minutos. Em seguida, o material sublimado foi devolvido para o interior do béquer, o sólido foi homogeneizado e dois novos ciclos de aquecimento e homogeneização foram repetidos. Por fim, todo o sólido branco (>98% de rendimento, P.F.: 131-134 °C) foi coletado e armazenado em ambiente seco contendo sílica gel.

4 mL de trietilamina foram adicionados a um balão de fundo redondo de duas bocas contendo 2,51 g de anidrido ftálico (16,97 mmol) (Britton et al., 2012). A mistura foi aquecida à 80-90 °C e o ácido malônico (2,23 g, 21,44 mmol, ~30% de excesso) foi adicionado em porções de 223 mg a cada 24 minutos, totalizando 10 adições em 4 horas. Em seguida, a mistura foi mantida em aquecimento por mais 2 horas. O meio foi então resfriado e vertido em 35 mL de água destilada. A suspensão obtida foi filtrada à vácuo e o filtrado foi acidificado com HCl concentrado. A solução límpida foi mantida em geladeira por 4 dias, período em que cristais marrons foram formados. A mistura foi filtrada à vácuo e os cristais lavados com o mínimo de água destilada gelada. Após secos, foram recristalizados 3 vezes em tolueno, fornecendo **A1** na forma de cristais castanhos.

A1. Cristais castanhos, rendimento: 57%;. P.F.: 114-115 °C (literatura: 114-115 °C, Yale, 1947). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃, ppm): 7,81 (d, *J* 7,18 Hz, 1H, H2), 7,69 (t, *J* 7,18 Hz, 1H, H4), 7,55 (t, *J* 7,18 Hz, 2H, H3+5), 4,39 (OH), 1,92 (s, 3H, H8).

2.5.4.3. Síntese do A2

Metodologia 1: aquecimento em microondas

Em um almofariz de porcelana foram adicionados 657 mg de **A1** (4,0 mmol), 3,0 g de sílica gel (70-230 mesh) e 401 mg de tiossemicarbazida (4,4 mmol). A mistura foi macerada por um minuto e, em seguida, aquecida em microondas convencional por 11 minutos para a

síntese de **A2**. Cada minuto de aquecimento foi seguido de 30 segundos de maceração a temperatura ambiente. Após esse período, o produto foi extraído com 20 mL CHCl_3 e, em sequência, com 20 mL de acetona. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotatório, fornecendo cristais de um sólido amarelado (**A2**). Duas recristalizações em metanol:THF forneceram **A2** como cristais incolores em 54% de rendimento.

Metodologia 2: refluxo em etanol

Uma mistura contendo 145,8 mg de **A1** (0,89 mmol), 89,0 mg de tiossemicarbazida (0,98 mmol) e uma gota de ácido acético glacial em 3 mL de etanol foi aquecida em temperatura de refluxo, sob forte agitação. Após 3 horas de reação, a mistura foi resfriada e os cristais incolores formados foram filtrados e lavados com o mínimo de etanol gelado, fornecendo **A2** em 63% de rendimento.

A2. Cristais incolores (metodologia 1), rendimento: 54%;. P.F.: 220–222 °C (literatura: 222 °C, Boltze; Dell, 1966). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3161, 3070, 3014 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 2899 ($\nu_{\text{C-H}}$ alifático); 1651 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1379 (δ_{CH_3}); 1601-1475 ($\nu_{\text{C=C}}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6 , ppm): 12,45 (s, 1H, NH), 8,25 (d, J 7,87 Hz, 1H, H3), 7,93 (m, 2H, H5+6), 7,86 (td, J 1,68, J 7,88, 1H, H4), 2,52 (s, 3H, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6 , ppm): 160,0 (C1), 127,8 (C2), 126,2 (C3), 132,0 (C4), 134,0 (C5), 126,1 (C6), 130,3 (C7), 143,8 (C8), 18,9 (C9).

2.5.4.4. Síntese do A3

Em um balão de fundo redondo de duas bocas, 5,0 mmol de **A1** (820,8 mg) foram dissolvidos pela adição de 8 mL de etanol. Em seguida, 501 mg de tiossemicarbazida (5,5 mmol) e 3 gotas de ácido acético glacial foram adicionados e o meio reacional foi mantido em refluxo e agitação constante por meio de agitador magnético. Após 10 minutos em refluxo, 4 mL de uma solução de 2-bromoacetofenona (1,1 g, 5,5 mmol) em etanol foi adicionada ao balão, gota a gota, através de um funil de adição. A solução foi então deixado por mais 4 h em refluxo e agitação. Após esse período, o balão foi mantido 24 h em refrigeração. Após filtração à vácuo, o sólido separado foi recristalizado em EtOH:ACN (7:3 v/v).

A3. Sólido branco, rendimento: 75%. P.F.: 123-124 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3090 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 2920 ($\nu_{\text{C-H}}$ alifático); 1651 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1377 (δ_{CH_3}); 1595-1445 ($\nu_{\text{C=C}}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6 , ppm): 8,41 (d, J 7,85 Hz, 1H, H3), 8,07 (d, J 7,82 Hz, 1H, H6), 8,02 (m, 4H,

H5+14+18+12), 7,96 (t, *J* 7,85 Hz, 1H, H4), 7,47 (t, *J* 7,56 Hz, 2H, H15+17), 7,36 (t, *J* 7,56 Hz, 1H, H16) 2,72 (s, 3H, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 157,9 (C1), 126,4 (C2), 126,9 (C3), 132,7 (C4), 134,7 (C5), 126,3 (C6), 128,6 (C7), 146,7 (C8), 19,1 (C9), 157,2 (C10), 149,9 (C11), 112,6 (C12), 134,2 (C13), 126,0 (C14+18), 128,8 (C15+17), 128,1 (C16). HPLC: >99% de pureza.

2.5.4.5. Síntese do A4

A4 foi preparado de maneira similar a **A2**, pela metodologia 1. Para tanto, em um almofariz de porcelana foram adicionados 820,8 mg de **A1** (5,0 mmol), 3,3 g de sílica gel (70-230 mesh) e 5,5 mmol de fenilhidrazina. A mistura foi macerada por um minuto e, em seguida, aquecida em microondas convencional por 3 minutos. Cada minuto de aquecimento foi seguido de 30 segundos de maceração a temperatura ambiente. Após esse período, o produto foi extraído com 20 mL CHCl_3 e, em sequência, com 20 mL de acetona. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotatório, fornecendo cristais de um sólido marrom (**A4**) que foi posteriormente purificado por duas recristalizações em EtOH:Hex, fornecendo **A4** na forma de cristais amarelo pálidos.

A4. Cristais amarelo pálidos, rendimento: 61%. P.F.: 95-97 °C (literatura: 97-98 °C, Vaughan; McCane; Sloan, 1951). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3068, 3039 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 2920 ($\nu_{\text{C-H}}$ alifático); 1655 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1379 (δ_{CH_3}); 1591-1456 ($\nu_{\text{C=C}}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 8,34 (d, *J* 7,92 Hz, 1H, H3), 7,94 (m, 2H, H5+6), 7,91 (m, 1H, H4), 7,59 (d, *J* 7,74 Hz, 2H, H11+15), 7,50 (t, *J* 7,74 Hz, 2H, H12+14), 7,40 (t, *J* 7,74 Hz, 1H, H13), 2,59 (s, 3H, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 158,3 (C1), 127,6 (C2), 127,5 (C3), 132,2 (C4), 133,9 (C5), 126,7 (C6), 129,3 (C7), 144,2 (C8), 18,7 (C9), 142,2 (C10), 126,1 (C11+15), 128,6 (C12+14), 125,9 (C13).

2.5.4.6. Síntese do A5

Uma mistura contendo 492,5 mg de **A1** (3,0 mmol), 360,1 mg de 2-hidrazinopiridina (3,3 mmol) e duas gotas de ácido acético glacial em 8 mL de etanol foi aquecida em temperatura de refluxo, sob forte agitação. Após 5 horas de reação, a mistura foi resfriada e o sólido amarelado formado foi coletado por filtração à vácuo, lavado com o mínimo de etanol gelado e então recristalizado três vezes em EtOH/ H_2O , fornecendo **A5** como um sólido branco puro.

A5. Sólido branco, rendimento: 46%. P.F.: 155-156 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3049 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 2955 ($\nu_{\text{C-H}}$ alifático); 1661 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1379 (δ_{CH_3}); 1585-1464 ($\nu_{\text{C=C}}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 8,70 (dd, J 1,09 Hz, J 5,05 Hz, 1H, H14), 8,53 (d, J 7,75 Hz, 1H, H3), 7,84 (m, 4H, H4+5+6+12), 7,72 (d, J 8,03 Hz, 1H, H11), 7,35 (dd, J 5,03 Hz, J 7,35 Hz, 1H, H13), 2,69 (s, 3H, H9). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 159,5 (C1), 128,4 (C2), 127,7 (C3), 131,9 (C4), 133,7 (C5), 125,2 (C6), 130,0 (C7), 145,1 (C8), 19,3 (C9), 153,5 (C10), 123,3 (C11), 138,0 (C12), 121,7 (C13), 149,6 (C14).

2.5.4.7. Síntese do B1

A chalcona **B1** foi preparada a partir do ácido 2-acetilbenzóico (**A1**) e benzaldeído, empregando o procedimento clássico da condensação de Claisen-Schmidt, como reportado anteriormente (Mendes et al., 2019). Para tanto, em um Erlenmeyer uma solução contendo 1,0 g de ácido 2-acetilbenzóico (6,1 mmol) em 3,3 mL de etanol foi resfriada em banho de gelo e sal. Em seguida, 7,3 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 10% foi adicionada gota a gota ao frasco. Após 10 minutos em agitação a 0°C, 7,3 mmol de benzaldeído (0,74 mL) foi adicionado ao meio. A mistura foi mantida em agitação por uma hora a 0-5 °C. A reação foi retirada do banho de gelo, ficando em agitação por três horas à temperatura ambiente. A solução límpida foi acidificada pela adição de HCl 10% v/v. Ao acidificar, um óleo amarelo foi formado. Esse óleo solidificou ao manter a mistura em refrigeração (freezer) por 20 h. O sólido de coloração esverdeada foi separado por filtração à vácuo e lavado com o mínimo de água destilada gelada. Em uma tentativa inicial de recristalização em etanol, obteve-se um sólido ainda com colocação esverdeada. Assim, outras tentativas de purificação foram exploradas para eliminar a impureza desconhecida de coloração verde. O sólido foi completamente dissolvido no menor volume possível de diclorometano. Em seguida, hexano foi adicionado aos poucos, para forçar a precipitação da chalcona ácida **B1**. Conforme hexano foi adicionado, a chalcona **B1** separou da solução como um sólido branco, enquanto a solução manteve a coloração verde inicial. O sólido branco foi filtrado e, após seco, recristalizado em EtOH:H₂O (6:4 v/v), fornecendo **B1** na forma de cristais incolores.

B1. Cristais incolores, rendimento: 68%; P.F.: 149–151 °C (literatura: 151-152 °C, Wang et al., 2005). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3053 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 1688 ($\nu_{\text{C=O}}$ ácido carboxílico); 1643 ($\nu_{\text{C=O}}$ cetona conjugada); 976 ($\gamma_{\text{C-H}}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 13,25 (s, 1H, OH), 7,92 (d, J 7,65 Hz, 1H, H3), 7,63 (t, J 7,54, 1H, H4), 7,70 (m, 3H, H5+12+16), 7,50 (d, J 7,43, 1H, H6),

7,19 (s, 2H, H9+10), 7,42 (m, H13+15+14). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 167,6 (C1), 130,40 (C2), 130,0 (C3), 130,7 (C4), 132,1 (C5), 127,6 (C6), 141,5 (C7), 195,7 (C8), 127,4 (C9), 144,0 (C10), 134,3 (C11), 128,6 (C12+16), 129,0 (C13+15), 129,7 (C14).

2.5.4.8. Síntese do B2.

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 2,27 g de **B1** (9,0 mmol), 902 mg de tiossemicarbazida (9,9 mmol), 24 mL de etanol e 4 gotas de ácido acético glacial. A mistura foi mantida em refluxo por 20 h. Após esse período, foi resfriada em freezer por quatro dias. O sólido branco formado foi separado por filtração a vácuo e lavado com uma mistura de EtOH:H₂O. Por fim, **B2** foi purificado por duas recristalizações em EtOH:H₂O (7:3 v/v), fornecendo **B2** como cristais incolores.

B2. Cristais incolores, rendimento: 44%; P.F.: 199–200 °C (literatura: 222–224 °C, Boltze; Dell, 1966). FTIR (ATR, cm^{-1}): 3095, 3039 ($\nu_{\text{C-H}}^{\text{aromático}}$); 1659 ($\nu_{\text{C=O}}$); 970 ($\gamma_{\text{C-H}}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 12,82 (s, 1H, NH), 8,29 (d, J 7,81 Hz, 1H, H3), 7,89 (t, J 7,58, 1H, H4), 7,98 (t, J 7,5 1H, H5), 8,40 (d, J 8,13, 1H, H6), 7,79 (m, 3H, H9+12+16), 7,47 (d, J 15,79, H10), 7,42 (t, J 7,47, H13+15), 7,34 (t, J 7,29, H14). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 159,5 (C1), 127,4 (C2), 126,1 (C3), 131,7 (C4), 133,7 (C5), 125,1 (C6), 129,1 (C7), 141,7 (C8), 120,0 (C9), 135,5 (C10), 136,3 (C11), 127,5 (C12+16), 128,8 (C13+15), 128,7 (C14).

2.5.4.9. Síntese do B3

A ftalazinona **B3** foi preparada de maneira similar à **A3**. Em um balão de fundo redondo de duas bocas, 4,5 mmol de **B1** (1,13 g) foram dissolvidos em 12 mL de etanol. 451 mg de tiossemicarbazida (4,95 mmol) 3 gotas de CH₃CO₂H foram adicionados e o meio reacional foi mantido em refluxo e agitação constante por meio de agitador magnético. Após 10 minutos em refluxo, 4 mL de uma solução de 2-bromoacetofenona (985 mg, 4,95 mmol) em etanol foi adicionada ao balão, gota a gota, através de um funil de adição. A solução foi então deixado por mais 3 h em refluxo e agitação. Após esse período, o balão foi mantido 24 h em refrigeração. Após filtração à vácuo, o sólido separado foi recristalizado em EtOH:EtOAc (8:2 v/v).

B3. Pó amarelo, rendimento: 32%; P.F.: 163–164 °C. FTIR (ATR, cm^{-1}): 3092, 3061, 3026 ($\nu_{\text{C-H}}^{\text{aromático}}$); 1659 ($\nu_{\text{C=O}}$); 966 ($\gamma_{\text{C-H}}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 8,49 (d,

J 7,82 Hz, 1H, H3), 8,01 (t, *J* 7,56, 1H, H4), 8,08 (m, H5+19+21+25), 8,55 (d, *J* 8,07, 1H, H6), 7,95 (d, *J* 15,72, 1H, H9), 7,74 (d, *J* 15,72, 1H, H10), 7,88 (d, *J* 7,38, 2H, H12+16), 7,49 (m, 4H, H13+15+22+24), 7,39 (m, 2H, H14+23). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): 157,7 (C1), 126,7 (C2), 127,1 (C3), 132,7 (C4), 134,7 (C5), 125,8 (C6), 128,1 (C7), 143,9 (C8), 119,5 (C9), 136,0 (C10), 135,9 (C11), 128,1 (C12+16), 128,9 (C13+15), 129,1 (C14), 157,4 (C17), 150,0 (C18), 113,0 (C19), 134,1 (C20), 126,0 (C21+25), 128,9 (C22+24), 128,1 (C23).

2.5.4.10. Síntese do B4

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1,98 g de **B1** (2,0 mmol), 0,25 mL de fenilhidrazina (2,5 mmol), 6,0 mL de etanol e 2 gotas de ácido acético glacial. A mistura foi mantida em refluxo por 1 hora. Após esse período, foi resfriada em freezer por 24 h, quando notou-se a presença de um óleo de coloração laranja. O produto cristalizou após friccionar o o óleo com um bastão de vidro. O sólido foi então purificado por recristalização em EtOAc:Hex, fornecendo **B4** na forma de cristais amarelos pálidos.

B4. Cristais amarelo pálidos, rendimento: 58%; P.F.: 179–180 °C (literatura: 178-179 °C, Boltze; Dell, 1966). FTIR (ATR, cm⁻¹): 3092, 3051, 3024, 3001 (ν_{C-H} aromático); 1651 (ν_{C=O}); 957 (γ_{C-H}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): 8,40 (d, *J* 7,86 Hz, 1H, H3), 7,95 (d, *J* 7,50, 1H, H4), 8,04 (t, *J* 7,78, 1H, H5), 8,49 (d, *J* 8,07, 1H, H6), 7,88 (d, *J* 15,76, 1H, H9), 7,51 (d, *J* 15,76, 1H, H10), 7,81 (d, *J* 7,49, 2H, H12+16), 7,43 (m, 3H, H13+15+20), 7,35 (t, *J* 7,29, 1H, H14), 7,70 (d, *J* 7,63, 2H, H18+22), 7,55 (t, *J* 7,63, 2H, H19+21). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): 158,2 (C1), 127,6 (C2), 126,9 (C3), 132,1 (C4), 133,9 (C5), 125,3 (C6), 128,7 (C7), 142,0 (C8), 119,6 (C9), 134,4 (C10), 136,1 (C11), 127,5 (C12+16), 128,8 (C13+15), 128,8 (C14), 142,1 (C17), 126,2 (C18+22), 128,6 (C19+21), 127,6 (C20).

2.5.4.11. Síntese de C2-C4.

A ligação olefínica das ftalazinonas **B2-B4** foi seletivamente reduzida por hidrogênio na presença de Pd/C como catalizador. Para tanto, 1 mmol dessas ftalazinonas foram dissolvidas em 14 mL de diclorometano. Então, 35 mg de Pd/C (10%) foram adicionados e a mistura mantida sob agitação constante a temperatura ambiente, em atmosfera de H₂, por 15 h (**C2**), 72h (**C3**), 2 h (**C4**). Após filtração em funil de vidro cinterizado contendo pequena camada de

celite, os produtos foram então purificados por recristalização em: EtOH:H₂O (**C2**); ACN:isopropanol (**C3**); isopropanol:hexano (**C4**).

C2. Cristais incolores, rendimento: 80%; P.F.: 159–160 °C (literatura: 146–147 °C, Chun et al., 2004). FTIR (ATR, cm⁻¹): 3180 (ν_{N-H}); 3053, 3026 (ν_{C-H} aromático); 2955, 2935, 2904 (ν_{C-H} alifático); 1641 (ν_{C=O}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): 12,52 (s, 1H, NH), 8,26 (d, *J* 7,82 Hz, 1H, H3), 7,84 (t, *J* 7,62, 1H, H4), 7,92 (t, *J* 7,62 1H, H5), 8,03 (d, *J* 8,04, 1H, H6), 3,21 (t, *J* 8,31, 1H, H9), 3,01 (t, *J* 8,31, H10), 7,27 (m, 4H, H12+16+13+15), 7,18 (m, 1H, H14). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): 159,5 (C1), 127,6 (C2), 126,0 (C3), 131,5 (C4), 133,6 (C5), 125,2 (C6), 129,3 (C7), 145,5 (C8), 33,14 (C9), 33,07 (C10), 141,3 (C11), 128,5 (C12+16), 128,4 (C13+15), 126,0 (C14).

C3. Pó branco, rendimento: 52%; P.F.: 173–174 °C. FTIR (ATR, cm⁻¹): 3057, 3024 (ν_{C-H} aromático); 2945, 2926, 2901 (ν_{C-H} alifático), 1649 (ν_{C=O}). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃, ppm): 8,63 (d, *J* 7,64 Hz, 1H, H3), 7,90 (m, 3H, H4+5+6), 3,50 (t, *J* 8,66, 2H, H9), 3,37 (t, *J* 8,66, 2H, H10), 7,48 (m, 5H, H12+16+19+22+24), 7,37 (t, 3H, H13+15+23), 7,28 (m, 1H, H14), 8,06 (d, *J* 8,05, 2H, H21+25). RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃, ppm): 158,4 (C1), 127,5 (C2), 128,2 (C3), 132,3 (C4), 134,6 (C5), 124,9 (C6), 128,7 (C7), 148,5 (C8), 34,6 (C9), 33,2 (C10), 141,4 (C11), 128,8 (C12+16), 128,9 (C13+15), 126,5 (C14), 158,0 (C17), 151,4 (C18), 111,3 (C19), 134,6 (C20), 126,4 (C21+25), 128,7 (C22+24), 128,1 (C23).

C4. Pó branco, rendimento: 61%; P.F.: 113–114 °C. FTIR (ATR, cm⁻¹): 3024, 3003 (ν_{C-H} aromático); 2958, 2930, 2904 (ν_{C-H} alifático), 1651 (ν_{C=O}). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃, ppm): 8,59 (d, *J* 7,72 Hz, 1H, H3), 7,83 (m, 1H, H4), 7,88 (m, 2H, H5+6), 3,36 (t, *J* 8,48, 2H, H9), 3,18 (t, *J* 18,48, 2H, H10), 7,27 (m, 3H, H12+16+14), 7,34 (t, *J* 7,33, 2H, H13+15), 7,63 (d, *J* 7,71, 2H, H18+22), 7,51 (t, *J* 7,62, 2H, H19+21), 7,39 (t, *J* 7,44, 1H, H20). RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃, ppm): 159,1 (C1), n.o. (C2), 127,9 (C3), 131,5 (C4), 133,3 (C5), 124,3 (C6), 129,2 (C7), 146,1 (C8), 33,9 (C9), 33,8 (C10), 141,1 (C11), 128,53 (C12+16), 128,56 (C13+15), 126,3 (C14), 142,0 (C17), 125,7 (C18+22), 128,7 (C19+21), 127,5 (C20).

2.5.4.12. Difração de raio-X de monocristal

A análise de difração de raio-X foi realizada pelo Professor Doutor Guilherme Pereira Guedes, do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense (UFF). Monocristais do híbrido ftalazinona-feniltiazol foram obtidos pelo resfriamento de uma solução em metanol:clorofórmio, seguida da evaporação lenta do solvente para o crescimento dos cristais.

Os dados de difração de raios X do composto **A3** foram coletados em um equipamento Bruker D8-Venture, utilizando radiação Mo K α monocromatizada por grafite ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). A coleta dos dados, o refinamento da célula unitária e a redução dos dados foram realizados utilizando os programas *Bruker Instrument Service vV6.2.16*, *APEX4* (Bruker, 2012. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, EUA) e *SAINT V8.40B* (Bruker, 2012. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, EUA), respectivamente. A correção de absorção, utilizando reflexões equivalentes, foi realizada com o programa *SADABS* (Krause et al., 2015). A solução da estrutura e o refinamento por mínimos quadrados em matriz completa baseado em F^2 foram realizados com os programas *SHELXS* e *SHELXL* (Sheldrick, 2015). Todos os átomos, com exceção dos hidrogênios, foram refinados de forma anisotrópica. Os átomos de hidrogênio foram tratados com refinamento misto. Duas moléculas de Metanol foram encontradas desordenadas na estrutura cristalina. As representações da estrutura foram feitas com o programa Mercury (Macrae et al., 2006).

2.5.4.13. Cultivo das células

A atividade citotóxica das ftalazinonas e seus precursores contra as células Huh-7 foram realizadas pelo próprio autor, com auxílio da aluna de iniciação científica Meyriane Mira de Mendonça (Graduanda em Farmácia da UFRRJ), sob orientação e supervisão da Profa. Dra. Ana Paula Pereira da Silva, do Departamento de Bioquímica da UFRRJ.

Células Huh-7 foram obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*) e mantidas em uma câmara de incubação a 37 °C e 5% de CO₂. A cultura celular foi feita em frascos apropriados, com superfície tratada para a cultura de células e tecidos [*Tissue Culture (TC)-treated surface*]. O meio utilizado para o cultivo (DMEM, *Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco®), contendo 5 mM de glicose, foi suplementado com 10% em volume de soro fetal bovino (SFB), bicarbonato de sódio 0,22% e tampão HEPES 0,2% [4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfonato], em pH 7,4. As células foram sub-cultivadas a cada 3-4 dias. Para o subcultivo, o meio era removido, as células aderidas eram lavadas com solução de tampão fosfato (pH 7,4) e em seguida removidas da superfície do frasco pelo tratamento com uma solução de tripsina-EDTA 0,25% (p/v). A suspensão de células era então transferida para novos frascos contendo um novo meio de cultura.

2.5.4.14. Solução estoque das substâncias testadas

Soluções estoque dessas substâncias foram preparadas em DMSO na concentração de 50 mM ou 25 mM e filtradas por um filtro com poros de 0,22 μ m para garantir a sua esterilidade. A solução estoque foi distribuída em alíquotas de 10-20 μ L e congeladas à -20 °C. Essas alíquotas foram descongeladas quando necessário.

2.5.4.15. Avaliação biológica das ftalazinonas e seus precursores contra células Huh-7

Para os ensaios de viabilidade, as células foram colhidas por tripsinização e semeadas em placas de cultura de 48 poços (250 μ L/poço) em uma densidade de $1,3 \times 10^4$ células. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias mantendo a concentração de DMSO fixa em 0,2%. Após incubação adicional de 48 horas a 37 °C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas uma vez com solução de tampão fosfato (PBS), e 250 μ L de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, 1,2 mM) em tampão fosfato (pH 7,4) foi adicionada a cada poço (Sladowski et al., 1993). A placa foi incubada novamente nas mesmas condições, por um período de 3 h. O sobrenadante foi retirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em 250 μ L de uma solução de isopropanol ácida. O formazan foi quantificado por colorimetria (570 nm) em leitor de microplaca ELISA (Kasuaki, DR-200BN-BI). A absorção em 690 nm foi utilizada como referência. Os resultados foram reportados como a média de pelo menos três experimentos independentes \pm erro-padrão da média.

2.5.4.16. Análise do consumo de oxigênio por células Huh-7 intactas

A taxa de consumo de oxigênio foi medida polarograficamente em um oxígrafo equipado com eletrodo do tipo Clark (Oxytherm, Hansatech Instruments, United Kingdom). Antes das análises, o eletrodo foi calibrado em duas condições distintas. Primeiro na presença de água grau Milli-Q saturada em oxigênio, condição atribuída como 100% de saturação de O₂. Em seguida, quantidade apreciável de ditionito de sódio foi adicionada à água Milli-Q, para consumir o oxigênio dissolvido. Esse sal foi adicionado até que não fosse mais notada redução na leitura de oxigênio dissolvido – esta condição foi calibrada como 0% de O₂.

Cerca de $6,24 \times 10^5$ células foram incubadas em uma placa de petri de poliestireno com superfície adequada para a cultura de células e tecidos. Após 24 h a 37°C e em atmosfera úmida com 5% de CO_2 as células foram tratadas com o $7,5 \mu\text{M}$ de **A3**. Após 48 h nas mesmas condições, o meio de cultivo foi retirado, as células aderidas foram lavadas com tampão fosfato e em seguida resuspendidas em solução de tripsina. Um novo meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino foi adicionado e a suspensão foi centrifugada a 2000 rpm/min por 7 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o pellet de células foi lavado com meio de cultivo sem SFB. Por fim, $3\sim 5 \times 10^6$ foram suspendidas em DMEM sem SFB e transferidas para o oxígrafo. A respiração basal foi medida após a adição das células ao meio de cultivo. Em seguida, Oligomicina ($1 \mu\text{g/mL}$) foi adicionada para registrar o consumo de oxigênio não associado a síntese de ATP. Por fim, $1 \mu\text{M}$ de FCCP foi adicionado para registrar a capacidade máxima de respiração das células.

2.5.4.17. Avaliação estatística

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via e as médias foram comparadas por meio do teste post-hoc de Dunnett. A concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em 50 % (IC_{50}) foi determinada por regressão não-linear.

2.5.4.18. Análises espectroscópicas da interação ASH:A3

A interação entre albumina sérica humana e **A3** foi investigada pelo próprio autor com auxílio da mestrandia Adriele de Oliveira Batista e supervisão do Prof. Dr. Darí Cesarin Sobrinho (Departamento de Química Orgânica, UFRRJ).

Os espectros de absorção no UV-visível e de fluorescência em estado estacionário foram obtidos em um espectrofotômetro JASCO J-815, utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Os espectros de fluorescência foram registrados na faixa de 310 à 550 nm em quatro temperaturas diferentes (300, 305, 310 e 315 K), com comprimento de excitação (λ_{exc}) de 295 nm. A concentração de albumina foi mantida fixa em $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, enquanto alíquotas de uma solução estoque de **A3** em metanol (1 mM) foram adicionadas para atingir as concentrações de 0,0; 1,66; 3,32; 4,98; 6,62; 8,26; 9,90; 11,53 e 13,16 μM . Para obter os espectros de absorção, procedeu-se da mesma maneira, realizando, contudo, a subtração da linha de base correspondente a solução de tampão fosfato (pH 7,4). Após a correção do efeito

do filtro interno (Zhang et al., 2020), a aproximação de Stern-Volmer e as equações de Van't Hoff, e energia livre de Gibbs foram utilizadas para obter os parâmetros termodinâmicos da interação ASH:**A3** (Rio et al., 2024). Os experimentos foram realizados em triplicata ou quadruplicata e os resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. Os experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados no mesmo instrumento, em uma temperatura fixa de 310 K e concentração de ASH de 1×10^{-6} μ M. Os espectros foram registrados na faixa de 200 a 250 nm, na ausência e na presença do composto **A3** (8,0 μ M). Os espectros médios obtidos foram corrigidos pela subtração do sinal do tampão fosfato. O conteúdo de alfa hélice foi calculado conforme relatado anteriormente na literatura (Chatterjee et al., 2012). Resumidamente, as elipticidades em 209,5 nm e 220,7 nm foram expressas como elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (MRE), conforme equação XX.

$$\text{Equação XX: } MRE = \frac{\theta}{(10 \cdot n \cdot l \cdot C_p)}$$

Onde:

- MRE = elipticidade residual significativa;
- θ = elipticidade observada (mdeg);
- n = número de aminoácidos residuais ou resíduos de aminoácido (585 para a ASH);
- l = comprimento óptico da cubeta (1 cm);
- C_p = concentração molar de ASH (1×10^{-6} mol/L).

As equações xx e xx foram então empregadas para obter o conteúdo de alfa hélice da proteína.

$$\text{Equação XX: } \% \text{ de } \alpha - \text{hélice} = \frac{(-MRE_{209,5} - 4000)}{(33000 - 400)} \times 100$$

$$\text{Equação XX: } \% \text{ de } \alpha - \text{hélice} = \frac{(-MRE_{220,7} - 2340)}{30300} \times 100$$

Onde:

- MRE_{209,5} e MRE_{220,7} correspondem a elipticidade residual significativa em 209,5 e 220,7 nm.

Para investigar o sítio preferencial de **A3**, ensaios de competição com sondas para o sítio I (varfarina), sítio II (ibuprofeno) e sítio III (digitoxina) foram realizados (Chaves et al., 2017) nas mesmas condições já descritas. Cada sonda foi incubada com a solução de ASH (1×10^{-5} M) na concentra fixa de 1.10^{-5} M antes da adição do híbrido A3 nas concentrações de 0,0; 1,66; 3,32; 4,98; 6,62; 8,26; 9,90; 11,53 e 13,16 μ M. Os experimentos na presença desses competidores foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média \pm erro padrão da média.

Os espectros de fluorescência resolvida no tempo (TRF, do inglês *Time-resolved fluorescence*) foram obtidos por meio de um spectrofluorímetro FS5 (Edinburgh Instruments, Ltd, Livingston, UK) com excitação em 280 nm e emissão em 343 nm. A resposta temporal do equipamento ao pulso de excitação em 280 nm (IRF, *Instrument Response Function*) e os decaimentos de fluorescência para a ASH (1×10^{-5} M, em PBS, pH 7,4) e para o sistema ASH:**A3** (13,16 μ M), foram registrados com 2048 canais e uma resolução de 24,4 ps/canal.

2.5.4.19. Docking molecular

A estrutura das ftalazinonas **A2-A5** e dos ativadores conhecidos da proteína BAX, **BAM-7** e **16**, foi construída e minimizada no software Spartan'24 (Wavefunction, Inc., 2025), utilizando o método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT, EDF2/6-31G*). Os cálculos de docking molecular foram realizados com o software GOLD 2022.3.0 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, CB2 1EZ, Reino Unido) (Jones et al., 1997).

Uma estrutura de RMN da BAX foi obtida do *Protein Data Bank* (PDB: 2K7W). O arquivo baixado possui 20 conformêros distintos dos quais o conformêro 1, considerado o melhor conformêro representativo neste conjunto, foi utilizado nos estudos de docking molecular, realizados com a função de pontuação padrão ChemScore e considerando um raio de 10 Å ao redor do resíduo de Lys-21. Os átomos de hidrogênio foram adicionados à proteína pela função padrão do GOLD antes do docking. O servidor *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP) (Adasme et al., 2021) foi utilizado para avaliar as interações entre a proteína e os ligantes em suas poses de maior valor de score ou em poses que se assemelhavam aquelas obtidas anteriormente por Stornaiuolo e colaboradores para o ativador **BAM-7** (Stornaiuolo et al., 2015). As figuras foram geradas com o software PyMOL Molecular Graphics System versão 3.2.0a (Open Source, Delano Scientific LLC software, Schrödinger, Nova York, EUA) (Yuan; Chan; Hu, 2017).

Os complexos **BAX-A3** e **BAX-BAM-7**, em ambas as poses dos ligantes (principal e secundária), foram também avaliados por uma abordagem mais robusta. As coordenadas dos átomos dos ligantes foram completamente otimizadas no nível semiempírico PM7 (Mopac2016, Stewart Computational Chemistry) para o cálculo dos valores das entalpias envolvidas no processo de interação (ΔH_{int}), enquanto as coordenadas dos átomos da proteína foram mantidas fixas, sem otimização. Para simular o ambiente aquoso, o modelo de solvatação contínua COSMO foi empregado com uma constante dielétrica adequada (78,4). As entalpias de interação entre a proteína BAX e o ligante foram calculadas pela diferença entre a entalpia de formação do complexo proteína-ligante e a soma dos valores de entalpia de formação da proteína e do ligante livres.

Para avaliar a interação de **A3** com a albumina sérica humana, a estrutura cristalográfica de PDB 1N5U foi obtida. Os ligantes presentes na proteína foram extraídos, bem como as moléculas de água. Na sequência, os átomos de hidrogênio foram adicionados à proteína pela função padrão do GOLD. O docking foi realizado pela função ChemPLP considerando um raio de 12 Å ao redor do resíduo de His-242. As interações para a pose de maior pontuação foram analisadas pelo servidor PLIP e as imagens geradas pelo software PyMOL.

2.5.4.20. Predição de ADMET

Parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos, e de farmacossinética foram estimados para **A3** pela ferramenta online e gratuita SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017), disponível em: <http://www.swissadme.ch>.

2.6. Cloridratos mesoiônicos - 1,3,4-Tiadiazólio-2-fenilaminas: breve histórico e síntese

Entre 1897 e 1903, Busch e colaboradores descreveram a preparação de compostos com a fórmula geral **56** (Figura 2.100) por meio das reações entre 1,3,4-tiadiazólio-2-tiolatos (**57**) e aminas primárias (**58**, rota A), bem como por reações entre 1,4-diariltiossemicarbazidas (**59**) e cloretos de ácido (**60**, rota B) ou benzaldeído (**61**, rota C) (Blume, 1903; Busch, 1903; Busch; Ridder, 1897; Kamphausen; Schneider, 1903; Schneider, 1903). Em 1938, Schönberg apontou que as estruturas de anel fundido inicialmente propostas por Busch não representavam com precisão as substâncias, já que violavam a regra de Bredt e não estavam de acordo com as propriedades físicas e químicas observadas. Schönberg então sugeriu que os compostos seriam melhor representados por estruturas monocíclicas bipolares, para as quais as regras de ressonância seriam aplicáveis. Com base nessa ideia, ele indicou que dois isômeros seriam possíveis para **56**, a saber: 1,3,4-triazólio-2-tiolato (**62a**) e 1,3,4-tiadiazólio-2-amineto (**62b**) (Schönberg, 1938). Desde então, o estudo dessas reações, especialmente a acilação anidra de tiossemicarbazonas substituídas (rota B), levou a controvérsias quanto aos produtos obtidos. Enquanto vários autores entre 1965 e 1967 declararam que **62a** era a estrutura correta dos derivados formados pelas acilações (Evans; Milligan, 1967; Grashey; Baumann; Hamprecht, 1972; Ohta; Kato; Kaneko, 1967; Potts; Roy; Jones, 1965, 1967), estudos posteriores comprovaram que, dependendo das condições reacionais, **62b** poderia ser obtido e, posteriormente, convertido em **62a** por meio de um rearranjo molecular, Figura 2.100 (Cheung et al., 1992; Echevarria et al., 1995; Montanari et al., 1994; Sandali, 1993).

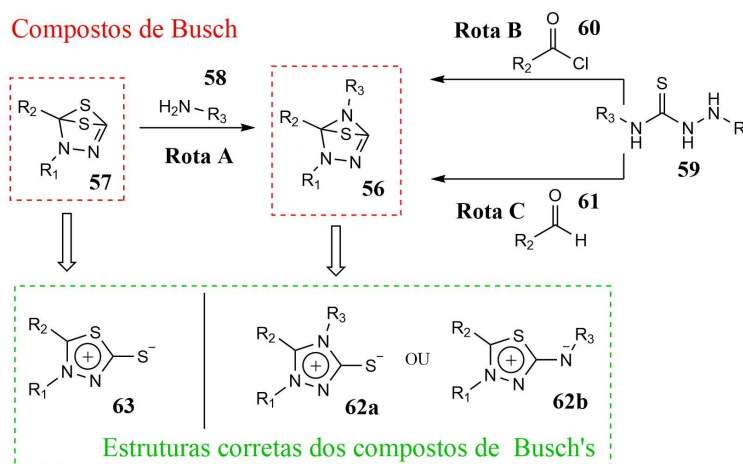


Figura 2.100. Rota de síntese dos compostos de Busch. **63**, **62a** e **62a** correspondem às estruturas corretas dos mesoiônicos **55** e **56**, conforme proposto por Schönberg, Baker e Ollis (Baker; Ollis, 1957; Baker; Ollis; Poole, 1949; Schönberg, 1938).

Um dos primeiros exemplos de compostos mesoiônicos da classe das 1,3,4-tiadiazólio-2-amidinas e seus derivados salinos foi descrito por David Ollis e Christopher A. Ramsden em 1971 (Ollis; Ramsden, 1971). Em sua abordagem sintética, a tio-hidrazida (**64**) foi reagida com dicloreto de isocianeto apropriados (**65a-d**) em clorofórmio sob refluxo (Figura 2.101). Os autores previram inicialmente a formação de uma carbodiimida intermediária (**66**), a qual, por meio de ciclização intramolecular, daria origem aos cloretos de 1,3,4-tiadiazólio (**67a-d**). O tratamento das suspensões desses sais com gás amônia anidro em clorofórmio resultou na desprotonação do grupo amino exocíclico, levando à formação dos compostos mesoiônicos **68a-c** com rendimentos elevados (95–98%). Por essa rota, os sais **67a-d** foram obtidos com rendimentos variando entre 57% e 72%. Ainda, os mesoiônicos **68a-c** puderam ser convertidos facilmente em seus isômeros estruturais **69a-c** por aquecimento em etanol absoluto, Figura 2.101 (Ollis; Ramsden, 1974).

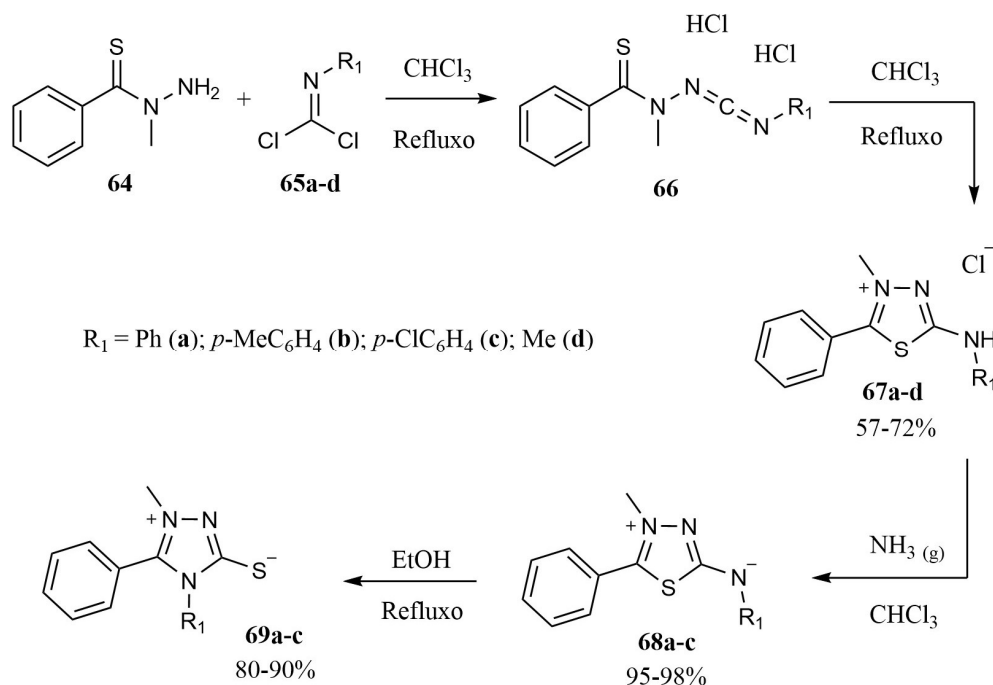
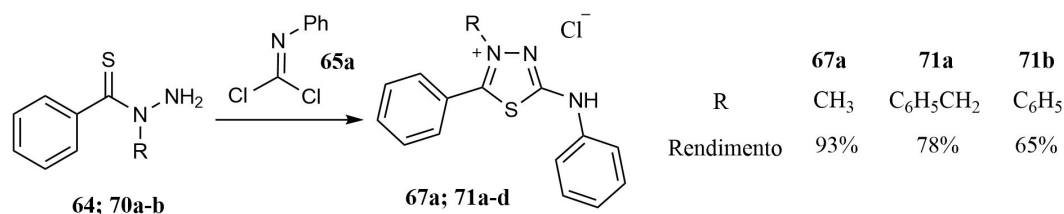


Figura 2.101. Rota de síntese das 1,3,4-tiadiazólio-2-amidinas e seus cloridratos proposta por David Ollis e Christopher A. Ramsden (Ollis; Ramsden, 1971).

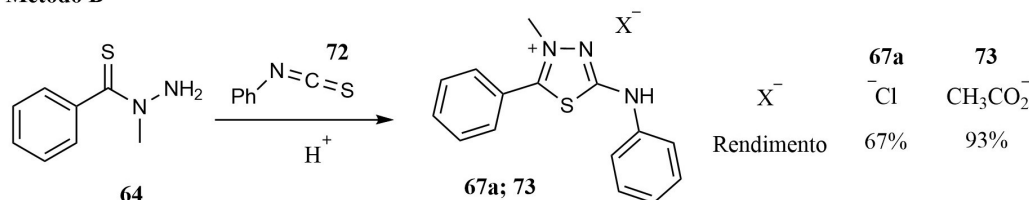
Em 1972, Grashey e colaboradores prepararam alguns exemplos de sais de 1,3,4-tiadiazólio-2-amineto utilizando diferentes metodologias (Figura 2.102) (Grashey; Baumann; Hamprecht, 1972). Segundo os autores, os compostos **67a** e **71-73** foram obtidos a partir das seguintes reações: A) tio-hidrazidas (**64** ou **70a-b**) com dicloreto de isocianeto **65a**, de forma

semelhante à descrita por Ollis e Ramsden; B) tio-hidrazida **64** com isotiocianato de fenila (**72**) em meio ácido; e C) 1,4-difeniltiossemicarbazida (**74**) com benzaldeído (**75**) na presença de HCl. Os resultados relatados mostram que grupos volumosos e eletronegativos, como o anel fenólico, reduzem o rendimento das reações realizadas pela metodologia A. Outra observação interessante é que o composto **71b** foi obtido em rendimentos mais elevados a partir do benzaldeído e da tiossemicarbazida **74** (metodologia C). Os autores também relataram que alguns dos sais obtidos puderam ser isomerizados para os correspondentes 1,3,4-triazólio-2-tiolatos sob condições alcalinas.

Método A



Método B



Método C

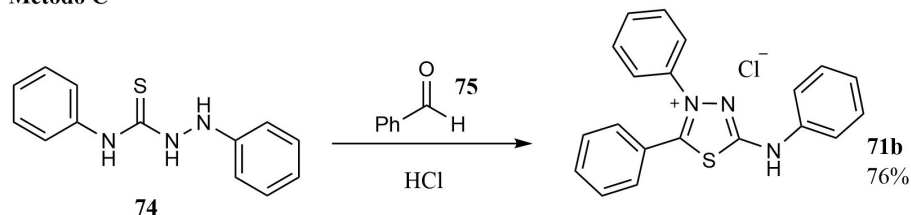


Figura 2.102. Algumas metodologias utilizadas por Grashey et al. para a síntese de sais de 1,3,4-triazólio-2-aminidas (Grashey; Baumann; Hamprecht, 1972).

Em 1976 e 1979, Cawkill e colaboradores descreveram a preparação de novos sais mesoiônicos a partir da reação de 1,1-dibromo-4-aryl-2,3-diazabuta-1,3-dienos com tio-hidrazidas em benzeno em ebulição (Figura 2.103). Os sais de bromo foram convertidos nos correspondentes compostos mesoiônicos por desprotonação com amônia anidra em diclorometano (Cawkill et al., 1976, 1979).

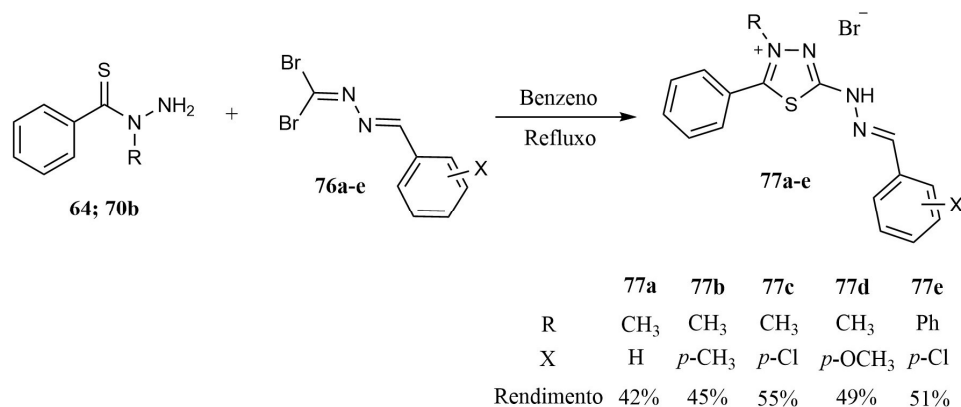


Figura 2.103. Síntese de sais de 1,3,4-tiadiazólio-2-benzilideno-hidrazinídeos (Cawkill et al., 1976, 1979).

Atualmente, a reação entre tiossemicarbazidas substituídas e cloretos de acila, em dioxano seco, é um dos métodos mais empregados para a preparação dos cloridratos de 1,3,4-tiadiazólio-2-amidina - esses sais são os primeiros produtos obtidos diretamente das acilações em condições anidras. No entanto, a presença de água ou de bases no meio reacional pode levar à formação do isômero **62a** (Figuras 2.100 e 2.104), ou até mesmo de uma mistura de ambos os isômeros e seus respectivos sais. Já na década de 1990, estava bem estabelecido que os cloridratos e suas bases livres (**62b**) podiam ser convertidos nos isômeros correspondentes (1,3,4-triazólio-2-tiolato, **62a**) por diferentes rotas, como demonstrado na Figura 2.104 (Britto et al., 1998; Echevarria et al., 1995; Maciel; Echevarria; Rumjanek, 1998; Montanari et al., 1994; Sandali, 1993). Até mesmo a luz emitida por uma lâmpada de mercúrio é capaz de promover o rearranjo do mesoiônico **62b** para o tiolato **62a**, conforme demonstrado por Montarani e colaboradores (Sandali, 1993). Nesses trabalhos, diversas técnicas foram empregadas para comprovar as estruturas dos compostos, incluindo espectroscopias no infravermelho, ultravioleta, RMN de ¹H, ¹³C e ¹⁵N. Além disso, a estrutura molecular do cloreto de 4-fenil-5-{4-metoxifenil}-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida e do 1,4,5-trifenil-1,3,4-triazólio-2-tiolato foi confirmada por análise de difração de raio-X (Figura 2.105) (Cheung et al., 1992, 1993).

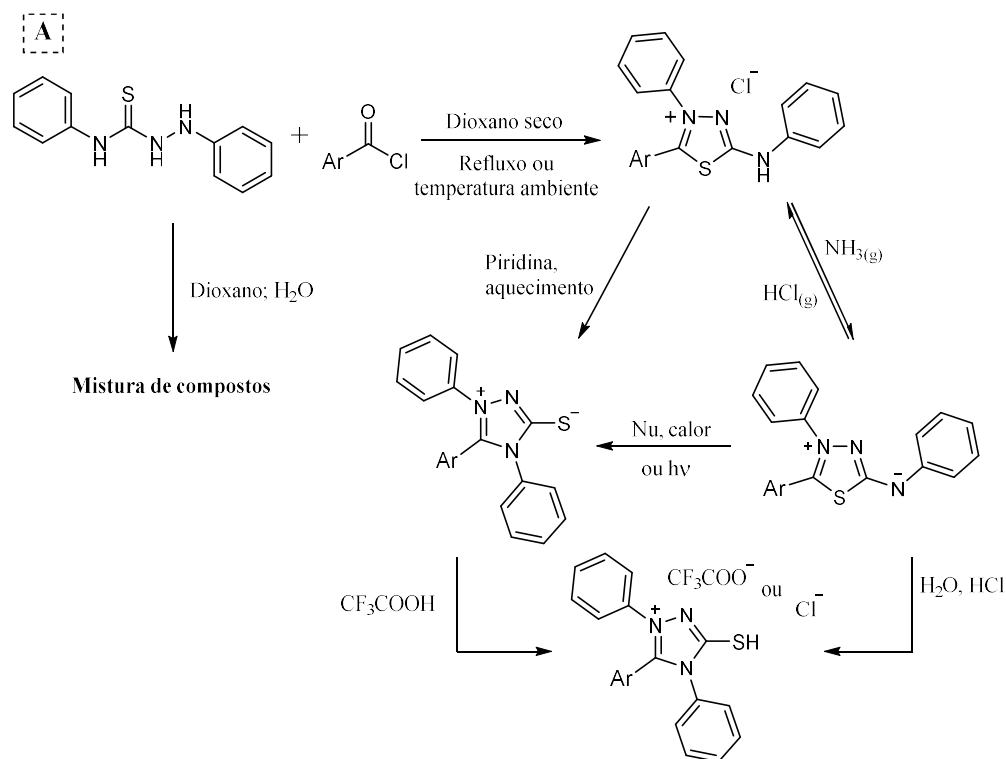


Figura 2.104. Rota sintética para a preparação do composto mesoiônico tipo **61b** e condições de rearranjo para o sistema 1,3,4-triazólio-2-tiolato (**61a**) (Echevarria et al., 1995; Montanari et al., 1994; Sandali, 1993).

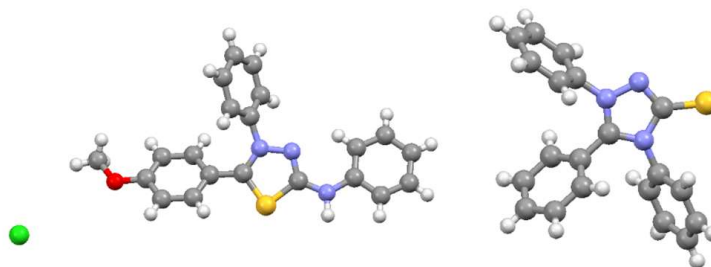


Figura 2.105. Estruturas cristalinas do cloridrato de 4-fenil-5-(4-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (esquerda) e 1,4,5-trifenil-1,3,4-triazólio-2-tiolato (direita) (Cheung et al., 1992, 1993).

Em 2004, Kappel et al. (Kappel; Yokum; Barany, 2004) relataram um novo procedimento para a síntese dos cloretos de 1,3,4-tiadiazólio. Esse método se baseou na reação de ciclização entre aldeídos e tiossemicarbazidas 1,4-disubstituídas (Figura 2.106). No entanto, em vez de utilizar um ácido para promover a reação, como anteriormente descrito, empregou-se o cloreto de trimetilsilila (TMS-Cl). Dessa forma, o sal **79** foi obtido em DMF por meio da reação entre a 1,4-difeniltiossemicarbazona (**74**) e excesso de 2-naftaldeído (**78**), na presença de TMS-Cl. Os autores também prepararam diversos sais mesoiônicos por meio de uma

estratégia com suporte sólido: tiossemicarbazonas apropriadas reagiram, por 2 h a 60 °C, com aldeídos ligados a uma resina; em seguida, os produtos foram liberados do suporte por meio de tratamento ácido. No total, 17 compostos foram obtidos com alta pureza (90–98%) e rendimentos de moderados a excelentes (38%–94%), Figura 2.106.

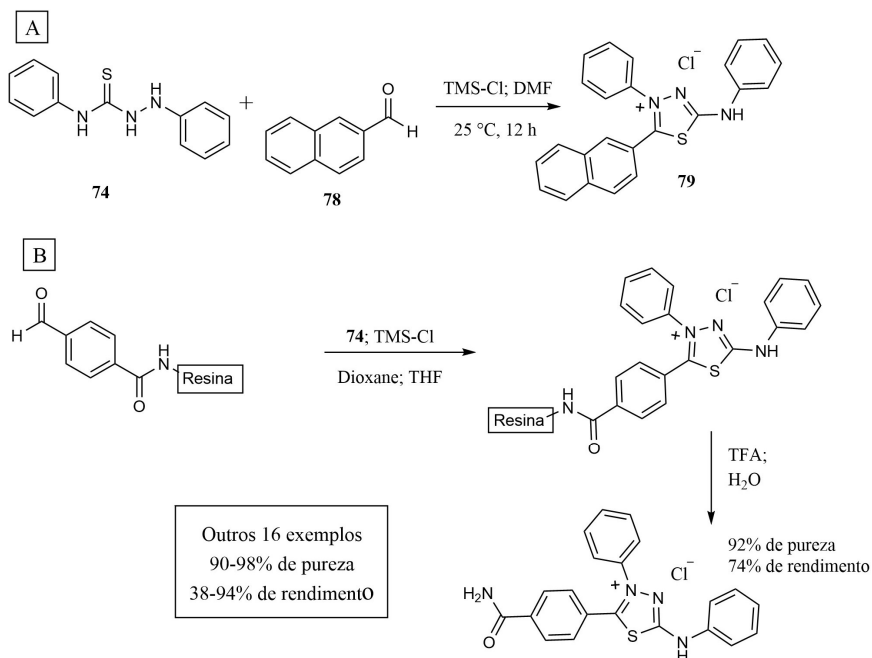


Figura 2.106. Novos métodos sintéticos descritos por Kappel et al. para a preparação de cloretos de 1,3,4-tiadiázólio (Kappel; Yokum; Barany, 2004).

Em 2011, o grupo de Echevarría investigou a síntese de cloretos mesoiônicos utilizando fontes alternativas de energia, com o objetivo de reduzir o tempo de reação e melhorar os rendimentos (Reis et al., 2011). Quantidades equimolares de um aldeído apropriado e de 1,4-difeniltiossemicarbazida foram misturadas com um ácido de Lewis (SOCl_2 ou TMS-Cl) e algumas gotas de 1,4-dioxano (Figura 2.107). A mistura obtida foi submetida à irradiação por micro-ondas por 5 minutos ou à irradiação por ultrassom por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,4-dioxano à mistura, que foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante a noite. Essas metodologias foram comparadas ao protocolo tradicional (reação de cloretos de ácido com tiossemicarbazonas). O uso de irradiação por micro-ondas e cloreto de tionila forneceu os melhores rendimentos na maioria dos casos. Além dos rendimentos superiores, essa metodologia apresenta duas vantagens principais em relação à tradicional. Primeiramente, elimina uma etapa, que envolve a conversão de um ácido carboxílico em cloreto de ácido. Além disso, reduz significativamente o tempo necessário para obtenção dos produtos, de 8 horas de

agitação + 24 - 48 horas em repouso à temperatura ambiente para apenas 5 minutos sob irradiação por micro-ondas, seguidos de repouso durante a noite. Também seria interessante verificar, em estudos futuros, a real necessidade do período de repouso noturno - talvez ele possa ser reduzido ou até eliminado sem comprometer o rendimento.

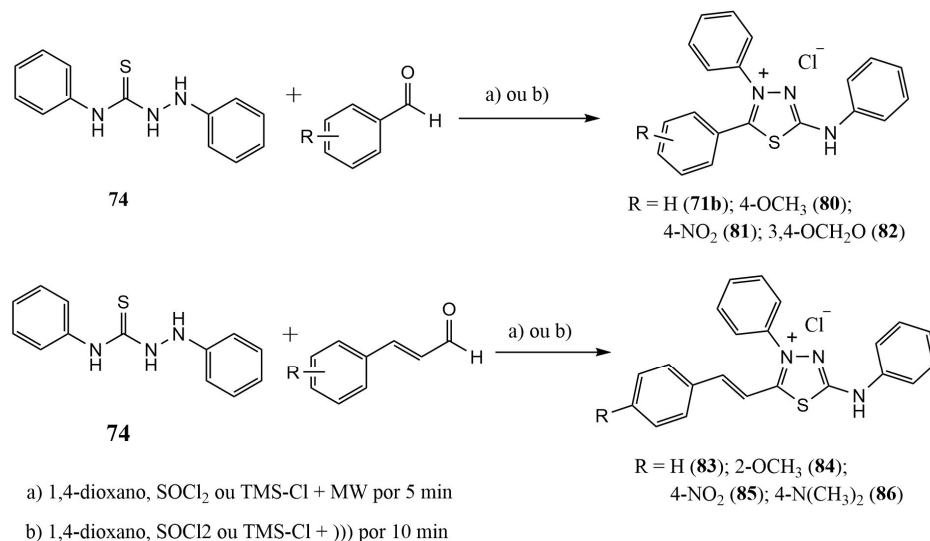


Figura 2.107. Síntese de sais mesoiônicos assistida por micro-ondas e ultrassom.

2.6.1. 1,3,4-Tiadiazólio-2-fenilaminas: atividade anticâncer

Entre todos os cloridratos mesoiônicos da classe de 1,3,4-Tiadiazólio-2-aminidas avaliados biologicamente, o mais estudado, sem dúvida, é o derivado **MI-D** (85, Figura 2.107). Foi demonstrado que essa substância apresenta efeitos citotóxicos em diferentes linhagens de câncer: melanoma humano (MEL-85, SK-MEL, A2058, MEWO) (Senff-Ribeiro et al., 2004), melanoma murino (B16-F10) (Senff-Ribeiro et al., 2003), hepatocarcinoma (HepG2) (Gozzi et al., 2015); leucemia humana (K562), linfoma de Daudi (Reis et al., 2011) e carcinoma de cólon (HT29) (De Oliveira et al., 2024). Com relação a seu mecanismo de ação, sabe-se que o MI-D atua como um desacoplador mitocondrial, diminuindo a permeabilidade da membrana e, em concentrações mais elevadas, inibindo a fosforilação oxidativa entre os complexos II e III (Cadena et al., 1998, 2002).

Além do efeito citotóxico observado *in vitro*, esse composto também exibiu atividade anti-tumoral significativa em modelos animais. Em um primeiro relato, a administração intraperitonal desse mesoiônico, em uma dose de 8mg/kg ou 25 mg/kg, aumentou o tempo de sobrevivência de animais inoculados com tumores de carcinoma ascístico (S180, %T/C = 208) e

Ehrlich (%T/C = 176), respectivamente (Grynberg; Santos; Echevarria, 1997). Na ocasião do estudo, os autores indicaram que nenhuma alteração hematológica foi observada no grupo de animais tratados. No entanto, é possível observar que os animais tratados com o MI-D apresentaram uma contagem de neutrófilos aproximadamente duas vezes superior ($30,3\% \pm 5,2$) que o grupo que recebeu salina ($14,0\% \pm 4,1$) ou DMSO ($11,5\% \pm 7,5$) (Grynberg; Santos; Echevarria, 1997). Embora isso não tenha sido discutido no artigo, talvez seja interessante averiguar se o MI-D é capaz de promover alguma resposta imunológica contra as células cancerígenas – como aumentar a produção de determinadas células de defesa.

Em modelo *in vivo* de melanoma murino, o MI-D inibiu o crescimento tumoral em 85%, após uma única administração intraperitoneal na dose de $57 \mu\text{mol/kg}$ (Senff-Ribeiro et al., 2003). Neste experimento, as células tumorais B16-F10 foram inoculadas somente 24 horas antes tratamento com o mesoiônico. Em outro protocolo, o MI-D foi administrado em três doses consecutivas ($57 \mu\text{mol/kg}$ por dia), com início no oitavo dia após a inoculação dos animais, quando o tumor já estava bem estabelecido. Mesmo neste cenário mais desafiador, também foi observada significativa redução do crescimento tumoral em 64%.

2.6.2. Justificativa e objetivos

Conforme discutido na introdução, o cloridrato mesoiônico **MI-D** tem sido investigado como agente anticâncer em diversas linhagens celulares, sendo elas: melanoma humano e murino, hepatocarcinoma, leucemia humana, linfoma de Daudi e carcinoma de cólon. Essa substância compromete a oxidação fosforilativa mitocondrial, exibindo características de um agente desacoplador em concentrações em que também inibem o transporte de elétrons na cadeia respiratória. As células de câncer possuem um metabolismo alterado que serve para promover seu crescimento, sobrevivência e proliferação. Assim, agentes anticâncer que atuam sobre a mitocôndria e alteram o metabolismo dessas células devem possuir alguma seletividade (Fulda; Galluzzi; Kroemer, 2010). A principal alteração bioenergética observada em células tumorais está relacionada a rota utilizada para a produção de ATP. Essas neoplasias dependem muito mais da via glicolítica e fermentação que células normais. Isso é observado pela maior taxa de consumo de glicose e formação de lactato. Esse fenômeno, conhecido como Efeito Warburg, ocorre mesmo na presença de oxigênio e de uma mitocôndria funcional (Liberti; Locasale, 2016). Essa mudança metabólica, no entanto, não é homogênea, havendo células tumorais que dependem mais da glicólise que outras. Atualmente, é reconhecido que

comprometer tanto a glicólise quanto o metabolismo mitocondrial são necessários para afetar as células tumorais em maior extensão (Liberti; Locasale, 2016).

O presente trabalho propõe avaliar a ação do **MI-D** em células de glioblastoma, tipo tumoral nunca investigado para este composto. O tratamento clínico mais relevante envolve o uso do agente alquilante temozolomida. No entanto, diversos tumores possuem resistência a esse quimioterápico ou adquirem resistência no curso do tratamento. Dessa forma, pensou-se em avaliar se o **MI-D** é capaz de afetar a viabilidade de duas linhagens de glioblastoma, uma sensível (A172) à temozolomida e outra resistente (T98G). A fim de verificar se o comprometimento da oxidação fosforilativa promovida pelo **MI-D** é relevante para seu efeito citotóxico, a viabilidade celular foi avaliada em dois meios de cultura distintos: DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) com alta concentração de glicose (DMEM HG), e em DMEM suplementado com galactose e glutamina (DMEM GAL). Este último meio torna as células mais dependentes da oxidação fosforilativa para a obtenção de ATP – a produção de piruvato a partir da galactose, pela via glicolítica, não gera ATP, de modo que as células passam a depender mais da oxidação fosforilativa (respiração mitocondrial) (Aguer et al., 2011). A glutamina, por sua vez, atua como precursora de um substrato fundamental para a manutenção da oxidação fosforilativa: é convertida em glutamato e depois em α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs (Fan et al., 2013).

O **MI-D** pode ser preparado pela reação de acilação entre o cloreto de *p*-nitrocinamoíla e a 1,4-difeniltiossemicarbazida (Figura 2.108). O cloreto de acila, por sua vez, é preparado pelo tratamento do respectivo ácido carboxílico com cloreto de tionila. O ácido cinâmico necessário, pode ser obtido pela reação de condensação de Knoevenagel entre o *p*-nitrobenzaldeído e o ácido malônico. Para o preparo da 1,4-difeniltiossemicarbazida, o isotiocianato de fenila é reagido com a fenil-hidrazina. A Figura 2.108 mostra a retrosíntese para obtenção do **MI-D**.

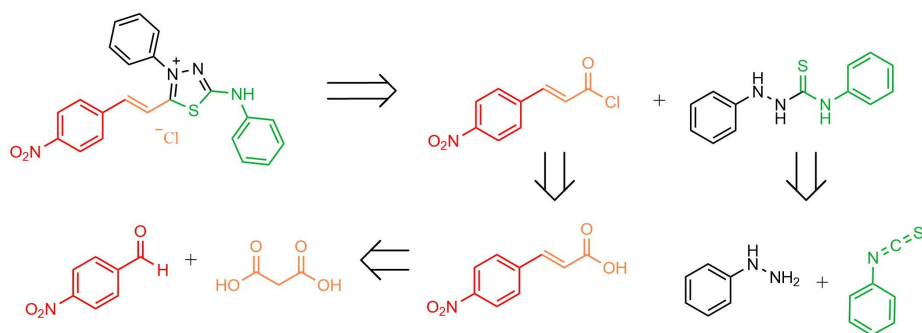


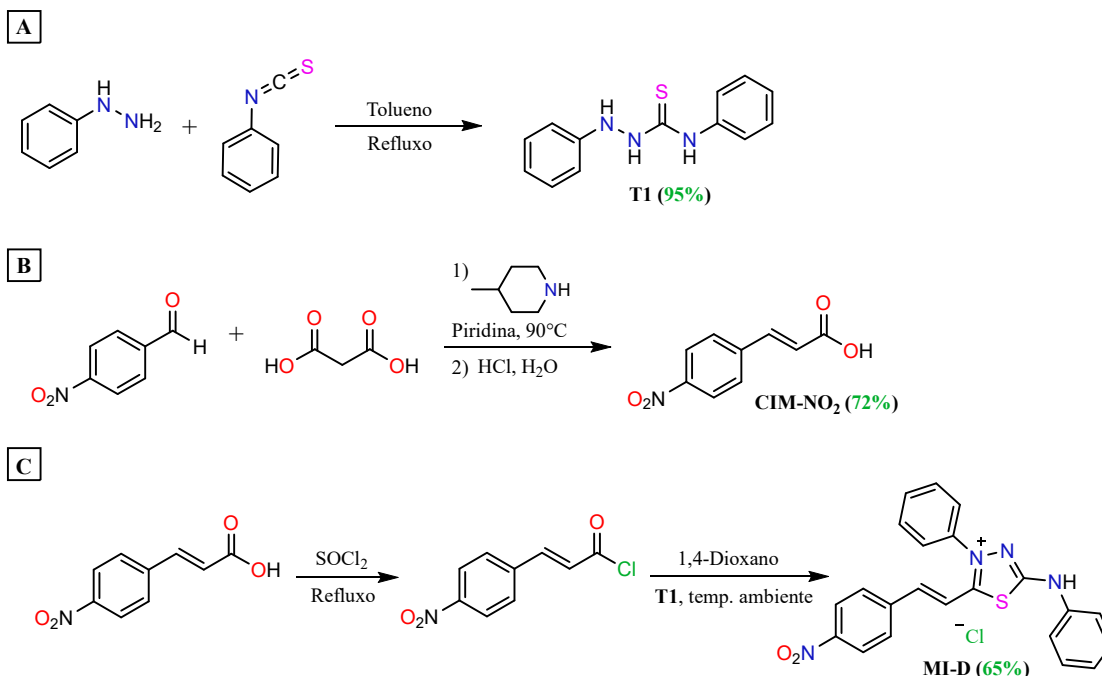
Figura 2.108. Análise retrosintética para o preparo do **MI-D**.

Assim, os objetivos foram:

- Sintetizar e purificar o cloridrato mesoiônico **MI-D**;
- Caracterizá-lo por RMN de ^1H e ^{13}C ;
- Investigar a atividade anticâncer em duas linhagens de glioblastoma: A172 (sensível à temozolomida) e T98G (resistente à temozolomida);
- Avaliar se o comprometimento da oxidação fosforilativa causado pelo **MI-D** está envolvido em sua ação antitumoral;
- Investigar a via de morte celular por apoptose.

2.6.3. Resultados e discussão

2.6.3.1. Síntese do MI-D



Esquema 2.7. Síntese do cloridrato mesoiônico **MI-D**. (A) 10 min em refluxo; (B) 85-90 °C (2 h) e refluxo (10 min); (C) Formação do cloreto de cinamoíla substituído: 4 h de refluxo em SOCl_2 ; **MI-D**: 2 horas em agitação a temperatura ambiente e 24 h em repouso a temperatura ambiente.

O cloridrato mesoiônico **MI-D** foi preparado conforme o Esquema 2.7. Inicialmente, a 1,4-difeniltiossemicarbazida (**T1**) foi obtida pela reação entre o isotiocianato de fenila e fenil-hidrazina. A reação ocorreu em tolueno sob refluxo e o produto foi obtido na forma de um

precipitado branco. Lavagens com tolueno e éter dietílico gelados, seguidas por uma recristalização em etanol, forneceram a 1,4-difeniltiossemicarbazida em sua forma pura, com 95% de rendimento. O ácido *p*-nitrocinâmico (**CIM-NO₂**), por sua vez, foi facilmente preparado pela reação de condensação de Knoevenagel, envolvendo o *p*-nitro-benzaldeído e o ácido malônico. Nesta reação, a piridina foi utilizada como solvente e a 4-metil-piperidina foi empregada como catalisador. O ácido malônico sofre decomposição por descarboxilação ao ser aquecido. Para evitar que isso ocorresse antes de sua reação com o aldeído, a temperatura não foi elevada acima de 90 °C. **CIM-NO₂** foi obtido em 72% de rendimento após lavagem com uma mistura Etanol:hexano (7:3 v/v) quente. Por fim, **CIM-NO₂** foi convertido à cloreto de acila ao ser tratado com cloreto de tionila (SOCl₂) em refluxo. O cloreto de tionila foi empregado em largo excesso e atuou também como solvente da reação. Seu excesso pôde ser facilmente eliminado à pressão reduzida em evaporador rotatório. O cloreto de acila foi utilizado na etapa seguinte sem qualquer isolamento prévio. Para tanto, 1,4-dioxano foi adicionado ao balão e a mistura foi agitada até que praticamente todo o cloreto de acila tivesse dissolvido. Em seguida, os cristais de **T1** foram adicionados. Em poucos minutos de agitação notou-se a completa solubilização do cloreto de acila e da tiossemicarbazida, acompanhada por uma mudança de coloração da solução, de amarela para castanho e então vermelho alaranjado, cor característica do **MI-D**. Após 24 h em repouso no escuro, cristais vermelho alaranjados do **MI-D** foram notados, filtrados e lavados com dioxano e éter dietílico gelados, fornecendo o cloridrato em 65% de rendimento.

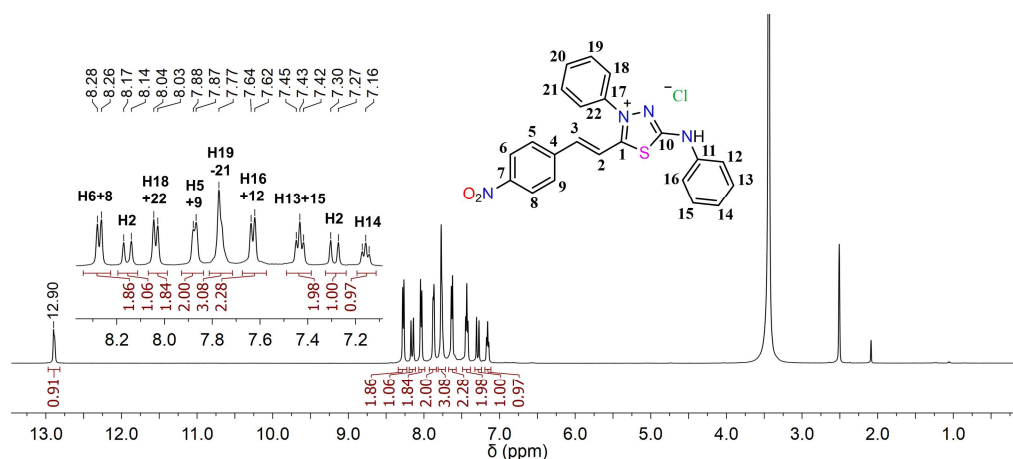
A obtenção dos precursores **T1** e **CIM-NO₂** foi confirmada somente por meio de seus pontos de fusão (Tabela 2.23). Nota-se que as temperaturas de fusão observadas para os sólidos obtidos neste trabalho estão muito próximas daquelas descritas na literatura, indicando que as substâncias foram obtidas com sucesso.

Tabela 2.23. Valores de rendimentos e pontos de fusão obtidos para os compostos **T1** e **CIM-NO₂**, precursores do **MI-D**.

Código	P.F. (°C)	P.F. (°C) literatura	Rendimento (%)
T1	175-176	175-176 ^a	95
CIM-NO₂	284-287	286-287 ^b	72
MI-D	232-235°C	234-236 ^c	65

^a(Soares de Oliveira et al., 2011); ^b(Strappaveccia et al., 2015) ^c(Reis et al., 2011)

Os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C confirmaram a obtenção do **MI-D**. Na Figura 2.109 é possível observar o singlete em 12,90 ppm, característico dos hidrogênios ácidos do grupo fenilamina (NH-Ar). Dois dupletos com constantes de acoplamento de aproximadamente ~ 16 Hz confirmam a presença dos hidrogênios da olefina em configuração *trans*. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.110) destacam-se os carbonos quaternários do anel tiadiazólico em 162,0 ppm (C1) e 159,6 ppm (C10). A ausência de sinais inesperados nos espectros, sugerem que o sólido isolado na reação possui pureza adequada.



2.109. RMN de ^1H do **MI-D** (500 MHz, DMSO-d_6).

Figura

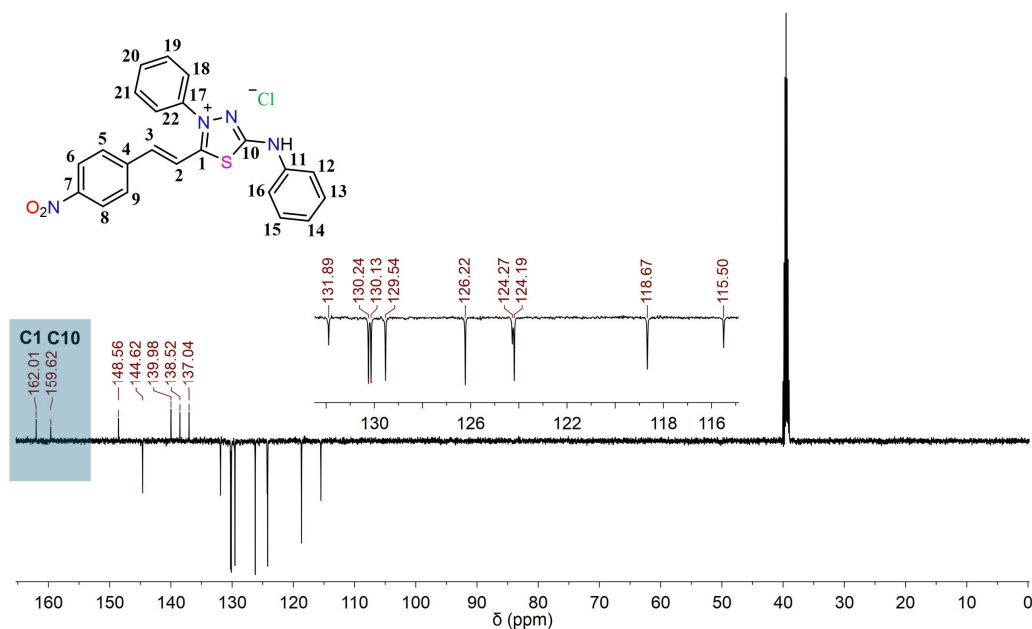


Figura 2.110. RMN de ^{13}C do **MI-D** (125 MHz, DMSO-d_6).

2.6.3.2. Análises Biológicas

Todas as análises biológicas envolvendo o **MI-D** foram realizadas pelo grupo liderado pela Profa. Dra. Sílvia Maria Suter Correia Cadena, na UFPR. Nesta tese serão apresentados alguns dos principais resultados obtidos em células de glioblastoma T98G e A172.

O **MI-D** foi citotóxico para as duas linhagens celulares, de maneira dose-dependente. (Figura 2.111). Fica claro pelos valores de IC_{50} que a sua ação foi mais pronunciada na linhagem T98G, resistente ao quimioterápico mais empregado no tratamento de Glioblastomas, a Temozolomida (TMZ). Kanzawa e colaboradores (Kanzawa et al., 2003) reportaram que a TMZ, com 2 dias de tratamento, apresenta um valor de IC_{50} contra essa linhagem acima de 500 μ M. O **MI-D**, por sua vez, em apenas 24 h de tratamento exibe valores de IC_{50} inferiores a 20 μ M – o que destaca seu potencial para o tratamento de tumores resistentes à TMZ. 24 h de tratamento com 25 μ M de **MI-D** reduziu a viabilidade das células A172 e T98G em 53% e 71%, respectivamente. Nestas mesmas condições, células HepG2 tiveram sua viabilidade reduzida em apenas 28%, conforme descrito em publicação anterior do grupo (Pereira et al., 2021). Essa diferença sugere que o **MI-D** deve apresentar algum grau de seletividade tecidual. Além disso, **MI-D** apresentou maior citotoxicidade quando as células (A172 e T98G) foram cultivadas em DMEM-GAL, meio que as torna mais dependentes da oxidação fosforilativa para a obtenção de ATP – a falta de glicose compromete a glicólise e torna as células mais susceptíveis a distúrbios mitocondriais já que compensar a produção de ATP pela glicólise e via do lactato é mais dificultosa nestas condições. Esse resultado indica que o efeito citotóxico do **MI-D** nestas células deve envolver, ao menos em parte, disfunções mitocondriais relevantes.

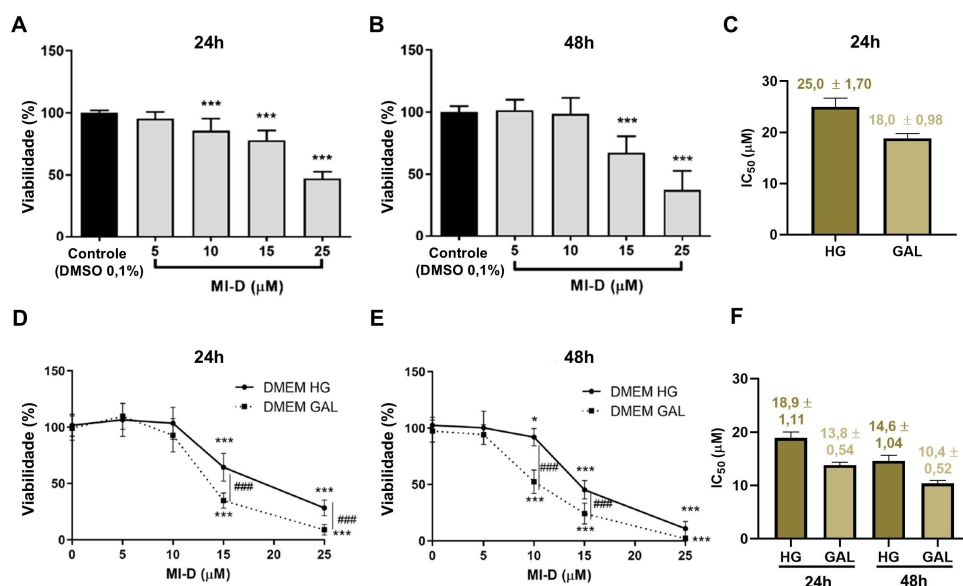


Figura 2.111. Efeito do **MI-D** na viabilidade de células A172. (A) Ensaio de MTT feito com 24 h de incubação e em meio DMEM-HG; (B) Ensaio de MTT feito com 48 h de incubação e em meio DMEM-HG; (C) IC₅₀ determinado em linhagem A172, com 24 h de tratamento. Os valores representam a média \pm SD de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$ significativamente diferente do controle (DMSO 0,1%). Efeito do **MI-D** na viabilidade de células T98G. (D) Ensaio de MTT feito com 24 h de incubação; (E) Ensaio de MTT feito com 48 h de incubação; (F) IC₅₀ determinado em linhagem T98G, com 24 h de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão (D.P.) de quatro experimentos independentes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ significativamente diferente do controle.

Em seguida, foi investigado se o **MI-D** (IC₂₅) seria capaz de causar alterações no consumo de oxigênio de células A172 cultivadas em meio DMEM-HG (Figura 2.112). Em condições basais, quando a respiração era sustentada apenas por substratos endógenos, o consumo de oxigênio pelas células A172 não foi afetado pelo tratamento com **MI-D**. Após a adição de oligomicina (estado *leak*), o **MI-D** estimulou o consumo de oxigênio independente da síntese de ATP em 45%. Ainda, **MI-D** reduziu a capacidade máxima da cadeia transportadora de elétrons (estado desacoplado, obtido por titulação com FCCP) em 23%. Consequentemente, a capacidade respiratória de reserva (estado desacoplado – estado basal) também foi reduzida em 23% na presença do **MI-D**. Neste meio de cultivo, o tratamento com o **MI-D** resultou em maior produção de lactato (Figura 40E), indicando que mediante inibição da oxidação fosforilativa, observada nos experimentos de consumo de oxigênio, as células mudam seu metabolismo para a glicólise possivelmente à fim de manter os níveis de ATP. De fato, o tratamento com 5 ou 15 μ M de **MI-D** não alterou a quantidade de ATP, sugerindo que a glicólise deve ter sido capaz de compensar a produção reduzida pela fosforilação oxidativa.

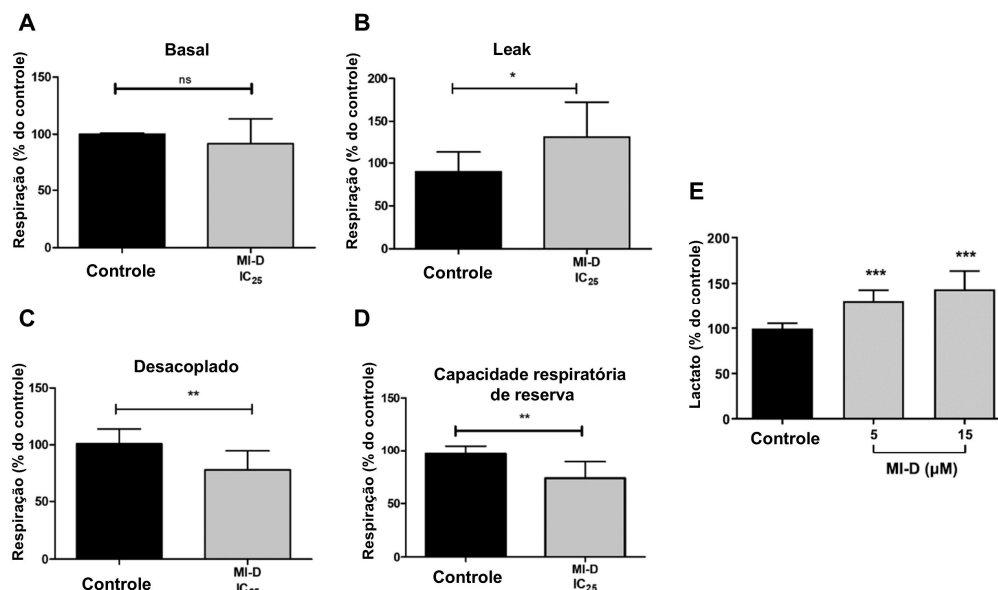


Figura 2.112. (A-D) Análise de respirometria de alta resolução para avaliar a função mitocondrial em células A172 cultivadas em DMEM-HG e tratadas com **MI-D**. Resultados expressos em porcentagem em relação ao controle, considerado como 100%. Os valores de consumo de oxigênio das células controle (pmol/(s × 10⁶ células)) foram: basal: 72,8 ± 14,11; leak: 22,5 ± 4,91; desacoplado: 175,4 ± 35,53; capacidade respiratória de reserva: 105,7 ± 14,03. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (D.P.) de três experimentos independentes. *p < 0,05; **p < 0,01, significativamente diferente do controle. (E) Níveis de lactato e em células A172 na presença ou ausência de **MI-D**. Para o ensaio de lactato: controle 100%: 232,9 ± 60,5 nmol de lactato/mg de proteína. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (D.P.) de três experimentos independentes. ***p < 0,001, significativamente diferente do controle.

Esperava-se que o consumo de oxigênio em estado basal, na ausência do **MI-D**, fosse superior em células cultivadas em meio DMEM-GAL, já que dependem muito mais da oxidação fosforilativa para obter ATP. De fato, foi observado um estímulo de ~33% no estado basal nas condições controle (ausência de **MI-D**) em culturas celulares em DMEM GAL, quando comparadas ao DMEM HG [valor do consumo de oxigênio das células controle em DMEM HG: 72,8 ± 14,11; DMEM GAL: 97,1 ± 31,25 pmol/(s × 10⁶ células)]. Esse resultado confirma que o meio DMEM GAL foi capaz de causar uma mudança metabólica nas células, tornando-as mais dependentes da oxidação fosforilativa. Nestas condições, o **MI-D** foi capaz de alterar significativamente as taxas de respiração (Figura 2.113A-D): os estados de respiração basal e desacoplada (FCCP) foram reduzidos em cerca de 20% e a capacidade respiratória mitocondrial de reserva também foi significativamente reduzida pelo **MI-D** (19%). Assim, em concordância com os ensaios de MTT, os experimentos de consumo de oxigênio mostram que a citotoxicidade desse cloridrato mesoiônico em células A172 deve estar parcialmente relacionada aos seus efeitos na mitocôndria. No meio DMEM GAL não foi observada maior produção de lactato

quando as células foram tratadas com o **MI-D**. Pelo contrário, foi observada uma redução de 18% nos níveis desse metabólito. Além disso, neste meio de cultivo, o tratamento com o **MI-D** causou redução nos níveis de ATP. Dessa forma, quando a célula depende mais da oxidação fosforilativa para provisão energética (DMEM-GAL), o tratamento com o **MI-D** afeta a mitocôndria e reduz a produção de ATP por essa via; uma vez que a quantidade de glicose presente no meio é bem reduzida, as células não são capazes de aumentar as taxas da via glicolítica para compensar a perda de ATP (menores níveis de ATP e sem aumento nos níveis de lactato).

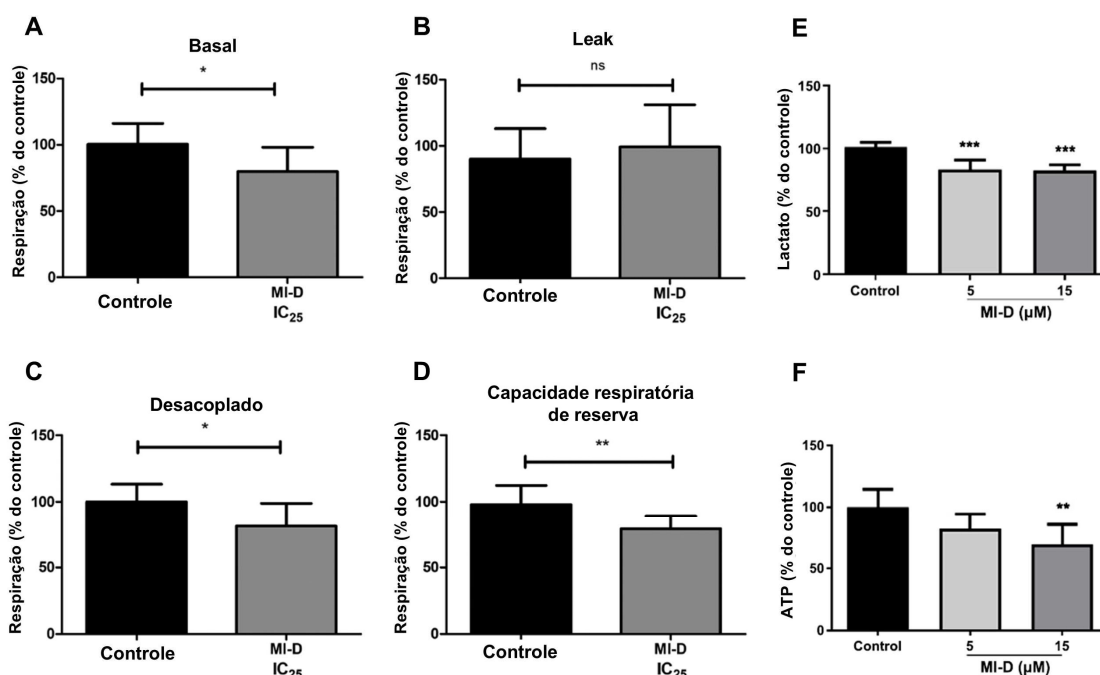


Figura 2.113. (A-D) Respiração de células A172 sob mudança metabólica (dependente de OxPhos) na presença ou ausência de **MI-D**. Resultados expressos como valores de consumo de oxigênio (pmol/(s × 10⁶ células)) em relação ao controle, considerado como 100%. Valores de consumo de oxigênio das células controle (pmol/(s × 10⁶ células)) – basal: 97,1 ± 31,25; vazamento: 25,7 ± 6,34; desacoplado: 177,5 ± 27,60; capacidade respiratória reserva: 88,5 ± 11,70. Resultados expressos como média ± desvio padrão (D.P.) de três experimentos independentes. *p < 0,05; **p < 0,01, significativamente diferente do controle. (E-F) Efeitos de **MI-D** sobre os níveis de metabólitos em células A172 submetidas a uma mudança metabólica. (E) Níveis de lactato (Controle 100%: 253,4 ± 54,2 nmol de lactato/mg de proteína); (E) Níveis de ATP (Controle 100%: 2,5 ± 0,61 nmol de ATP/mg de proteína). Resultados expressos como média ± desvio padrão (D.P.) de três ensaios independentes. **p < 0,01; ***p < 0,001, significativamente diferente do controle.

As células T98G também foram cultivadas nos dois meios, DMEM HG e DMEM GAL. As células cultivadas em meio DMEM-GAL apresentaram maiores taxas de respiração (Tabela 2.24) e menores níveis de lactato (Figura 2.114D), confirmando a mudança metabólica para a

oxidação fosforilativa. Nos dois meios, o tratamento com **MI-D** foi capaz de alterar a respiração nos estados basal e desacoplado, além de reduzir a capacidade respiratória de reserva. Ao contrário do que ocorreu com as células A172, não foi observado aumento significativo nos níveis de lactato em ambos os meios de cultivo, indicando que as células não foram capazes de estimular a via glicolítica para compensar as alterações mitocondriais causadas pelo **MI-D**. Trabalhos anteriores demonstram que linhagens celulares de glioma que são predominantemente glicolíticas, como a T98G, não são capazes de executar glicólise compensatória mesmo quando a síntese mitocondrial de ATP é inibida (Rodrigues-Silva et al., 2017). Essa característica pode, ao menos em parte, explicar a maior potência do **MI-D** sobre a viabilidade das células T98G em comparação com as células A172. No entanto, em meio DMEM-HG, a quantidade de ATP não foi alterada, enquanto em meio DMEM-GAL houve aumento em seus níveis. O maior nível de ATP foi inesperado, já que se esperava que as células T98G em meio DMEM-GAL não fossem capazes de estimular a via glicolítica para maior produção energética, compensando as perdas na oxidação fosforilativa. É possível, no entanto, que o tratamento com o **MI-D** não tenha aumentado a produção de ATP, mas reduzido, por algum motivo, sua taxa de consumo de nessas células.

Tabela 2.24. Mudança do meio de cultivo e sua influência na respiração celular.

	DMEM-HG	DMEM-GAL
	Fluxo de oxigênio [pmol/ (sec × 10 ⁶ cells)]	
Estado Basal	32,6 ± 2,26	44,3 ± 3,33*
Estado Desacoplado	95,1 ± 5,36	125,6 ± 7,29**
Capacidade respiratória de reserva	64,5 ± 19,55	84,3 ± 14,10**

Resultados expressos como média ± desvio padrão (D.P.) (n = 9). *p < 0,05 e **p < 0,01, significativamente diferentes das células cultivadas em DMEM HG. Um teste t não pareado foi utilizado para comparar os valores de consumo de oxigênio das células controle cultivadas nos diferentes meios

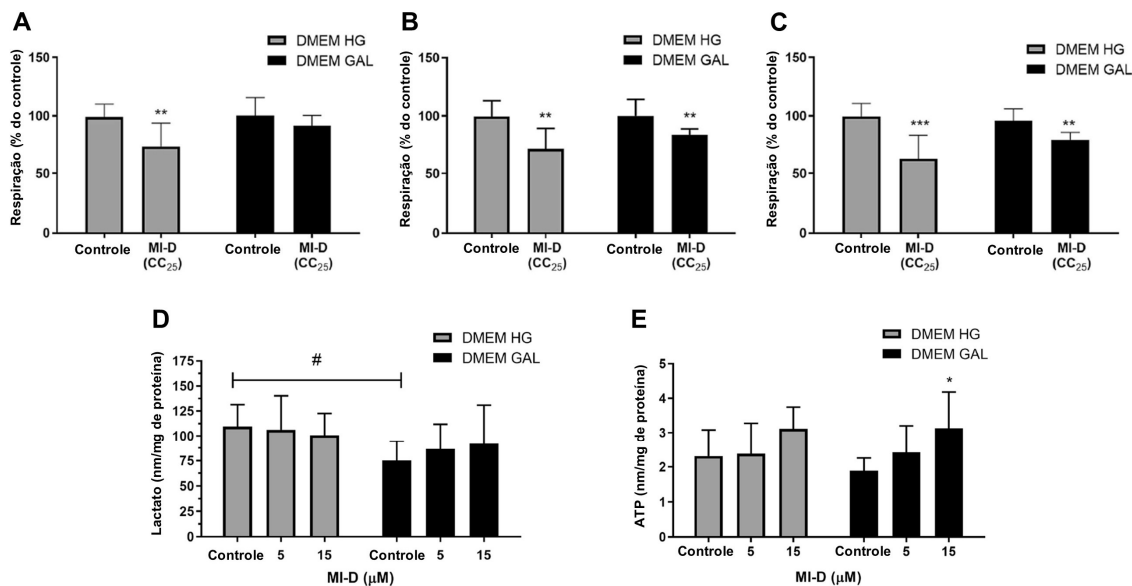


Figura 2.114. Efeito do **MI-D** sobre a respiração de células T98G intactas. Os valores de consumo de oxigênio foram expressos em pmol/(s × 10⁶ células) em relação ao controle, considerado como 100%. (A-C) Análise quantitativa do efeito do **MI-D** sobre a respiração de células T98G no estado basal (A), estado desacoplado (B) e capacidade respiratória de reserva (C). Resultados expressos como média ± desvio padrão (D.P.). **p < 0,01, significativamente diferente do respectivo controle. (D-E) Efeito do **MI-D** sobre os níveis de lactato (D) e ATP (E) em células T98G. Resultados expressos como média ± desvio padrão (D.P.). *p < 0,05, significativamente diferente do controle. #p < 0,05, comparação entre os meios DMEM HG e GAL.

O processo de morte celular por apoptose pode envolver o a ativação da enzima caspase-3. Essa é ativada após sua clivagem em duas subunidades que se associam para formarem um dímero. Esse dímero, que corresponde a forma ativa da enzima, promovem diversos efeitos na célula, culminando em sua morte celular. Buscou-se averiguar se o tratamento com o **MI-D** seria capaz de promover a ativação dessa proteína. Para tanto, um anticorpo recombinante específico para a forma ativa da caspase-3 foi adicionado às células tratadas (**MI-D** 15μM) e não tratadas (DMSO 0,1%). O percentual de células marcadas para caspase-3 ativa foi então avaliado por citometria de fluxo. Enquanto a compotecina (controle positivo) induziu aumento percentual da forma ativa em 3 vezes, quase todas as células A172 e T98G mostraram-se positivas quando tratadas com o **MI-D** (Figura 2.115). Assim, foi demonstrado que o **MI-D** induziu morte celular por apoptose ambas as células, processo que pode ter ocorrido devido às disfunções mitocondriais causadas por esse cloridrato mesoiônico.

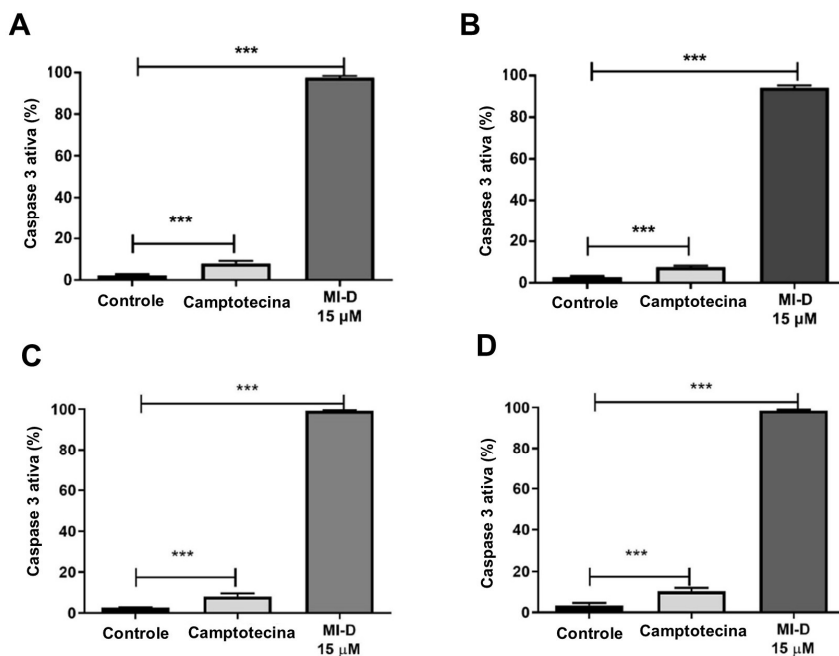


Figura 2.115. Efeito do tratamento com **MI-D** sobre os níveis de caspase-3 ativa em células A172 (A-B) e T98G (C-D). As células foram incubadas por 24 horas com 5 µM de camptotecina (controle positivo), 15 µM de **MI-D** ou 0,1% de DMSO em DMEM HG ou DMEM GAL (controle). A análise quantitativa dos dados de citometria de fluxo obtidos para cada meio está apresentada nos gráficos. Os valores representam a média ± desvio padrão (D.P.) de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata (n = 8). ***p < 0,001, indicando diferença significativa em relação ao controle.

2.6.4. Conclusões e perspectivas

O **MI-D** demonstrou ser citotóxico para células de glioblastoma sensíveis (A172) e resistentes (T98G) à temezolomida. Experimentos de consumo de oxigênio e monitoramento de lactato e ATP indicaram que a sua citotoxicidade pode estar ao menos parcialmente relacionada a disfunções mitocondriais causadas por seu tratamento. A maior potência dessa substância em células cultivadas em meio DMEM-GAL, corroboram essa hipótese. Por fim, foi observado que independente da linhagem celular e das condições de cultivo das células, **MI-D** causa morte celular por apoptose, via ativação da caspase-3.

Todos os experimentos realizados com o **MI-D** até o momento mostram que seus efeitos na mitocôndria são significativos. No entanto, o exato mecanismo por trás das alterações mitocondriais ainda não é completamente conhecido. Seria interessante averiguar se esses efeitos são causados diretamente por esse composto ou se são secundários, causados, por exemplo, pela ativação das vias de apoptose. Para tanto, sugere-se que no futuro os experimentos de consumo de oxigênio e quantificação de lactato e ATP sejam realizados na

presença de inibidores das caspases, como Z-VAD-FMK [inibidor de múltiplas caspases (3,7, 8 e 9) (Van Noorden, 2001), Ac-DEVD-CHO (inibidor das caspases 3 e 7) (Zhang et al., 2014); Z-IETD-FMK (inibidor da caspase 8) (Wang et al., 2018a) e Z-LEHD-FMK (inibidor de caspase 9) (Ozoren et al., 2000), Q-VD-OPh [inibidor de múltiplas caspases (3, 9, 8, 10 e 12)] (Caserta et al., 2003). Se a ativação prévia de alguma dessas caspases for necessária para que o **MI-D** cause alterações mitocondriais, o pré-tratamento das células com os inibidores de caspase deve ser capaz de impedir que as alterações respiratórias sejam observadas, além de manter os níveis de lactato e ATP. Além disso, caso realmente a ativação dessas caspases seja necessária para a morte celular, como foi sugerido no presente trabalho, os inibidores de caspases (especialmente da caspase-3) devem aumentar a viabilidade de culturas células tratadas com o **MI-D**. Uma outra possibilidade, seria avaliar os efeitos do **MI-D** em células com diferentes expressões de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1) e apoptóticas (Bax, e Bak), como por exemplo em células de fibroblasto embrionário de camundongo *knockout* para BAX, BAK, Bcl-2 entre outras. Caso o mecanismo de ação dependa, por exemplo, da ativação da proteína Bax, células que não a expressam devem ser menos sensíveis ao **MI-D**.

Compreender o mecanismo de ação dessa substância certamente possibilitará o planejamento de novos cloridratos mesoiônicos, ou análogos estruturas dessas substâncias, mais potentes e seletivos.

2.6.5. Materiais e métodos

Todos os reagentes e solventes foram adquiridos da Sigma-Aldrich/Merck e Neon, respectivamente, e utilizados sem qualquer purificação adicional. Os pontos de fusão (p.f.) foram determinados em um aparelho Gehaka PF 1500 Farma e não foram corrigidos. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) foram obtidos em temperatura ambiente em um espectrômetro Bruker Avance III Ultrashield Plus, utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

2.6.5.1. Síntese do MI-D

2.6.5.2. Síntese da 1,4-difeniltiossemicarbazida

Foram adicionados 35 mL de tolueno, previamente seco em CaCl_2 , e 3,4 mL de isotiocianato de fenila (25 mmols) em um balão de duas bocas de 100 mL de capacidade equipado com um funil de adição e um condensador de refluxo com tubo de cloreto de cálcio na extremidade. A solução foi colocada em refluxo, e aos poucos 2,5 mL de fenilhidrazina (25 mmols) foram adicionados através do funil de adição. A mistura foi deixada em refluxo por 10 minutos, período em que grande quantidade de produto precipitou na forma de sólido branco. A mistura foi resfriada em banho de gelo e posteriormente filtrada à vácuo, sendo o sólido lavado com pequenas porções de tolueno e éter gelados. O produto bruto foi, por fim, purificado por recristalização em etanol. Rendimento: 95%. P.F.: 175-176 °C (lit. 175-176 °C, Soares de Oliveira et al., 2011).

2.6.5.3. Síntese do ácido *p*-nitrocinâmico.

Em um balão de 25 mL de capacidade foram adicionados 12,5 mmols do *p*-nitro-benzaldeído (1,89 g), 25 mmols de ácido malônico (2,61 g), 4-metil-piperidina (0,48 mL, 4 mmol) 5,0 mL de piridina. O sistema foi conectado a um condensador de refluxo e colocado em banho de glicerina por 2 horas, pré-estabilizado em 85-90 °C. Em seguida, a mistura foi aquecida em refluxo 10 minutos. Após esse período, foi resfriada e acidificada com solução aquosa de HCl 20% até completa precipitação do produto. O sólido obtido foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada. **CIM-NO₂** foi purificado por lavagem com etanol:hexano (7:3, v/v) quente. Rendimento: 72%. P.F.: 284-287 °C (lit. 286-287 °C, Strappaveccia et al., 2015).

2.6.5.4. Formação do cloridrato mesoiônico

Em um balão de fundo redondo com 25 mL de capacidade, acoplado a um condensador de refluxo com tubo de secagem, foi adicionado 6 mmols do ácido *p*-nitro-cinâmico correspondente e 4,4 mL de cloreto de tionila (60 mmols). A mistura foi mantida sob agitação constante e em refluxo durante 4 horas. Em seguida, o excesso de cloreto de tionila foi eliminado em evaporador rotatório. Então, 7,5 mL de dioxano previamente seco em CaCl_2 , foi adicionado ao balão contendo o cloreto de acila. Em seguida, os cristais de 1,4-difeniltiossemicarbazida (1,46 g, 6 mmols) foram adicionados em uma única porção. A mistura foi deixada sob agitação por 2 horas e mantida em repouso por 24 h. Os cristais vermelho-

alaranjados formados foram filtrados e lavados com o mínimo de 1,4-dioxano e éter dietílico gelados.

MI-D. Cristais vermelho-alaranjados, rendimento: 65%; P.F.: 232–235 °C (lit. 234-236 °C, Reis et al., 2011). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 12,90 (s, 1H, NH), 8,27 (d, *J* 8,50 Hz, 1H, H6+8), 8,15 (d, 1H, *J* 16,02 Hz, H2), 8,03 (d, 2H, *J* 8,43 Hz, H18+22), 7,87 (d, 2H, *J* 5,93 Hz, H5+9), 7,77 (s, 3H, H19-21), 7,63 (d, 2H, *J* 7,76 Hz, H16+12), 7,43 (t, 2H, *J* 7,76 Hz, H13+15), 7,28 (d, 2H, *J* 16,02 Hz, H2), 7,28 (t, 1H, *J* 7,29 Hz, H14). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 162,0 (C1), 159,6 (C10), 148,6 (C7), 144,6 (C2), 140,0, 138,5, 137,0, 131,89 (C20), 130,2, 130,1, 129,5, 126,2, 124,3 (C14), 124,2, 118,7, 115,5 (C3).

2.6.5.5. Análises biológicas

Todas as análises biológicas envolvendo o **MI-D** foram realizadas pelo grupo liderado pela Profa. Dra. Sílvia Maria Suter Correia Cadena, na UFPR. Nesta tese serão apresentados alguns dos principais resultados obtidos em células de glioblastoma T98G e A172.

2.6.5.6. Ensaio de viabilidade

A viabilidade das células A172 e T98G foi determinada pelo ensaio de MTT (Sladowski et al., 1993). Para esses experimentos, 1×10^4 células foram transferidas para cada poço de placas de 96 poços e, após 24 h, as células foram incubadas na presença ou ausência de **MI-D** (5, 10, 15, 25 μM) por 24 e 48 h a 37 °C e 5% de CO_2 . As células aderentes foram incubadas com a solução de MTT (0,5 mg/mL) a 37 °C por 3 h. Os cristais de formazan foram dissolvidos com DMSO:etanol (1:1), e a absorbância foi medida por um leitor de microplacas (Epoch) nos comprimentos de onda de 570 nm e 690 nm (referência). A viabilidade celular foi normalizada em relação ao controle (100%), que consistiu nos meios DMEM HG ou DMEM GAL com 0,1% de DMSO.

2.6.5.7. Consumo de oxigênio em células intactas

A respiração de células intactas foi medida com um Oxygraph-2k (OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Áustria) a 37 °C, sob agitação leve. 2×10^6 células foram cultivadas em placas de cultura (100 mm) e incubadas por 24 h com o **MI-D** na concentração

de IC₂₅. Após esse período, as células viáveis ($2 \times 10^6/\text{mL}$) foram colocadas nas câmaras do equipamento contendo meio DMEM HG ou DMEM GAL. O consumo de oxigênio foi avaliado no estado basal de respiração (ausência de inibidores ou desacopladores), no estado leak (presença de oligomicina) e no estado desacoplado (presença do desacoplador FCCP). A capacidade máxima do sistema de transporte de elétrons mitocondrial foi obtida por titulação com FCCP, até alcançar 10 μM (Ruas et al., 2016). A capacidade respiratória de reserva (SRC) foi calculada pela diferença entre o estado desacoplado e a respiração basal. O fluxo de oxigênio foi expresso por milhão de células [$\text{pmol}/(\text{s} \times 10^6 \text{ células})$], e os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle.

2.6.5.8. Dosagem de lactato e ATP

8×10^5 células foram cultivadas em placas de cultura de 60 mm e, após 24 h, as células foram tratadas com o **MI-D** (5 e 15 μM) por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. O sobrenadante foi coletado e centrifugado à 5000 rpm durante 5 min. Em seguida, os níveis de lactato foram quantificados pelo método de Gutmann e Wahlefeld (Gawehn, 1974). As células aderentes foram coletadas e utilizadas para medir os níveis intracelulares de ATP utilizando um kit de ensaio bioluminescente para ATP [(ATP) *bioluminescent somatic cell assay kit*, FLASC—Sigma-Aldrich], conforme as instruções do fabricante. A concentração de ATP foi calculada por meio de uma curva padrão de ATP e a medida de fluorescência foi feita em um leitor TECAN Infinite.

2.6.5.9. Dosagem de caspase-3 ativa

A caspase-3 ativa foi medida utilizando o kit PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Bioscience, New Jersey, EUA). 8×10^5 células foram cultivadas em placas de cultura de 60 mm e, após 24 h, as células aderentes foram incubadas com 15 μM de **MI-D**, 5 μM de camptotecina e em condições controle por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Todas as células da cultura (aderentes e em suspensão) foram coletadas. Em seguida, as instruções fornecidas pelo fabricante foram seguidas para fixar, permeabilizar as células e corar para caspase-3 ativa. A medida foi realizada por citometria de fluxo (BD Accuri C5®). Para cada amostra, foram adquiridos 100.000 eventos.

2.7. Referências bibliográficas

- ABATE, Chiara *et al.* Metal-Based Compounds in Antiviral Therapy. **Biomolecules**, v. 12, n. 7, 2022.
- ABDELGAWAD, Mohamed A. *et al.* Phthalazone tethered 1,2,3-triazole conjugates: In silico molecular docking studies, synthesis, in vitro antiproliferative, and kinase inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 133, p. 106404, 1 abr. 2023.
- ADASME, Melissa F. *et al.* PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W530–W534, 2021.
- AFONIN, Andrei V. *et al.* Solvent-induced E/Z isomerization of 2-(furylmethylidene)-1-hydrazinecarbothioamide: The N–H···O intramolecular hydrogen bond as promoting factor. **Journal of Molecular Structure**, v. 1207, p. 127782, 5 maio 2020.
- AGRAWAL, K. C.; SARTORELLI, A. C. 7 The Chemistry and Biological Activity of α -(N)-Heterocyclic Carboxaldehyde Thiosemicarbazones. *In*: ELLIS, G. P.; WEST, G. B. (Orgs.). **Progress in Medicinal Chemistry**. [S.l.]: Elsevier, 1978. v. 15 p. 321–356.
- AGUER, Céline *et al.* Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28536, 2011.
- AGUIRRE, Andrea R. *et al.* Structural and theoretical studies on copper(II) and zinc(II) complexes with a 9-anthraldehyde-derived thiosemicarbazone. **Polyhedron**, v. 217, p. 115724, 1 maio 2022.
- AKHTAR, Wasim *et al.* The therapeutic journey of pyridazinone. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 256–281, 10 nov. 2016.
- ALBALADEJO, María José; ALONSO, Francisco; GONZÁLEZ-SORIA, María José. Synthetic and Mechanistic Studies on the Solvent-Dependent Copper-Catalyzed Formation of Indolizines and Chalcones. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 6, p. 3446–3456, 5 jun. 2015.
- ALLEN, Frank H. *et al.* Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 12, p. S1–S19, 1987.
- ARZUK, Ege *et al.* Novel Pyrazole Derivatives Bearing Carbonitrile and Substituted Thiazole Moiety for Selective COX-2 Inhibition. **ChemistrySelect**, v. 9, n. 1, p. e202304783, 8 jan. 2024.
- ASHTEKAR, Kumar Dilip; STAPLES, Richard J.; BORHAN, Babak. Development of a Formal Catalytic Asymmetric [4 + 2] Addition of Ethyl-2,3-butadienoate with Acyclic Enones. **Organic Letters**, v. 13, n. 21, p. 5732–5735, 2011.
- ASIF, Mohammad *et al.* Studies on new substituted pyridazinones: synthesis and biological evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p. e00040, 2018.

AYE, Yimon; LONG, Marcus J. C.; STUBBE, JoAnne. Mechanistic Studies of Semicarbazone Triapine Targeting Human Ribonucleotide Reductase in Vitro and in Mammalian Cells: TYROSYL RADICAL QUENCHING NOT INVOLVING REACTIVE OXYGEN SPECIES *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 42, p. 35768–35778, 2012.

AZAD, Mahan Gholam *et al.* NDRG1 and its family members: More than just metastasis suppressor proteins and targets of thiosemicarbazones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 301, n. 7, p. 110230, 1 jul. 2025.

BABCOCK, Jeremiah J.; BRANCALEON, Lorenzo. Bovine serum albumin oligomers in the E- and B-forms at low protein concentration and ionic strength. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 53, p. 42–53, 1 fev. 2013.

BACKMAN, Tyler W. H.; CAO, Yiqun; GIRKE, Thomas. ChemMine tools: an online service for analyzing and clustering small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl_2, p. W486–W491, 1 jul. 2011.

BAEV, Artyom Y. *et al.* Mitochondrial Permeability Transition, Cell Death and Neurodegeneration. **Cells**, v. 13, n. 7, 2024.

BAJUSZ, Dávid; RÁCZ, Anita; HÉBERGER, Károly. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? **Journal of Cheminformatics**, v. 7, n. 1, p. 20, 20 maio 2015.

BAKER, Wilson; OLLIS, W. D. Meso-ionic compounds. **Quarterly Reviews, Chemical Society**, v. 11, n. 1, p. 15–29, 1957.

BAKER, Wilson; OLLIS, W. D.; POOLE, V. D. 73. Cyclic meso-ionic compounds. Part I. The structure of the sydnones and related compounds. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 307–314, 1949.

BALACHANDRAN, Hardha *et al.* Advances in Structure-Based PARP1 Inhibitors: Implications for Cancer Treatment. **Current Enzyme Inhibition**, 2025.

BANGHAM, Charles R. M. *et al.* HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15012, 2015.

BARBOSA, Igor Resendes *et al.* Synthesis of copper(II) and zinc(II) complexes with chalcone–thiosemicarbazone hybrid ligands: X-ray crystallography, spectroscopy and yeast activity. **Transition Metal Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 739–751, 1 nov. 2018.

BARSKY, Inna *et al.* Disappearing and Reappearing Polymorphism in p-Methylchalcone. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 1, p. 63–70, 2008.

BASHA, Maram T. *et al.* Kinetico-mechanistic studies on methemoglobin generation by biologically active thiosemicarbazone iron(III) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 162, p. 326–333, 2016.

BATISTELLA, Gabriel Novaes de Rezende *et al.* Approaching glioblastoma during COVID-19 pandemic: current recommendations and considerations in Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 79, p. 167–172, 2021.

BAZARBACHI, Ali *et al.* Meta-Analysis on the Use of Zidovudine and Interferon-Alfa in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma Showing Improved Survival in the Leukemic Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 27, p. 4177–4183, 2010.

BEISSERT, Stefan; SCHWARZ, Agatha; SCHWARZ, Thomas. Regulatory T Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 1, p. 15–24, 1 jan. 2006.

BENTLEY, Colene *et al.* Impact of cancer on income, wealth and economic outcomes of adult cancer survivors: a scoping review. **BMJ open**, v. 12, n. 9, p. e064714, 2022.

BERTHOLET, Ambre M. *et al.* Mitochondrial uncouplers induce proton leak by activating AAC and UCP1. **Nature**, v. 606, n. 7912, p. 180–187, 2022.

BIJARI, Nooshin *et al.* Elucidating the interaction of letrozole with human serum albumin by combination of spectroscopic and molecular modeling techniques. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 4, 2018.

BLAKELEY, Jaishri O. *et al.* Phase II Study of Iniparib with Concurrent Chemoradiation in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 1, p. 73–79, 3 jan. 2019.

BLUME, E. Über Endothio-5-phenyl-1-paratolylthiobiazolin. **Journal für Praktische Chemie**, v. 67, n. 1, p. 257–262, 1903.

BOLTZE, K. H.; DELL, H. D. Über die Umsetzung von 1-Methyl-phthalazin-und 1-Methylphthalazinon-Derivaten. **Archiv der Pharmazie**, v. 299, n. 8, p. 702–708, 1966.

BOLTZE, K. H.; DELL, H. D.; LEHWALD, H. lorenz, D.; Rueberg-Schweer, MS. **Arzneimittel-forschung**, v. 13, p. 688, 1963.

BORMIO NUNES, Julia H. *et al.* Cancer Cell Resistance Against the Clinically Investigated Thiosemicarbazone COTI-2 Is Based on Formation of Intracellular Copper Complex Glutathione Adducts and ABCC1-Mediated Efflux. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 22, p. 13719–13732, 25 nov. 2020.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024.

BRITTO, M. M. *et al.* On the synthesis of mesoionic 1, 3, 4-thiadiazolium-2-aminide and precursors. **Heterocyclic Communications**, v. 4, n. 3, p. 209–216, 1998.

BRITTON, Hugh *et al.* Discovery and Development of an Efficient Process to Atovaquone. **Organic Process Research & Development**, v. 16, n. 10, p. 1607–1617, 2012.

- BROCKMAN, R. Wallace *et al.* Observations on the Antileukemic Activity of Pyridine-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone and Thiocarbohydrazone*. **Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. 167–170, 1 fev. 1956.
- BRUKER AXS INC. **Bruker, SADABS**. Madison, Wisconsin, USA, 2001.
- BRUKER AXS INC. **Bruker, APEX2**. Madison, Wisconsin, USA, 2012a.
- BRUKER AXS INC. **Bruker, SAINT**. Madison, Wisconsin, USA, 2012b.
- BURMAOGLU, Serdar *et al.* Design of potent fluoro-substituted chalcones as antimicrobial agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 490–495, 1 jan. 2017.
- BUSCH, M. Über heterobicyklische Verbindungen der Thiobiazol- und Triazolreihe. **Journal für Praktische Chemie**, v. 67, n. 1, p. 201–215, 1903.
- BUSCH, M.; RIDDER, Herm. Ueber die Einwirkung von Aldehyden auf Thiosemicarbazide. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 30, n. 1, p. 849–855, 1897.
- BUTTELL, Anna; QIU, Wei. The action and resistance mechanisms of Lenvatinib in liver cancer. **Molecular Carcinogenesis**, v. 62, n. 12, p. 1918–1934, 2023.
- CADENA, Silvia MSC *et al.* Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **FEBS letters**, v. 440, n. 1–2, p. 46–50, 1998.
- CADENA, Silvia MSC *et al.* Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. **Cell biochemistry and function**, v. 20, n. 1, p. 31–37, 2002.
- CAO, Wei *et al.* Socioeconomic inequalities in cancer incidence and mortality: An analysis of GLOBOCAN 2022. **Chinese Medical Journal**, v. 137, n. 12, p. 1407–1413, 2024.
- CARHART, Raymond E.; SMITH, Dennis H.; VENKATARAGHAVAN, R. Atom pairs as molecular features in structure-activity studies: definition and applications. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 25, n. 2, p. 64–73, 1 maio 1985.
- CASERTA, Tina M. *et al.* Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. **Apoptosis**, v. 8, n. 4, p. 345–352, 2003.
- CAWKILL, Eric *et al.* Meso-ionic 1, 3, 4-thiadiazolium and 1, 3, 4-triazolium-2-benzylidenehydrazinides. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 12, p. 439–440, 1976.
- CAWKILL, Eric *et al.* Cyclic meso-ionic compounds. Part 15. Synthesis, spectroscopic properties, and chemistry of 1, 3, 4-thiadiazolium-2-benzylidenehydrazinides and 1, 2, 4-triazolium-3-benzylidenehydrazinides. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 724–731, 1979.
- CHATTERJEE, Tanaya *et al.* Interaction of virstatin with human serum albumin: spectroscopic analysis and molecular modeling. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37468, 2012.

- CHAVES, Otavio Augusto *et al.* Investigation of interaction between human plasmatic albumin and potential fluorinated anti-trypanosomal drugs. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 199, p. 103–112, 2017.
- CHEN, Simiao *et al.* Estimates and projections of the global economic cost of 29 cancers in 204 countries and territories from 2020 to 2050. **JAMA oncology**, v. 9, n. 4, p. 465–472, 2023.
- CHEUNG, K. K. *et al.* Mesoionic compounds. 3. Structure of the hydrochloride of 5 (4-methoxyphenyl)-4-phenyl-1, 3, 4-thiadiazolium-2-phenylaminide. **Crystal Structure Communications**, v. 48, n. 8, p. 1471–1474, 1992.
- CHEUNG, K. K. *et al.* Mesoionic compounds. 4. Structure of 1, 4, 5-triphenyl-1, 2, 4-triazolium-3-thiolate. **Crystal Structure Communications**, v. 49, n. 6, p. 1092–1094, 1993.
- CHO, Yeonguk *et al.* Discovery of Orally Bioavailable Phthalazinone Analogues as an ENPP1 Inhibitor for STING-Mediated Cancer Immunotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, n. 22, p. 15141–15170, 2023.
- CHUN, Tae Gyu *et al.* Synthesis of 4-Alkyl-1(2H)-phthalazinones and 4-Alkyl-2,3-benzoxazin-1-ones via Ring Cleavage of 3-Substituted N-Alkylated-3-hydroxyisoindolin-1-ones. **Synthetic Communications**, v. 34, n. 7, p. 1301–1308, 31 dez. 2004.
- CLAYDEN, Jonathan; GREEVES, Nick; WARREN, Stuart. **Organic Chemistry**. [S.l.]: OUP Oxford, 2012.
- COCCONCELLI, Giuseppe *et al.* Aryl azoles with neuroprotective activity—Parallel synthesis and attempts at target identification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 2043–2052, 15 fev. 2008.
- COOK, Lucy B. *et al.* Long-term clinical remission maintained after cessation of zidovudine and interferon- α therapy in chronic adult T-cell leukemia/lymphoma. **International Journal of Hematology**, v. 107, n. 3, p. 378–382, 2018.
- COSTA, Fabio L. P. *et al.* Structural characterisation of natural products by means of quantum chemical calculations of NMR parameters: new insights. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 8, n. 9, p. 2019–2058, 2021.
- COSTA-TUNA, Andreia *et al.* Profiling the interaction between human serum albumin and clinically relevant HIV reverse transcriptase inhibitors. **Viruses**, v. 16, n. 4, p. 491, 2024.
- DA SILVA, JEFERSON G. *et al.* Chalcone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) and gallium(III) complexes: spectral studies and antimicrobial activity. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 66, n. 3, p. 385–401, 1 fev. 2013.
- DA SILVA MOREIRA, Micaeli Louise *et al.* Spectroscopic and in silico characterization of the interaction between synthetic 2-substituted-naphtho-1,4-quinones and human serum albumin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 403, p. 124829, 1 jun. 2024.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

DE OLIVEIRA, Ronaldo Figueira *et al.* Evaluation of the antitumoral effects of the mesoionic compound MI-D: Implications for endothelial cells viability and angiogenesis inhibition. **Chemico-biological interactions**, v. 387, p. 110796, 2024.

DE PAIVA, Raphael E. F. *et al.* What is holding back the development of antiviral metallodrugs? A literature overview and implications for SARS-CoV-2 therapeutics and future viral outbreaks. **Dalton Transactions**, v. 49, n. 45, p. 16004–16033, 2020.

DE SIQUEIRA, Lucianna Rabelo Pessoa *et al.* Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 170, p. 237–260, 15 maio 2019.

DECONTI, Ronald C. *et al.* Clinical and Pharmacological Studies with 5-Hydroxy-2-formylpyridine Thiosemicarbazone1. **Cancer Research**, v. 32, n. 7, p. 1455–1462, 1 jul. 1972.

DECOTEAU, Claire Laurier; SWEET, Paige L. Vaccine Hesitancy and the Accumulation of Distrust. **Social Problems**, v. 71, n. 4, p. 1231–1246, 1 nov. 2024.

DENG, Danfeng *et al.* Unusual C–O bond cleavage of aromatic ethers in ruthenium complexes bearing a 2-alkoxyphenyl fragment. **Dalton Transactions**, v. 48, n. 36, p. 13614–13621, 2019.

DHARMASIVAM, Mahendiran *et al.* Designing Tailored Thiosemicarbazones with Bespoke Properties: The Styrene Moiety Imparts Potent Activity, Inhibits Heme Center Oxidation, and Results in a Novel “Stealth Zinc(II) Complex”. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 1426–1453, 2023.

DHARMASIVAM, Mahendiran *et al.* Advantages of Novel Anti-cancer Selenosemicarbazones: Preferential Reactivity of Their Fe(III), Cu(II), and Zn(II) Complexes with Key Physiological Reductants/Ligands Versus Isosteric Thiosemicarbazones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 9594–9622, 8 maio 2025.

DOMAGK, G. *et al.* Über eine neue, gegen Tuberkelbazillen in vitro wirksame Verbindungsklasse. **Naturwissenschaften**, v. 33, n. 10, p. 315–315, 1 out. 1946.

DONKOR, Andrew *et al.* Financial toxicity of cancer care in low-and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **Supportive Care in Cancer**, v. 30, n. 9, p. 7159–7190, 2022.

DOS SANTOS, Daiane Fernanda *et al.* Non-cytotoxic 1,2,3-triazole tethered fused heterocyclic ring derivatives display Tax protein inhibition and impair HTLV-1 infected cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 22, p. 115746, 15 nov. 2020.

DOUGLAS, Diane Gillian *et al.* **Phthalazinone derivatives**. , 2006. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/AU2001295789B2/pt-PT>>. Acesso em: 4 set. 2025

ECHEVARRIA, A. *et al.* REACTIONS OF AROYL CHLORIDES WITH 1, 4-DIPHENYLTHIOSEMICARBAZIDE: FORMATION OF BOTH 1, 3, 4-THIADIAZOLIUM-2-AMINIDES AND 1, 3, 4-TRIAZOLIUM-2-THIOLATE. **Heterocyclic Communications**, v. 1, n. 2–3, p. 129–136, 1995.

ELAGAWANY, Mohamed *et al.* Design, synthesis, and molecular modelling of pyridazinone and phthalazinone derivatives as protein kinases inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 7, p. 2007–2013, 2013.

ELKHALIFA, Dana *et al.* A comprehensive review on the antiviral activities of chalcones. **Journal of Drug Targeting**, v. 29, n. 4, p. 403–419, 21 abr. 2021.

EVANS, G. W.; MILLIGAN, B. The structure of the 'endothiotriazoline' and 'endoxytriazolines'. **Australian Journal of Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1779–1781, 1967.

FAN, Jing *et al.* Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. **Molecular systems biology**, v. 9, n. 1, p. 712, 2013.

FARID, Umar *et al.* Stereoselective Rearrangements with Chiral Hypervalent Iodine Reagents. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 27, p. 7018–7022, 1 jul. 2013.

FENNER, Frank *et al.* Smallpox and its eradication / F. Fenner ... [et al.]. History of international public health ; no. 6. 1988.

FERREIRA, Romulo C. *et al.* Interactive profile between 1, 4-naphthoquinone derivatives and human serum albumin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 35, n. 10, p. e-20240043, 2024.

FINCH, Rick A. *et al.* Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 8, p. 983–991, 15 abr. 2000.

FLOREA, Ana-Maria; BÜSSELBERG, Dietrich. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 1351–1371, 2011.

FLORES, Joan Ericka *et al.* The global impact of hepatitis B vaccination on hepatocellular carcinoma. **Vaccines**, v. 10, n. 5, p. 793, 2022.

FRANÇA, Ana Paula *et al.* Vaccine hesitancy in the vaccination of children in Brazil. **Vaccine**, v. 53, p. 126905, 19 abr. 2025.

FRENCH, Frederic A.; BLANZ, Erwin J., Jr. The Carcinostatic Activity of α -(N) Heterocyclic Carboxaldehyde Thiosemicarbazones: I. Isoquinoline-1-carboxaldehyde Thiosemicarbazone. **Cancer Research**, v. 25, n. 9_Part_1, p. 1454–1458, 1965.

FULDA, Simone; GALLUZZI, Lorenzo; KROEMER, Guido. Targeting mitochondria for cancer therapy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 6, p. 447–464, 2010.

GAVATHIOTIS, Evripidis *et al.* BAX activation is initiated at a novel interaction site. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1076–1081, 1 out. 2008.

GAVATHIOTIS, Evripidis *et al.* Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 7, p. 639–645, 2012.

GAWEHN, K. D-(-)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. **Methods of enzymatic analysis**, v. 3, p. 1492–1495, 1974.

GESSAIN, Antoine; CASSAR, Olivier. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

GIAM, Chou-Zen; SEMMES, Oliver John. HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma—A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 161, 2016.

GIRALT, Sergio; BISHOP, Michael R. Principles and Overview of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *In*: BISHOP, Michael R. (Org.). **Hematopoietic Stem Cell Transplantation**. Boston, MA: Springer US, 2009. p. 1–21.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE LIVER CANCER COLLABORATION. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 12, p. 1683–1691, 1 dez. 2017.

GOTO, Kaku *et al.* Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma: when the host loses its grip. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 9, p. 3057, 2020.

GOZZI, Gustavo Jabor *et al.* Selective cytotoxicity of 1, 3, 4-thiadiazolium mesoionic derivatives on hepatocarcinoma cells (HepG2). **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130046, 2015.

GRASHEY, Rudolf; BAUMANN, Margit; HAMPRECHT, Rainer. Zur synthese mesoionischer 1.2. 4-triazol-3-thione. **Tetrahedron Letters**, v. 13, n. 29, p. 2939–2942, 1972.

GRYNBERG, Noema; SANTOS, Ana Cristina; ECHEVARRIA, Aurea. Synthesis and in vivo antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1, 3, 4-thiadiazolium-2-aminide class. **Anti-cancer drugs**, v. 8, n. 1, p. 88–91, 1997.

GUENGERICH, F. Peter. Cytochrome P450 Enzymes as Drug Targets in Human Disease. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 52, n. 6, p. 493–497, 2024.

GUIMARÃES, João Sérgio Fonseca *et al.* Burden of liver disease in Brazil, 1996–2022: a retrospective descriptive study of the epidemiology and impact on public healthcare. **The Lancet Regional Health–Americas**, v. 33, 2024.

GUIMARAES-CORREA, Ana B. *et al.* C7a, a Biphosphinic Cyclopalladated Compound, Efficiently Controls the Development of a Patient-Derived Xenograft Model of Adult T Cell Leukemia/Lymphoma. **Viruses**, v. 3, n. 7, p. 1041–1058, 2011.

HALL, Charlie L. *et al.* Color Differences Highlight Concomitant Polymorphism of Chalcones. **Crystal Growth & Design**, v. 20, n. 10, p. 6346–6355, 7 out. 2020.

HANSEN, Poul E. *et al.* NH Stretching Frequencies of Intramolecularly Hydrogen-Bonded Systems: An Experimental and Theoretical Study. **Molecules**, v. 26, n. 24, 2021.

HASSAN, Essam A. *et al.* Azo-thiosemicarbazone transition metal complexes: synthesis, structural characterization, theoretical insights, and anticancer and antimicrobial activities. **Journal of Molecular Structure**, v. 1341, p. 142610, 5 out. 2025.

HE, Zhang-Xu *et al.* Pyridazine as a privileged structure: An updated review on anticancer activity of pyridazine containing bioactive molecules. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 209, p. 112946, 1 jan. 2021.

HEFFETER, Petra *et al.* Anticancer Thiosemicarbazones: Chemical Properties, Interaction with Iron Metabolism, and Resistance Development. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 30, n. 8, p. 1062–1082, 10 mar. 2019.

HEFFRON, Timothy P. *et al.* Discovery of Clinical Development Candidate GDC-0084, a Brain Penetrant Inhibitor of PI3K and mTOR. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 4, p. 351–356, 2016.

HEGI, Monika E. *et al.* MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 997–1003, 2005.

HEHRE, Thomas *et al.* Practical Machine Learning Strategies. I. Correcting the MMFF Molecular Mechanics Model to More Accurately Provide Conformational Energy Differences in Flexible Organic Molecules. **Journal of Computational Chemistry**, v. 46, n. 1, p. e70016, 5 jan. 2025.

HIGUCHI, Fumi *et al.* Restoration of Temozolomide Sensitivity by PARP Inhibitors in Mismatch Repair Deficient Glioblastoma is Independent of Base Excision Repair. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 7, p. 1690–1699, 1 abr. 2020.

HOUSSEIN, Marwa *et al.* Apoptosis as a mechanism for the treatment of adult T cell leukemia: promising drugs from benchside to bedside. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 7, p. 1189–1197, 1 jul. 2020.

HUANG, Xian; XIE, Linghong; WU, Hong. Synthetic applications of organotellurium compounds. 1. A facile synthesis of .alpha.,.beta.-unsaturated esters, ketones, and nitriles. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 4862–4864, 1 set. 1988.

HUNDT, Melanie; WU, Cheng Ying; YOUNG, Michael. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Biliary Ducts. 2017.

INOUE, Yoshitaka *et al.* Prognostic importance of pretransplant disease status for posttransplant outcomes in patients with adult T cell leukemia/lymphoma. **Bone Marrow Transplantation**, v. 53, n. 9, p. 1105–1115, 1 set. 2018.

- ISHITSUKA, Kenji; TAMURA, Kazuo. Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 11, p. e517–e526, 2014.
- ITABASHI, Kazuo; MIYAZAWA, Tokuo. Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1: Mechanisms and Nutritional Strategies for Prevention. **Cancers**, v. 13, n. 16, p. 4100, 2021.
- JAGADEESWARA RAO, D. *et al.* Phthalide form of 2-Acetyl-benzoic acid: Spectroscopy and quantum chemical studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1186, p. 482–489, 15 jun. 2019.
- JAMPILEK, Josef. Heterocycles in Medicinal Chemistry. **Molecules**, v. 24, n. 21, 2019.
- JÁVEGA, Beatriz *et al.* Flow Cytometry of Oxygen and Oxygen-Related Cellular Stress. **Oxygen**, v. 3, n. 2, p. 222–255, 2023.
- JESSEN, Kristjan R. Glial cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 10, p. 1861–1867, 2004.
- JIAO, Qinlian *et al.* Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, p. 36, 19 fev. 2018.
- JONES, Gareth *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997.
- JUNG, Eun Mi *et al.* The novel phospholipase C activator, m-3M3FBS, induces apoptosis in tumor cells through caspase activation, down-regulation of XIAP and intracellular calcium signaling. **Apoptosis**, v. 13, n. 1, p. 133–145, 1 jan. 2008.
- KALIA, Jeet; RAINES, Ronald T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 39, p. 7523–7526, 2008.
- KAMPHAUSEN, W.; SCHNEIDER, S. Experimentelles. Über Endothiodiphenylthiobiazolin. **Journal für Praktische Chemie**, v. 67, n. 1, p. 216–238, 1903.
- KANOGAWA, Naoya *et al.* Use of ramucirumab for various treatment lines in real-world practice of patients with advanced hepatocellular carcinoma. **BMC Gastroenterology**, v. 23, n. 1, p. 70, 11 mar. 2023.
- KANWAL, Fasiha *et al.* Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. **Gastroenterology**, v. 153, n. 4, p. 996–1005.e1, 1 out. 2017.
- KANZAWA, T. *et al.* Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. **British journal of cancer**, v. 89, n. 5, p. 922–929, 2003.
- KAPPEL, Joseph C.; YOKUM, T. Scott; BARANY, George. Parallel solid-phase syntheses of 1, 3, 4-thiadiazolium-2-aminides. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 746–752, 2004.
- KATSUYA, Hiroo *et al.* Treatment and survival among 1594 patients with ATL. **Blood**, v. 126, n. 24, p. 2570–2577, 10 dez. 2015.

- KAUR, Ravinder; RAGHAV, Neera. Some thiocarbamoyl based novel anticathepsin agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, p. 104174, 1 nov. 2020.
- KAYA, Busra *et al.* Isosteric Replacement of Sulfur to Selenium in a Thiosemicarbazone: Promotion of Zn(II) Complex Dissociation and Transmetalation to Augment Anticancer Efficacy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, n. 14, p. 12155–12183, 2024.
- KHATUN, Nilufa *et al.* Nano CuO Catalyzed Cross Dehydrogenative Coupling (CDC) of Aldehydes to Anhydrides. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 6, p. 1309–1313, 1 fev. 2015.
- KIANI-ESFAHANI, Abbas *et al.* DHR123: an alternative probe for assessment of ROS in human spermatozoa. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 58, n. 3, p. 168–174, 2012.
- KOEBEL, Mathew R. *et al.* S···O and S···N Sulfur Bonding Interactions in Protein–Ligand Complexes: Empirical Considerations and Scoring Function. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 12, p. 2298–2309, 27 dez. 2016.
- KÖLMEL, Dominik K.; KOOL, Eric T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 15, p. 10358–10376, 9 ago. 2017.
- KRAUSE, Lennard *et al.* Comparison of silver and molybdenum microfocus X-ray sources for single-crystal structure determination. **Applied Crystallography**, v. 48, n. 1, p. 3–10, 2015.
- KRISHNAKUMAR, B.; SWAMINATHAN, M. Solvent free synthesis of quinoxalines, dipyrrophenazines and chalcones under microwave irradiation with sulfated Degussa titania as a novel solid acid catalyst. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 350, n. 1, p. 16–25, 2011.
- LACONI, Ezio; MARONGIU, Fabio; DEGREGORI, James. Cancer as a disease of old age: changing mutational and microenvironmental landscapes. **British journal of cancer**, v. 122, n. 7, p. 943–952, 2020.
- LAKOWICZ, Joseph R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. [S.l.]: Springer, 2006.
- LANA, Agner Pereira *et al.* Cost analysis of Cancer in Brazil: a population-based study of patients treated by public health system from 2001–2015. **Value in Health Regional Issues**, v. 23, p. 137–147, 2020.
- LARIONOV, Vladimir A. *et al.* Chiral octahedral complexes of Co(III) as catalysts for asymmetric epoxidation of chalcones under phase transfer conditions. **RSC Advances**, v. 5, n. 89, p. 72764–72771, 2015.
- LAUER, Georg M.; WALKER, Bruce D. Hepatitis C Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 1, p. 41–52, 2001.

LESSEM, Erica. The Tuberculosis Treatment Pipeline: Activity, but No Answers. In: **2016 PIPELINE REPORT: HIV & TB**. 2016. ed. [S.l.]: HIV i-Base, Treatment Action Group, 2016.

LI, Chia-Wai; SHEN, Tzu-Hsuan; SHIH, Tzenge-Lien. Reinvestigation of synthesis of halo-substituted 3-phenyl-1-(2-pyridyl)-2-propen-1-ones (azachalcones). A tandem reaction for formation of penta-substituted cyclohexanols. **Tetrahedron**, v. 73, n. 31, p. 4644–4652, 3 ago. 2017.

LI, Guo-Min. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 85–98, 1 jan. 2008.

LIBERTI, Maria V.; LOCASALE, Jason W. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.

LICHT, Stuart *et al.* Abstract A226: Mechanism of action of iniparib: Stimulation of reactive oxygen species (ROS) production in an iniparib-sensitive breast cancer cell line. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 11_Supplement, p. A226–A226, 12 nov. 2011.

LIN, Jiunn H.; YAMAZAKI, Masayo. Clinical Relevance of P-Glycoprotein in Drug Therapy. **Drug Metabolism Reviews**, v. 35, n. 4, p. 417–454, 2003.

LINDEMANN, Antje *et al.* COTI-2, A Novel Thiosemicarbazone Derivative, Exhibits Antitumor Activity in HNSCC through p53-dependent and -independent Mechanisms. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 18, p. 5650–5662, 2019.

LIU, Hui *et al.* Therapeutic strategies of glioblastoma (GBM): The current advances in the molecular targets and bioactive small molecule compounds. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 4, p. 1781–1804, 1 abr. 2022.

LIU, Mao Chin; LIN, Tai Chun; SARTORELLI, Alan C. Synthesis and antitumor activity of amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 20, p. 3672–3677, 1 out. 1992.

LIU, Xuesong *et al.* Iniparib Nonselectively Modifies Cysteine-Containing Proteins in Tumor Cells and Is Not a Bona Fide PARP Inhibitor. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 2, p. 510–523, 2012.

LIU, Yan; WU, Felicia. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 6, p. 818–824, 2010.

LLOVET, Josep M. *et al.* Hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 6, 2021.

LOMBARDI, Giuseppe *et al.* Regorafenib compared with lomustine in patients with relapsed glioblastoma (REGOMA): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. **The Lancet Oncology**, v. 20, n. 1, p. 110–119, 1 jan. 2019.

LOMBARDI, Giuseppe *et al.* Regorafenib in Recurrent Glioblastoma Patients: A Large and Monocentric Real-Life Study. **Cancers**, v. 13, n. 18, 2021.

LOVEJOY, David B. *et al.* Antitumor Activity of Metal-Chelating Compound Dp44mT Is Mediated by Formation of a Redox-Active Copper Complex That Accumulates in Lysosomes. **Cancer Research**, v. 71, n. 17, p. 5871–5880, 30 ago. 2011.

LYNCH, D. E.; MCCLENAGHAN, I. 4-Methyl-2-(8-quinoly)-phthalazin-1-one. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, v. 58, n. 10, p. o1051–o1052, 1 out. 2002.

MACIEL, M. A. M.; ECHEVARRIA, A.; RUMJANEK, V. M. Isolamento e caracterização de acil-tiossemicarbazidas como intermediários na síntese de compostos mesoiônicos. **Química Nova**, v. 21, p. 569–572, 1998.

MACRAE, C. F. *et al.* Mercury: visualization and analysis of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 39, n. 3, p. 453–457, 2006.

MAEDA, Michiyuki *et al.* IL-2/IL-2 Receptor Pathway Plays a Crucial Role in the Growth and Malignant Transformation of HTLV-1-Infected T Cells to Develop Adult T-Cell Leukemia. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

MAITI, Biplab K. A review on chemical and physical properties of tetrathiomolybdate (TTM) anion drug is useful for TTM treated diseases. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 98, n. 8, p. 100117, 1 ago. 2021.

MARSHALL, Alison D. *et al.* Direct-acting antiviral therapies for hepatitis C infection: global registration, reimbursement, and restrictions. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 4, p. 366–382, 2024.

MARZIALI, Federico *et al.* Interference of HTLV-1 Tax Protein with Cell Polarity Regulators: Defining the Subcellular Localization of the Tax-DLG1 Interaction. **Viruses**, v. 9, n. 12, p. 355, 2017.

MASEKO, Sibusiso B. *et al.* Identification of small molecule antivirals against HTLV-1 by targeting the hDLG1-Tax-1 protein-protein interaction. **Antiviral Research**, v. 217, p. 105675, 2023.

MATULONIS, U. A.; MONK, B. J. PARP inhibitor and chemotherapy combination trials for the treatment of advanced malignancies: does a development pathway forward exist? **Annals of Oncology**, v. 28, n. 3, p. 443–447, 1 mar. 2017.

MEANWELL, Nicholas A. The pyridazine heterocycle in molecular recognition and drug discovery. **Medicinal Chemistry Research**, v. 32, n. 9, p. 1853–1921, 1 set. 2023.

MENDELEYEV, Jerome *et al.* Potential chemotherapeutic activity of 4-iodo-3-nitrobenzamide: Metabolic reduction to the 3-nitroso derivative and induction of cell death in tumor cells in culture. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 5, p. 705–714, 25 ago. 1995.

- MENDES, Edinéia P. *et al.* Evaluation of Novel Chalcone-Thiosemicarbazones Derivatives as Potential Anti-Leishmania amazonensis Agents and Its HSA Binding Studies. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, 2019.
- MENG, Lingjiao *et al.* Mechanisms of immune checkpoint inhibitors: insights into the regulation of circular RNAs involved in cancer hallmarks. **Cell Death & Disease**, v. 15, n. 1, p. 3, 2024.
- MENTZEL, Jacob *et al.* Effective Radiosensitization of HNSCC Cell Lines by DNA-PKcs Inhibitor AZD7648 and PARP Inhibitors Talazoparib and Niraparib. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, 2024.
- MIAH, Aisha; HARRINGTON, Kevin; NUTTING, Chris. Triapine in Clinical Practice. **European Journal of Clinical & Medical Oncology**, v. 2, 1 jan. 2010.
- MJOS, Katja Dralle; ORVIG, Chris. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540–4563, 2014.
- MONTANARI, Carlos A. *et al.* Structural studies on some 1, 3, 4-thiadiazolium-2-aminides and their rearrangement isomers using ¹⁵N and ¹³C NMR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 12, p. 2571–2575, 1994.
- MORENO-RODRÍGUEZ, Adriana *et al.* In vitro antiparasitic activity of new thiosemicarbazones in strains of Trypanosoma cruzi. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 23–29, 24 nov. 2014.
- MORISHITA, Hiroki *et al.* Gastrointestinal absorption of pimozide is enhanced by inhibition of P-glycoprotein. **PLOS ONE**, v. 15, n. 10, p. e0232438, 2020.
- MORIUCHI, Hiroyuki *et al.* Mother-to-child Transmission of Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 2, 2013.
- MYERS, Stephanie M. *et al.* High-Throughput Screening and Hit Validation of Extracellular-Related Kinase 5 (ERK5) Inhibitors. **ACS Combinatorial Science**, v. 18, n. 8, p. 444–455, 2016.
- NAPIÓRKOWSKA, Mariola *et al.* Anticancer Potential of Halogen Derivatives of Methyl 6-Acetyl-5-Hydroxy-2-Methyl-1-Benzofuran-3-Carboxylate. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 12, 2025.
- NEWMAN, Melvin S. Synthesis of o-acetylbenzoic acid. An experiment for an honors organic laboratory course. **Journal of Chemical Education**, v. 54, n. 3, p. 191, 1 mar. 1977.
- NOLFI-DONEGAN, Deirdre; BRAGANZA, Andrea; SHIVA, Sruti. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. **Redox Biology**, v. 37, p. 101674, 2020.

NOVELLO, S. *et al.* A phase II randomized study evaluating the addition of iniparib to gemcitabine plus cisplatin as first-line therapy for metastatic non-small-cell lung cancer. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 11, p. 2156–2162, 1 nov. 2014.

NUNN, Paul; PORTER, John; WINSTANLEY, Peter. Thiacetazone—avoid like poison or use with care? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 5, p. 578–582, 1 set. 1993.

OECD. **Tackling the Impact of Cancer on Health, the Economy and Society**. OECD Health Policy Studies, OECD Publishing, , 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1787/85e7c3ba-en>>. Acesso em: 3 set. 2025

OFFE, H. A. Historical Introduction and Chemical Characteristics of Antituberculosis Drugs. *In*: BARTMANN, Karl (Org.). **Antituberculosis Drugs**. Berlin, Heidelberg: Springer, 1988. p. 1–30.

OHTA, Masaki; KATO, Hiroshi; KANEKO, Takashi. Structure of Busch's Endo-thiatriazolines. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 40, n. 3, p. 579–583, 1967.

OLLIS, W. D.; RAMSDEN, C. A. Synthesis of meso-ionic anhydro-2-arylamino-1, 3, 4-thiadiazolium hydroxides and the rearrangement of meso-ionic 1, 3, 4-thiadiazoles to meso-ionic 1, 3, 4-triazoles. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, n. 19, p. 1222–1223, 1971.

OLLIS, W. David; RAMSDEN, Christopher A. Cyclic meso-ionic compounds. Part X. Synthesis, spectroscopic properties, and chemistry of 1, 3, 4-thiadiazolium-2-aminides and their rearrangement to 1, 3, 4-triazolium-2-thiolates. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 633–638, 1974.

OMELCHUK, Olga A. *et al.* Stereochemistries and Biological Properties of Oligomycin A Diels–Alder Adducts. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 86, n. 12, p. 7975–7986, 18 jun. 2021.

OSTERMANN, Sandrine *et al.* Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 11, p. 3728–3736, 1 jun. 2004.

OSTROM, Quinn T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019. **Neuro-Oncology**, v. 24, n. Supplement_5, p. v1–v95, 5 out. 2022.

OUR WORD IN DATA. **Causes of death, World, 2021**. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/grapher/annual-number-of-deaths-by-cause>>. Acesso em: 3 set. 2025.

OZOREN, Nesrin *et al.* The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. **Cancer research**, v. 60, n. 22, p. 6259–6265, 2000.

PARK, Yae Won *et al.* The 2021 WHO Classification for Gliomas and Implications on Imaging Diagnosis: Part 1—Key Points of the Fifth Edition and Summary of Imaging Findings on Adult-Type Diffuse Gliomas. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 58, n. 3, p. 677–689, 1 set. 2023.

PELOSI, Giorgio *et al.* Antiretroviral Activity of Thiosemicarbazone Metal Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 8765–8769, 23 dez. 2010.

PEREIRA, Rafaela Aparecida *et al.* The toxicity of 1, 3, 4-thiadiazolium mesoionic derivatives on hepatocarcinoma cells (HepG2) is associated with mitochondrial dysfunction. **Chemico-Biological Interactions**, v. 349, p. 109675, 2021.

PERKINS, Ed *et al.* Novel Inhibitors of Poly(ADP-ribose) Polymerase/PARP1 and PARP2 Identified Using a Cell-based Screen in Yeast. **Cancer Research**, v. 61, n. 10, p. 4175–4183, 1 maio 2001.

PIOCH, Jonathan; BLOMGRAN, Robert. Optimized flow cytometry protocol for dihydrorhodamine 123-based detection of reactive oxygen species in leukocyte subpopulations in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 507, p. 113308, 1 ago. 2022.

POIESZ, Bernard J. *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 12, p. 7415–7419, 1980.

POIESZ, Bernard J. *et al.* Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia. **Nature**, v. 294, n. 5838, p. 268–271, 1981.

PORTENKIRCHNER, Engelbert *et al.* A Comparison of Pyridazine and Pyridine as Electrocatalysts for the Reduction of Carbon Dioxide to Methanol. **ChemElectroChem**, v. 1, n. 9, p. 1543–1548, 16 set. 2014.

POTTS, K. T.; ROY, S. K.; JONES, D. P. Meso-ionic compounds of the s-triazole series. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 105–107, 1965.

POTTS, Kevin T.; ROY, Sunil Kumar; JONES, Daniel Patrick. 1, 2, 4-Triazoles. XVII. Meso-ionic compounds. 2. Derivatives of the s-triazole series. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 32, n. 7, p. 2245–2252, 1967.

PRÄBST, Konstantin *et al.* Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: GILBERT, Daniel F.; FRIEDRICH, Oliver (Orgs.). **Cell Viability Assays: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2017. p. 1–17.

PRICE, Louise S.; PRICE, Sarah L. Packing Preferences of Chalcones: A Model Conjugated Pharmaceutical Scaffold. **Crystal Growth & Design**, v. 22, n. 3, p. 1801–1816, 2 mar. 2022.

PRICOPIE, Andreea-Iulia *et al.* Design and Synthesis of Novel 1,3-Thiazole and 2-Hydrazinyl-1,3-Thiazole Derivatives as Anti-Candida Agents: In Vitro Antifungal Screening, Molecular Docking Study, and Spectroscopic Investigation of their Binding Interaction with Bovine Serum Albumin. **Molecules**, v. 24, n. 19, 2019.

PU, Jianlin *et al.* Glioblastoma multiforme: an updated overview of temozolomide resistance mechanisms and strategies to overcome resistance. **Discover Oncology**, v. 16, n. 1, p. 731, 2025.

QADIR, Tanzeela *et al.* A Review on Medicinally Important Heterocyclic Compounds. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, 2022.

QUACH, Patricia *et al.* Methemoglobin Formation by Triapine, Di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT), and Other Anticancer Thiosemicarbazones: Identification of Novel Thiosemicarbazones and Therapeutics That Prevent This Effect. **Molecular Pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 105–114, 2012.

QUARATO, Giovanni *et al.* Ca²⁺-mediated mitochondrial inner membrane permeabilization induces cell death independently of Bax and Bak. **Cell Death & Differentiation**, v. 29, n. 7, p. 1318–1334, 1 jul. 2022.

RAJABI, Somayeh *et al.* Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 20, 24 fev. 2015.

RAY, Ratna B.; RAY, Ranjit. Hepatitis C Virus Manipulates Humans as its Favorite Host for a Long-Term Relationship. **Hepatology**, v. 69, n. 2, p. 889, 2019.

REIS, Camilla Moretto dos *et al.* Improved synthesis of 1, 3, 4-thiadiazolium-2-phenylamines using microwave and ultrasound irradiation and investigation of their cytotoxic activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1505–1510, 2011.

RIDDICK, J. A.; BUNGER, W. B.; SAKANO, T. K. **Techniques of chemistry fourth edition, Volume II. Organic Solvents.** [S.l.]: John Wiley, New York, NY, 1985.

RIO, Gabriel F. *et al.* Evaluation of the interaction between new trypanocide 1, 2, 4-triazolo-3-thiones with human serum albumin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 407, p. 125247, 2024.

RIVETT, DE; ROSEVEAR, J.; WILSHIRE, JFK. The preparation and spectral properties of some monosubstituted 1,3,5-Triphenyl-2-pyrazolines. **Australian Journal of Chemistry**, v. 32, n. 7, p. 1601–1612, 1979.

RODRIGUES, Vivian C. *et al.* **Chalcone-thiosemicarbazone Hybrids as Inhibitors of Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells Viability and Oxygen Consumption.** **Current Bioactive Compounds** Bentham Science Publishers, , 2022.

RODRIGUES-SILVA, Erika *et al.* Evaluation of mitochondrial respiratory function in highly glycolytic glioma cells reveals low ADP phosphorylation in relation to oxidative capacity. **Journal of neuro-oncology**, v. 133, n. 3, p. 519–529, 2017.

ROSS, Philip D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981.

RUAS, Juliana S. *et al.* Underestimation of the Maximal Capacity of the Mitochondrial Electron Transport System in Oligomycin-Treated Cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0150967, 7 mar. 2016.

RUMGAY, Harriet *et al.* Global burden of cancer in 2020 attributable to alcohol consumption: a population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1071–1080, 2021.

RUMGAY, Harriet *et al.* Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. **Journal of hepatology**, v. 77, n. 6, p. 1598–1606, 2022.

SAKAGAMI, Hiroshi *et al.* Quantitative Structure–Cytotoxicity Relationship of Chalcones. **Anticancer Research**, v. 37, n. 3, p. 1091–1098, 1 mar. 2017.

SALIM, K. Y. *et al.* COTI-2, a new anticancer drug currently under clinical investigation, targets mutant p53 and negatively modulates the PI3K/AKT/mTOR pathway. **European Journal of Cancer**, v. 69, p. S19, 1 dez. 2016a.

SALIM, Kowthar Y. *et al.* COTI-2, a novel small molecule that is active against multiple human cancer cell lines in vitro and in vivo. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, 2016b.

SALPHATI, Laurent *et al.* Brain Distribution and Efficacy of the Brain Penetrant PI3K Inhibitor GDC-0084 in Orthotopic Mouse Models of Human Glioblastoma. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 44, n. 12, p. 1881–1889, 1 dez. 2016.

SANDALI, J. P. B. ALGUMAS PROPRIEDADES ESPECTROSCOPIAS DOS PRODUTOS CÍCLICOS DA REAÇÃO DE ACILAÇÃO ANIDRA DE 1, 4-DIFENILTIOSSOMICARBAZIDA. **QUÍMICA NOVA**, v. 16, p. 5, 1993.

SANGRO, Bruno *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines on the management of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 82, n. 2, p. 315–374, 2025.

SANKARAPERUMAL, Anitha; NITYANANDA SHETTY, A.; KARTHIKEYAN, J. Synthesis, Structural Characterization, and Biological Application of p-[N,N-bis(2-chloroethyl) Aminobenzaldehyde Thiosemicarbazone and Its Nickel (II) Complex. **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 1318–1326, 2 set. 2015.

SANTOS, L. *et al.* Ground and Excited State Hydrogen Atom Transfer Reactions and Cyclization of 2-Acetylbenzoic Acid. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 43, p. 9331–9341, 2004.

SARAVANAN, K. *et al.* 2-Chloro-N-(4-phenyl-1,3-thia-zol-2-yl)acetamide. **IUCrData**, v. 1, n. 6, p. x160879, 28 jun. 2016.

SCHAKE, Philipp *et al.* PLIP 2025: introducing protein–protein interactions to the protein–ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. W1, p. W463–W465, 7 jul. 2025.

SCHIERHOUT, Gill *et al.* Association between HTLV-1 infection and adverse health outcomes: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 133–143, 1 jan. 2020.

SCHNEIDER, S. Über Endothiophenylthiobiazolin und Endothiomethylphenylthiobiazolin. **Journal für Praktische Chemie**, v. 67, n. 1, p. 246–257, 1903.

SCHÖNBERG, Alexander. 158. The constitution and isomerism of certain triazole derivatives of the nitron type in the light of the Bredt rule and the theory of resonance. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 824–825, 1938.

SEITZ, Helmut K. *et al.* Alcoholic liver disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 16, 2018.

SELYUTINA, O. Yu. *et al.* Ascorbate-and iron-driven redox activity of Dp44mT and Emodin facilitates peroxidation of micelles and bicelles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1866, n. 4, p. 130078, 1 abr. 2022.

SENFF-RIBEIRO, A. *et al.* Cytotoxic effect of a new 1, 3, 4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **British journal of cancer**, v. 91, n. 2, p. 297–304, 2004.

SENFF-RIBEIRO, Andrea *et al.* Effect of a new 1, 3, 4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. **Melanoma Research**, v. 13, n. 5, p. 465–471, 2003.

SESTAK, Vit *et al.* Novel and potent anti-tumor and anti-metastatic di-2-pyridylketone thiosemicarbazones demonstrate marked differences in pharmacology between the first and second generation lead agents. **Oncotarget**, v. 6, n. 40, 2015.

SHA, Xiaowei *et al.* Enhanced tumor suppression in patient-derived temozolomide-resistant glioblastoma cells using a combination treatment of Olaparib and FK866. **BMC Cancer**, v. 25, n. 1, p. 1174, 2025.

SHAO, Gaoxuan *et al.* The Pathogenesis of HCC Driven by NASH and the Preventive and Therapeutic Effects of Natural Products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 7 jul. 2022.

SHAO, Jimin *et al.* A Ferrous-triapipe complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 3, p. 586–592, 16 mar. 2006.

SHELDRICK, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 3–8, 2015.

SHIYU DENG, Lin Gan, Chang Liu, Tongtong Xu, Shiyi Zhou, Yiyan Guo, Zhijun Zhang, Guo-Yuan Yang, Hengli Tian, Yaohui Tang. Roles of Ependymal Cells in the Physiology and Pathology of the Central Nervous System. **Aging and disease**, v. 14, n. 2, p. 468–483, 2023.

SILVA, Christiane Nazareth *et al.* Analysis of the Epidemiological Profile of Glioblastomas in Brazil Between 2012 and 2021: evidence and challenges for public health. **JBNC - JORNAL BRASILEIRO DE NEUROCIRURGIA**, v. 35, n. 1, p. 66–74, 2024.

SILVERSTEIN, Robert M. *et al.* **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 8^a ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2014.

SIMON, Tracey G. *et al.* Association of Aspirin with Hepatocellular Carcinoma and Liver-Related Mortality. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 11, p. 1018–1028, 12 mar. 2020.

ŞİMŞEK, İrem *et al.* **A tale of two mechanisms: The p53 modulator COTI-2 is a Zn metallochaperone**. ChemRxiv, , 17 jan. 2025. Disponível em: <<https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/6787de5a81d2151a0248a785>>. Acesso em: 3 set. 2025

SIQUEIRA, Alessandra de Sá Earp *et al.* Economic impact analysis of cancer in the health system of Brazil: model based in public database. 2017.

SLADOWSKI, Dariusz *et al.* An improved MIT assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 157, n. 1, p. 203–207, 4 jan. 1993.

SOARES DE OLIVEIRA, Cleudaldo *et al.* Drug resistance modulation in *Staphylococcus aureus*, a new biological activity for mesoionic hydrochloride compounds. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2023–2031, 2011.

SOARES, Marília Amável Gomes *et al.* Insights into the effect of glucose on the binding between human serum albumin and the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 265, p. 131148, 2024.

SOTO, Martín; SOENGAS, Raquel G.; RODRÍGUEZ-SOLLA, Humberto. Solvent-Controlled Hydrogenation of 2'-Hydroxychalcones: A Simple Solution to the Total Synthesis of Bussealins. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 362, n. 23, p. 5422–5431, 8 dez. 2020.

SOUSA-PEREIRA, Danilo *et al.* Synthetic (E)-3-Phenyl-5-(phenylamino)-2-styryl-1,3,4-thiadiazol-3-ium Chloride Derivatives as Promising Chemotherapy Agents on Cell Lines Infected with HTLV-1. **Molecules**, v. 25, n. 11, 2020.

STACY, Alexandra E. *et al.* Structure–Activity Relationships of Di-2-pyridylketone, 2-Benzoylpyridine, and 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones for Overcoming Pgp-Mediated Drug Resistance. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 18, p. 8601–8620, 22 set. 2016.

STORNAIUOLO, Mariano *et al.* Structure-Based Lead Optimization and Biological Evaluation of BAX Direct Activators as Novel Potential Anticancer Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2135–2148, 12 mar. 2015.

STRAPPAVECCIA, Giacomo *et al.* A biomass-derived safe medium to replace toxic dipolar solvents and access cleaner Heck coupling reactions. **Green Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 365–372, 2015.

STROBA, Adriana *et al.* 3,5-Diphenylpent-2-enoic Acids as Allosteric Activators of the Protein Kinase PDK1: Structure–Activity Relationships and Thermodynamic Characterization of Binding as Paradigms for PIF-Binding Pocket-Targeting Compounds†PDB code of 2Z with PDK1: 3HRF. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4683–4693, 2009.

SUGATA, Kenji *et al.* Protective effect of cytotoxic T lymphocytes targeting HTLV-1 bZIP factor. **Blood**, v. 126, n. 9, p. 1095–1105, 27 ago. 2015.

SVEC, Riley L. *et al.* Tunable Stability of Imidazotetrazines Leads to a Potent Compound for Glioblastoma. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 11, p. 3206–3216, 16 nov. 2018.

SVEC, Riley L. *et al.* Novel Imidazotetrazine Evades Known Resistance Mechanisms and Is Effective against Temozolomide-Resistant Brain Cancer in Cell Culture. **ACS Chemical Biology**, v. 17, n. 2, p. 299–313, 18 fev. 2022.

SYNNOTT, Naoise C. *et al.* COTI-2 reactivates mutant p53 and inhibits growth of triple-negative breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 179, n. 1, p. 47–56, 1 jan. 2020.

TABIBIAN, James H. *et al.* Physiology of cholangiocytes. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 1, p. 541–565, 2013.

TAGAYA, Yutaka; MATSUOKA, Masao; GALLO, Robert. **40 years of the human T-cell leukemia virus: past, present, and future**. F1000Research, , 28 fev. 2019. Disponível em: <<https://f1000research.com/articles/8-228>>. Acesso em: 3 set. 2025

TANG, Weiwei *et al.* The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 87, 10 jun. 2020.

TERADA H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 213–218, 1 jul. 1990.

Thiacetazone. **British Medical Journal**, v. 1, n. 4698, p. 128–130, 20 jan. 1951.

TOPCHYAN, Paytsar; LIN, Siying; CUI, Weiguo. The Role of CD4 T Cell Help in CD8 T Cell Differentiation and Function During Chronic Infection and Cancer. **Immune Netw**, v. 23, n. 5, out. 2023.

TSUKASAKI, Kunihiro *et al.* VCAP-AMP-VECP Compared With Biweekly CHOP for Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 34, p. 5458–5464, dez. 2007.

TSUKASAKI, Kunihiro *et al.* Diagnostic Approaches and Established Treatments for Adult T Cell Leukemia Lymphoma. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

TÜNBEKICI, Salih *et al.* Regorafenib Treatment for Recurrent Glioblastoma Beyond Bevacizumab-Based Therapy: A Large, Multicenter, Real-Life Study. **Cancers**, v. 17, n. 1, 2025.

- TÜRKKAN, Baki; ÜLKÜSEVEN, Bahri; EROĞLU, Erol. Zinc(II) Complexes of Acetophenone and 5-Chloro-2-hydroxy-benzophenone Thiosemicarbazones. Synthesis, Characterization, and Nonlinear Optical Properties from Quantum Chemical Calculations. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, v. 190, n. 1, p. 53–65, 2 jan. 2015.
- TYMAN, J. H. P.; NAJAM, A. A. The structure of 2-keto and 2-aldehydobenzoic acids (spectroscopic studies). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 33, n. 3, p. 479–485, 1 jan. 1977.
- VAN NOORDEN, Cornelis JF. **The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition**. [S.l.]: Elsevier, 2001. v. 103 p. 241–251
- VAUGHAN, Wyman R.; MCCANE, Donald I.; SLOAN, Gilbert J. The Rowe Rearrangement1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, n. 5, p. 2298–2301, 1 maio 1951.
- VERMES, István *et al.* A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, 17 jul. 1995.
- VICENTIM, ohnny Marcelo; BERETTA, Ana Laura Remedio Zeni. Hepatite C e as novas estratégias de tratamento: revisão deliteratura. **RBAC. (Online)**, p. 185–190, 2019.
- VIEIRA, H. L. A. *et al.* Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. **Cell Death & Differentiation**, v. 7, n. 12, p. 1146–1154, 1 dez. 2000.
- VILA, Noemí *et al.* Phthalazin-1(2H)-one as a remarkable scaffold in drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 462–482, 5 jun. 2015.
- VILLARRUEL-MELQUIADES, Fernanda *et al.* Current and novel approaches in the pharmacological treatment of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 17, p. 2571–2599, 2023.
- WANG, Guo-Qin *et al.* Photoredox Synthesis of Silicon-Containing Isoindolin-1-ones and Deuterated Analogues Through Hydrosilylation and Deuterium-silylation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 89, n. 11, p. 7899–7912, 7 jun. 2024.
- WANG, Jingnan *et al.* Rabdocoestin B exhibits antitumor activity by inducing G2/M phase arrest and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 469–481, 2018a.
- WANG, Shaozhong *et al.* Preparation of 2-Pyridone-Containing Tricyclic Alkaloid Derivatives as Potential Inhibitors of Tumor Cell Proliferation by Regioselective Intramolecular N- and C-Acylation of 2-Pyridone. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 1, p. 67–71, 2005.
- WANG, Wei *et al.* Synthesis and biological evaluation of 2,4-disubstituted phthalazinones as Aurora kinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 3217–3226, 23 jul. 2018b.

WAVEFUNCTION, INC. **Spartan'24 v1.3.1**. Irvine, CA, 2025.

WEISS, Martin M. *et al.* Rethinking Smallpox. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 11, p. 1668–1673, 1 dez. 2004.

WEN, Patrick Y. *et al.* Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. **Neuro-Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1073–1113, 2020.

WEN, Patrick Y. *et al.* Paxalisib in patients with newly diagnosed glioblastoma with unmethylated MGMT promoter status: Final phase 2 study results. **Journal of Clinical Oncology**, v. 40, n. 16_suppl, p. 2047–2047, 1 jun. 2022.

WENSKOWSKY, Lea *et al.* Resolving Binding Events on the Multifunctional Human Serum Albumin. **ChemMedChem**, v. 15, n. 9, p. 738–743, 6 maio 2020.

WERMUTH, Camille G. Are pyridazines privileged structures? **MedChemComm**, v. 2, n. 10, p. 935–941, 2011.

WESTIN, Shannon N. *et al.* Abstract CT033: Safety and early efficacy signals for COTI-2, an orally available small molecule targeting p53, in a phase I trial of recurrent gynecologic cancer. **Cancer Research**, v. 78, n. 13_Supplement, p. CT033–CT033, 1 jul. 2018.

WHITE, Mary C. *et al.* Age and cancer risk: a potentially modifiable relationship. **American journal of preventive medicine**, v. 46, n. 3, p. S7–S15, 2014.

WHITNALL, Megan *et al.* A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 40, p. 14901–14906, 3 out. 2006.

WIJESINGHE, Tharushi P. *et al.* Steric Blockade of Oxy-Myoglobin Oxidation by Thiosemicarbazones: Structure–Activity Relationships of the Novel PPP4pT Series. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, n. 22, p. 15453–15476, 23 nov. 2023.

WILES, D. M.; GINGRAS, B. A.; SUPRUNCHUK, T. The C=S stretching vibration in the infrared spectra of some thiosemicarbazones. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 469–473, 1 mar. 1967.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes**. [S.l.]: World Health Organization, 2007. v. 2

YADAV, Priya *et al.* Fabrication of Copper-based Silica-coated Magnetic Nanocatalyst for Efficient One-pot Synthesis of Chalcones via A3 Coupling of Aldehydes-Alkynes-Amines. **ChemCatChem**, v. 12, n. 9, p. 2488–2496, 2020.

YALE, Harry L. o-Acetobenzoic Acid, its Preparation and Lactonization. A Novel Application of the Doebner1 Synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, n. 6, p. 1547–1548, 1 jun. 1947.

- YAU, Thomas *et al.* Nivolumab plus ipilimumab versus lenvatinib or sorafenib as first-line treatment for unresectable hepatocellular carcinoma (CheckMate 9DW): an open-label, randomised, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 405, n. 10492, p. 1851–1864, 24 maio 2025.
- YU, Yawen *et al.* Synthesis and Characterization of a Series of Temozolomide Esters and Its Anti-glioma Study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 10, p. 3431–3438, 1 out. 2021.
- YUAN, Jun; LOVEJOY, David B.; RICHARDSON, Des R. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. **Blood**, v. 104, n. 5, p. 1450–1458, 1 set. 2004.
- YUAN, Shuguang; CHAN, H. C. Stephen; HU, Zhenquan. Using PyMOL as a platform for computational drug design. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 7, n. 2, p. e1298, 1 mar. 2017.
- ZAJACOVA, Anna *et al.* Employment and income losses among cancer survivors: estimates from a national longitudinal survey of American families. **Cancer**, v. 121, n. 24, p. 4425–4432, 2015.
- ZEMBRUSKI, Nadine C. L. *et al.* 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 79–81, 1 out. 2012.
- ZHANG, Hong-Jia *et al.* Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of chalcone thiosemicarbazide derivatives as novel anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4702–4708, 1 set. 2011.
- ZHANG, Jihong; F.G. STEVENS, Malcolm; D. BRADSHAW, Tracey. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 102–114, 1 jan. 2012.
- ZHANG, Jing *et al.* Probing the Interaction between Human Serum Albumin and 9-Hydroxyphenanthrene: A Spectroscopic and Molecular Docking Study. **ACS Omega**, v. 5, n. 27, p. 16833–16840, 14 jul. 2020.
- ZHANG, Jingwen *et al.* Effect of Caspase Inhibitor Ac-DEVD-CHO on Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Artesunate. **AIMS Bioengineering**, v. 1, n. 1, p. 13–24, 2014.
- ZHANG, Xuejin *et al.* Intermolecular Sulfur···Oxygen Interactions: Theoretical and Statistical Investigations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 10, p. 2138–2153, 2015.
- ZHANG, Zhenwei *et al.* Directly targeting BAX for drug discovery: Therapeutic opportunities and challenges. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 14, n. 6, p. 2378–2401, 2024.
- ZSILA, Ferenc. Subdomain IB Is the Third Major Drug Binding Region of Human Serum Albumin: Toward the Three-Sites Model. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 5, p. 1668–1682, 6 maio 2013.

3.1. Anexos – Capítulo 1

- Resultados do SwissADME

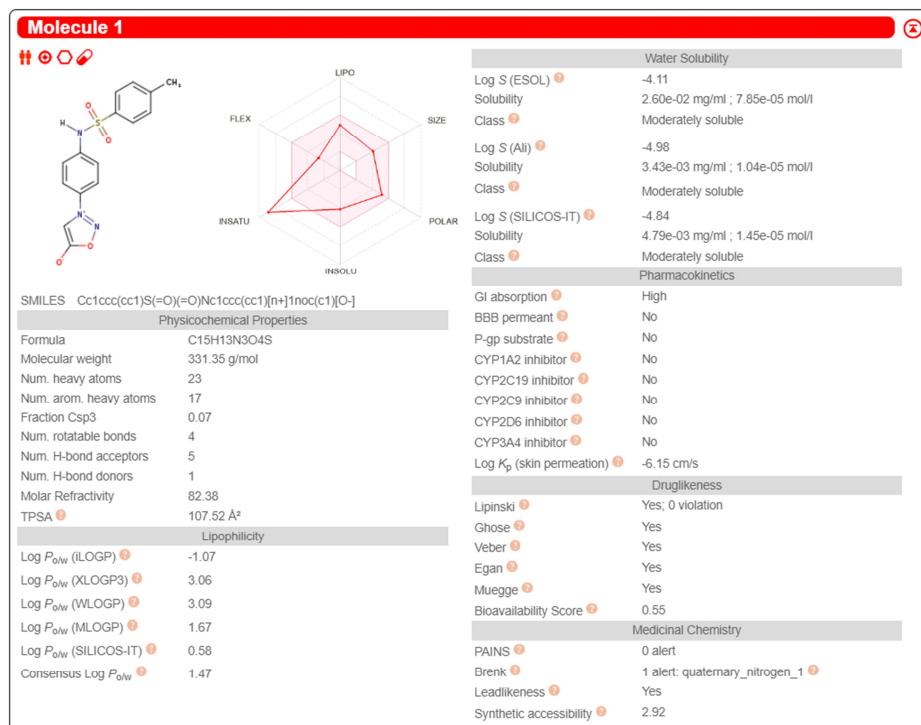


Figura A1. Resultado do SwissADME para 44a.

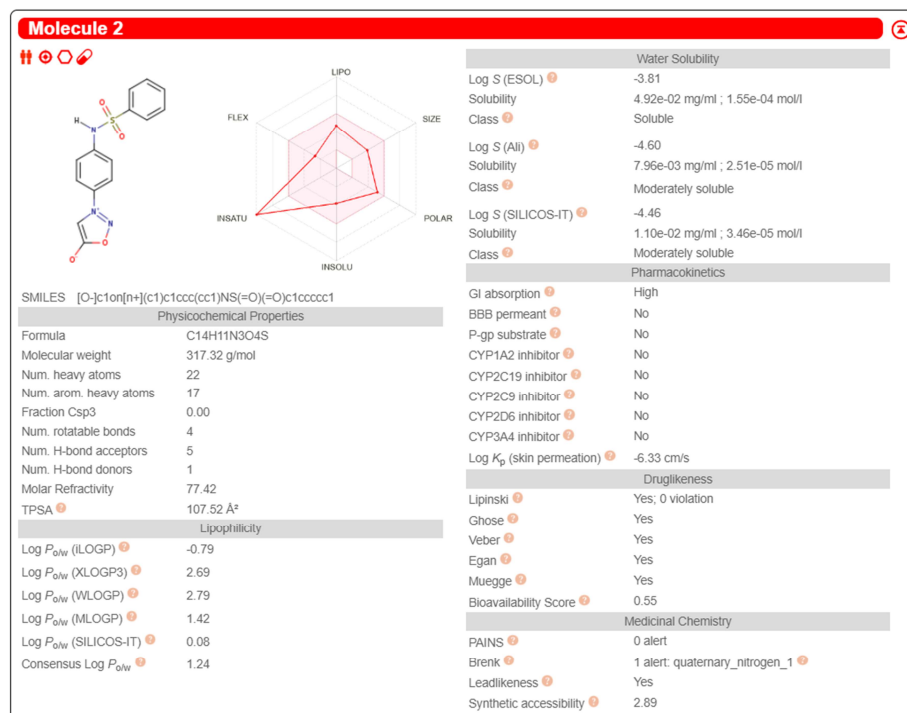


Figura A2. Resultado do SwissADME para 44b.

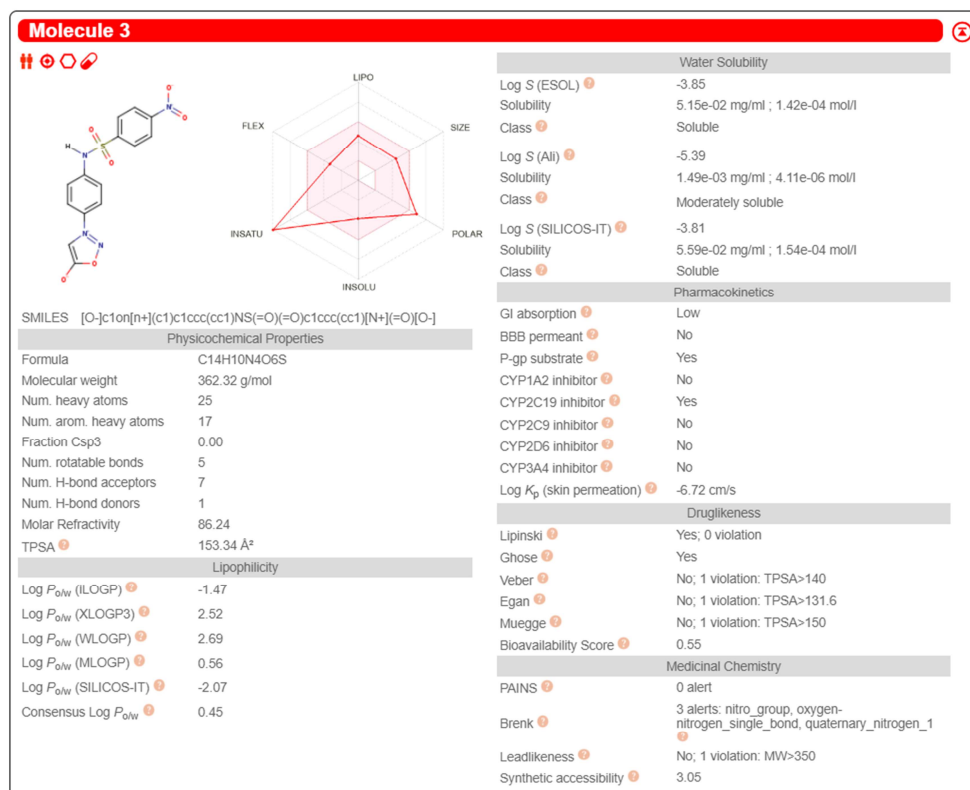


Figura A3. Resultado do SwissADME para 44c.

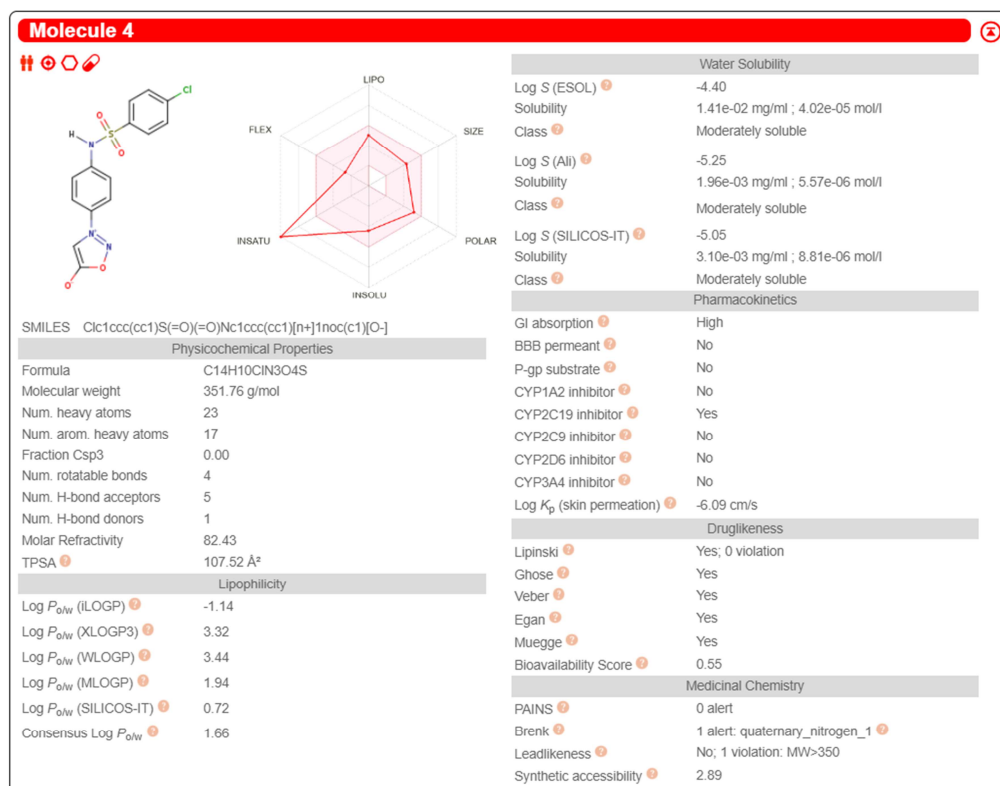


Figura A4. Resultado do SwissADME para **44d**.

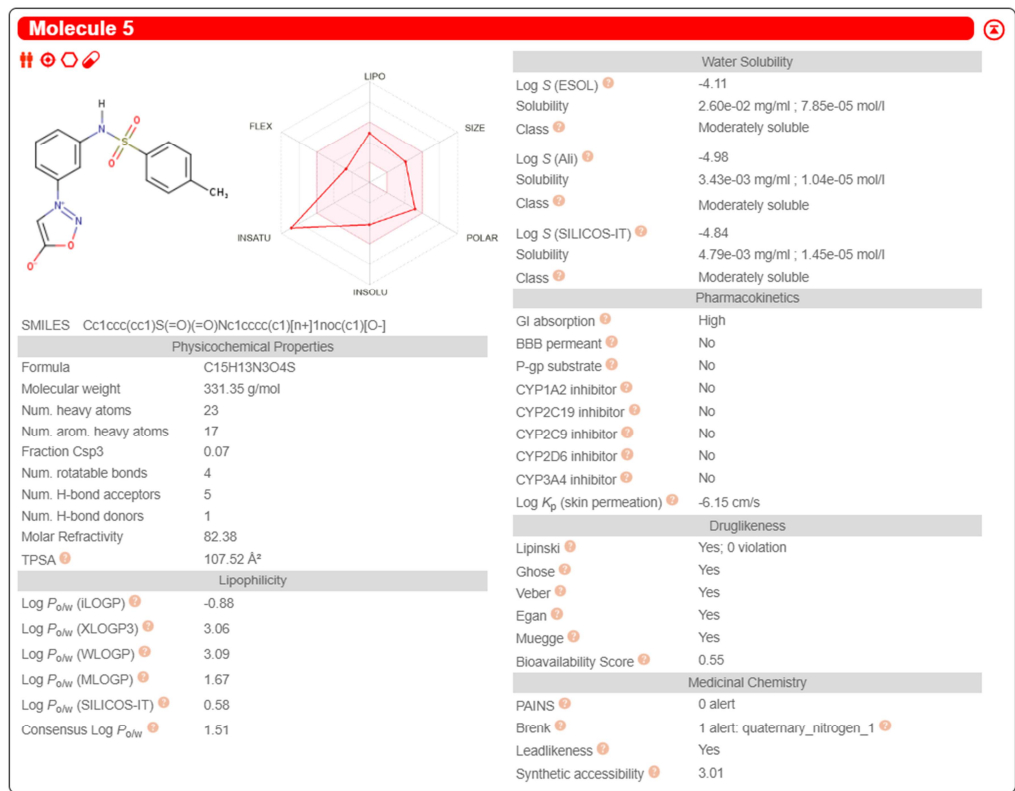


Figura A5. Resultado do SwissADME para **45a**.

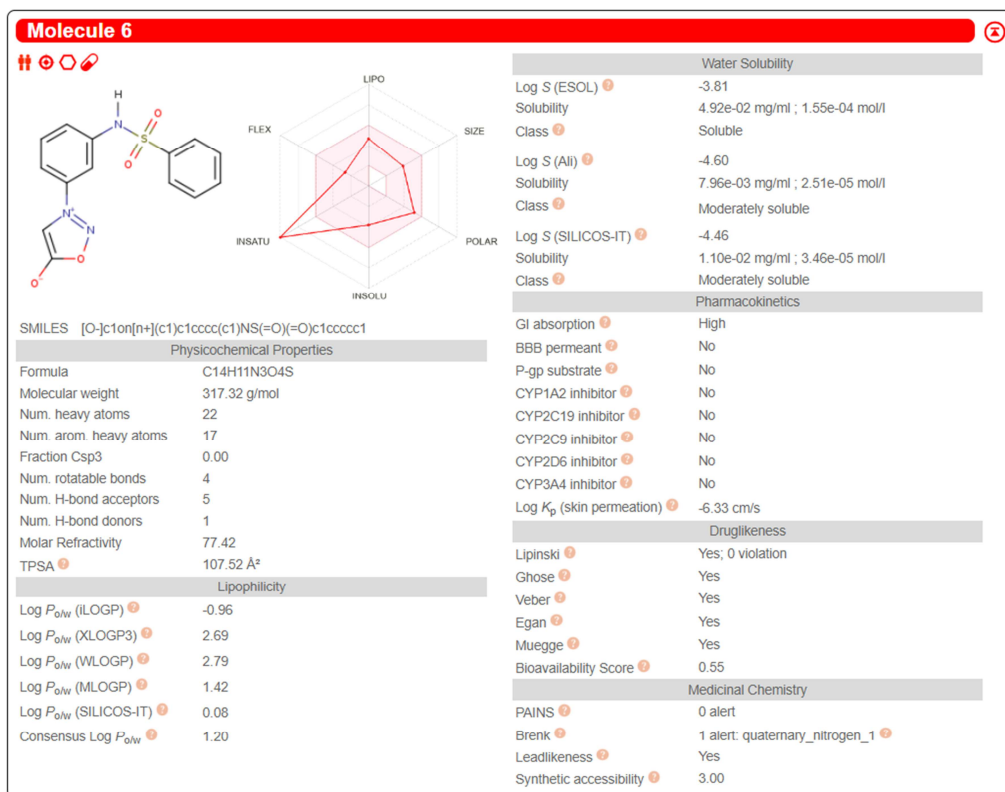


Figura A6. Resultado do SwissADME para 45b.

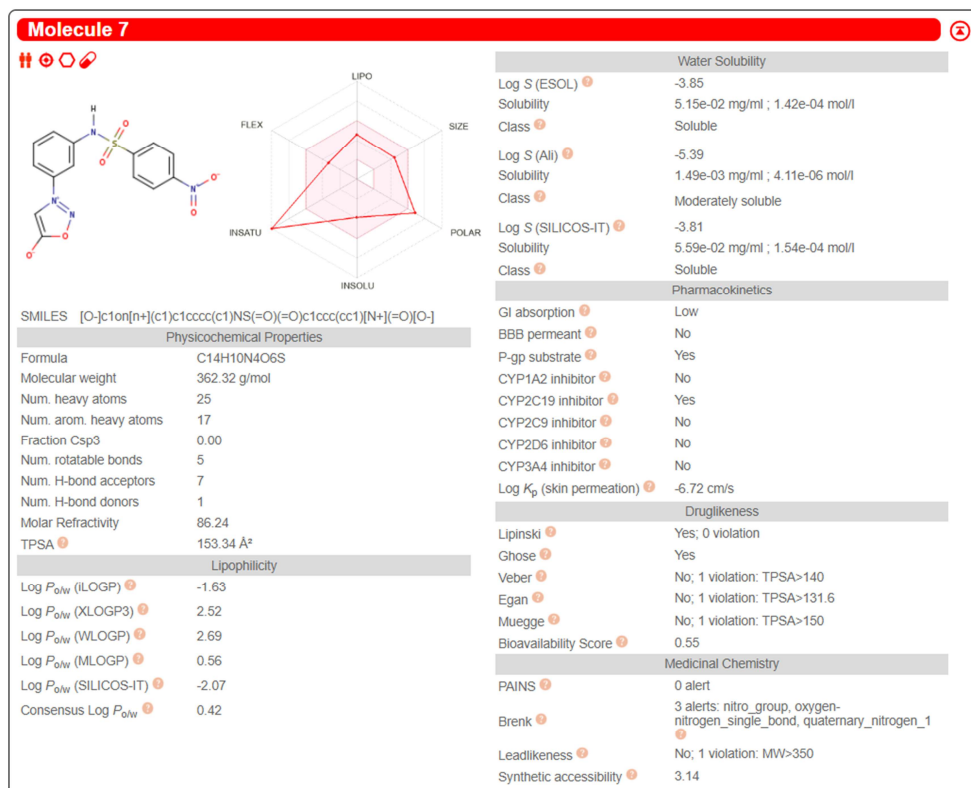


Figura A7. Resultado do SwissADME para 45c.

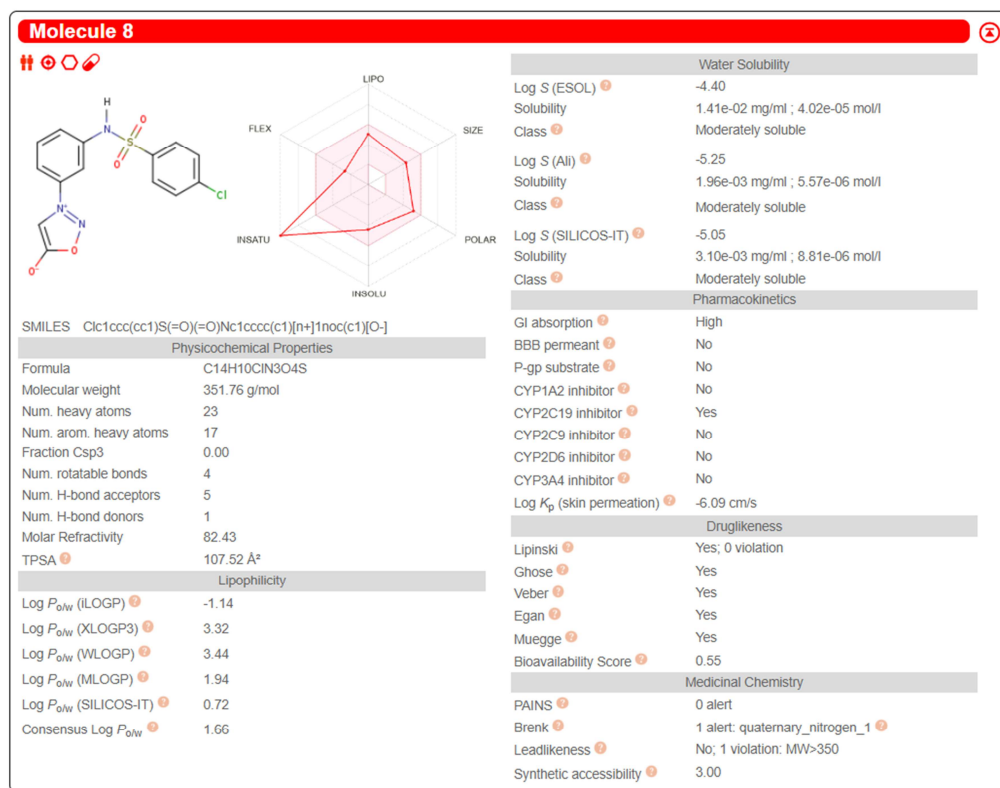


Figura A8. Resultado do SwissADME para 45d.

- Espectros de infravermelho e RMN dos precursores e produtos finais.

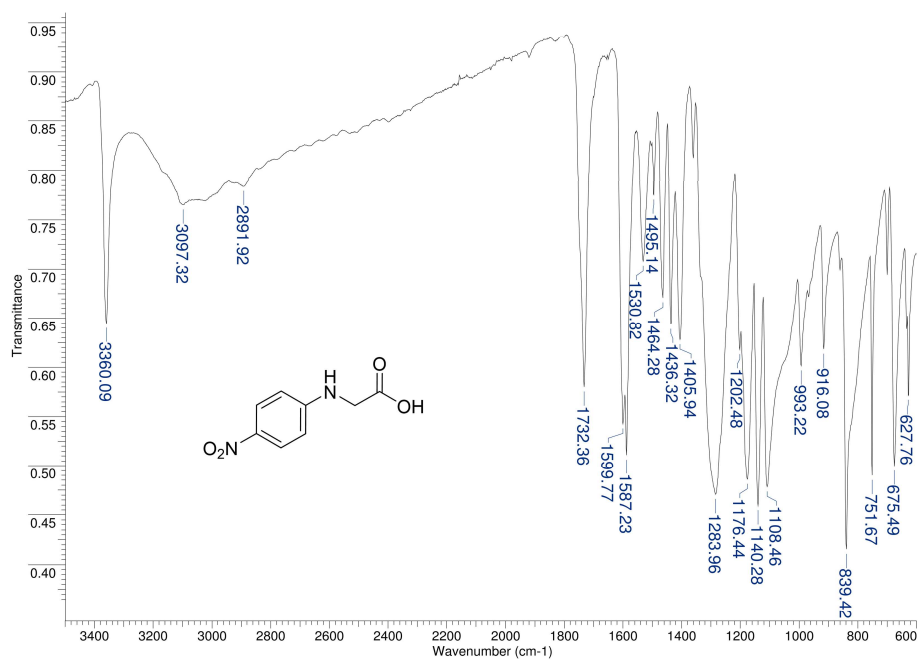


Figura A9. Espectro de IV (46a).

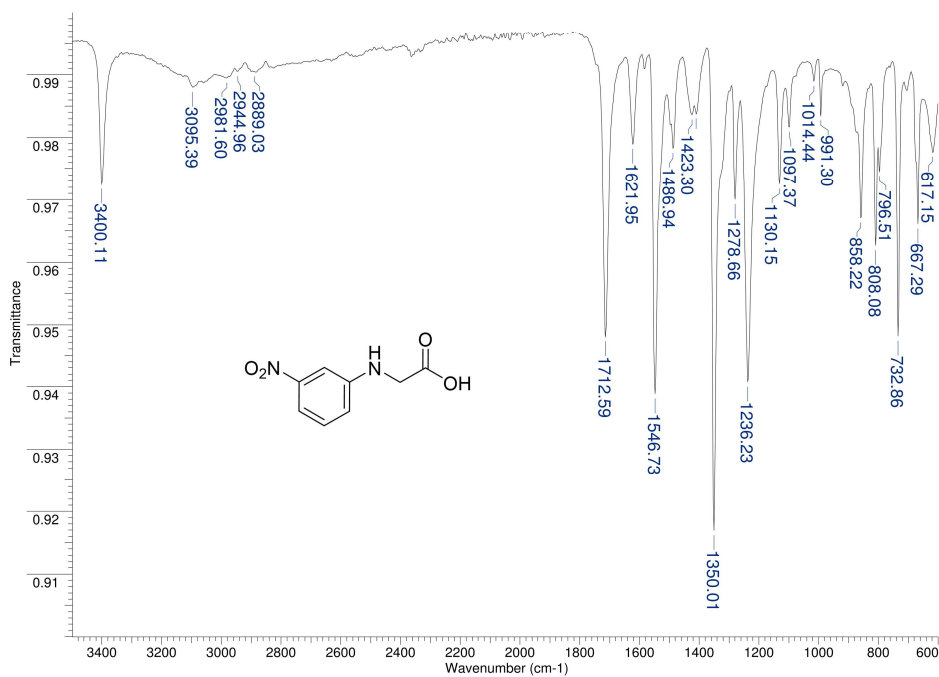


Figura A10. Espectro de IV (46b).

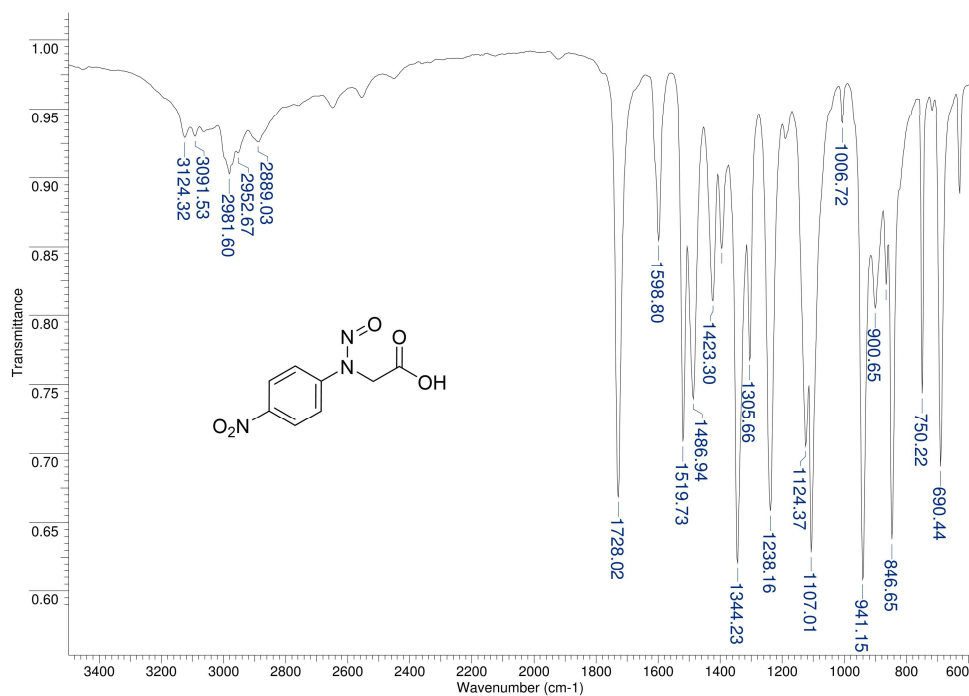


Figura A11. Espectro de IV (47a).

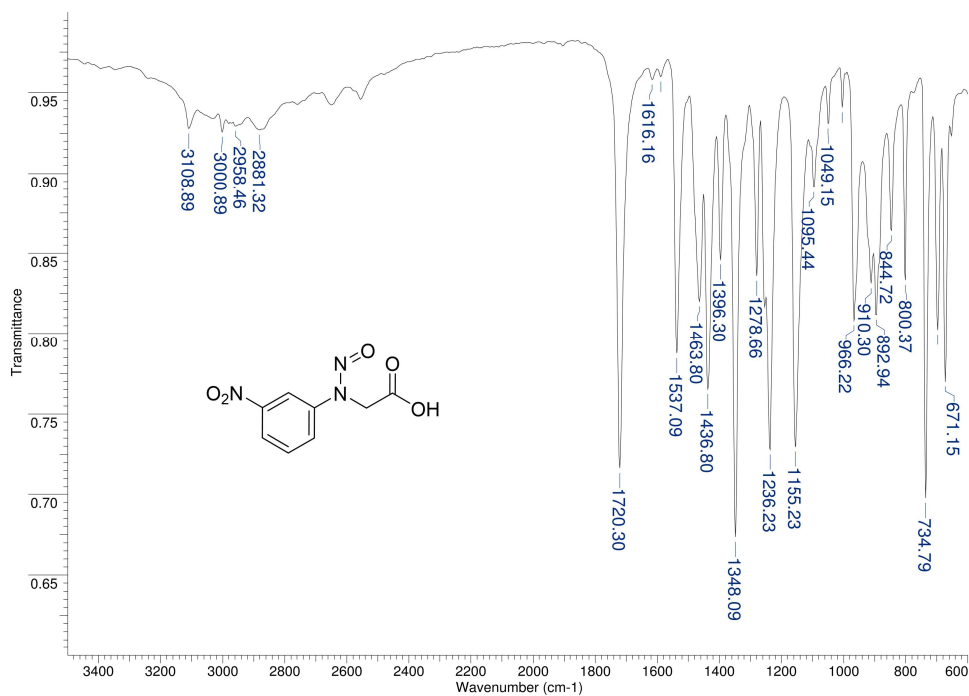


Figura A12. Espectro de IV (47b).

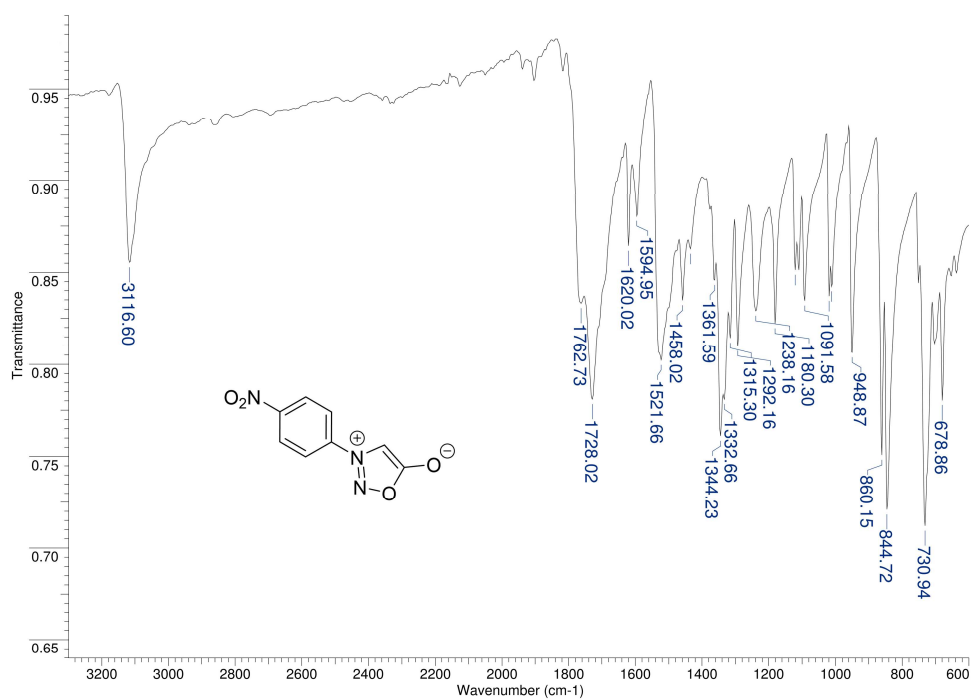


Figura A13. Espectro de IV (48a).

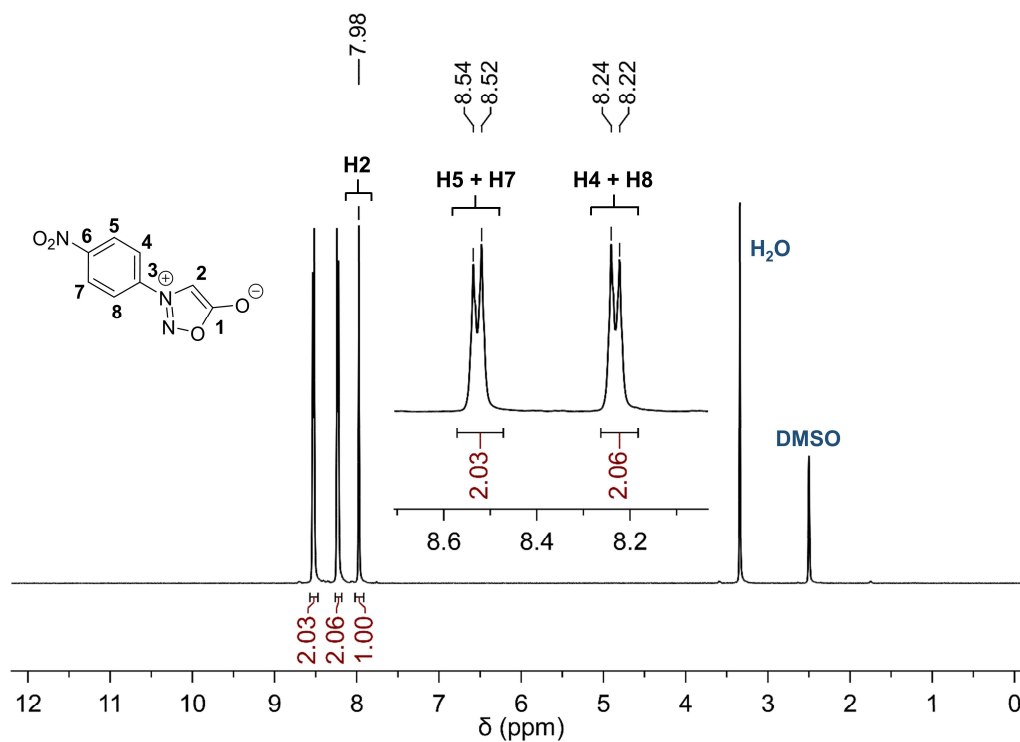


Figura A14. Espectro de RMN de ^1H (48a).

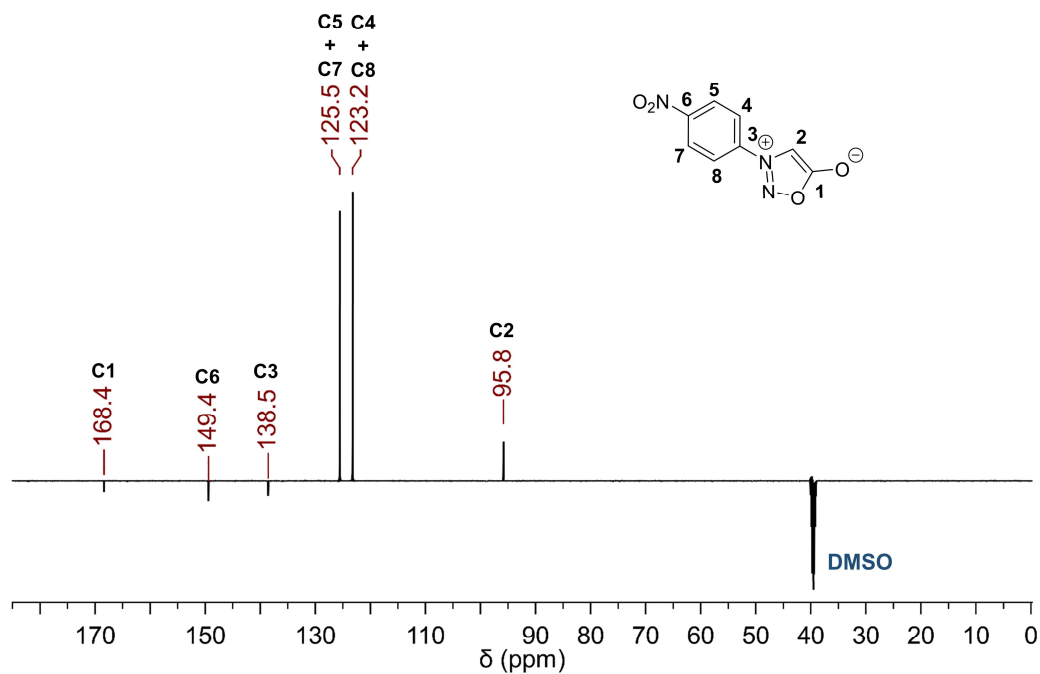


Figura A15. Espectro de RMN de ^{13}C (48a).

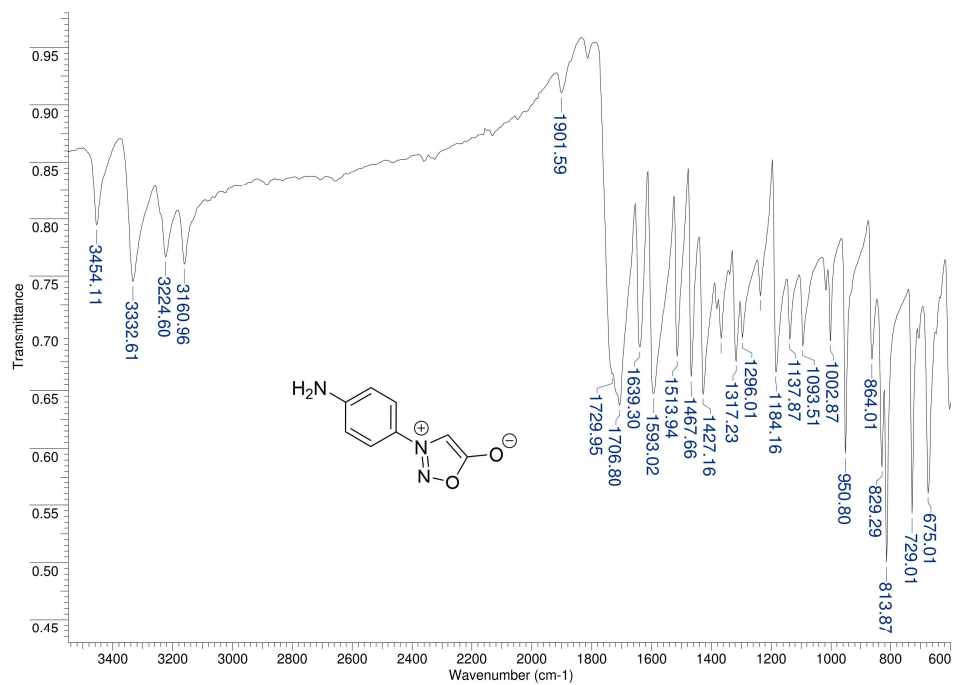


Figura A16. Espectro de IV (49a).

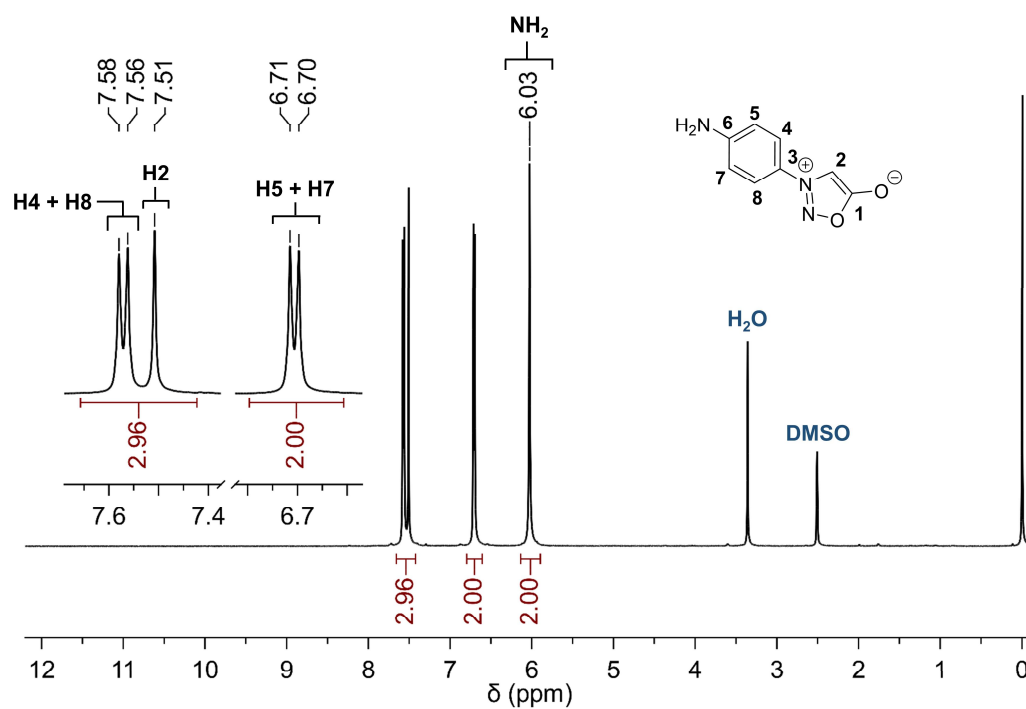


Figura A16. Espectro de RMN de ¹H (49a).

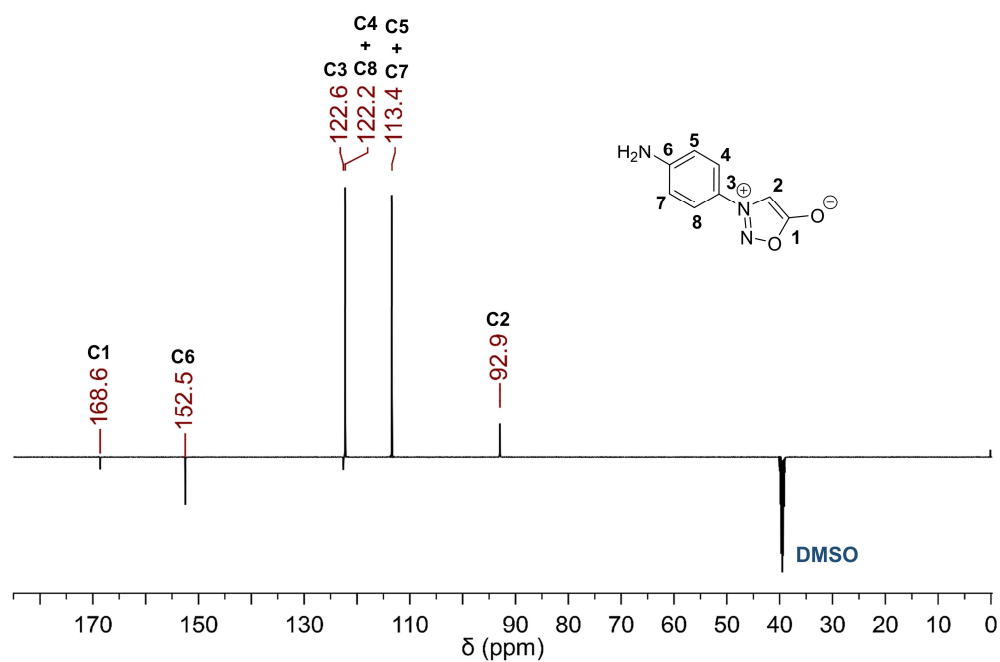


Figura A17. Espectro de RMN de ¹³C (49a).

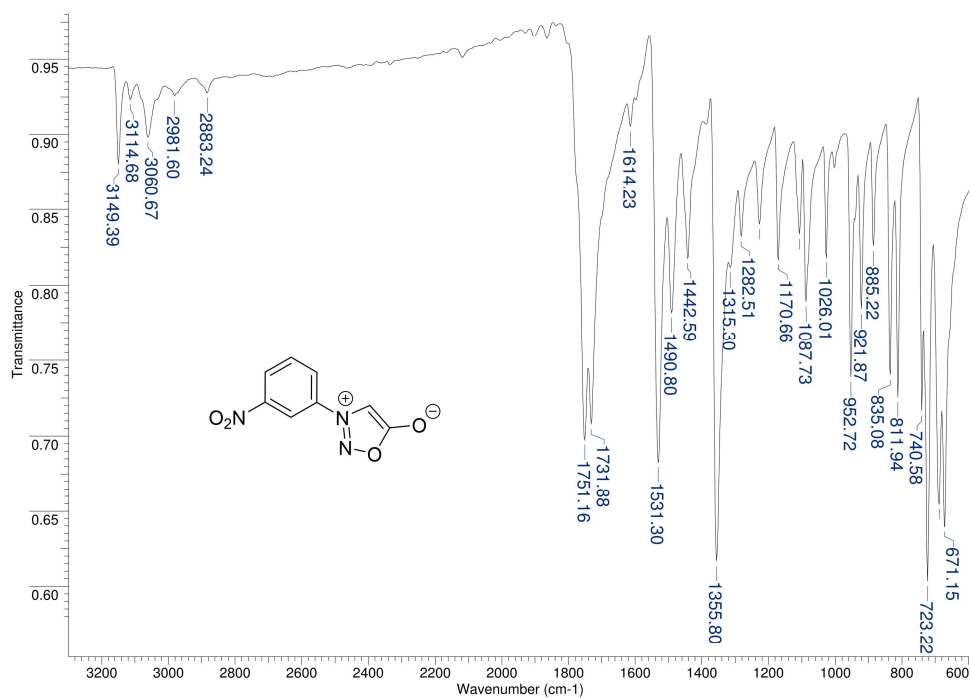


Figura A18. Espectro de IV (48b).

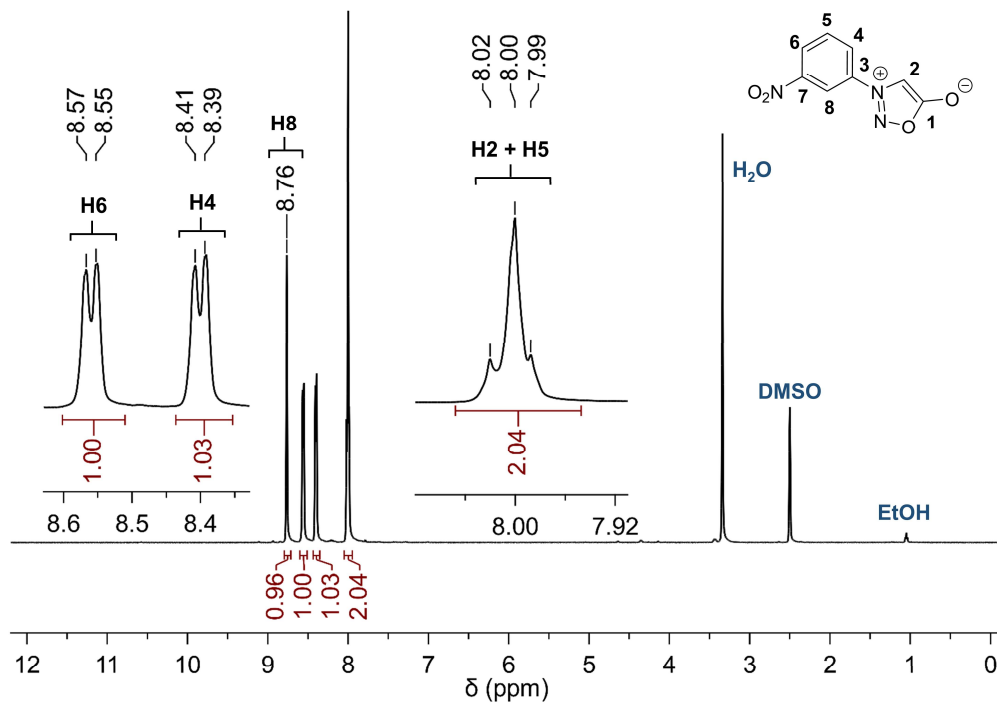


Figura A19. Espectro de RMN de ¹H (48b).

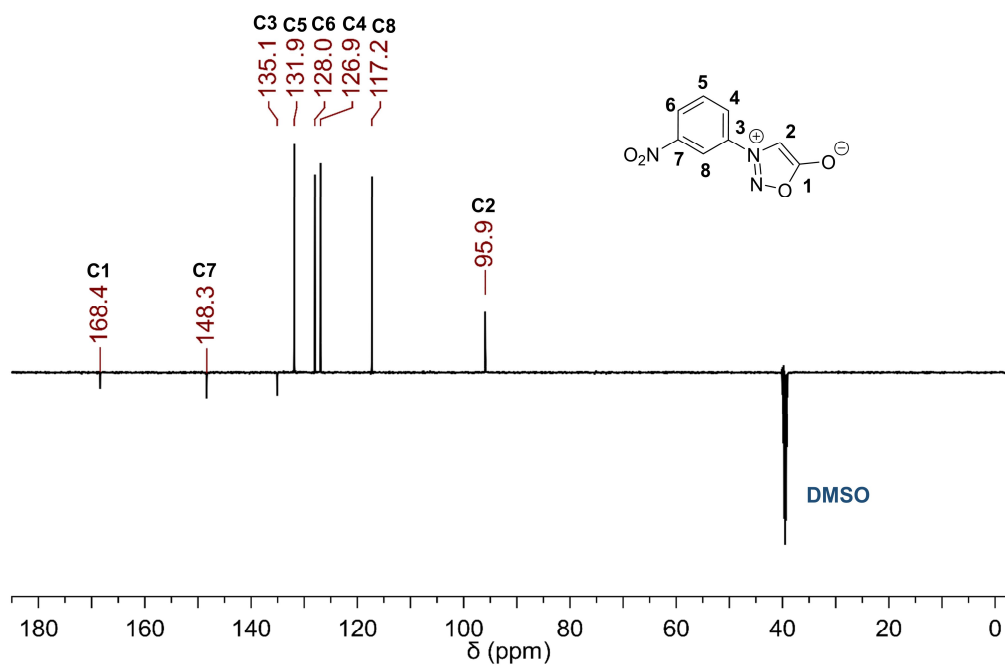


Figura A20. Espectro de RMN de ^{13}C (48b).

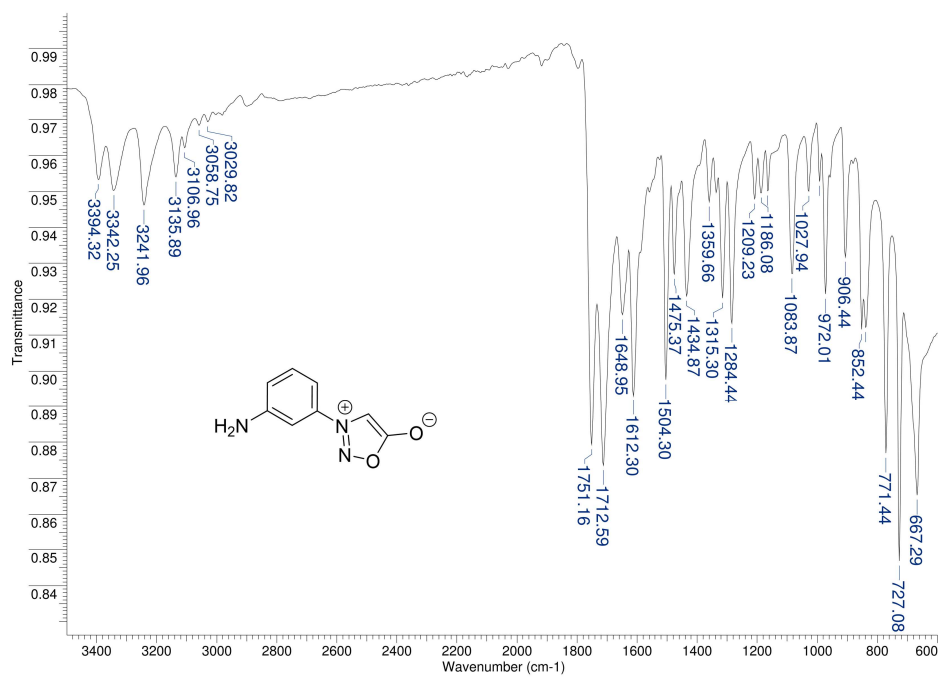


Figura A21. Espectro de IV (49b).

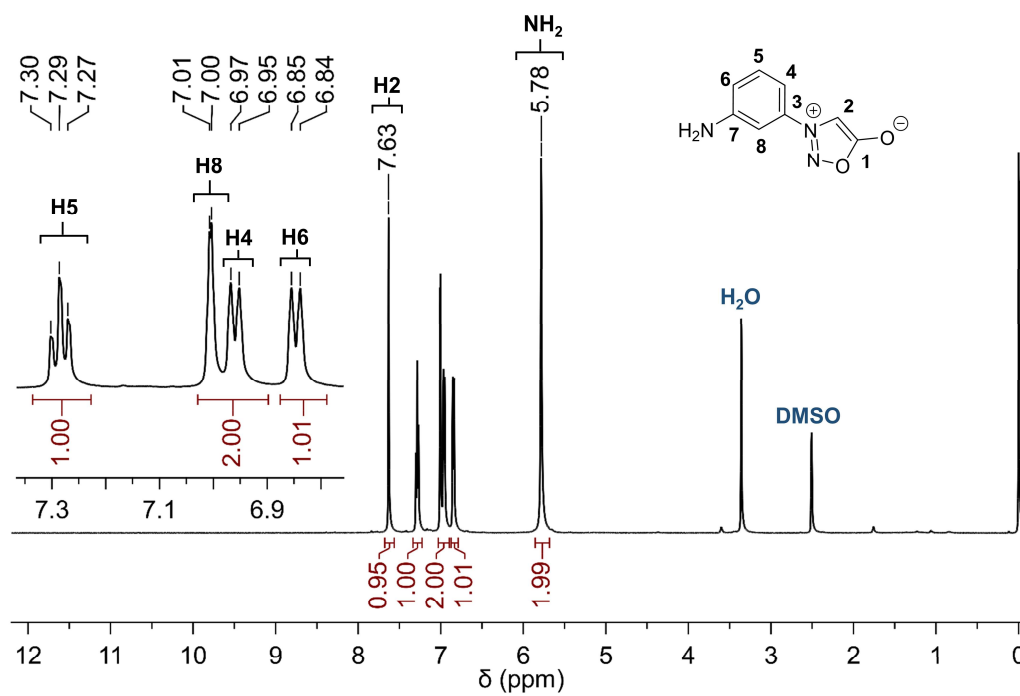


Figura A22. Espectro de RMN de ¹H (49b).

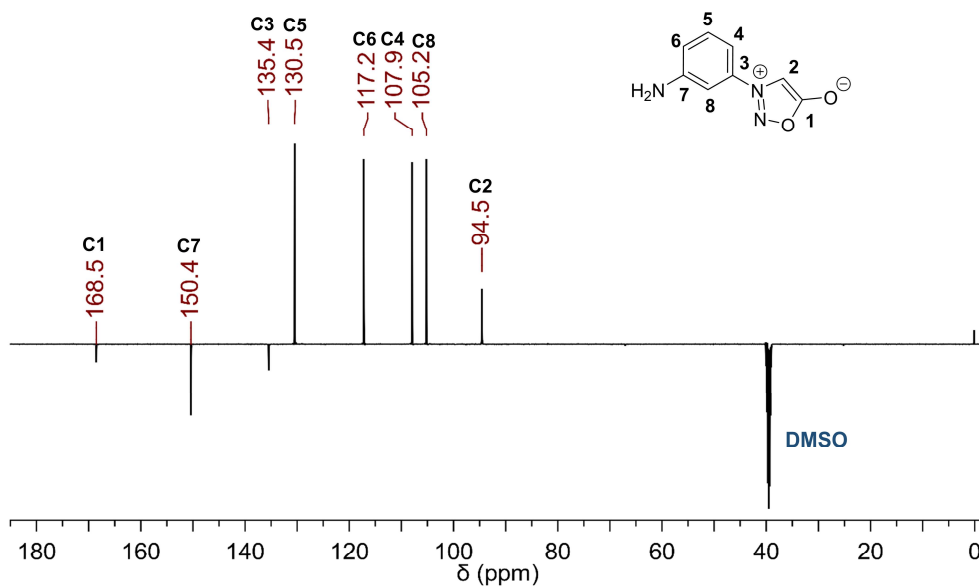


Figura A23. Espectro de RMN de ¹³C (49b).

- **Espectros de IV, RMN, CLAE e HRMS para 44a-44d**

Nas figuras de CLAE e HRMS, as estruturas estão nomeadas com seus códigos originais: S8C1 (44a), S8C2 (44b), S8C3 (44c), S8C4 (44d).

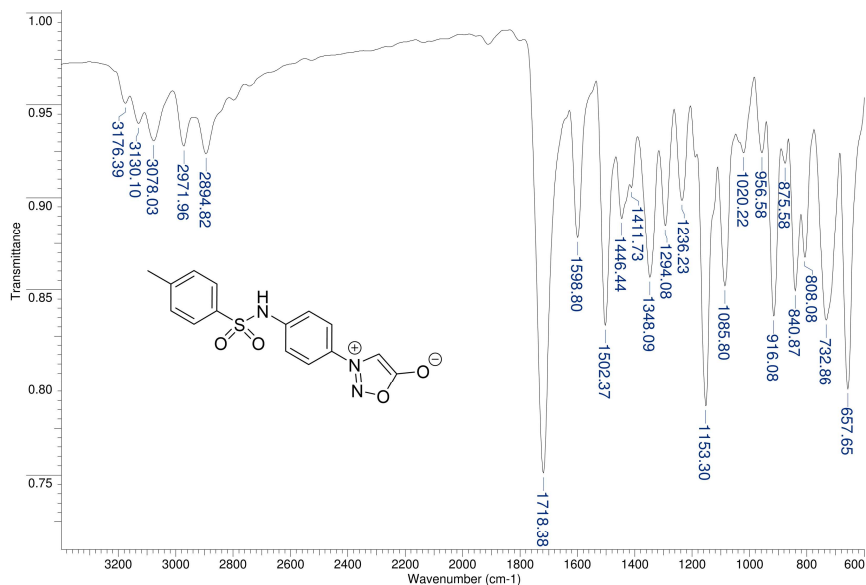


Figura A24. Espectro de IV (44a).

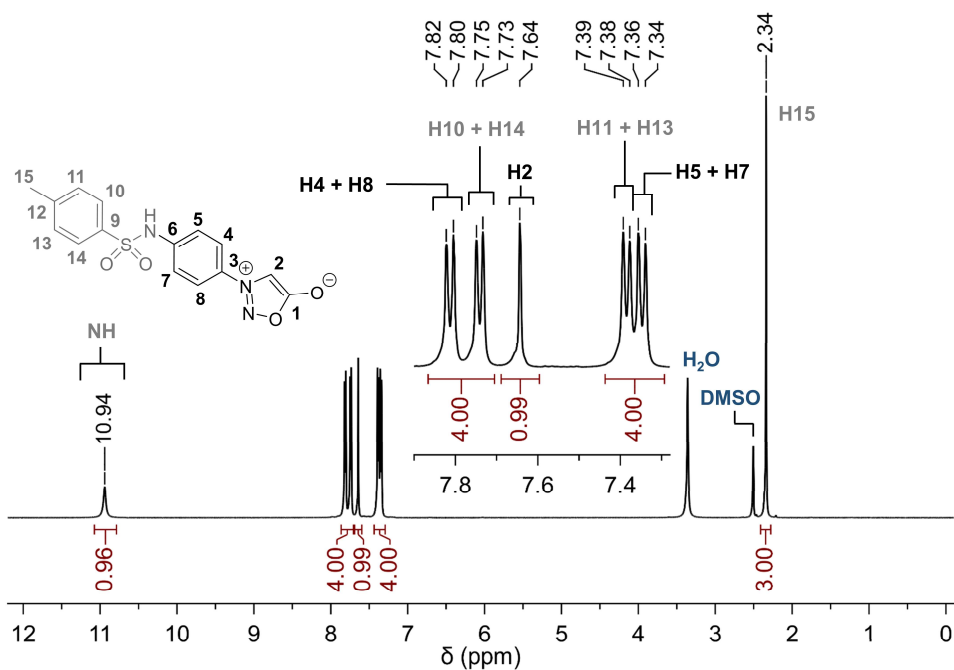


Figura A25. Espectro de RMN de ¹H (44a).

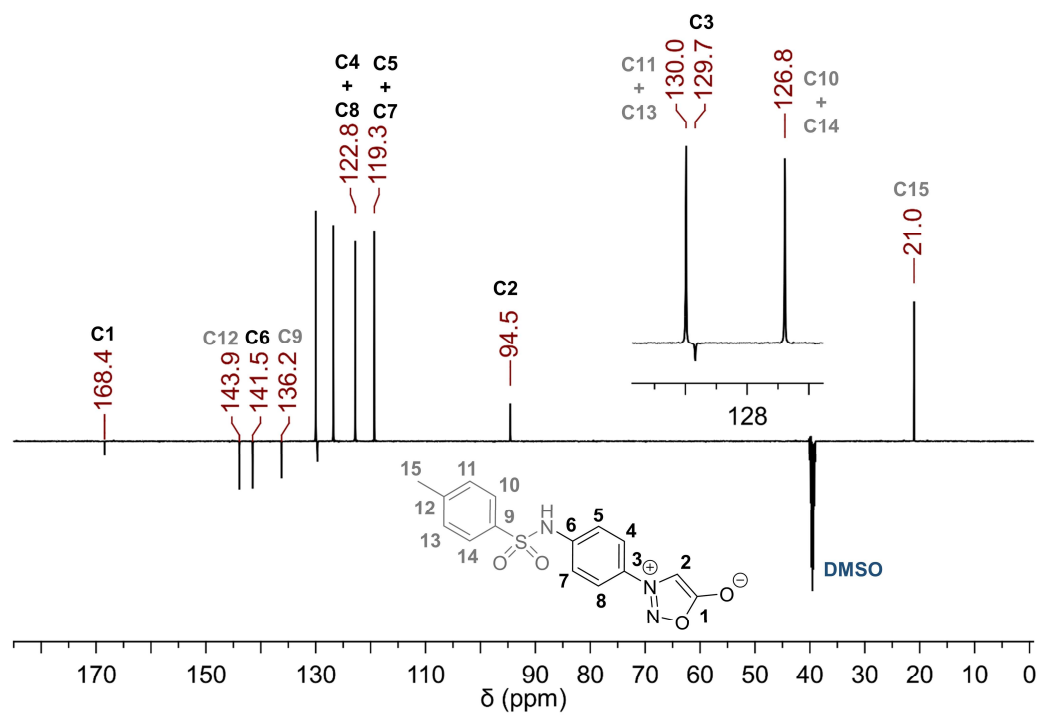
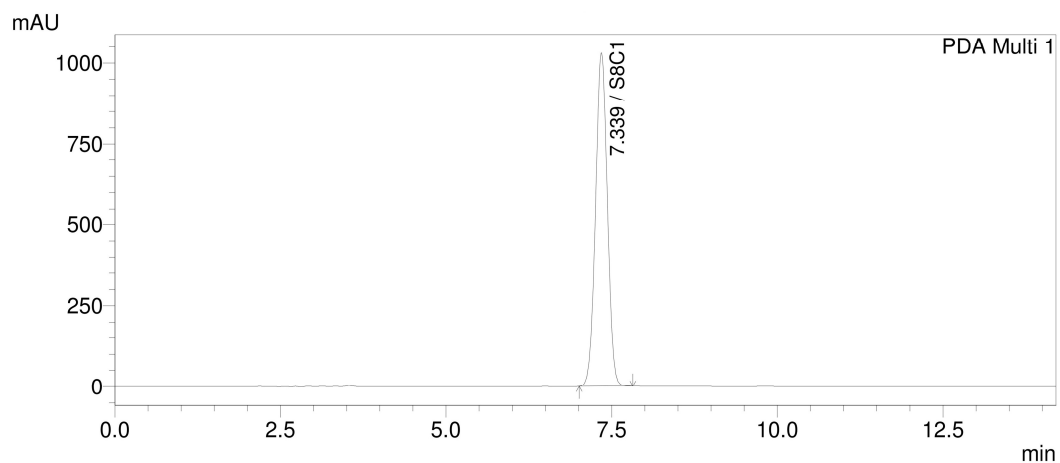


Figura A26. Espectro de RMN de ^{13}C (**44a**).



1 PDA Multi 1/280nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 280nm 4nm

Name	Ret. Time	Area %	Height %
S8C1	7.339	100.000	100.000
		100.000	100.000

Figura A27. Cromatograma (CLAE) de **44a**.

IgorResendes_S8C1_neg_20210820153058 #1-50 RT: 0.01-0.43 AV: 50 NL: 1.99E7
T: FTMS - p ESI Full ms [50.0000-750.0000]

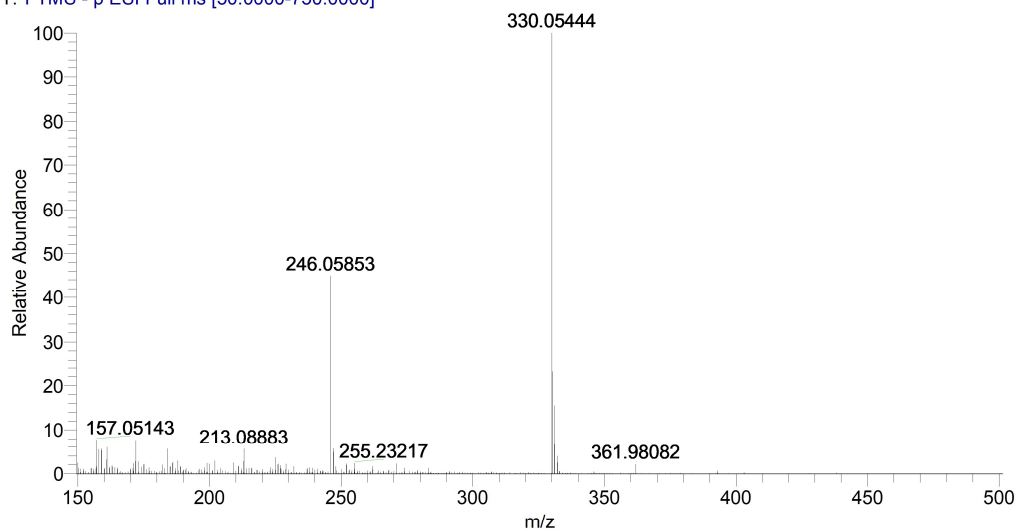


Figura A28. Espectro de massas de alta resolução de **44a**.

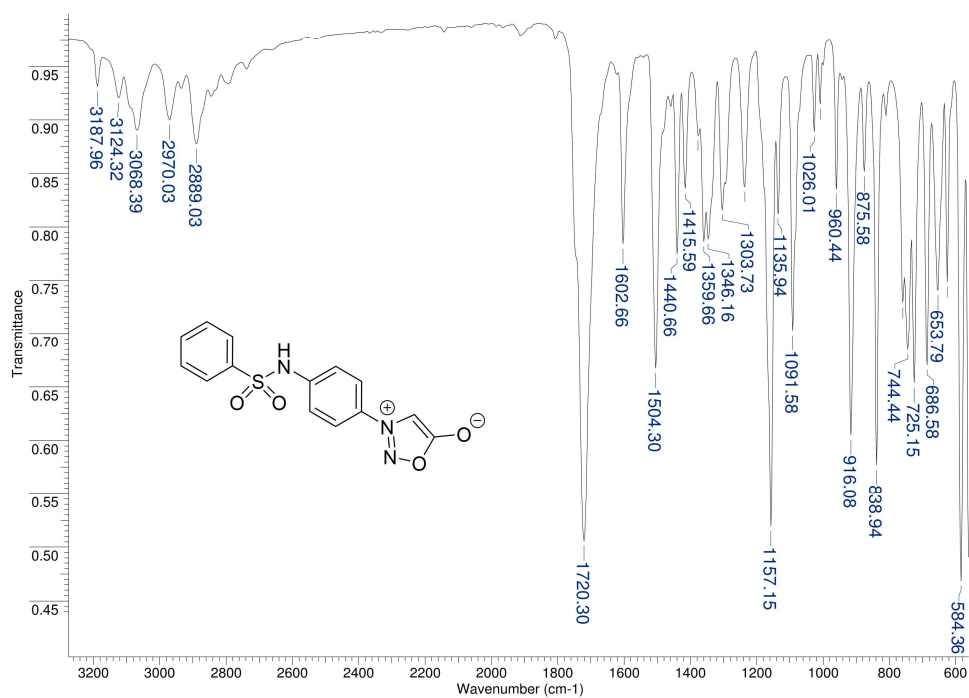


Figura A29. Espectro de IV (**44b**).

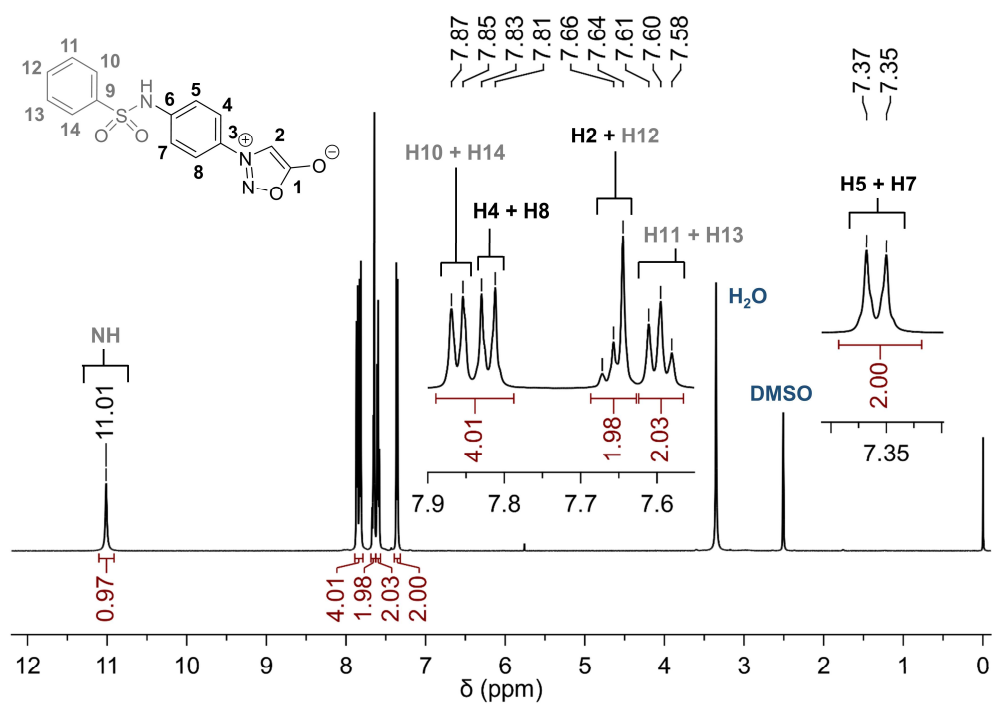


Figura A30. Espectro de RMN de ¹H (**44b**).

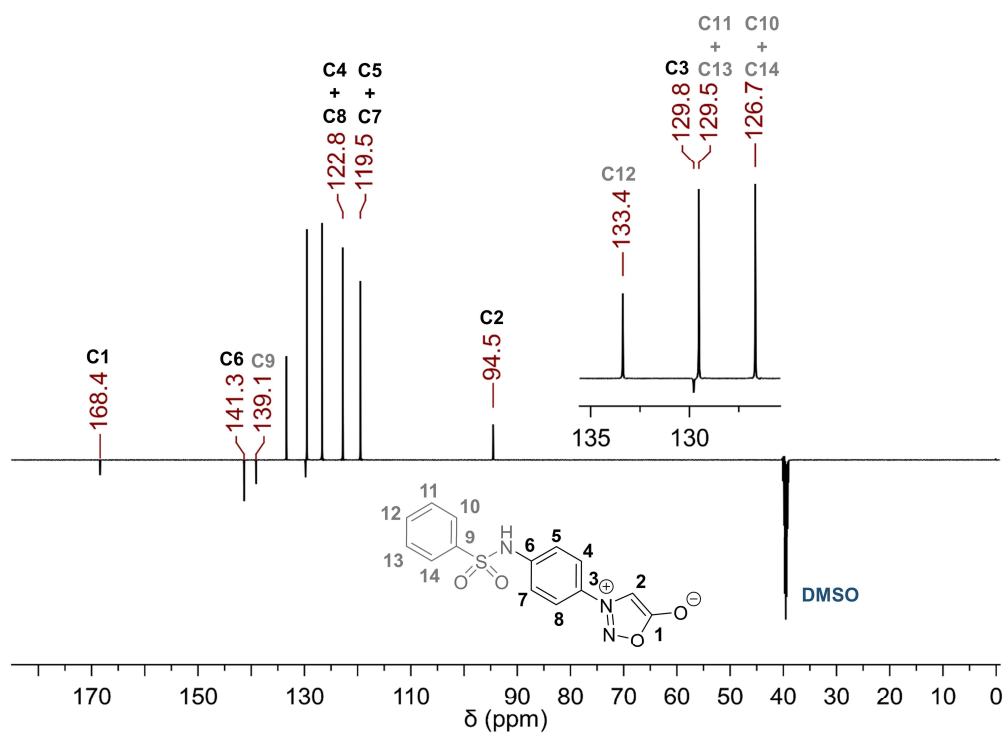


Figura A31. Espectro de RMN de ¹³C (**44b**).

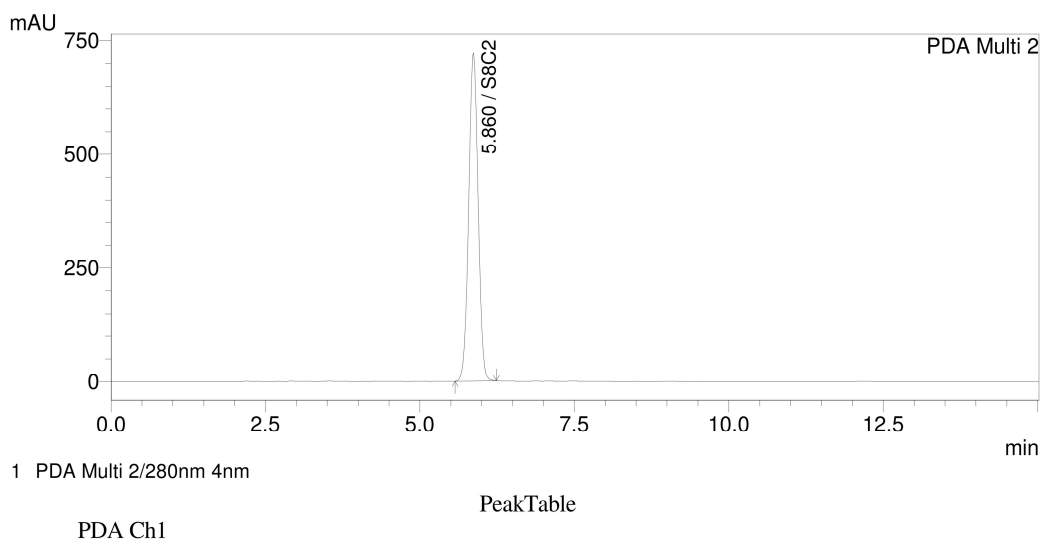


Figura A32. Cromatograma (CLAE) de **44b**.

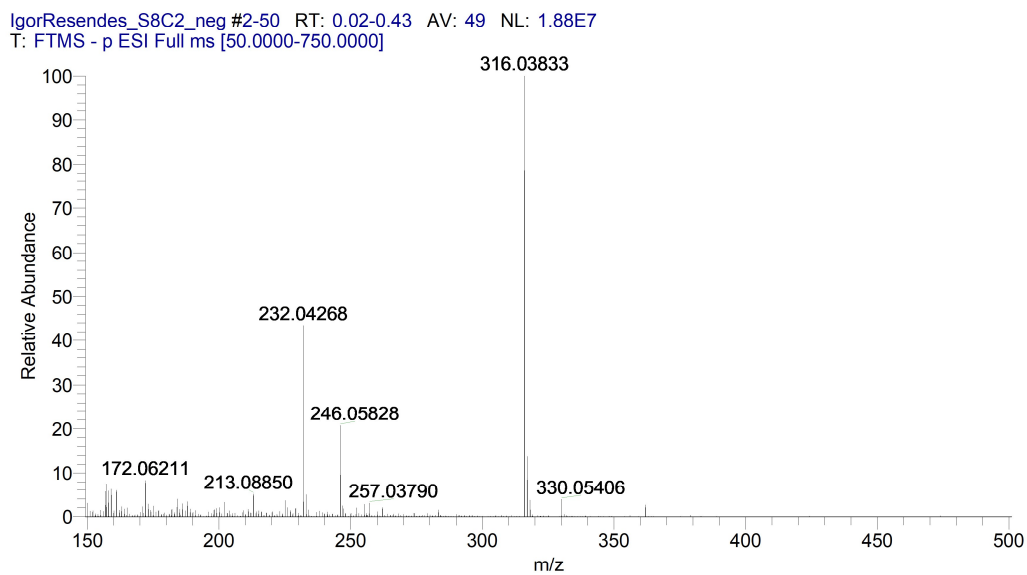


Figura A33. Espectro de massas de alta resolução de **44b**.

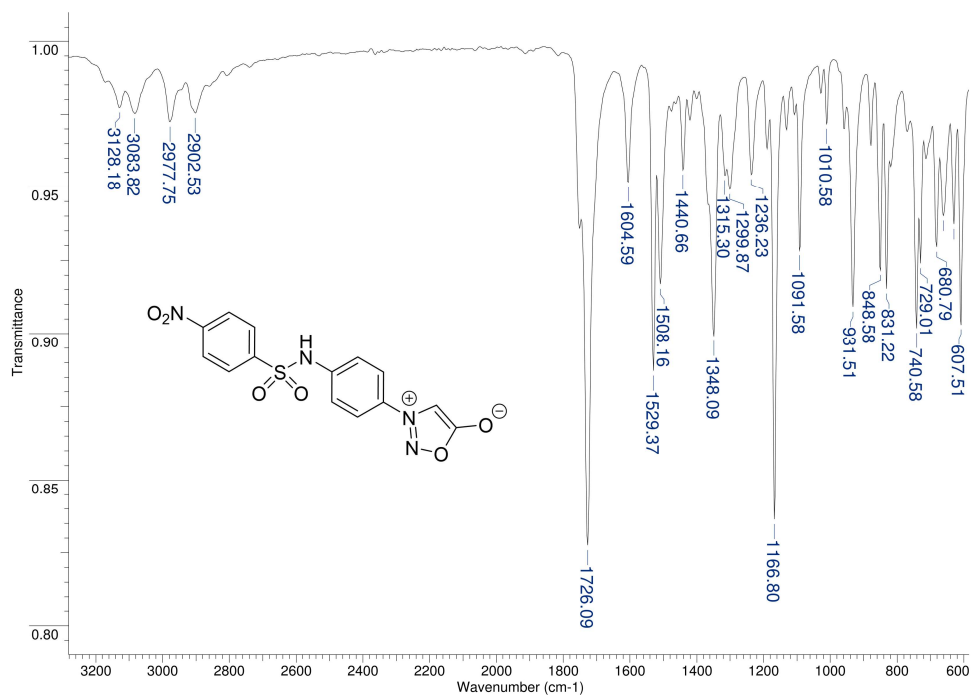


Figura A34. Espectro de IV (44c).

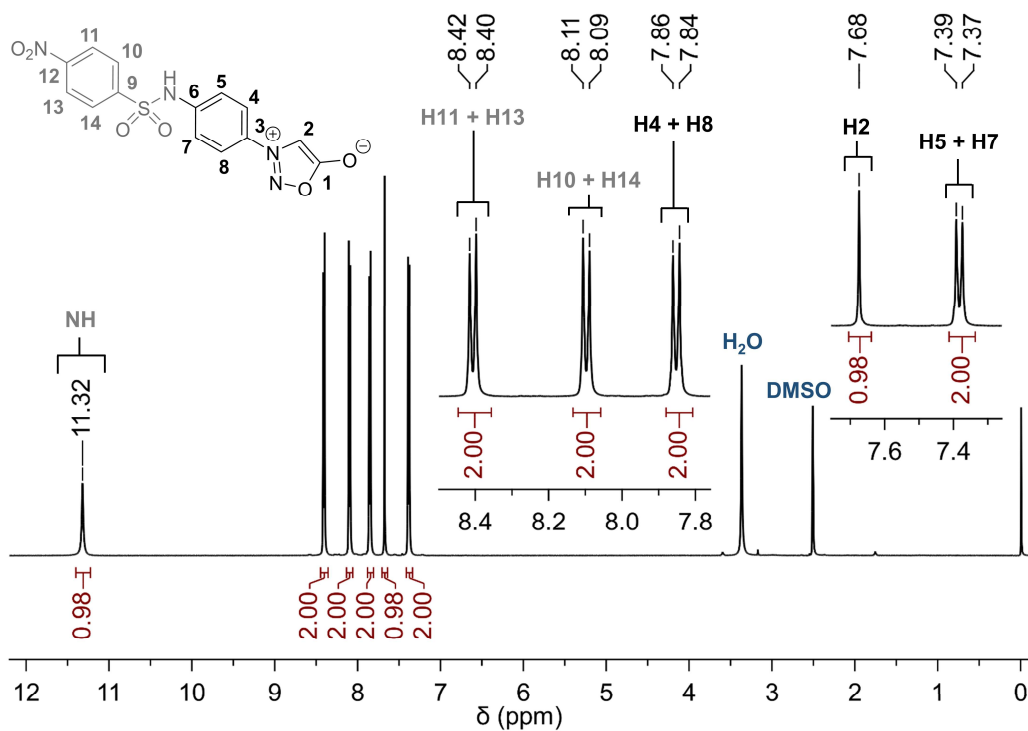


Figura A35. Espectro de RMN de ¹H (44c).

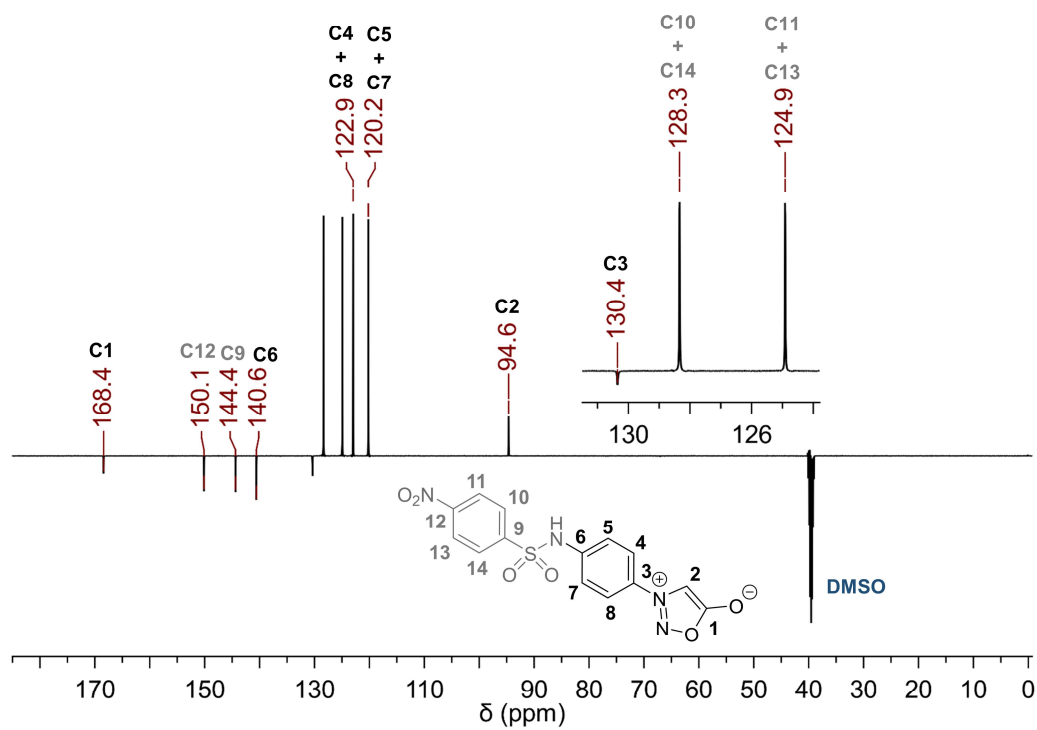
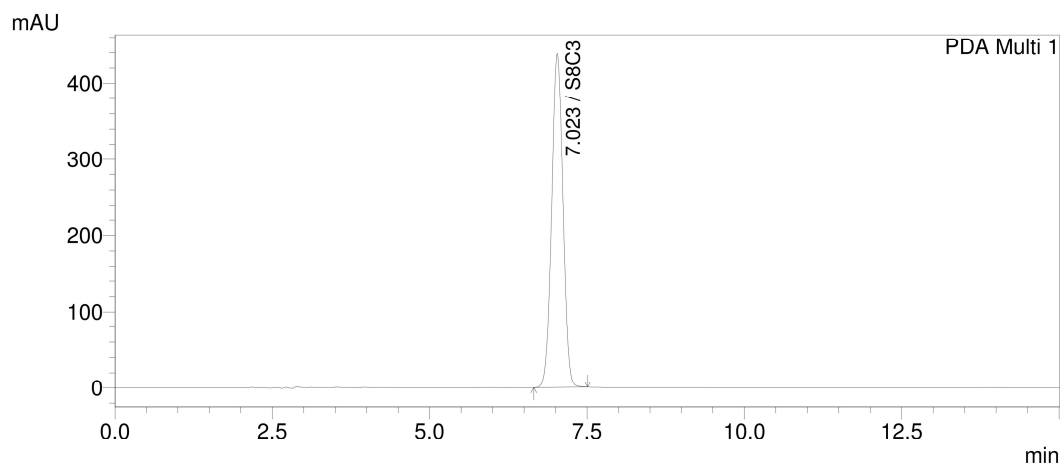


Figura A36. Espectro de RMN de ^{13}C (**44c**).



1 PDA Multi 1/280nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 280nm 4nm			
Name	Ret. Time	Area %	Height %
S8C3	7.023	100.000	100.000
		100.000	100.000

Figura A37. Cromatograma (CLAE) de **44c**.

IgorResendes_S8C3_neg_20210820155012 #1-50 RT: 0.01-0.43 AV: 50 NL: 4.60E7
T: FTMS - p ESI Full ms [50.0000-750.0000]

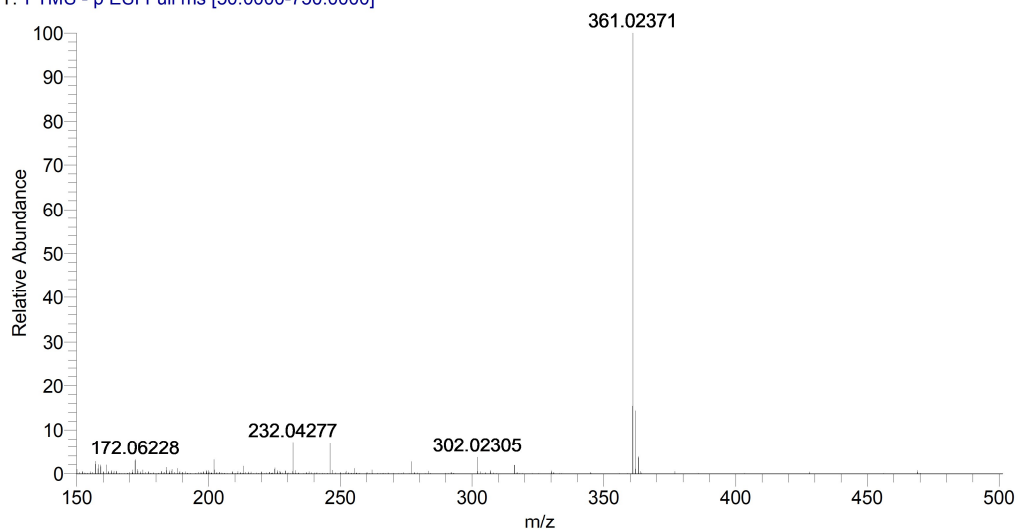


Figura A38. Espectro de massas de alta resolução de **44c**.

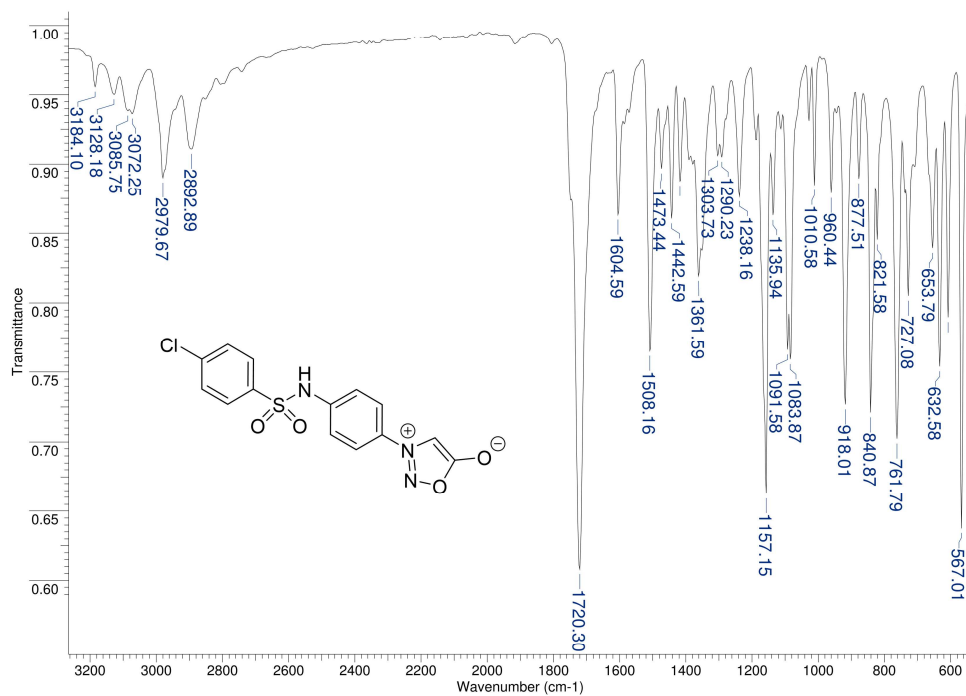


Figura A39. Espectro de IV (**44d**).

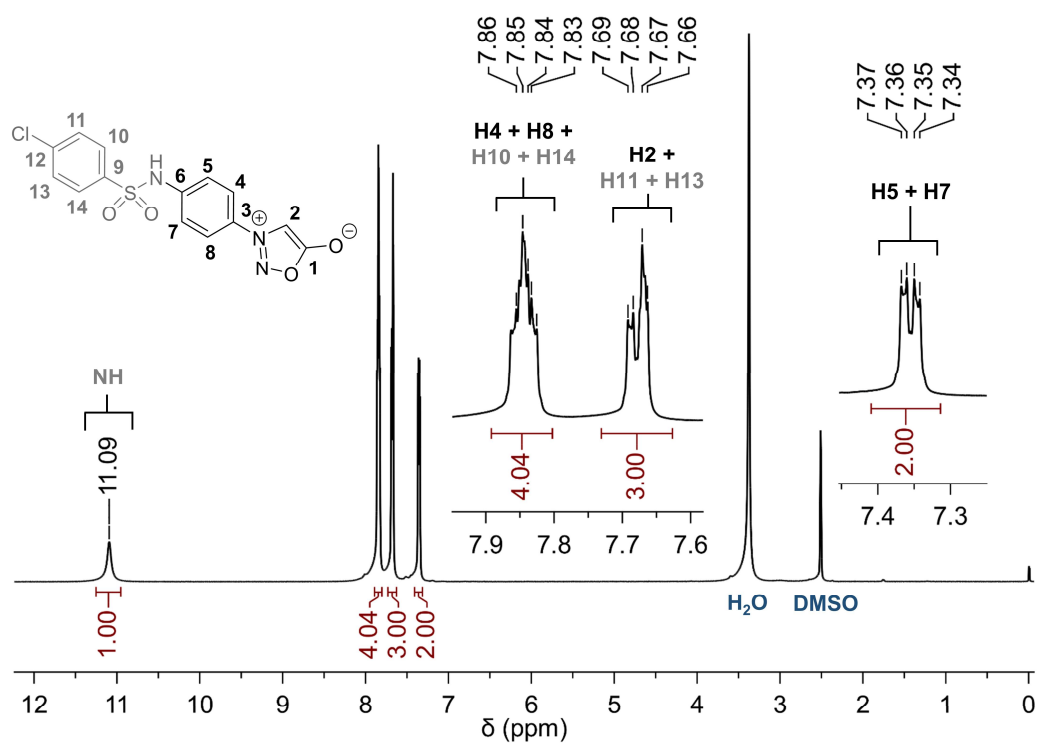


Figura A40. Espectro de RMN de ¹H (44d).

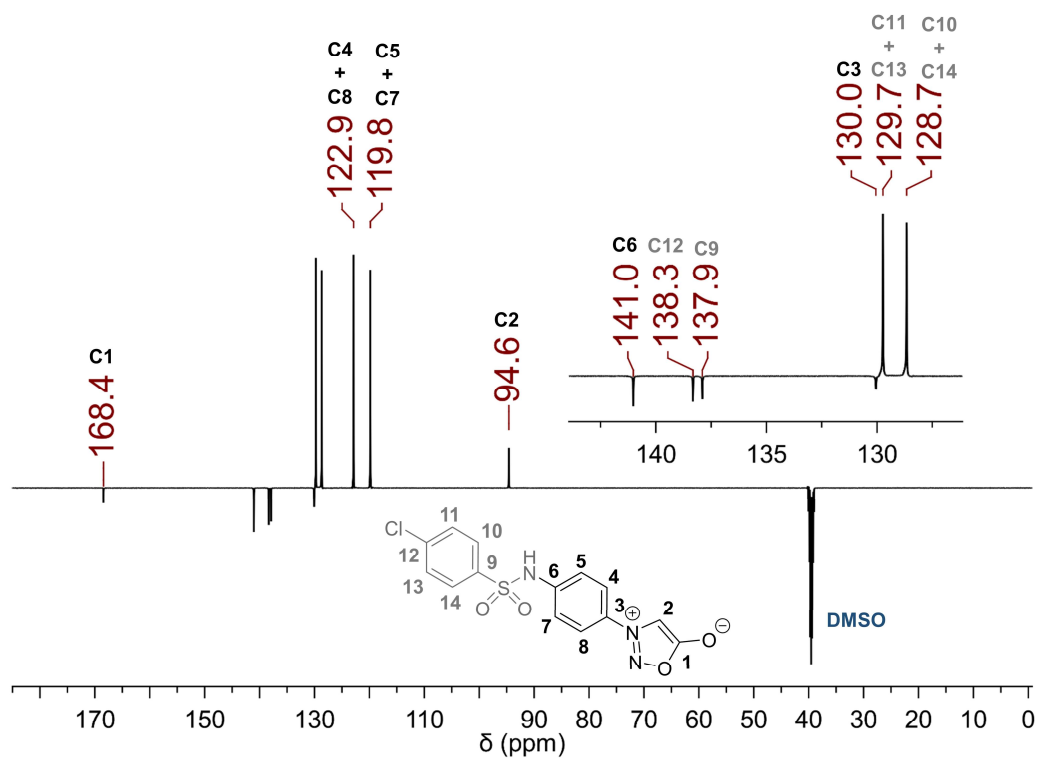
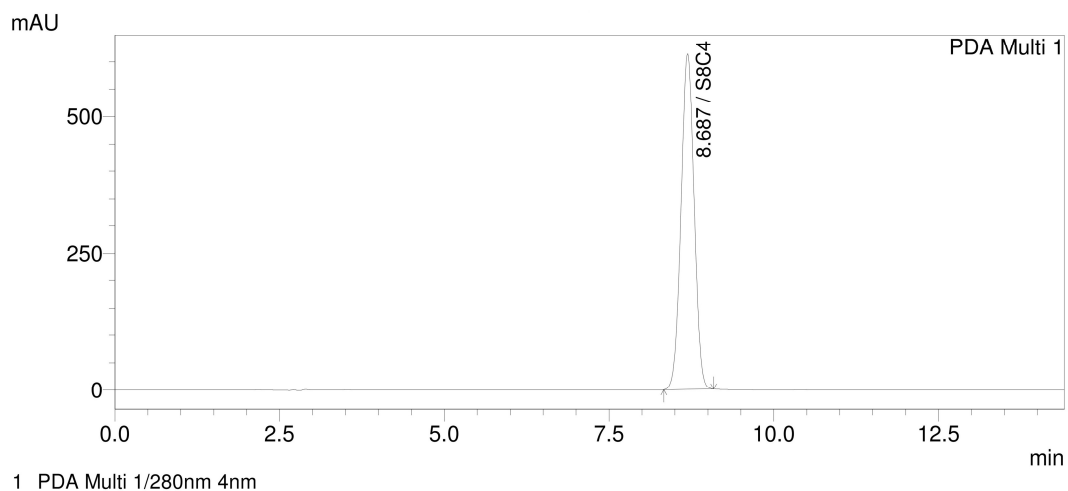


Figura A41. Espectro de RMN de ¹³C (44d).



PeakTable

PDA Ch1 280nm 4nm			
Name	Ret. Time	Area %	Height %
S8C4	8.687	100.000	100.000
		100.000	100.000

Figura A44. Cromatograma (CLAE) de **44d**.

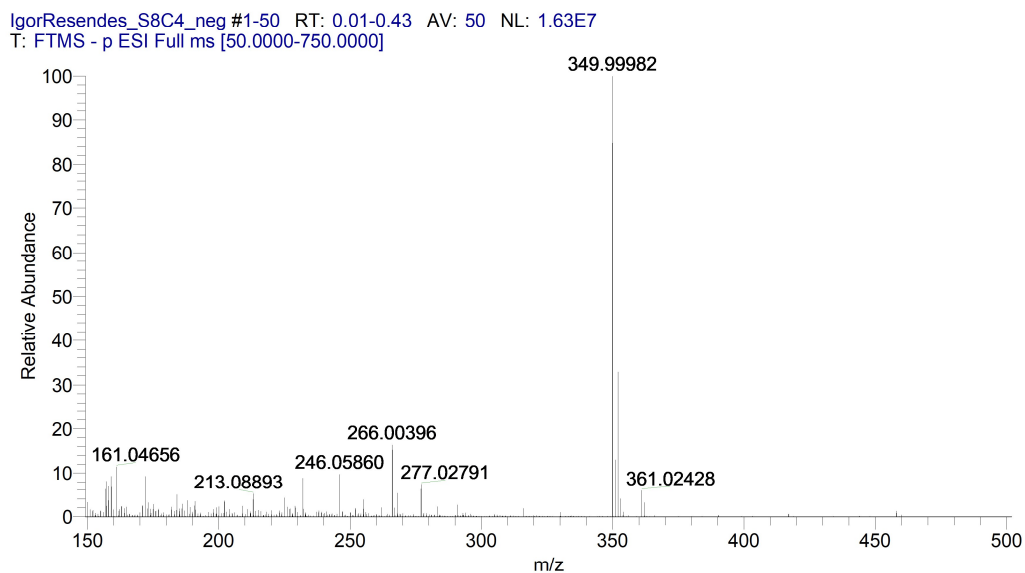


Figura A43. Espectro de massas de alta resolução de **44d**.

- FTIR, NMR, HPLC and HRMS spectra of 11a-11d

In the figures of HPLC and HRMS, the structures are labeled with their original codes/names:

S9C1 (11a), S9C2 (11b), S9C3 (11c), S9C4 (11d).

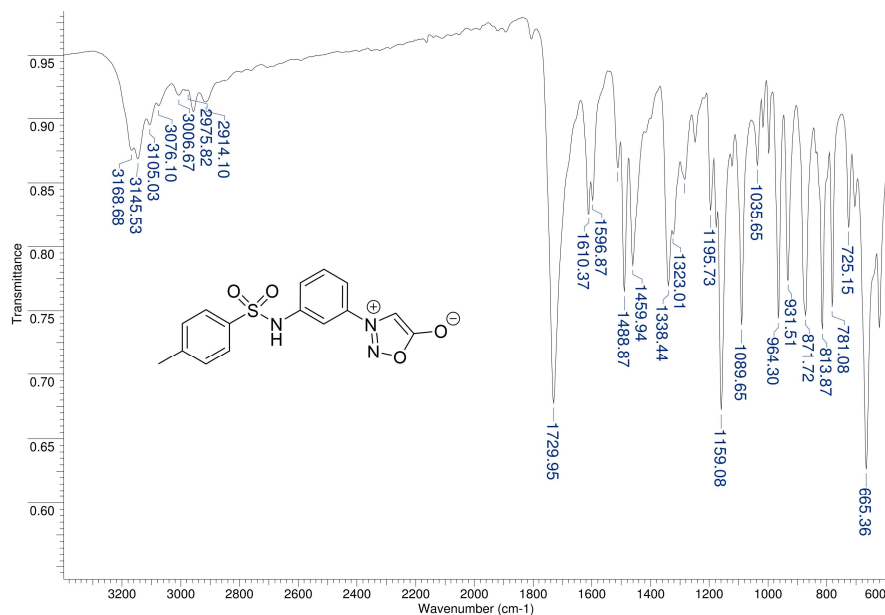


Figura A44. Espectro de IV (45a).

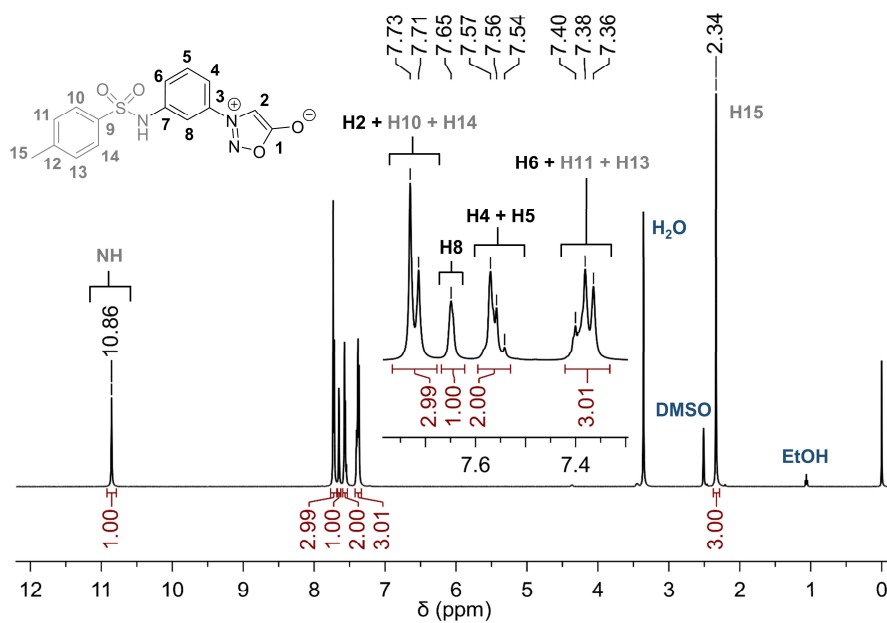


Figura A45. Espectro de RMN de ¹H (45a).

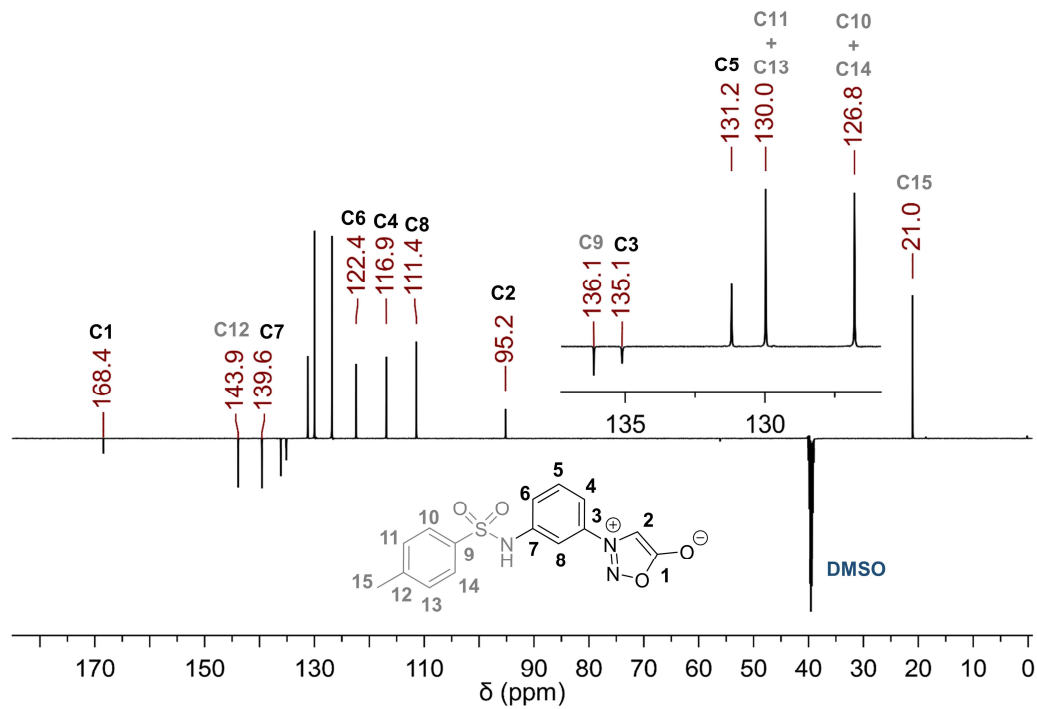
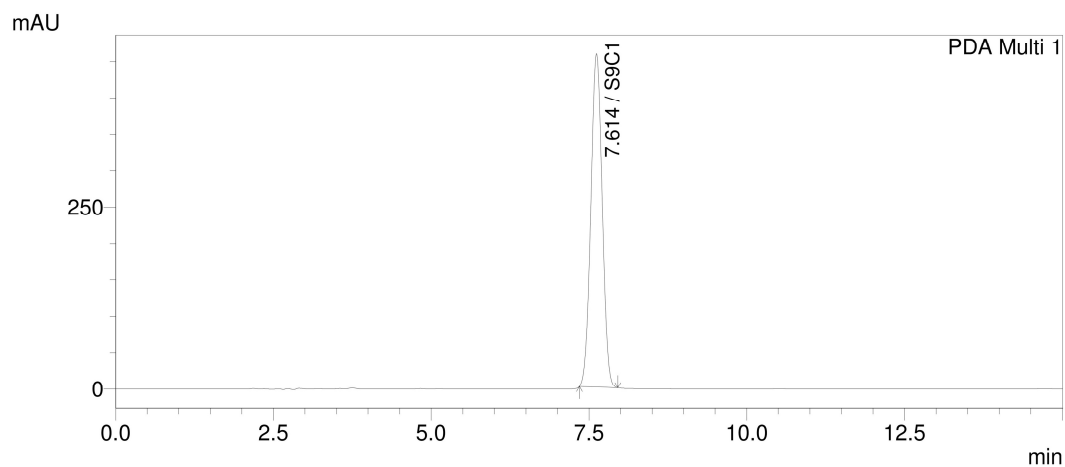


Figura A46. Espectro de RMN de ^{13}C (45a).



1 PDA Multi 1/304nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 304nm 4nm

Name	Ret. Time	Area %	Height %
S9C1	7.614	100.000	100.000
		100.000	100.000

Figura A47. Cromatograma (CLAE) de 45a.

IgorResendes_S9C1_neg #1-50 RT: 0.01-0.43 AV: 50 NL: 1.45E7
T: FTMS - p ESI Full ms [50.0000-750.0000]

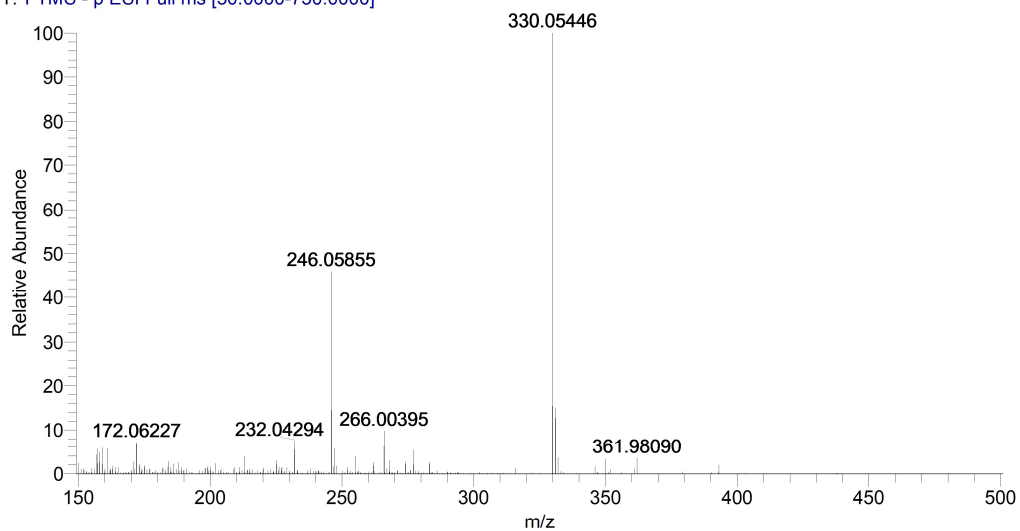


Figura A48. Espectro de massas de alta resolução de **45a**.

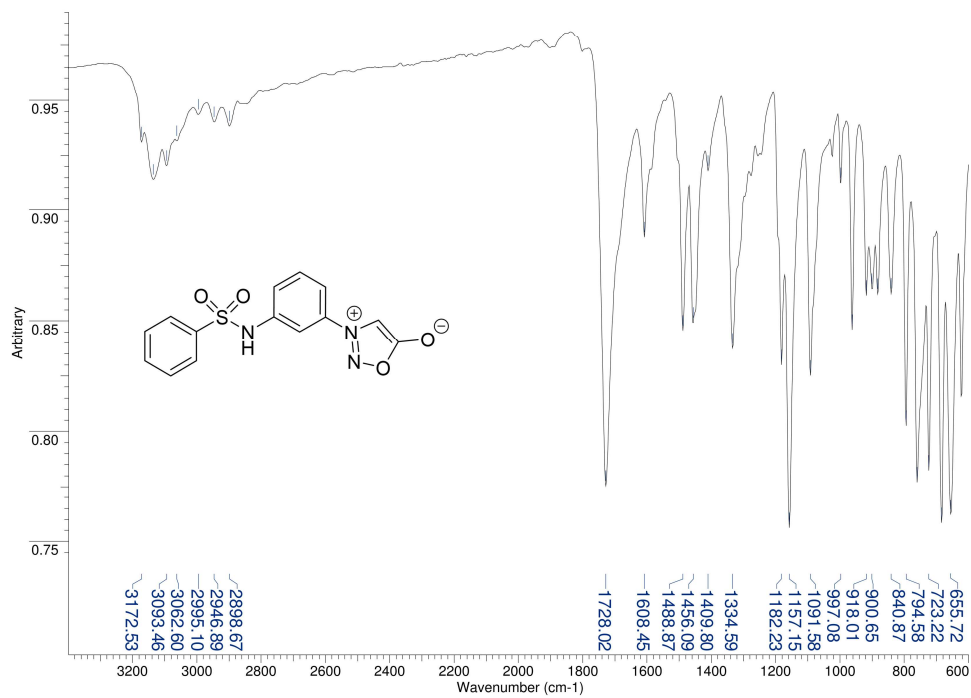


Figura A49. Espectro de IV (**45b**).

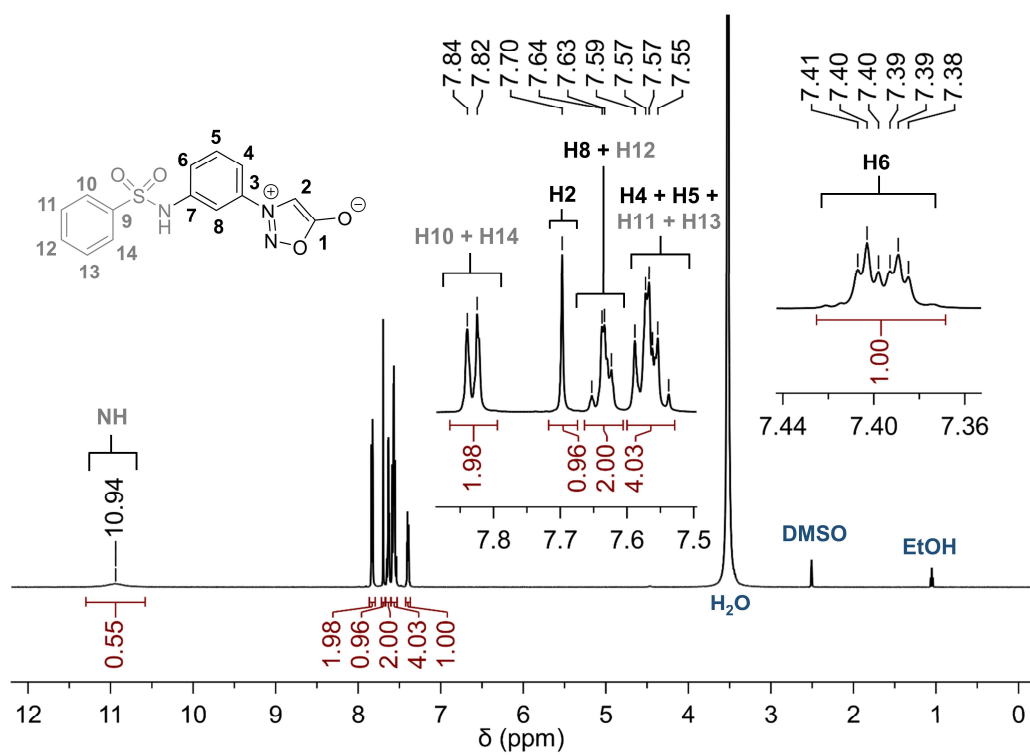


Figura A50. Espectro de RMN de ¹H (45b)

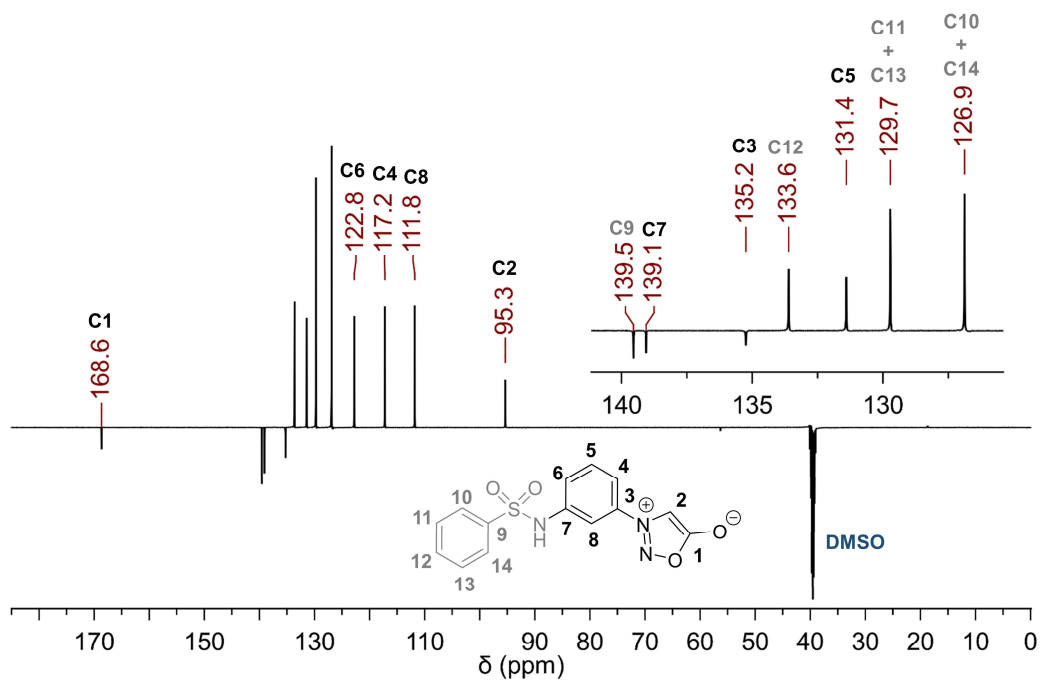
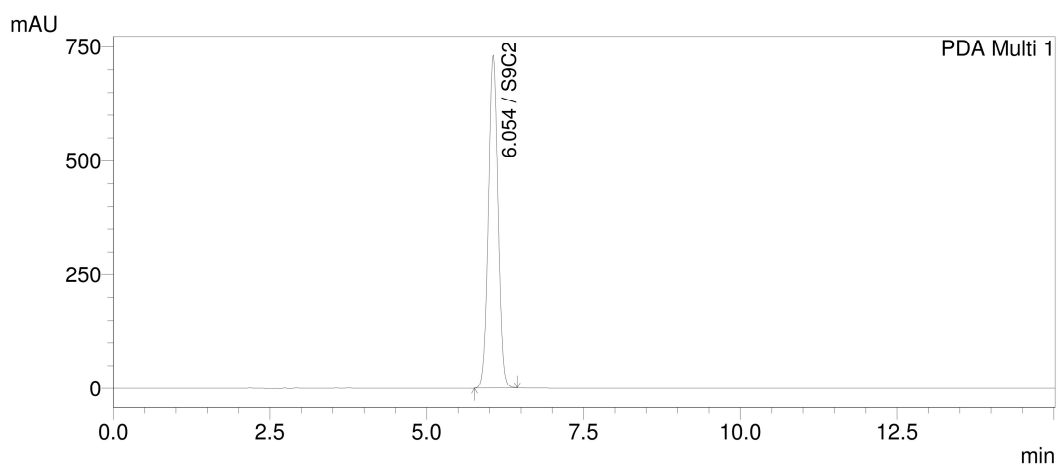


Figura A51. Espectro de RMN de ¹³C (45b).



1 PDA Multi 1/304nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 304nm 4nm

Name	Ret. Time	Area %	Height %
S9C2	6.054	100.000	100.000
		100.000	100.000

Figura A52. Cromatograma (CLAE) de **45b**.

IgorResendes_S9C2_neg #1-50 RT: 0.01-0.43 AV: 50 NL: 2.44E7
T: FTMS - p ESI Full ms [50.0000-750.0000]

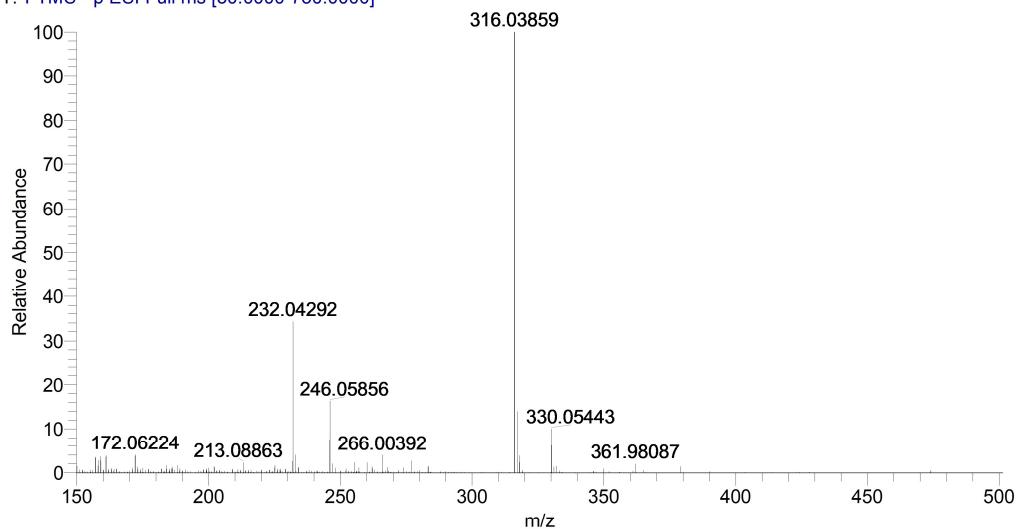


Figura A53. Espectro de massas de alta resolução de **45b**.

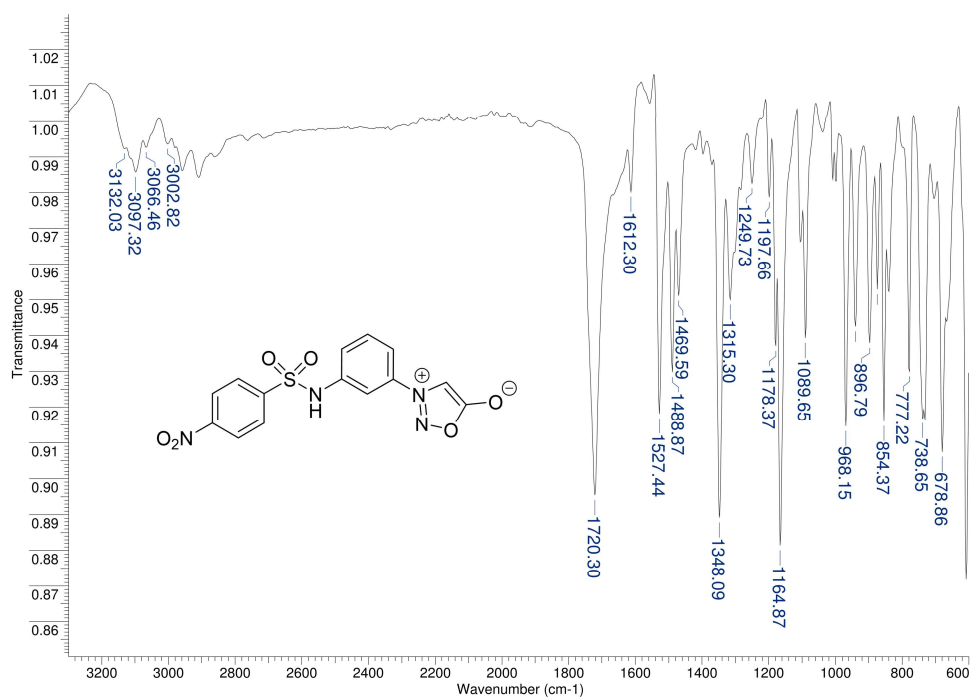


Figura A54. Espectro de IV (45c).

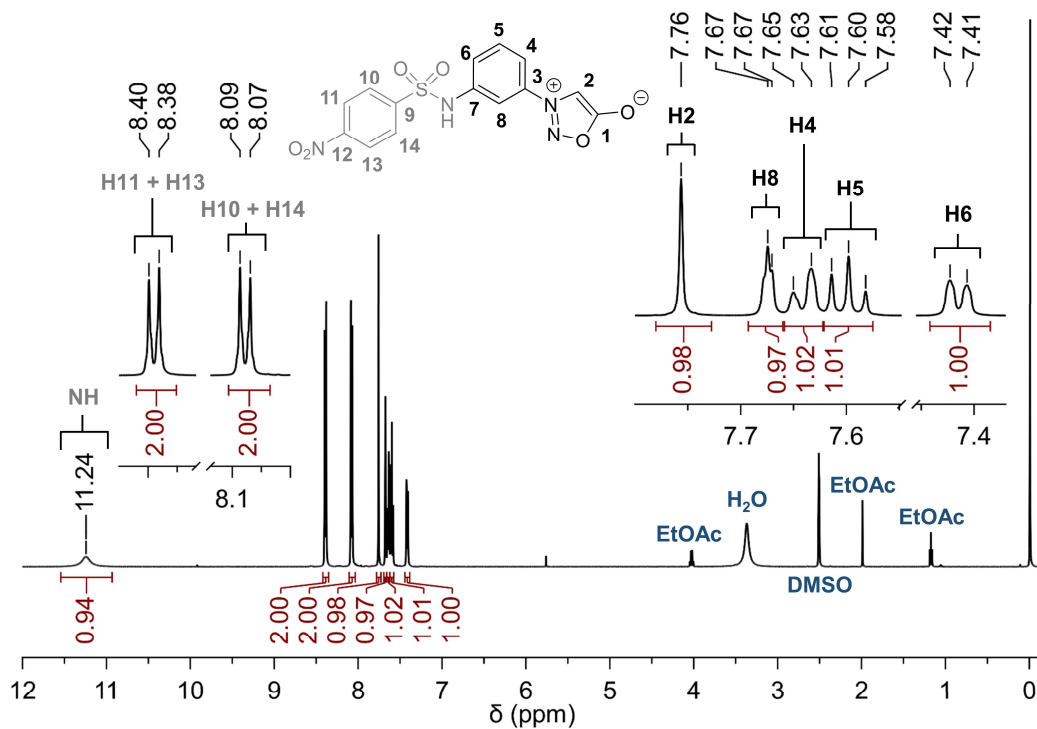


Figura A55. Espectro de RMN de ¹H (45c)

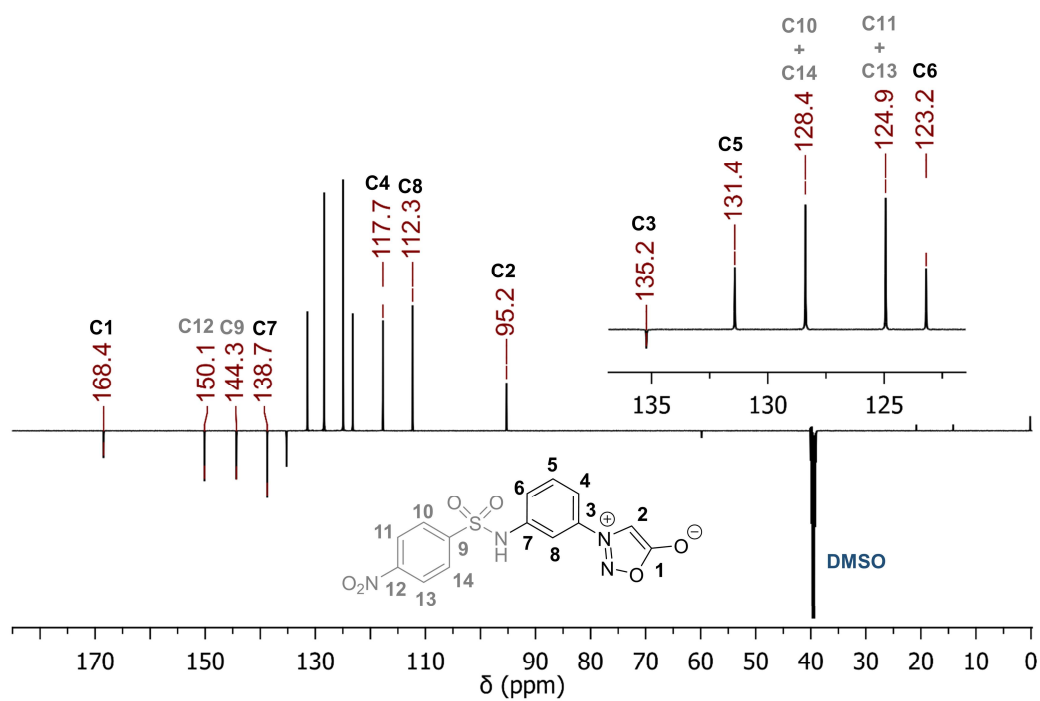
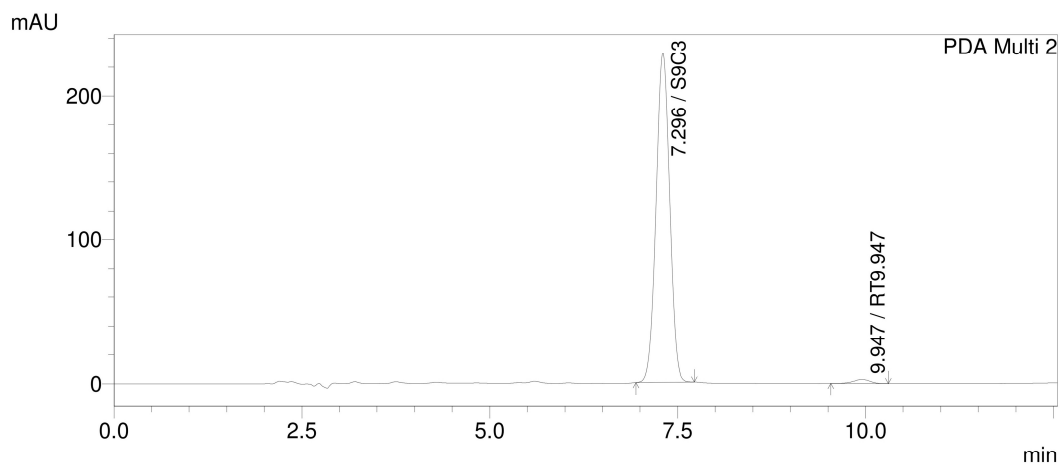


Figura A56. Espectro de RMN de ^{13}C (**45c**).



1 PDA Multi 2/254nm 4nm

PeakTable

PDA Ch2 254nm 4nm

Name	Ret. Time	Area %	Height %
S9C3	7.296	98.456	98.766
RT9.947	9.947	1.544	1.234
		100.000	100.000

Figura A57. Cromatograma (CLAE) de **45c**.

IgorResendes_S9C3_neg_20210820162707 #1-50 RT: 0.01-0.43 AV: 50 NL: 4.60E7
T: FTMS - p ESI Full ms [50.0000-750.0000]

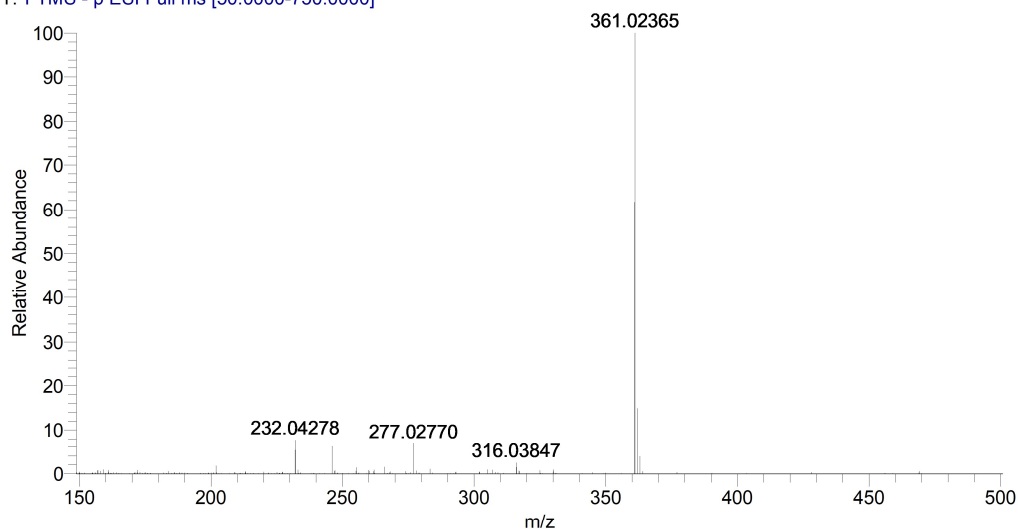


Figura A58. Espectro de massas de alta resolução de **45c**.

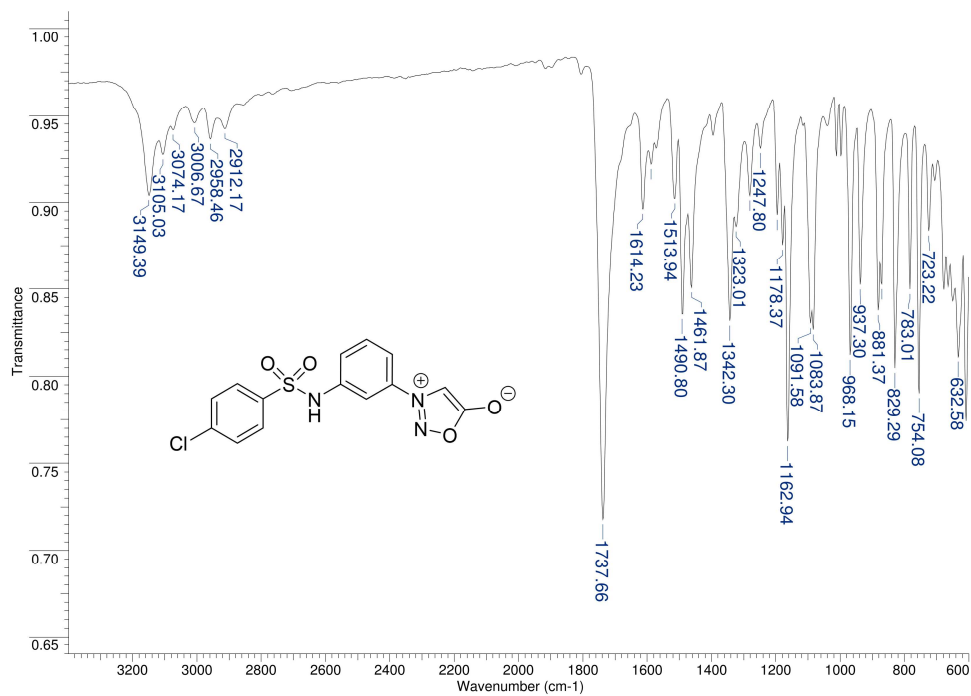


Figura A59. Espectro de IV (**45d**).

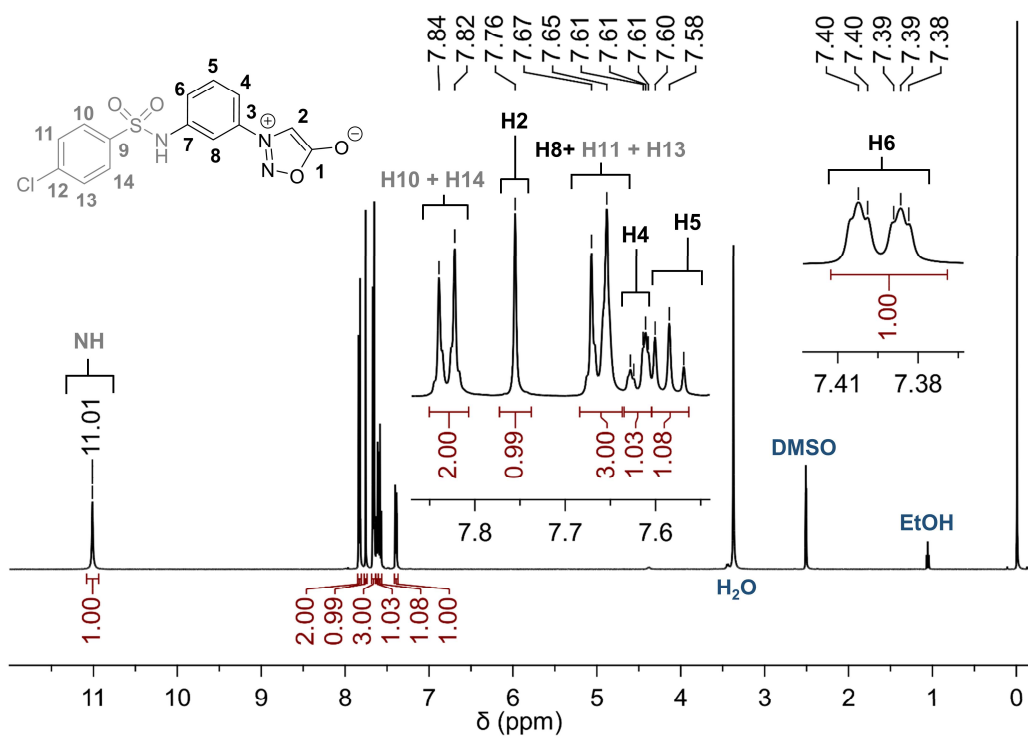


Figura A60. Espectro de RMN de ¹H (45d)

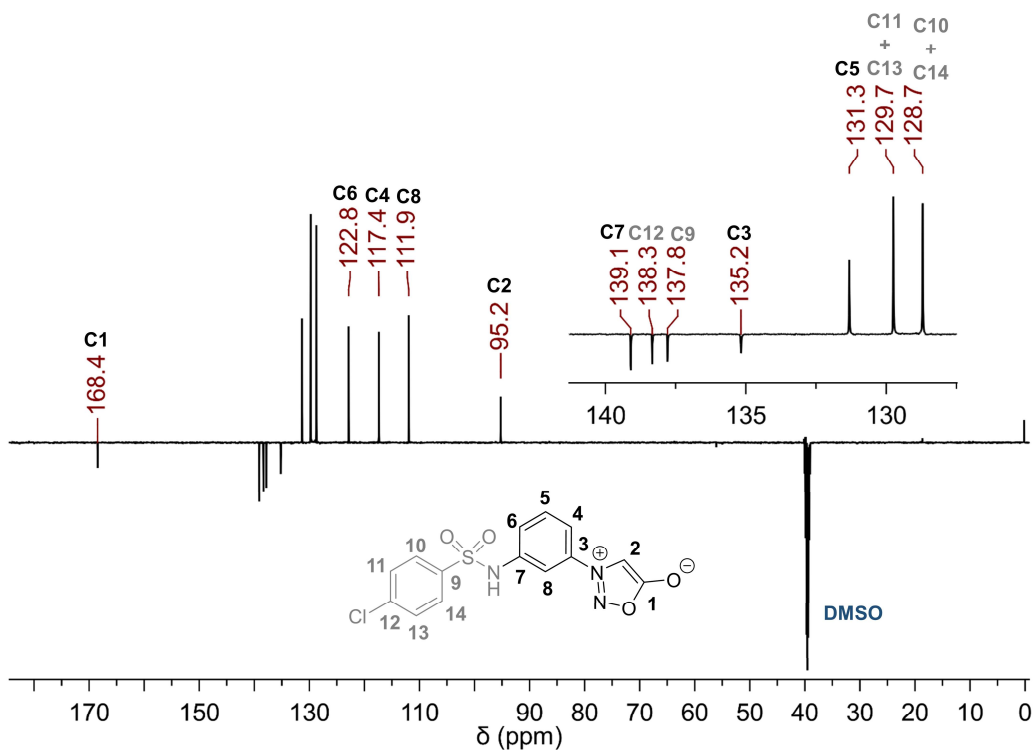
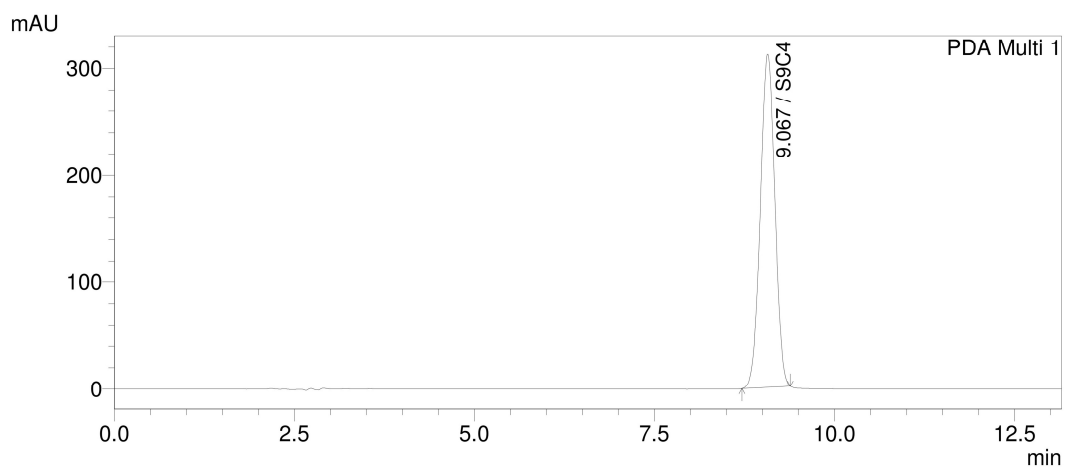


Figura A61. Espectro de RMN de ¹³C (45d).



1 PDA Multi 1/304nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 304nm 4nm

Name	Ret. Time	Area %	Height %
S9C4	9.067	100.000	100.000
		100.000	100.000

Figura A62. Cromatograma (CLAE) de **45d**.

IgorResendes_S9C4_neg_20210820163825 #1-50 RT: 0.01-0.43 AV: 50 NL: 1.87E7
T: FTMS - p ESI Full ms [50.0000-750.0000]

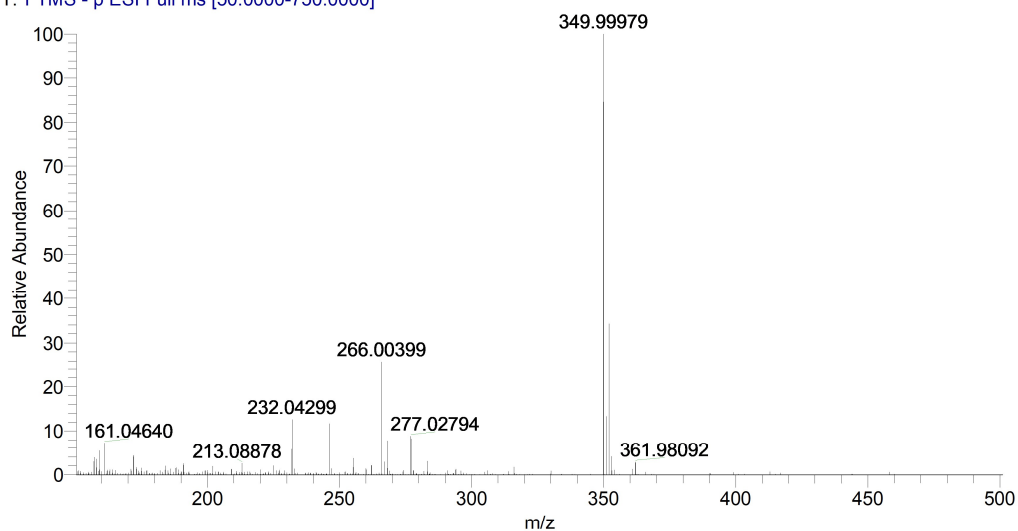


Figura A63. Espectro de massas de alta resolução de **45d**.

- Difração de raio-X

Tabela A1. Dados cristalográficos e refinamento da estrutura de **44a**.

Fórmula química	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S
Massa molecular	331.34
Temperatura/K	273.15
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c
a/Å	16.7484(9)
b/Å	10.4264(5)
c/Å	8.7180(4)
β°	99.672(2)
Volume da célula/Å ³	1500.75(13)
Unidades de fórmulas por célula, Z	4
ρ _{calc} g/cm ³	1.466
μ/mm ⁻¹	0.240
F(000)	688.0
Tamanho do cristal/mm ³	0.402 × 0.11 × 0.086
Radiação	MoKα (λ = 0.71073)
Faixa de 2Θ para coleta de dados/°	4.62 a 52.792
Intervalos de indexação	-20 ≤ h ≤ 20 -13 ≤ k ≤ 13 -10 ≤ l ≤ 10
Reflexões coletadas	87925
Reflexões independentes	3064 [R _{int} = 0.0597]
Dados/restrições/parâmetros	3064/0/213
Qualidade de ajuste F ²	1.114
Valores finais de R [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0.0416, wR ₂ = 0.1060
Valores finais de R [todos os dados]	R ₁ = 0.0631, wR ₂ = 0.1301
Maior pico/hole / e Å ⁻³	0.20/-0.34
Número CCDC	CCDC2376514

- **Check CIF of 10a**

checkCIF/PLATON report

Structure factors have been supplied for datablock(s) mo_s8c1_dmsc_0ma

THIS REPORT IS FOR GUIDANCE ONLY. IF USED AS PART OF A REVIEW PROCEDURE FOR PUBLICATION, IT SHOULD NOT REPLACE THE EXPERTISE OF AN EXPERIENCED CRYSTALLOGRAPHIC REFEREE.

No syntax errors found. CIF dictionary Interpreting this report

Datablock: mo_s8c1_dmso_0ma

Bond precision:	C-C = 0.0035 A	Wavelength=0.71073	
Cell:	a=16.7484 (9)	b=10.4264 (5)	c=8.7180 (4)
	alpha=90	beta=99.672 (2)	gamma=90
Temperature:	298 K		

	Calculated	Reported
Volume	1500.75 (13)	1500.75 (13)
Space group	P 21/c	P 1 21/c 1
Hall group	-P 2ybc	-P 2ybc
Moiety formula	C15 H13 N3 O4 S	C15 H13 N3 O4 S
Sum formula	C15 H13 N3 O4 S	C15 H13 N3 O4 S
Mr	331.34	331.34
Dx, g cm-3	1.467	1.466
Z	4	4
Mu (mm-1)	0.240	0.240
F000	688.0	688.0
F000'	688.81	
h, k, lmax	20, 13, 10	20, 13, 10
Nref	3069	3064
Tmin, Tmax	0.969, 0.980	0.723, 0.745
Tmin'	0.908	

```
Correction method= # Reported T Limits: Tmin=0.723 Tmax=0.745
AbsCorr = MULTI-SCAN
```

Data completeness= 0.998 Theta (max)= 26.396

```
R(reflections)= 0.0416( 2351)          wR2(reflections)=
S = 1.114                               0.1301( 3064)
Npar= 213
```

The following ALERTS were generated. Each ALERT has the format

test-name_ALERT_alert-type_alert-level.

Click on the hyperlinks for more details of the test.



Alert level C

PLAT905_ALERT_3_C	Negative K value in the Analysis of Variance ...	-1.652	Report
PLAT911_ALERT_3_C	Missing FCF Refl Between Thmin & STh/L= 0.600	3	Report
	1 1 1, 3 1 1, -1 0 2,		



Alert level G

PLAT910_ALERT_3_G	Missing # of FCF Reflection(s) Below Theta(Min).	1	Note
	1 0 0,		
PLAT912_ALERT_4_G	Missing # of FCF Reflections Above STh/L= 0.600	1	Note
PLAT933_ALERT_2_G	Number of HKL-OMIT Records in Embedded .res File	2	Note
	1 1 1, 3 1 1,		
PLAT969_ALERT_5_G	The 'Henn et al.' R-Factor-gap value	8.916	Note
	Predicted wR2: Based on SigI**2 1.46 or SHELX Weight 11.67		
PLAT978_ALERT_2_G	Number C-C Bonds with Positive Residual Density.	2	Info

0 **ALERT level A** = Most likely a serious problem - resolve or explain
0 **ALERT level B** = A potentially serious problem, consider carefully
2 **ALERT level C** = Check. Ensure it is not caused by an omission or oversight
5 **ALERT level G** = General information/check it is not something unexpected

0 ALERT type 1 CIF construction/syntax error, inconsistent or missing data
2 ALERT type 2 Indicator that the structure model may be wrong or deficient
3 ALERT type 3 Indicator that the structure quality may be low
1 ALERT type 4 Improvement, methodology, query or suggestion
1 ALERT type 5 Informative message, check

It is advisable to attempt to resolve as many as possible of the alerts in all categories. Often the minor alerts point to easily fixed oversights, errors and omissions in your CIF or refinement strategy, so attention to these fine details can be worthwhile. In order to resolve some of the more serious problems it may be necessary to carry out additional measurements or structure refinements. However, the purpose of your study may justify the reported deviations and the more serious of these should normally be commented upon in the discussion or experimental section of a paper or in the "special_details" fields of the CIF. checkCIF was carefully designed to identify outliers and unusual parameters, but every test has its limitations and alerts that are not important in a particular case may appear. Conversely, the absence of alerts does not guarantee there are no aspects of the results needing attention. It is up to the individual to critically assess their own results and, if necessary, seek expert advice.

Publication of your CIF in IUCr journals

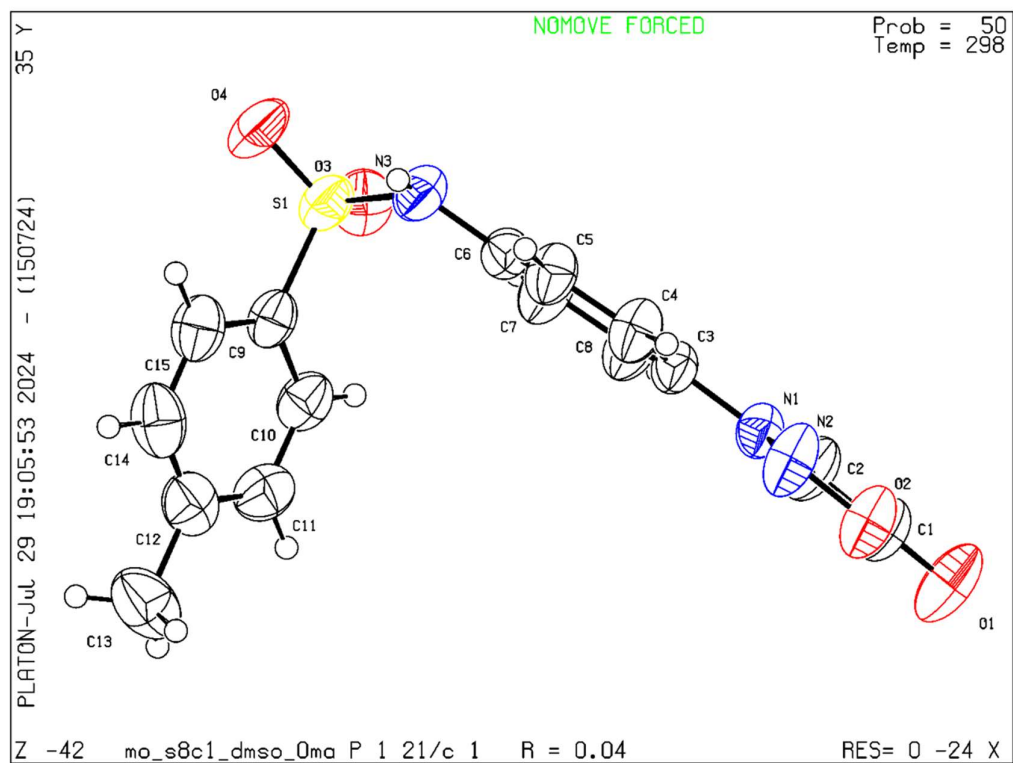
A basic structural check has been run on your CIF. These basic checks will be run on all CIFs submitted for publication in IUCr journals (*Acta Crystallographica*, *Journal of Applied Crystallography*, *Journal of Synchrotron Radiation*); however, if you intend to submit to *Acta Crystallographica Section C* or *E* or *IUCrData*, you should make sure that full publication checks are run on the final version of your CIF prior to submission.

Publication of your CIF in other journals

Please refer to the *Notes for Authors* of the relevant journal for any special instructions relating to CIF submission.

PLATON version of 15/07/2024; check.def file version of 15/07/2024

atablock mo_s8c1_dmso_0ma - ellipsoid plot



3.2. Anexos – Capítulo 2

- Infravermelho das chalconas e azachalconas

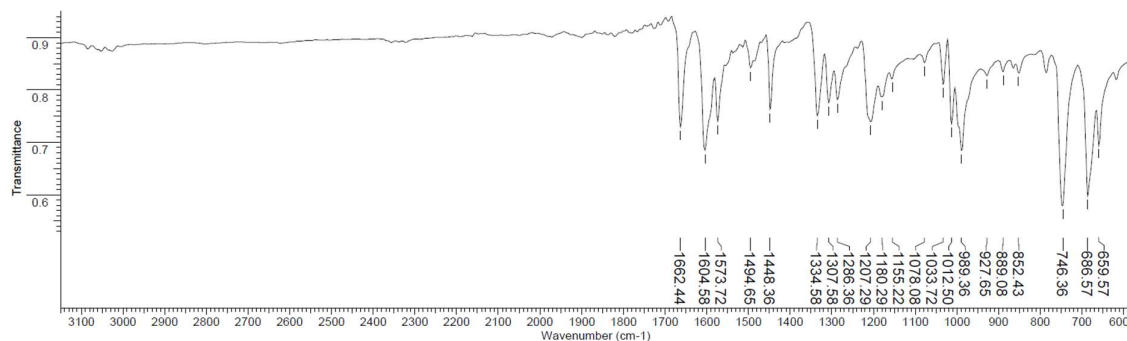


Figura A64. Espectro de infravermelho da chalcona C1.

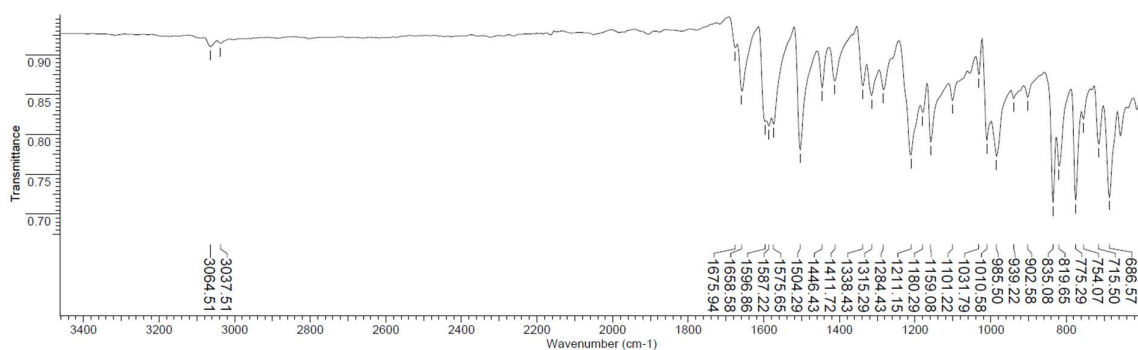


Figura A65. Espectro de infravermelho da chalcona C2.

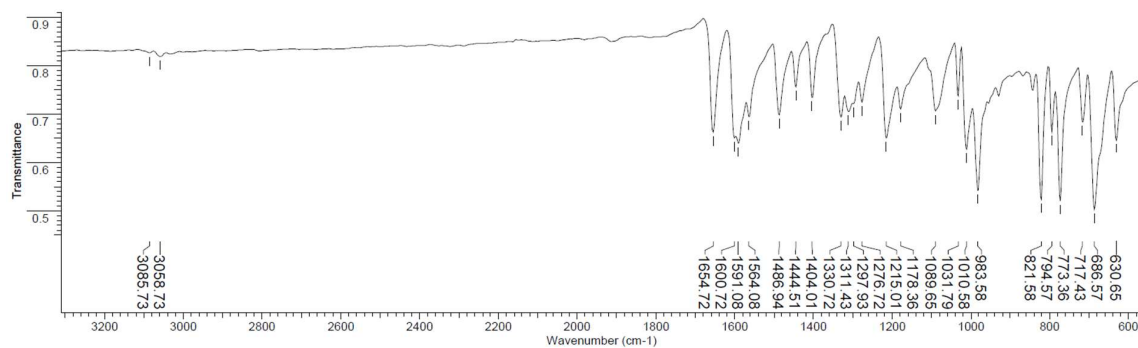


Figura A66. Espectro de infravermelho da chalcona C3.

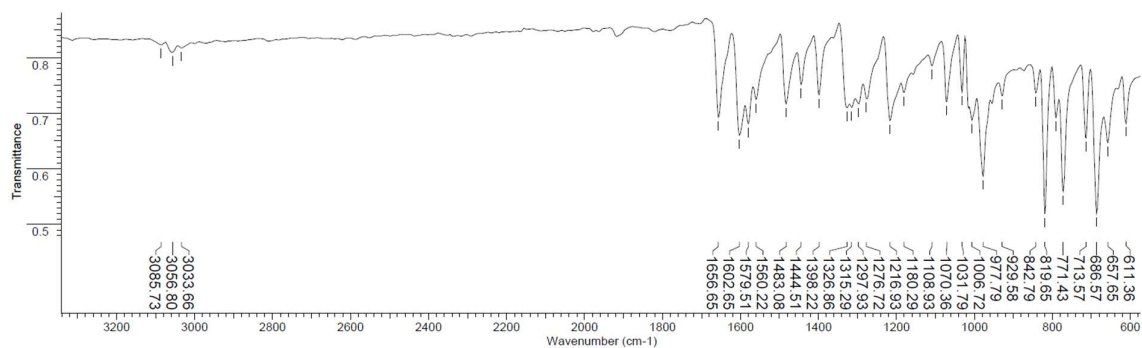


Figura A67. Espectro de infravermelho da chalcona **C4**.

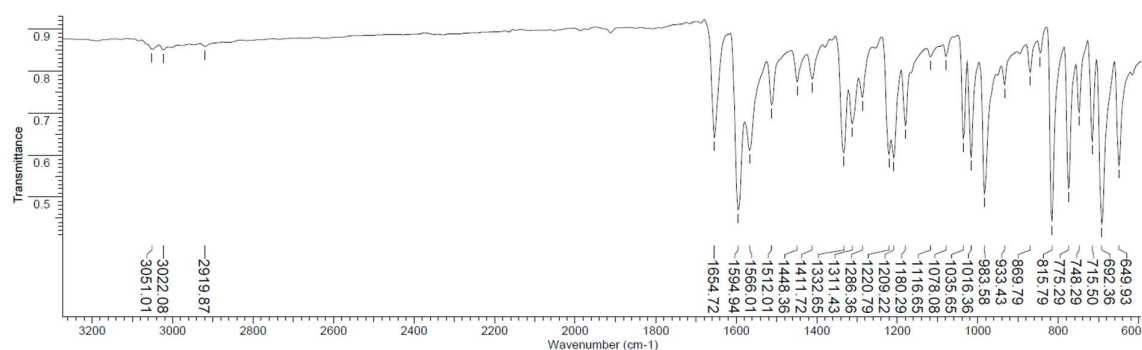


Figura A68. Espectro de infravermelho da chalcona **C5**.

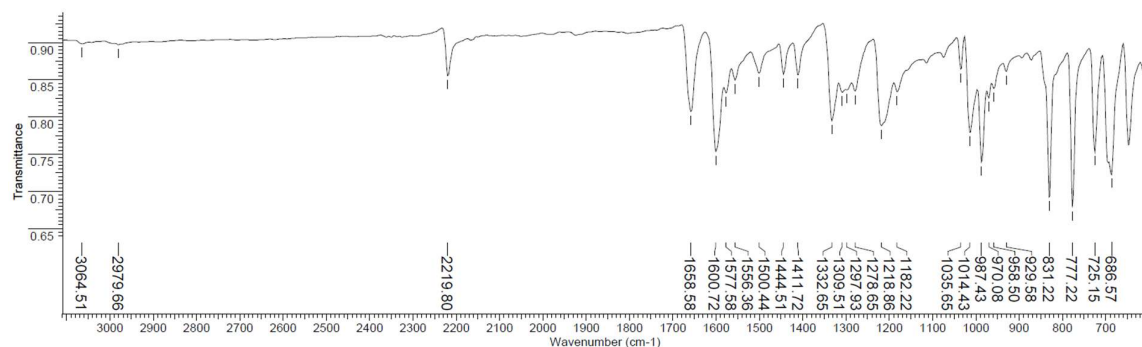


Figura A69. Espectro de infravermelho da chalcona **C6**.

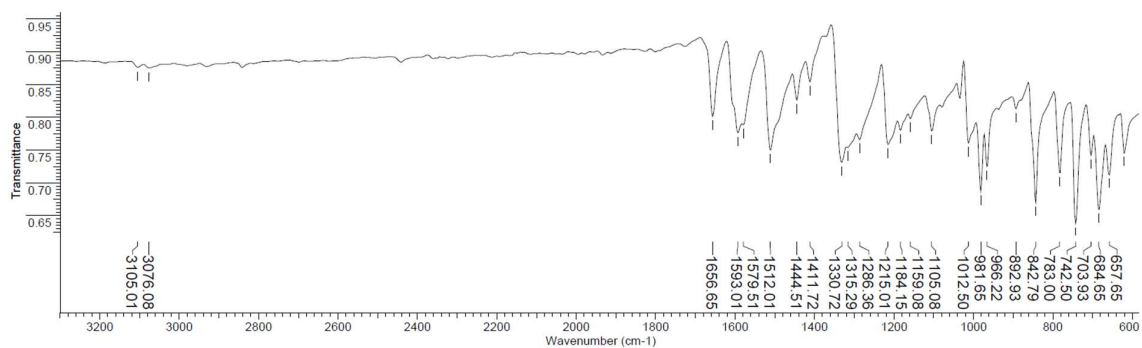


Figura A70. Espectro de infravermelho da chalcona **C7**.

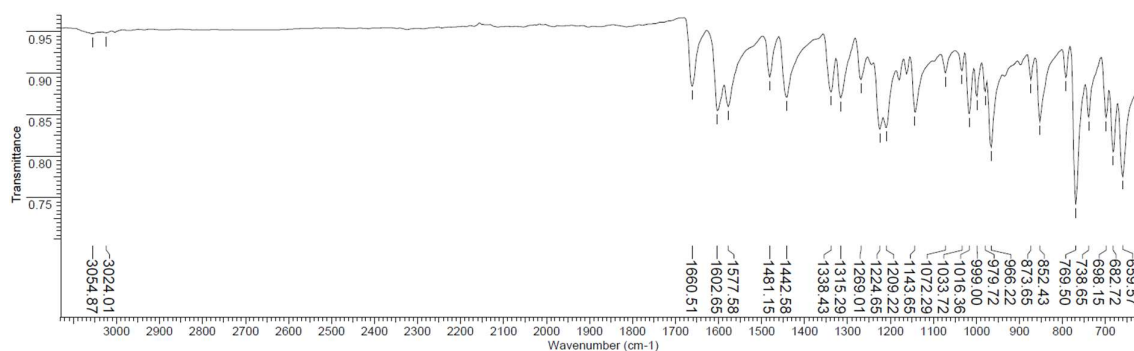


Figura A71. Espectro de infravermelho da chalcona **C8**.

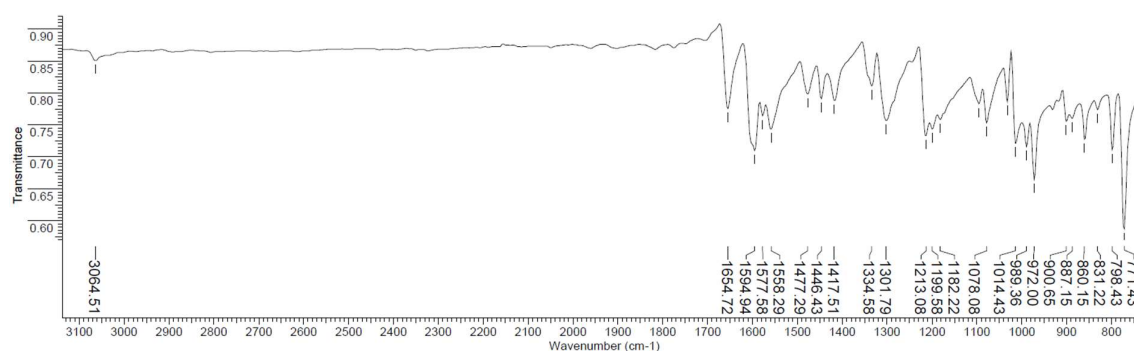


Figura A72. Espectro de infravermelho da chalcona **C9**.

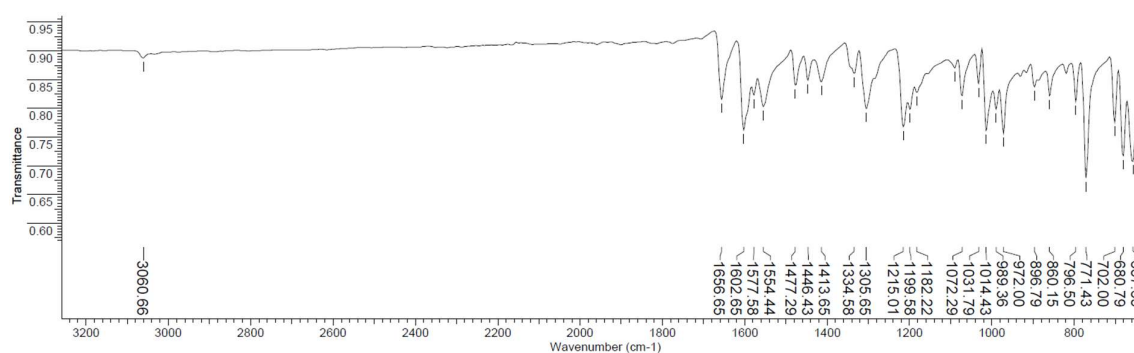


Figura A73. Espectro de infravermelho da chalcona **C10**.

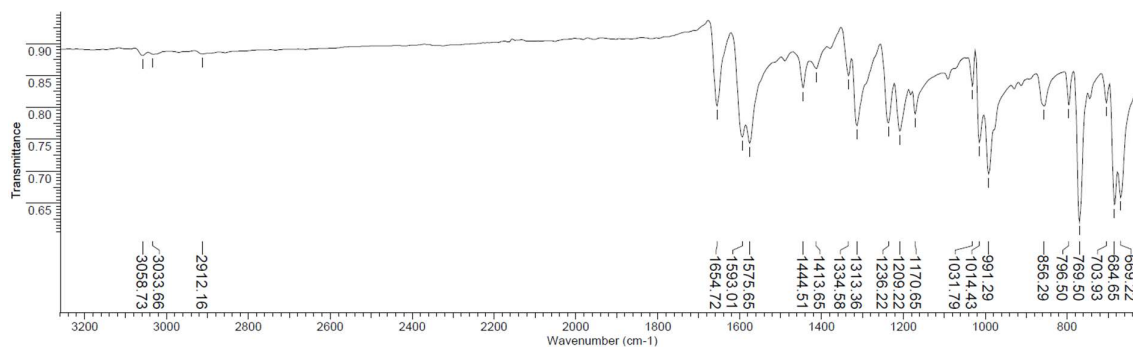


Figura A74. Espectro de infravermelho da chalcona **C11**.

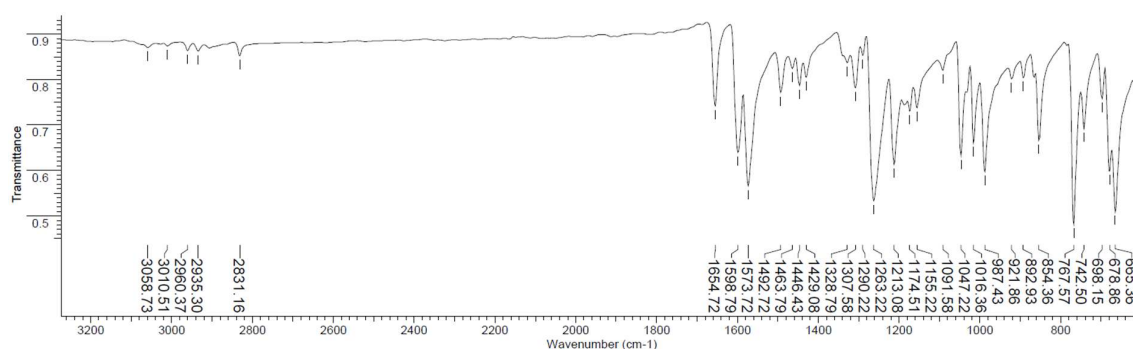


Figura A75. Espectro de infravermelho da chalcona **C12**.

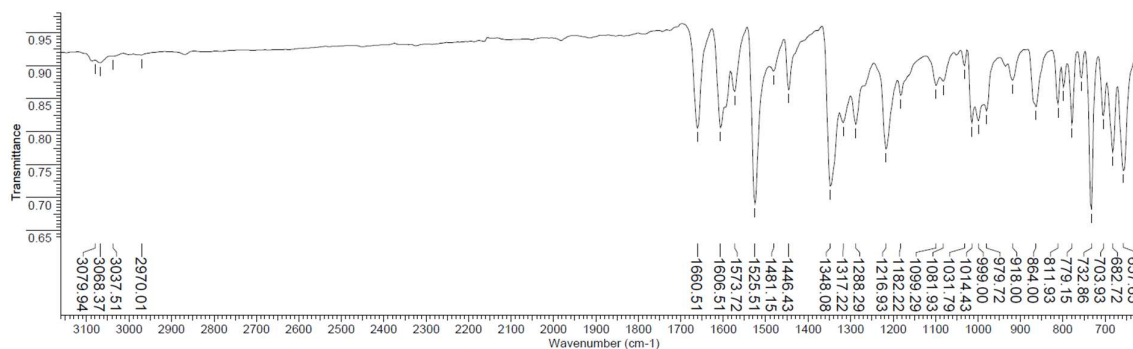


Figura A76. Espectro de infravermelho da chalcona **C13**.

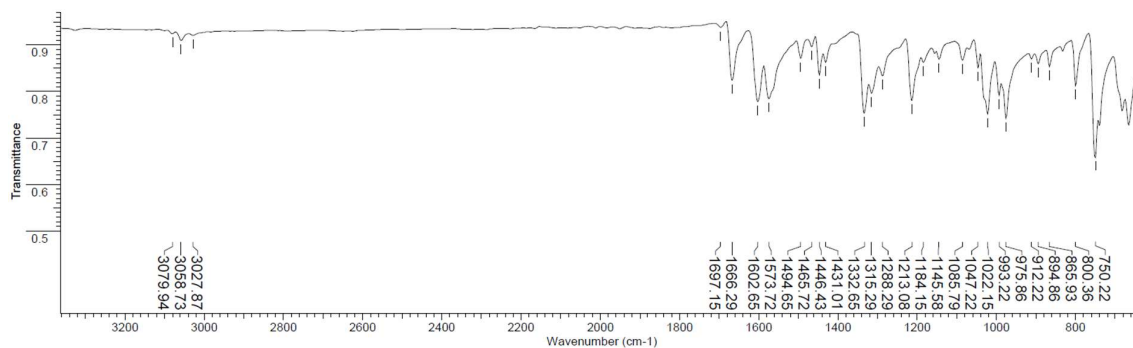


Figura A77. Espectro de infravermelho da chalcona CP1.

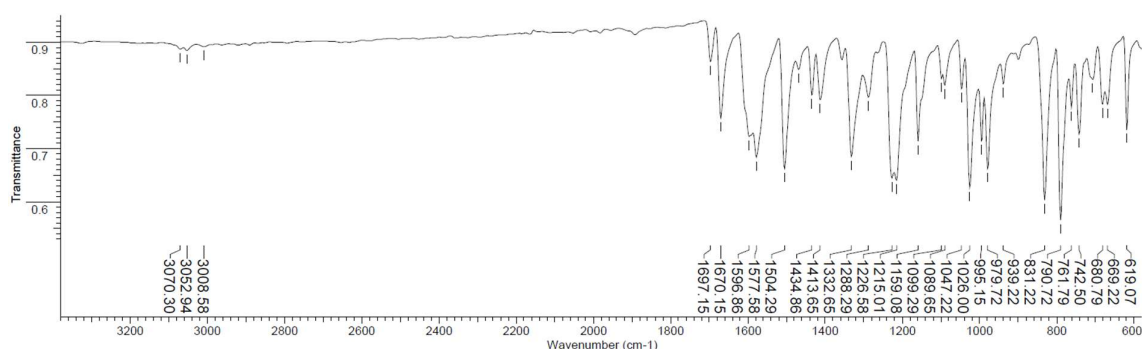


Figura A78. Espectro de infravermelho da chalcona CP2.

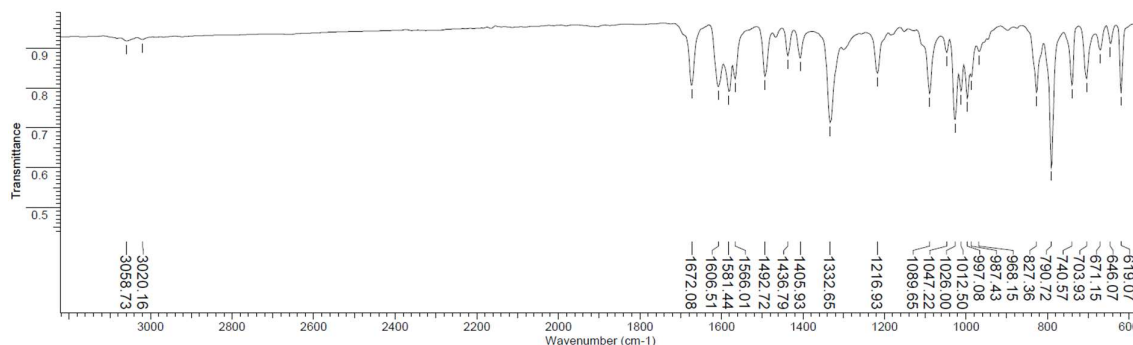


Figura A79. Espectro de infravermelho da chalcona CP3.

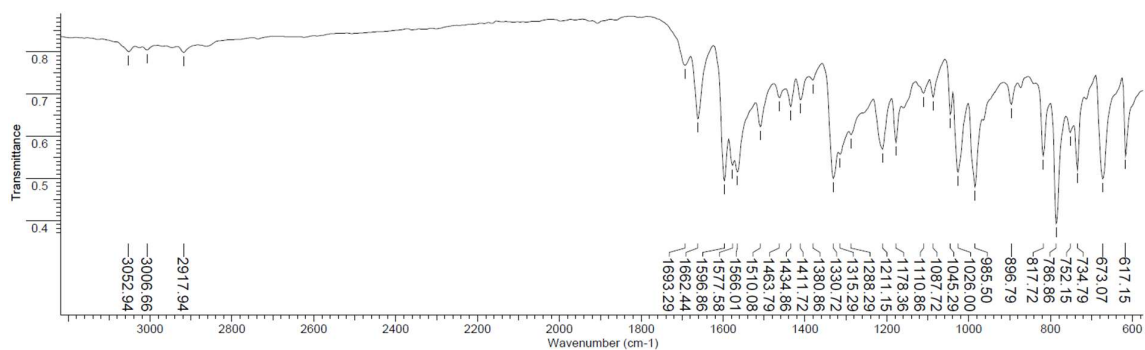


Figura A80. Espectro de infravermelho da chalcona CP4.

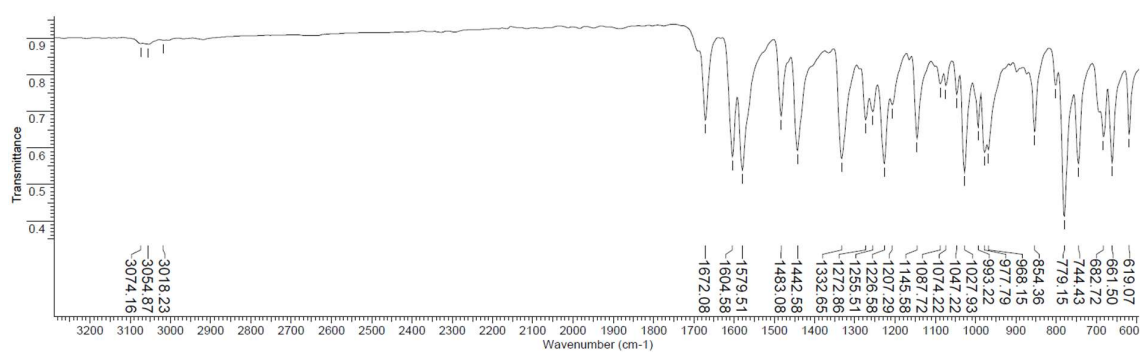


Figura A81. Espectro de infravermelho da chalcona CP5.

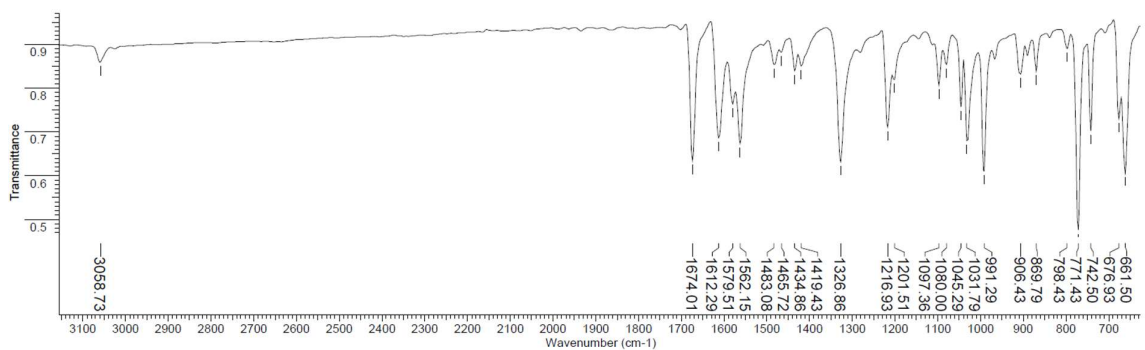


Figura A82. Espectro de infravermelho da chalcona CP6.

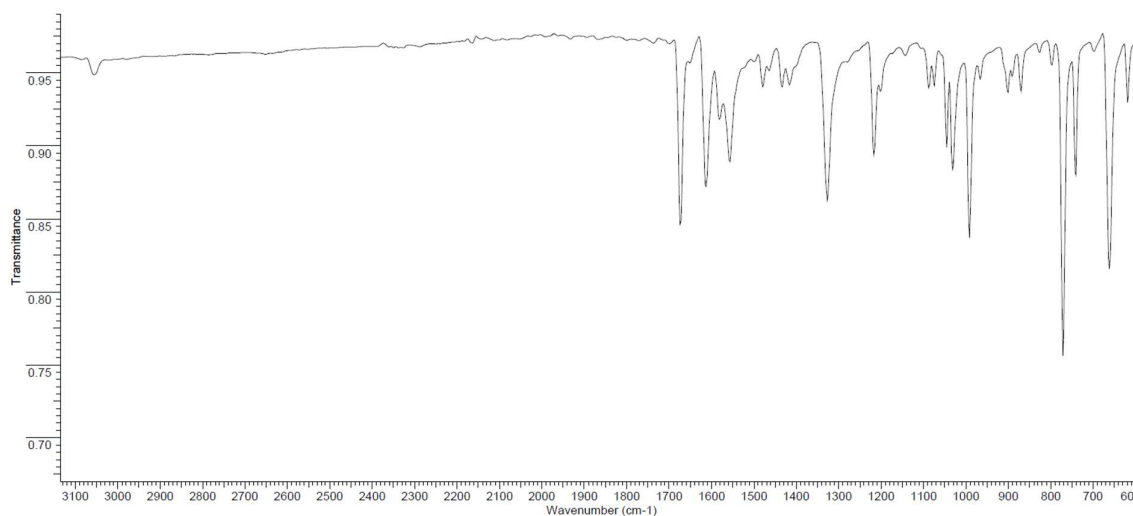


Figura A83. Espectro de infravermelho da chalcona **CP7**.

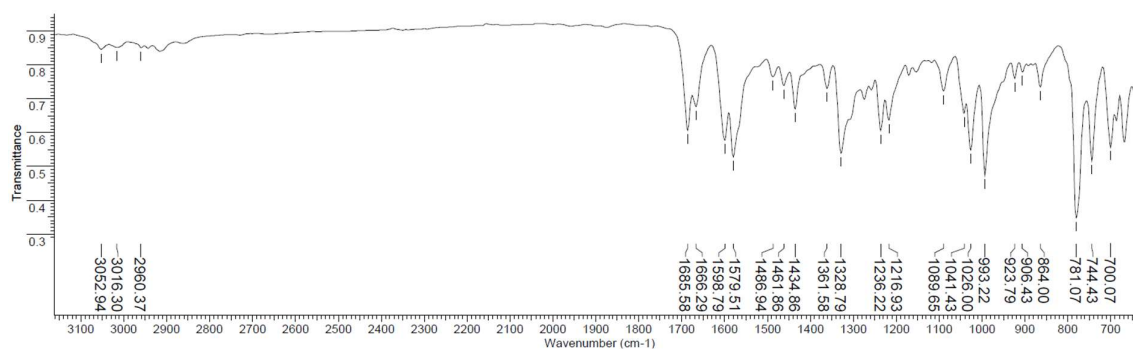


Figura A84. Espectro de infravermelho da chalcona **CP8**.

- Espectros de infravermelho, RMN de ^1H , ^{13}C e HRMS das tiossemicarbazonas finais.
- Derivados avaliados em ensaios biológicos: CT1-3, HCT1-2, CPT1-2, HCPT1-2.

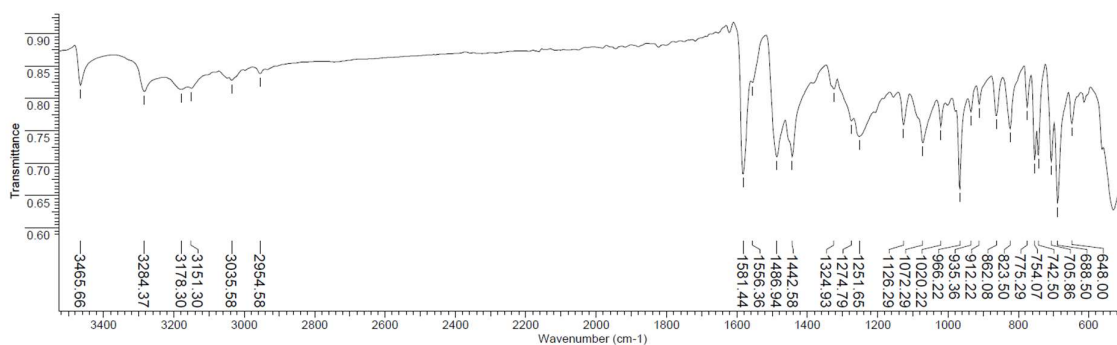


Figura A85. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona **CT1**.

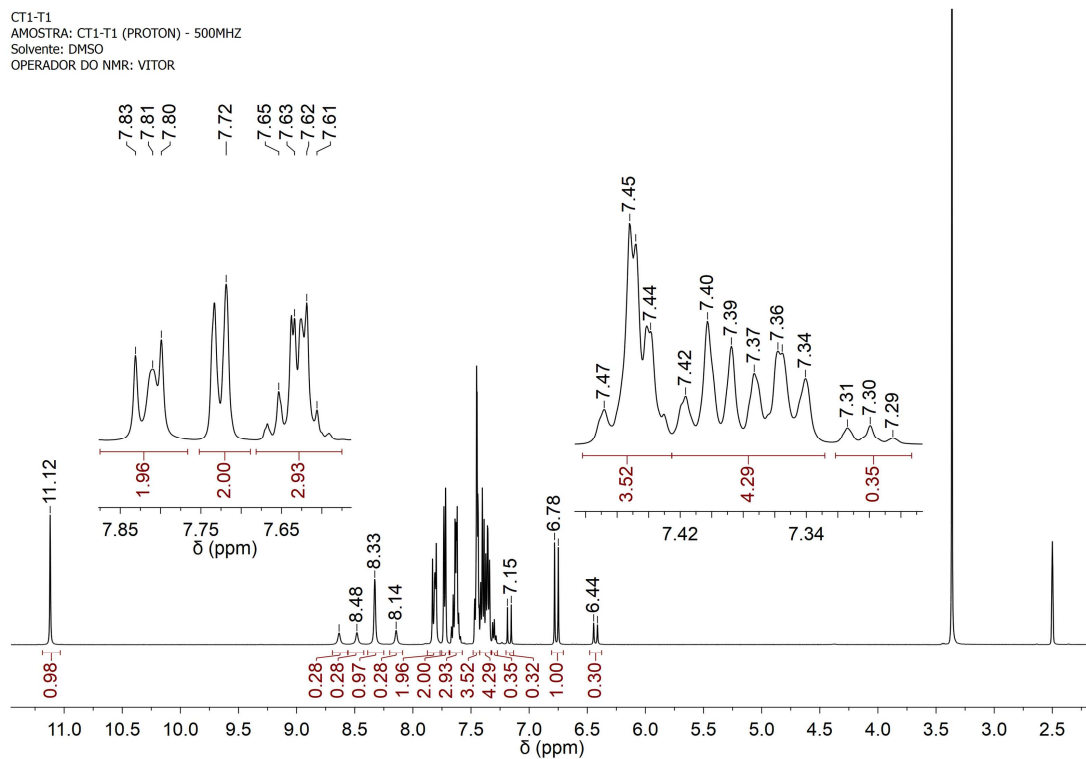


Figura A86. Espectro de RMN de ^1H de CT1.

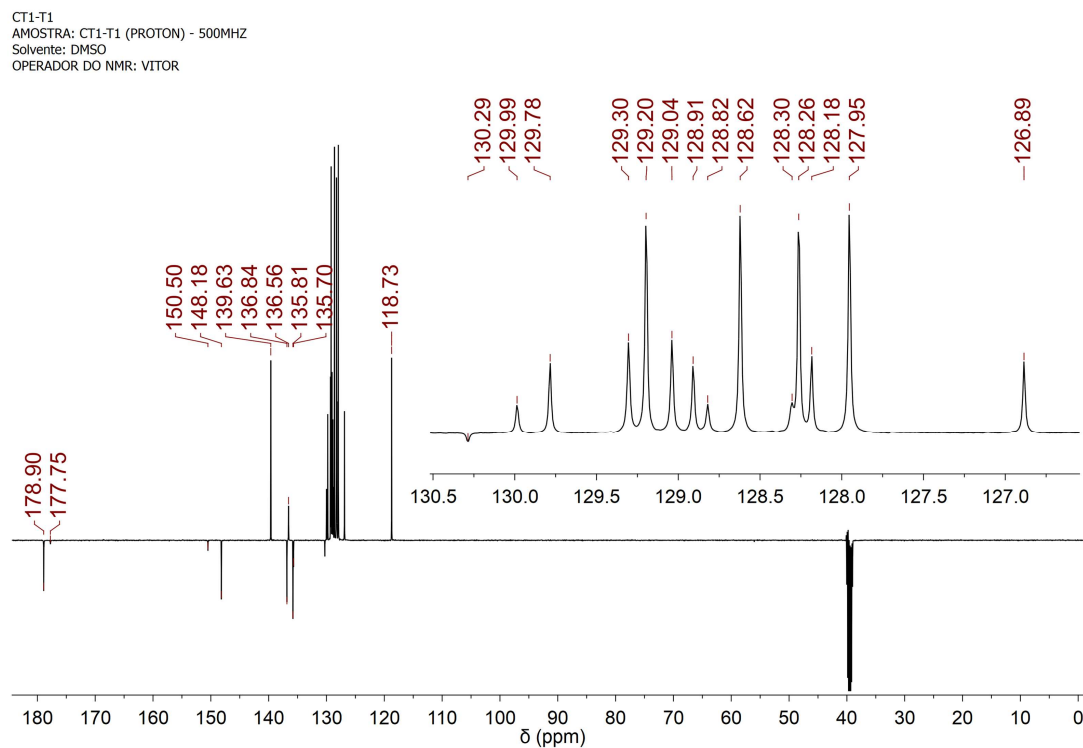


Figura A87. Espectro de RMN de ^{13}C de CT1.

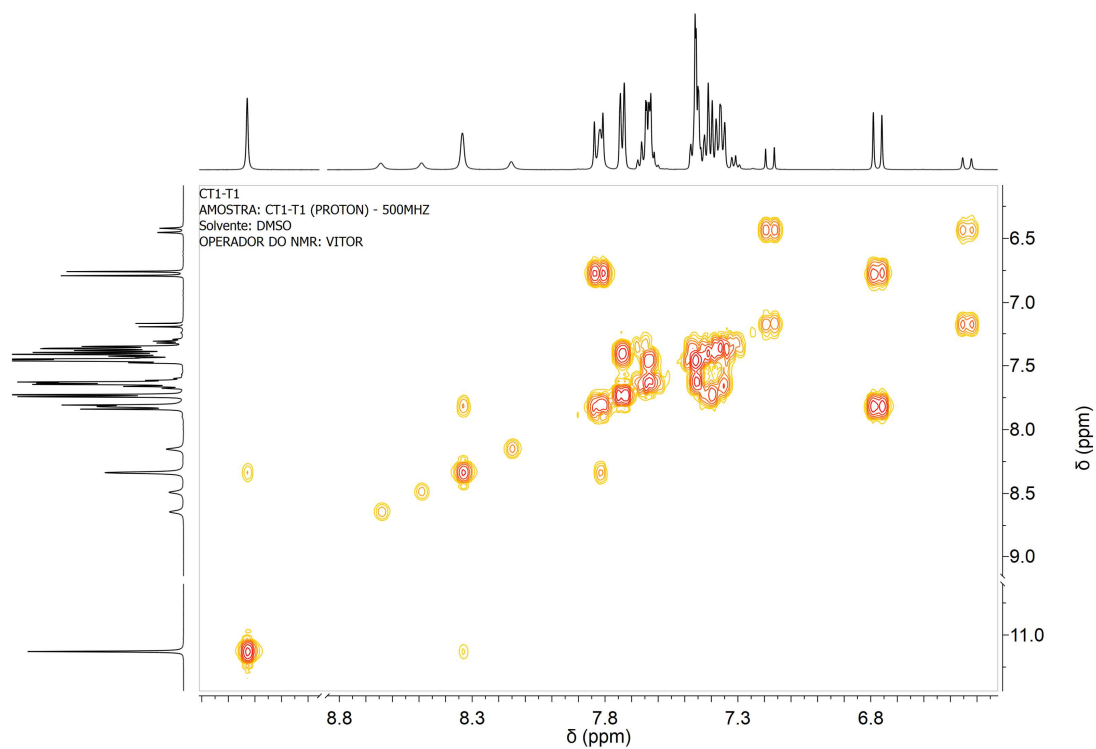


Figura A88. Espectro de COSY de CT1.

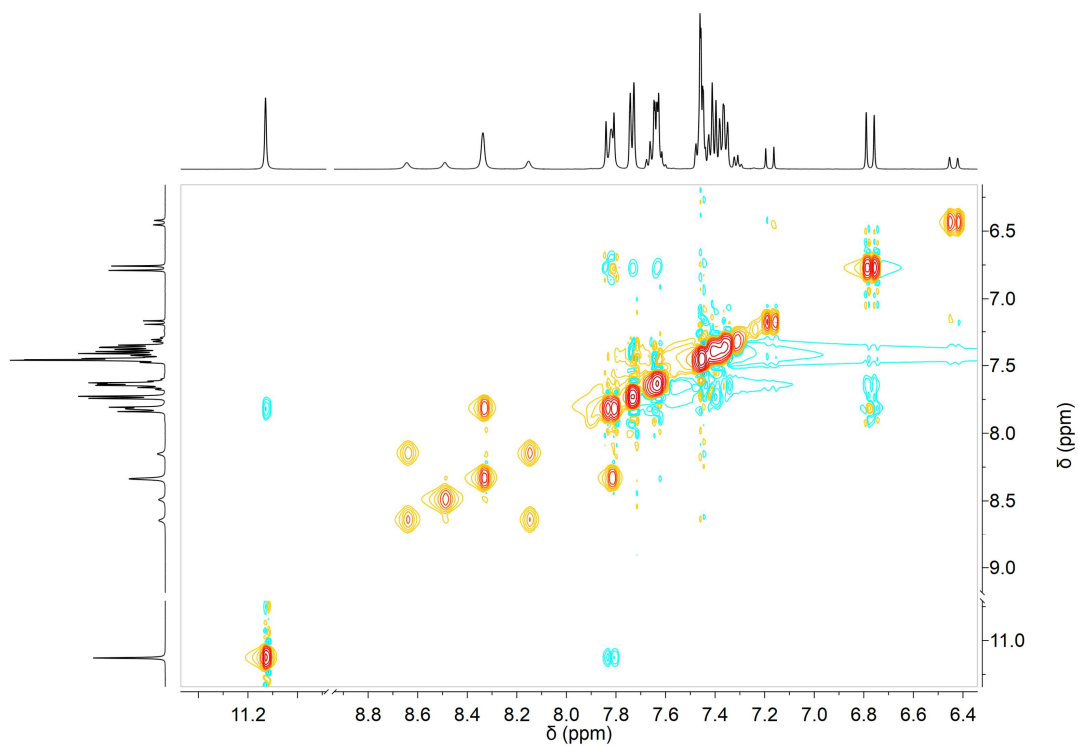


Figura A89. Espectro de NOESY de CT1.

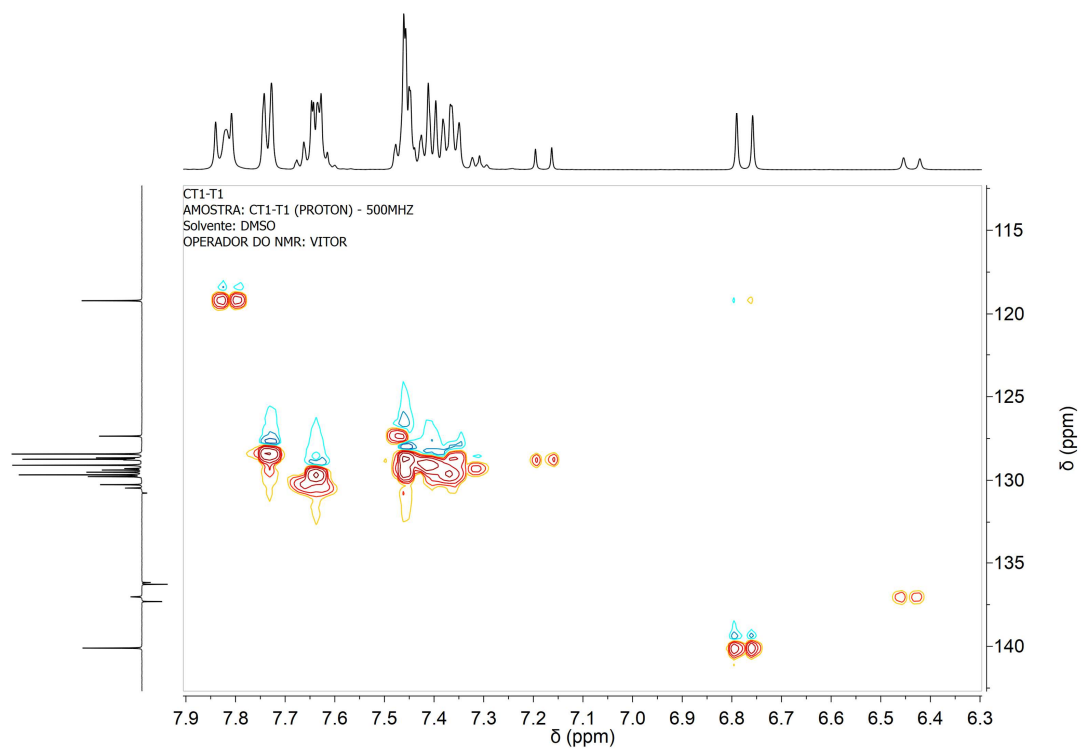


Figura A90. Espectro de HSQC de CT1.

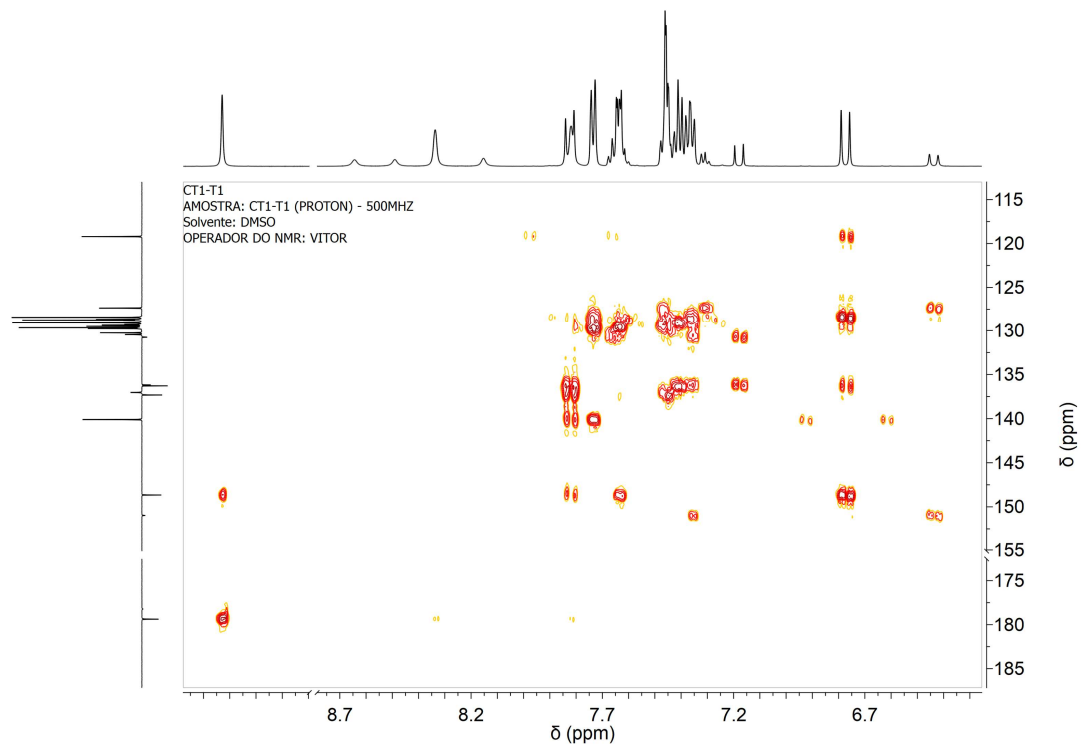
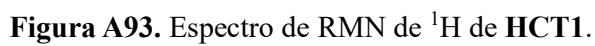
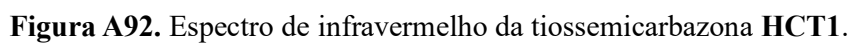


Figura A91. Espectro de HMBC de CT1.



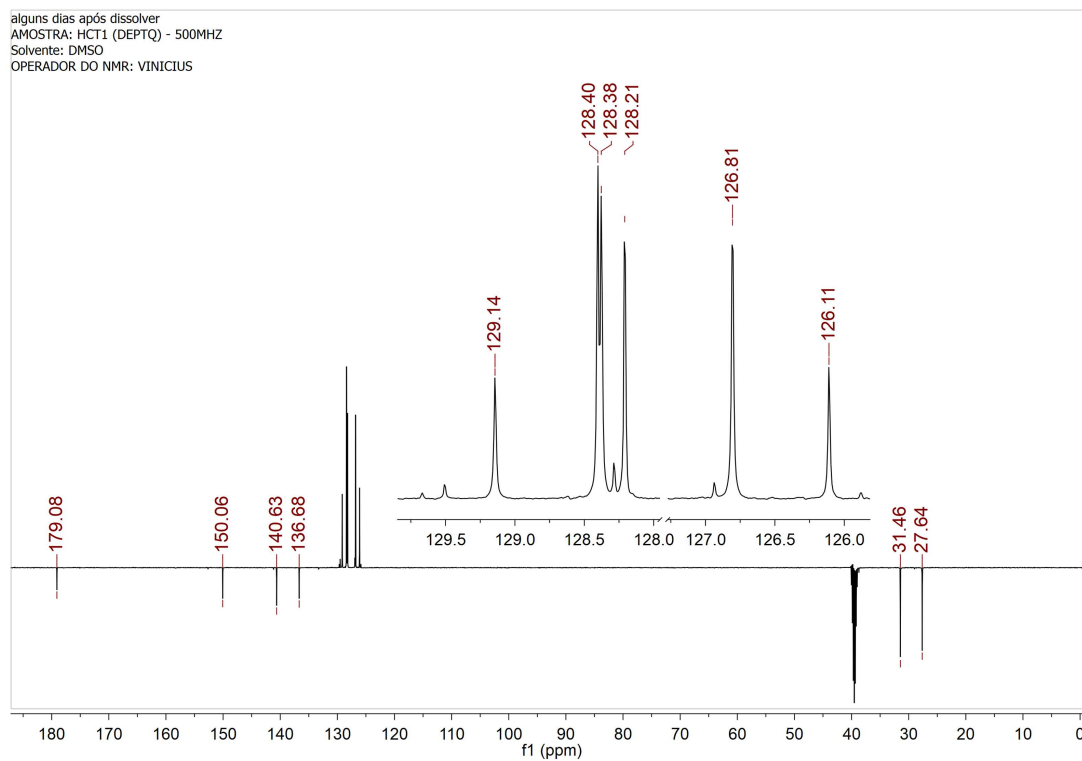


Figura A94. Espectro de RMN de ^{13}C de HCT1.

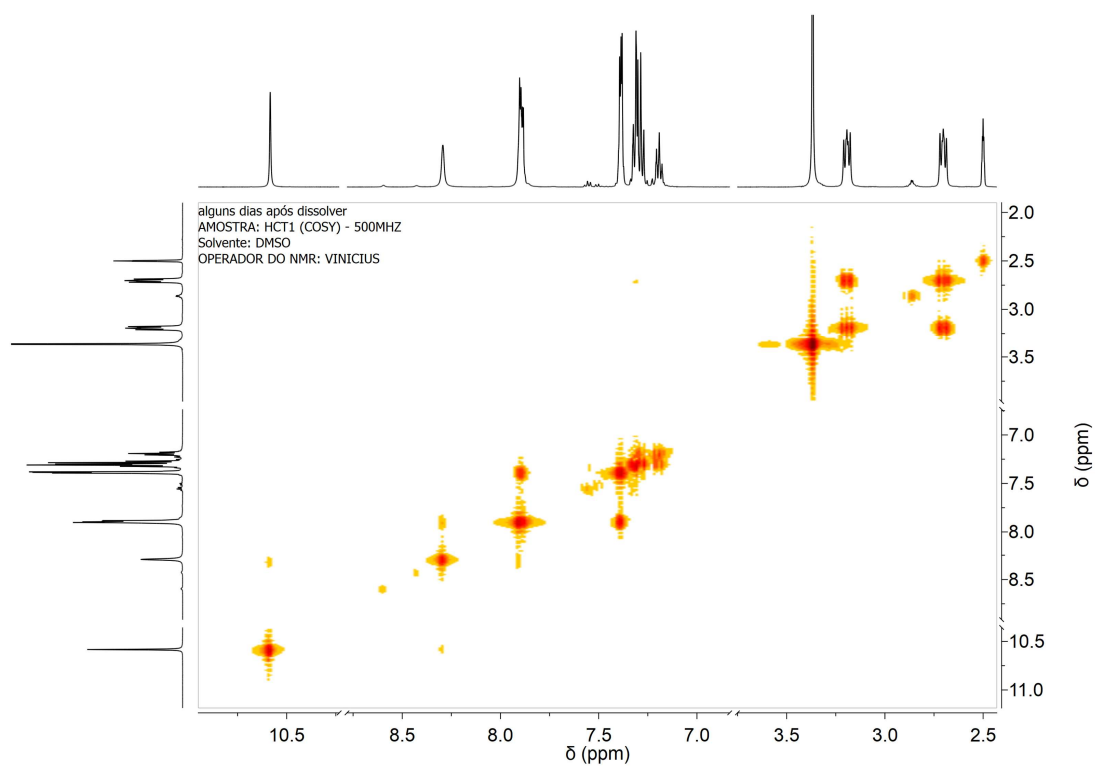


Figura A95. Espectro de COSY de HCT1.

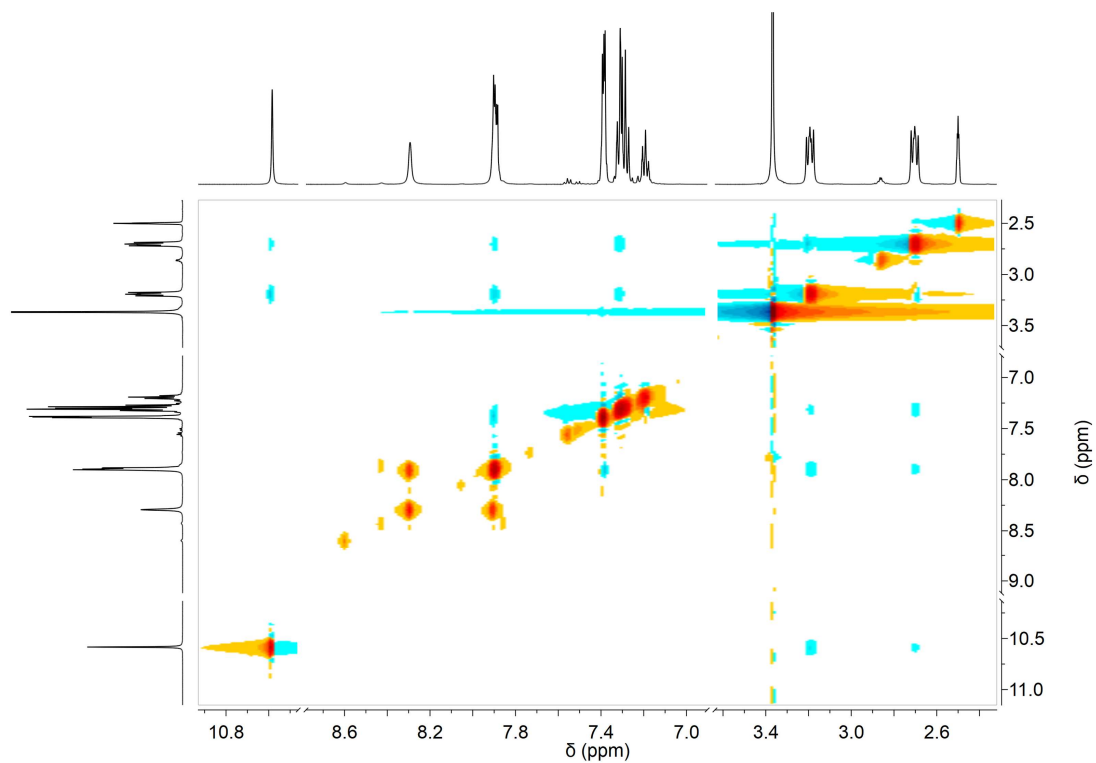


Figura A96. Espectro de NOESY de **HCT1**.

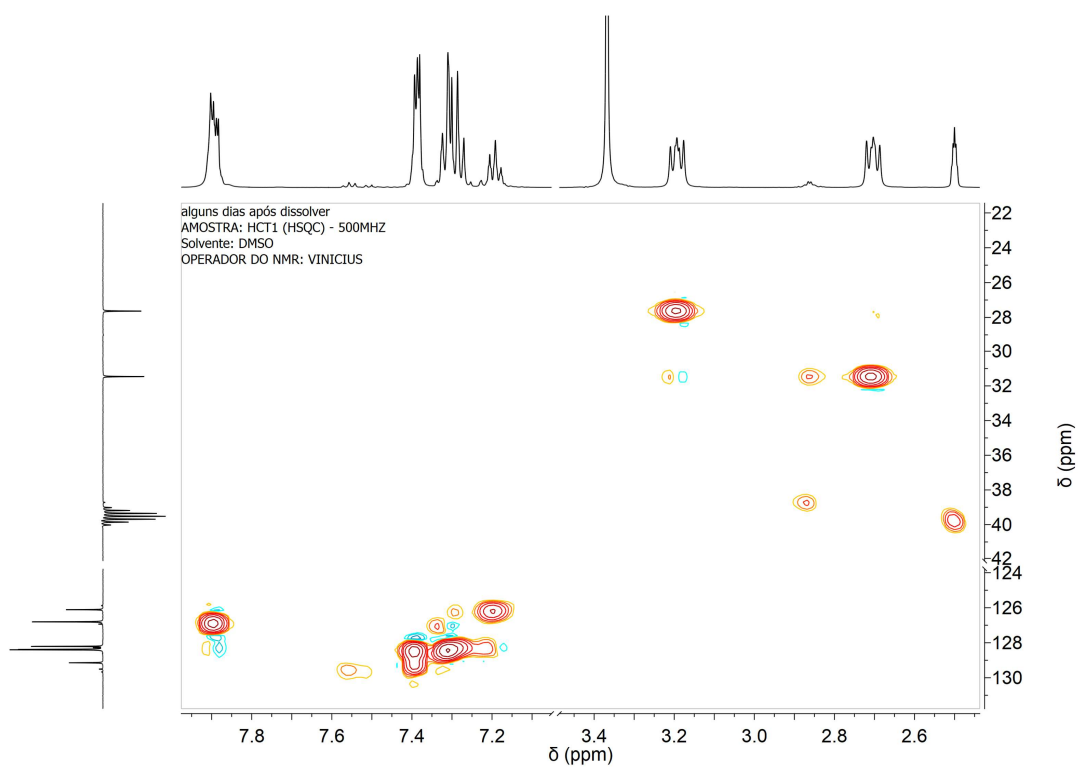


Figura A97. Espectro de HSQC de **HCT1**.

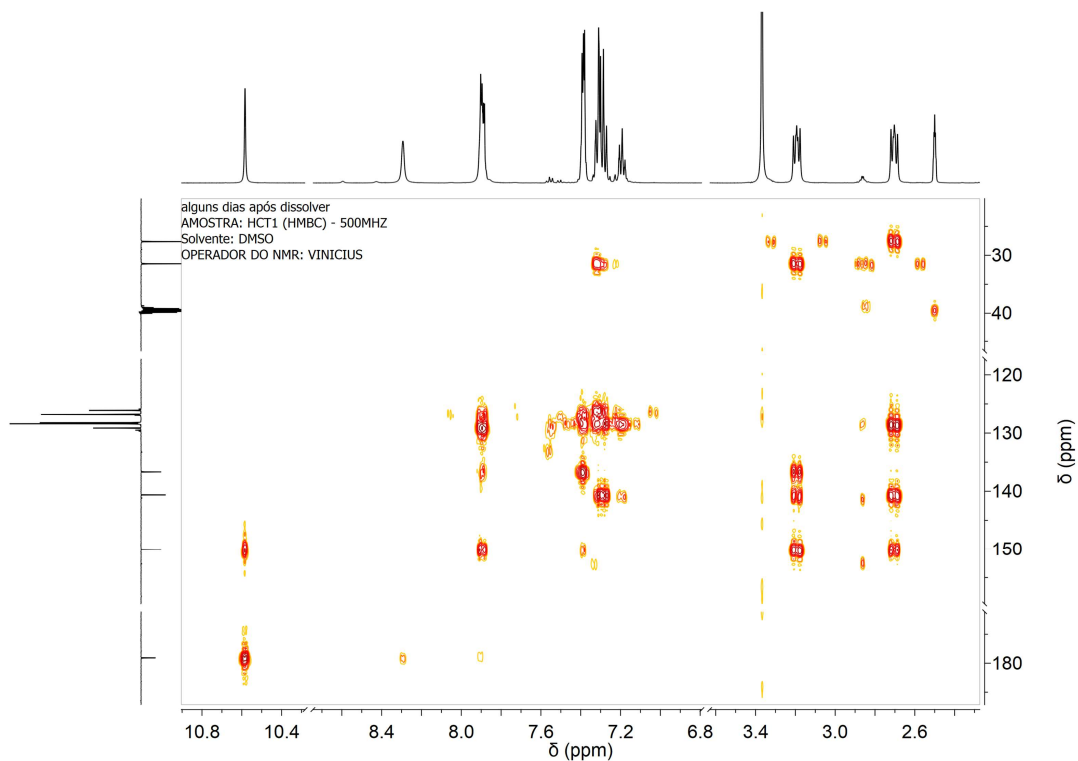


Figura A98. Espectro de HMBC de HCT1.

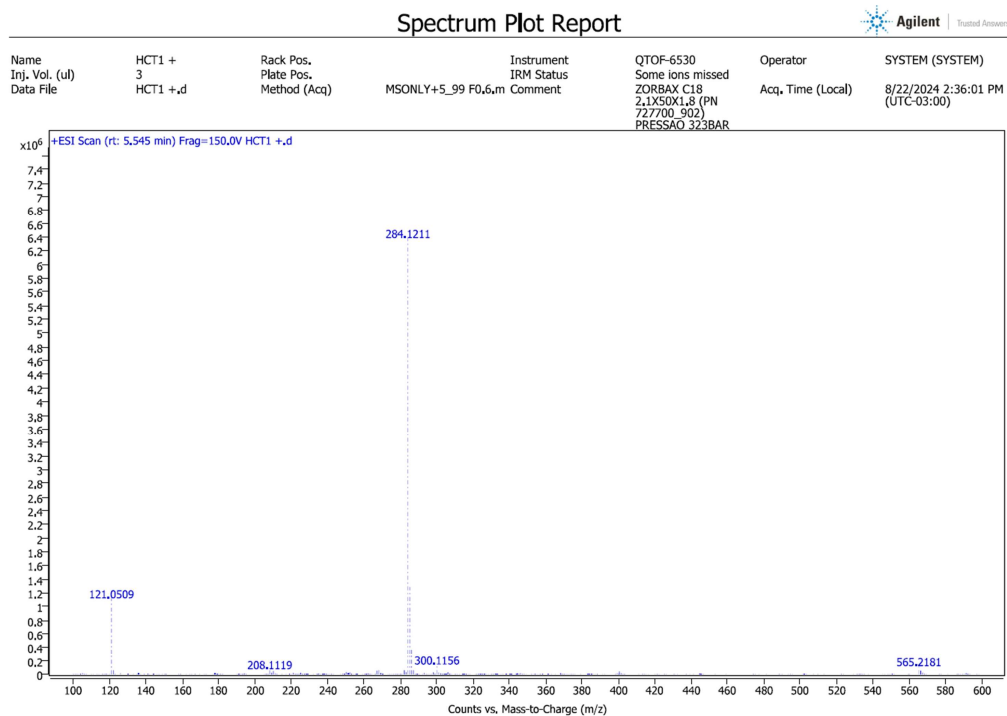


Figura A99. HRMS de HCT1.

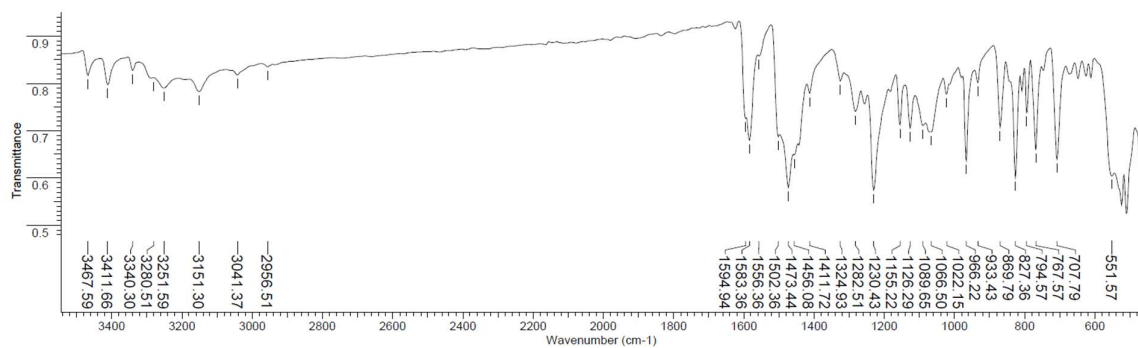


Figura A100. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CT2.

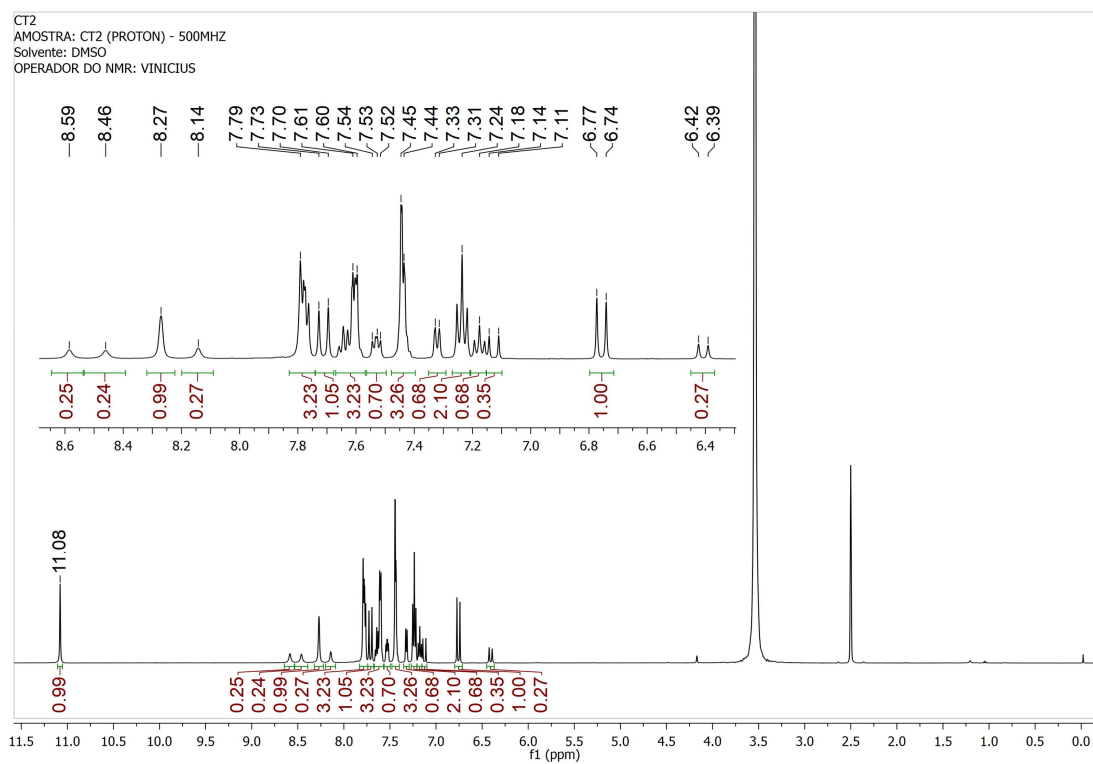


Figura A101. Espectro de RMN de ^1H de CT2.

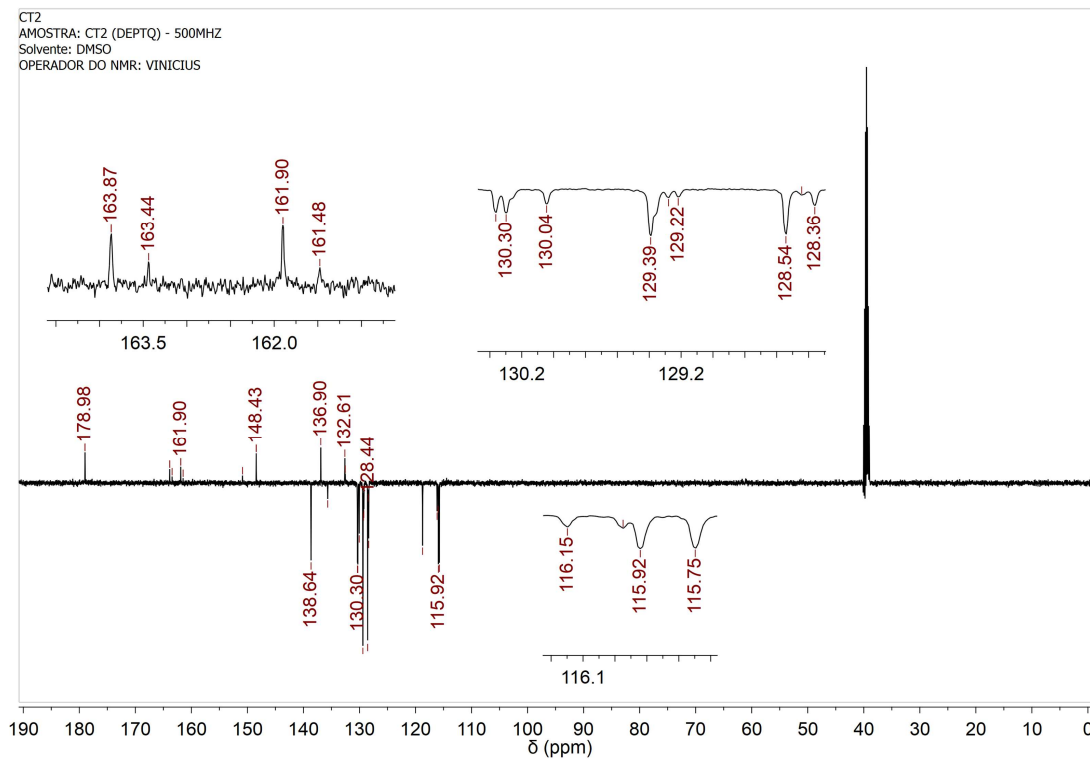


Figura A102. Espectro de RMN de ^{13}C de CT2.

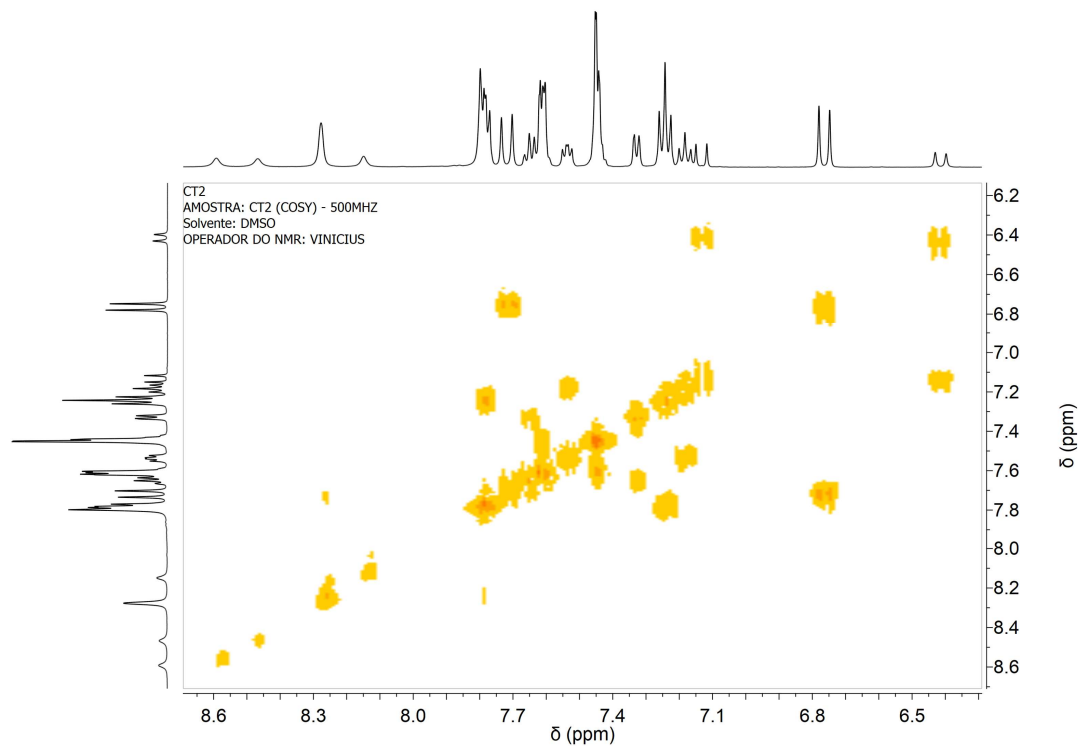


Figura A103. Espectro de COSY de CT2.

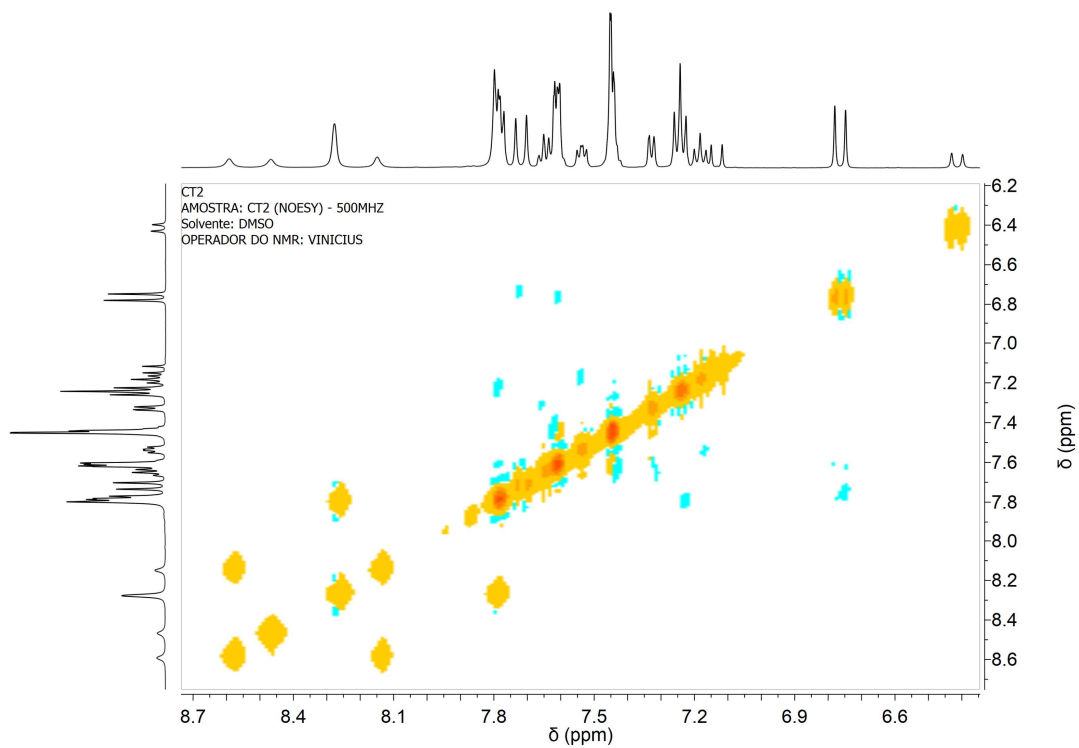


Figura A104. Espectro de NOESY de CT2.

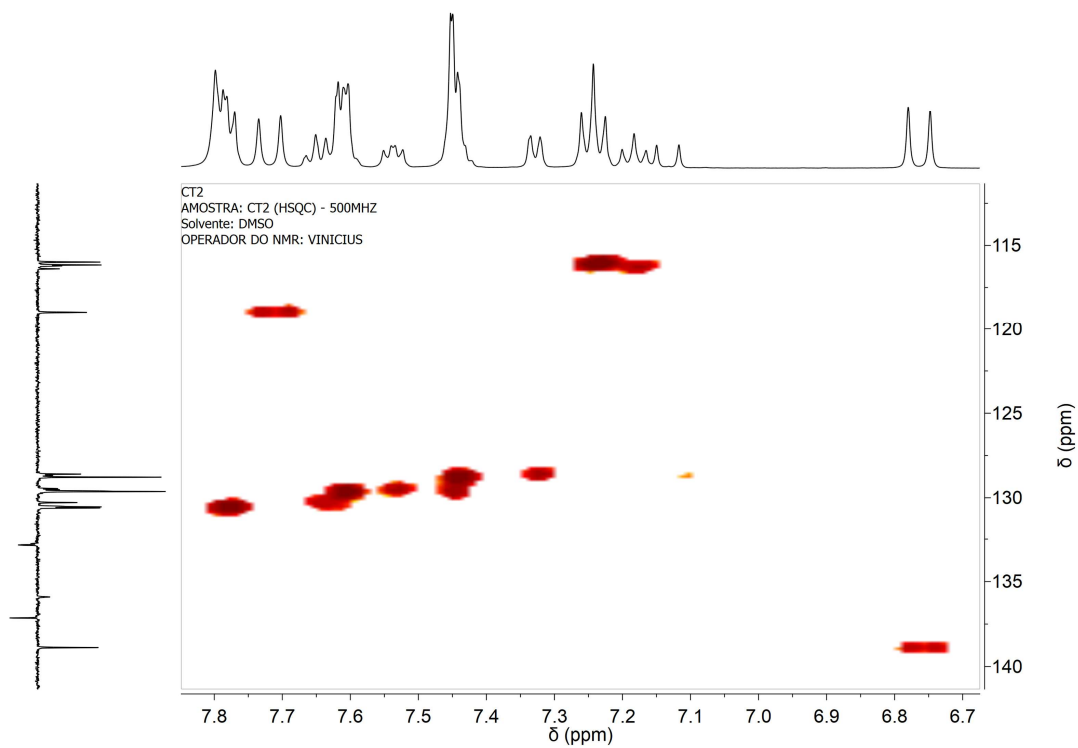


Figura A105. Espectro de HSQC de CT2.

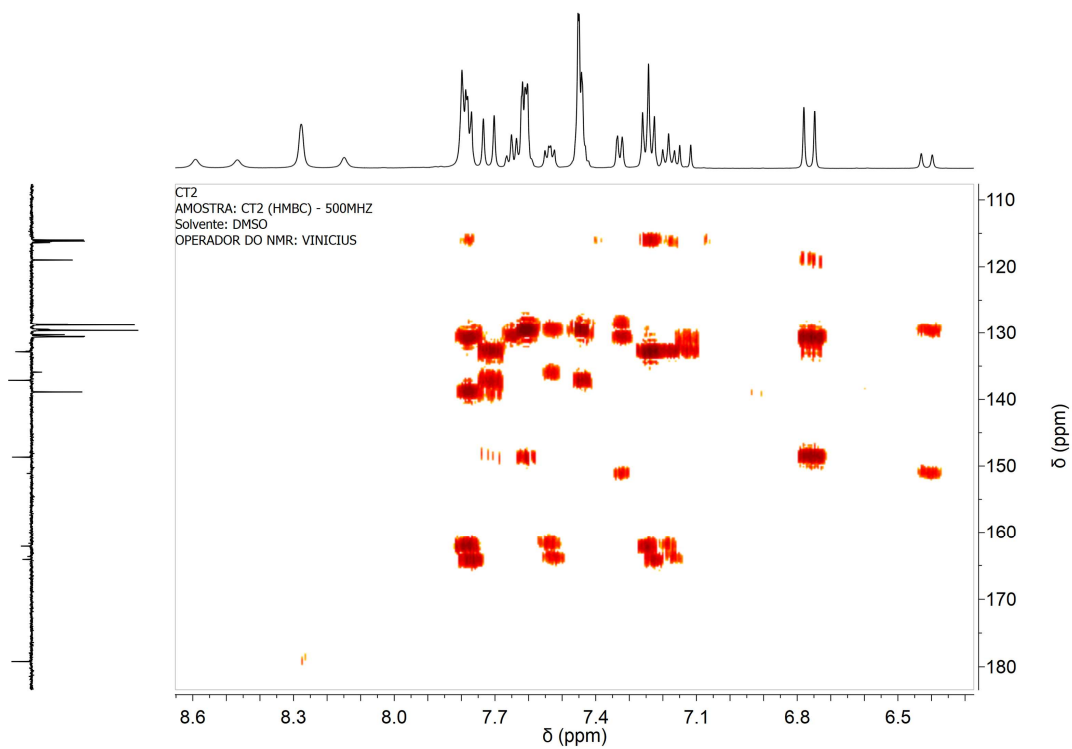


Figura A106. Espectro de HMBC de CT2.

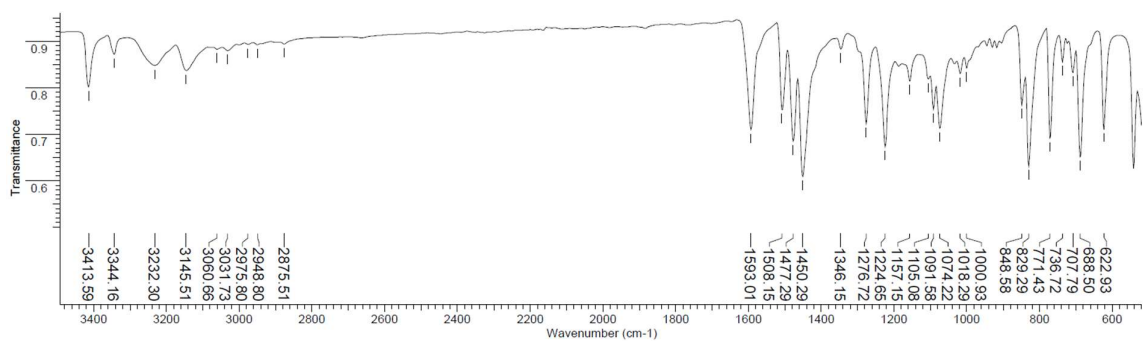


Figura A107. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona HCT2.

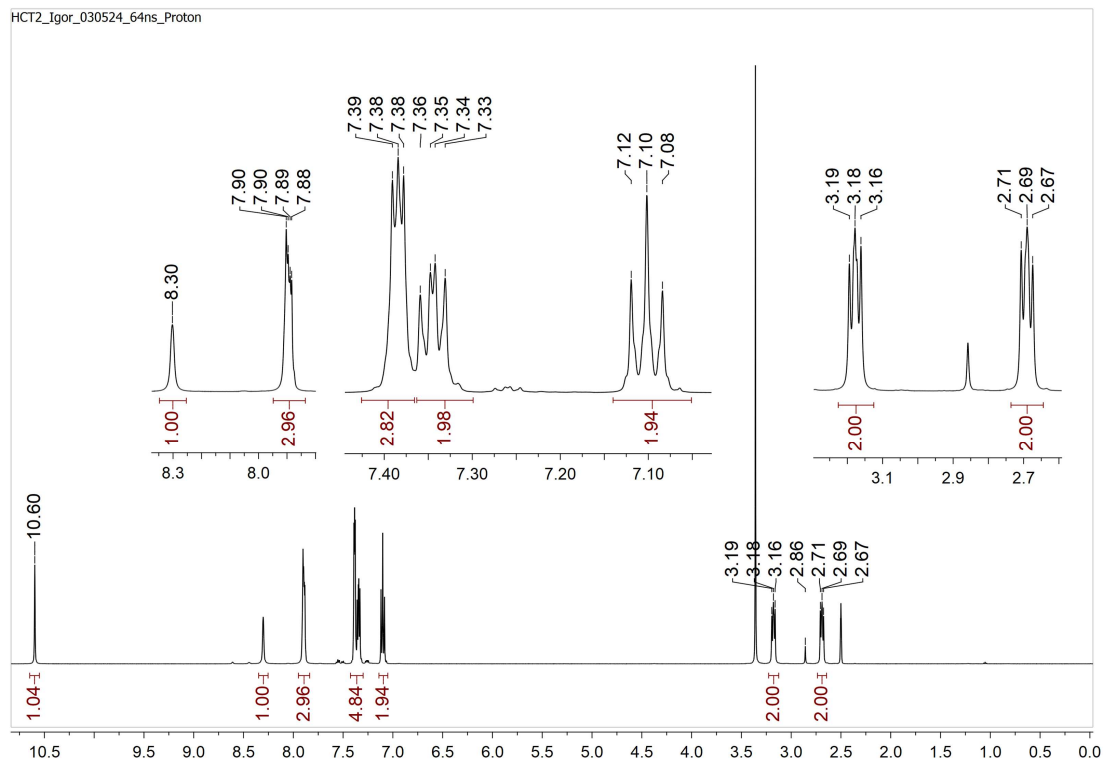


Figura A108. Espectro de RMN de ^1H de HCT2.

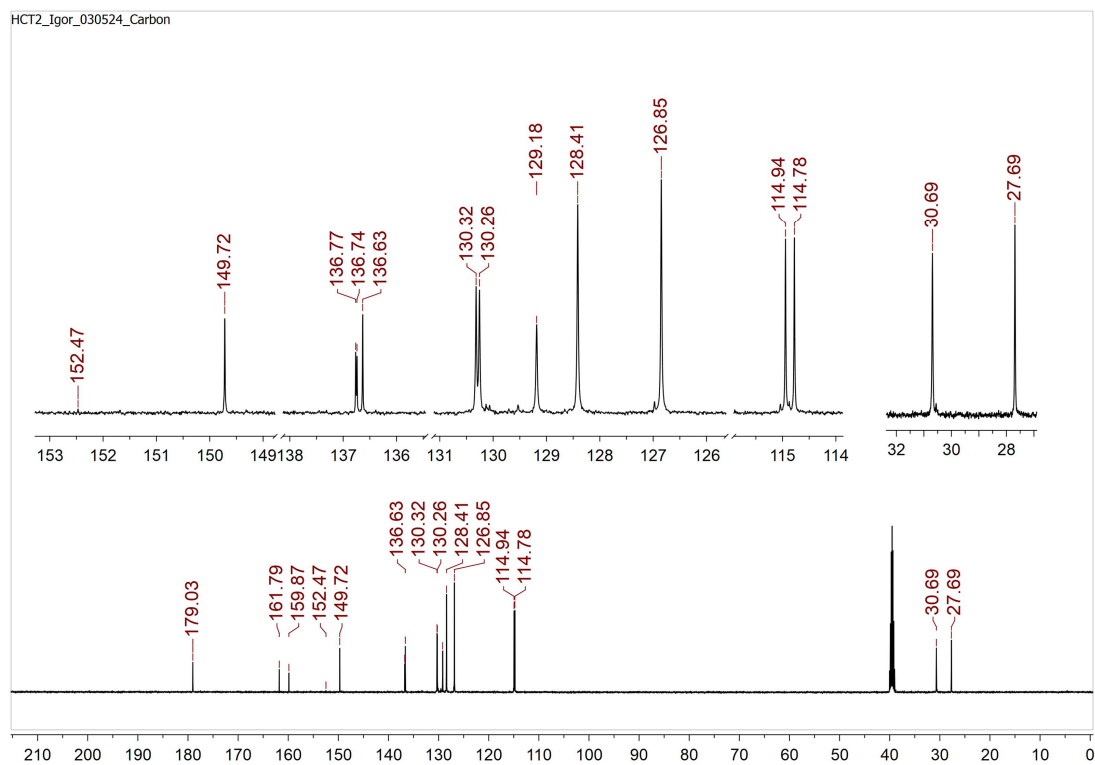


Figura A109. Espectro de RMN de ^{13}C de HCT2.

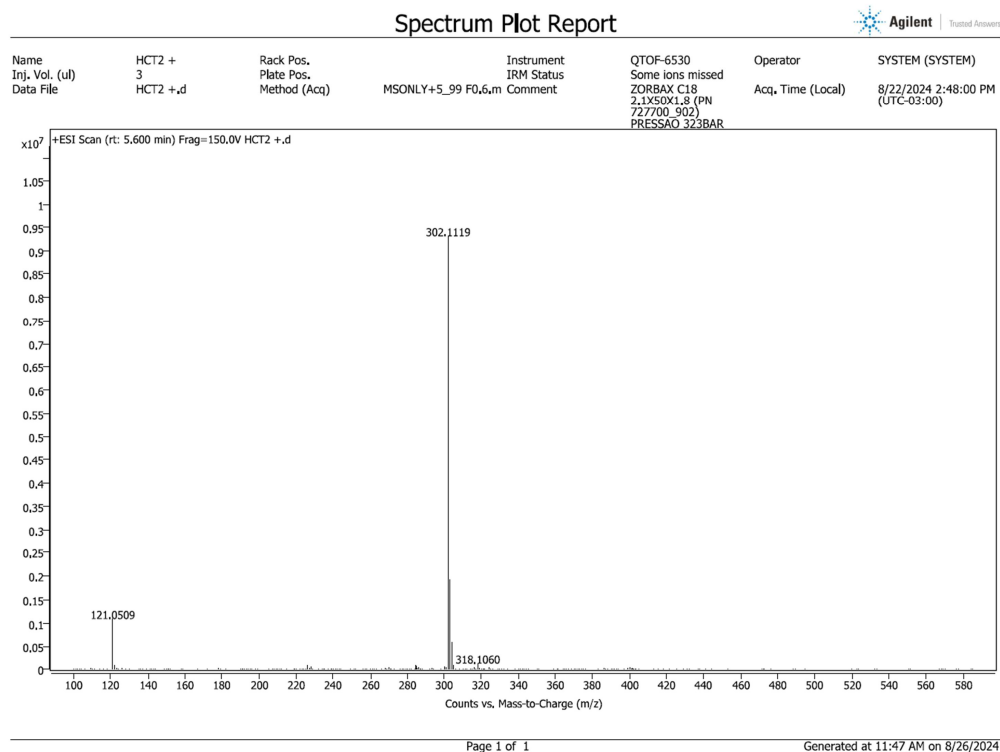


Figura A110. HRMS de HCT2.

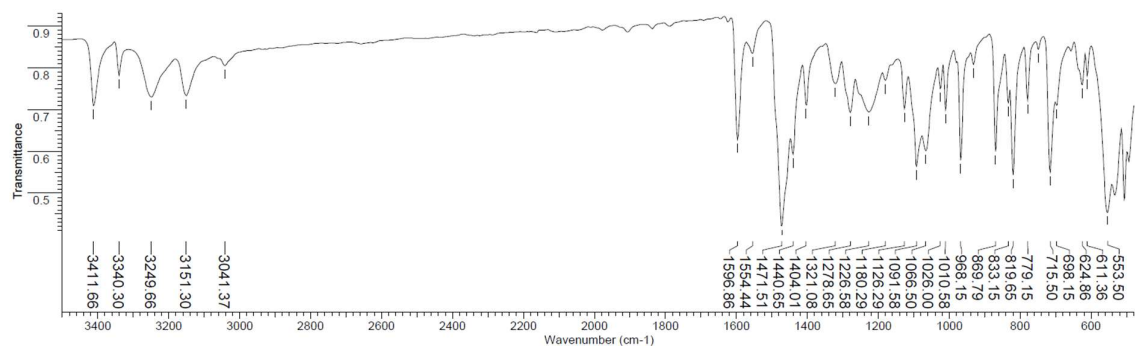


Figura A111. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CT3.

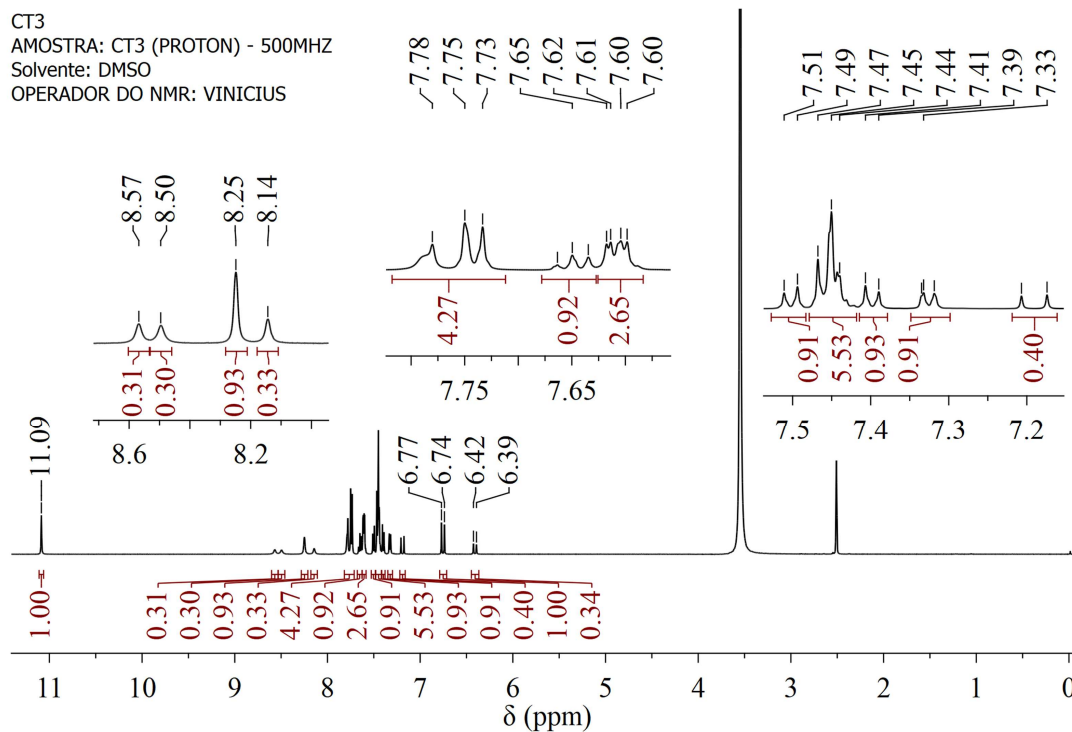


Figura A112. Espectro de RMN de ^1H de CT3.

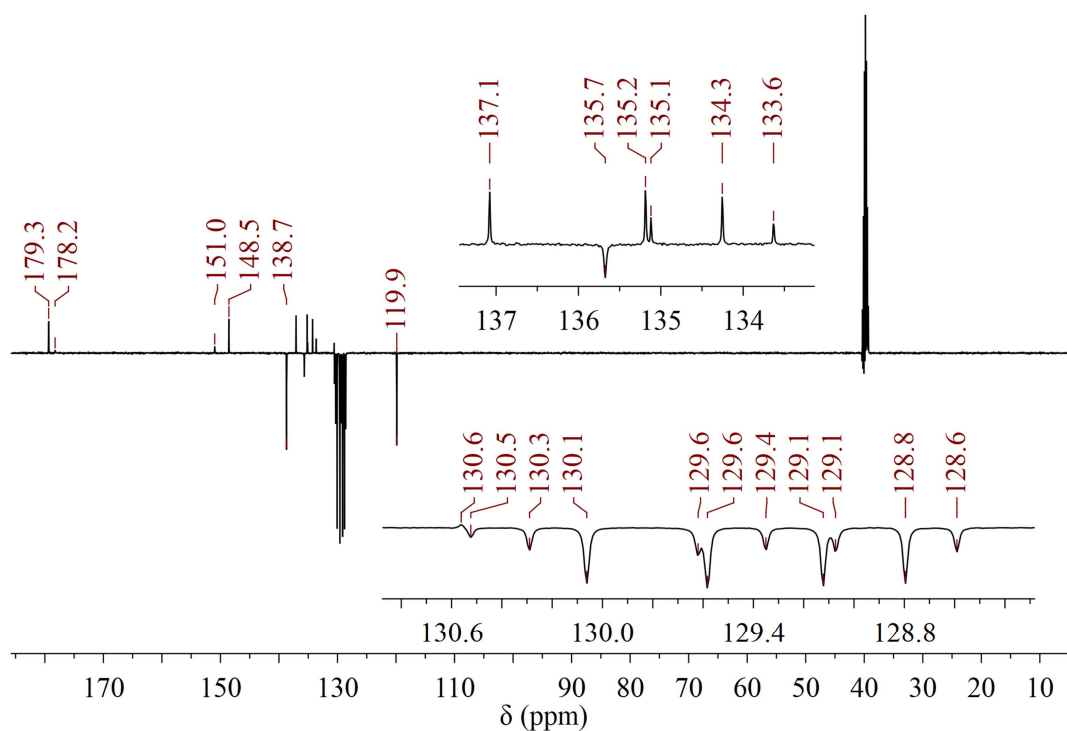


Figura A113. Espectro de RMN de ^{13}C de CT3.

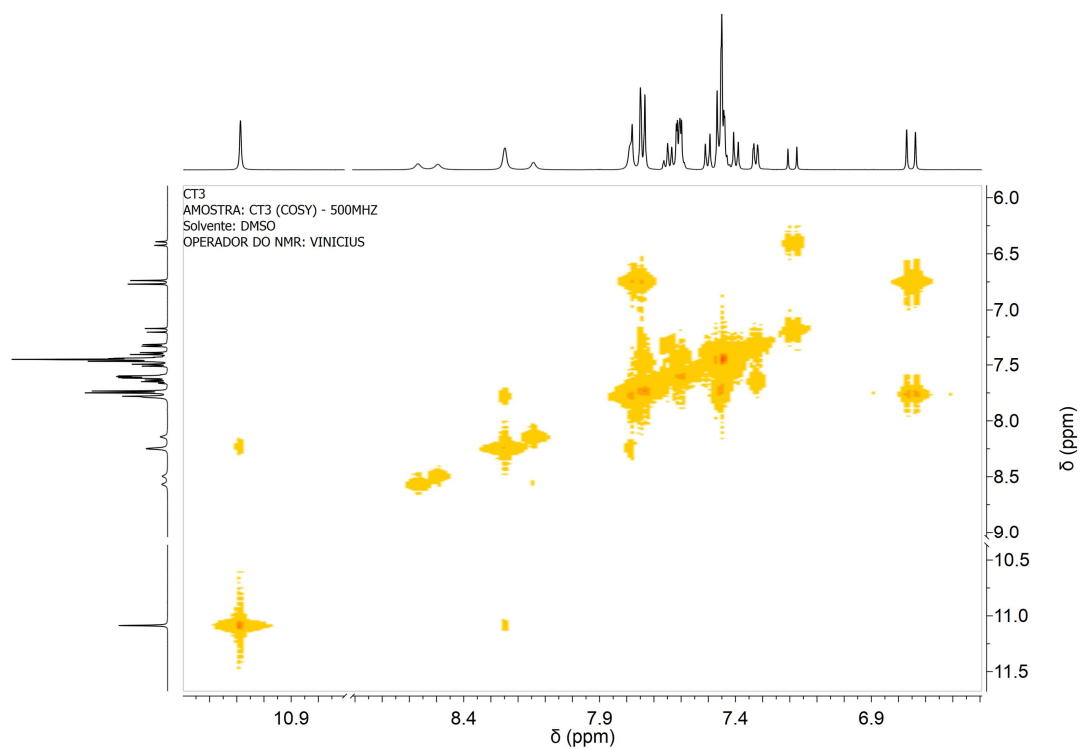


Figura A114. Espectro de COSY de CT3.

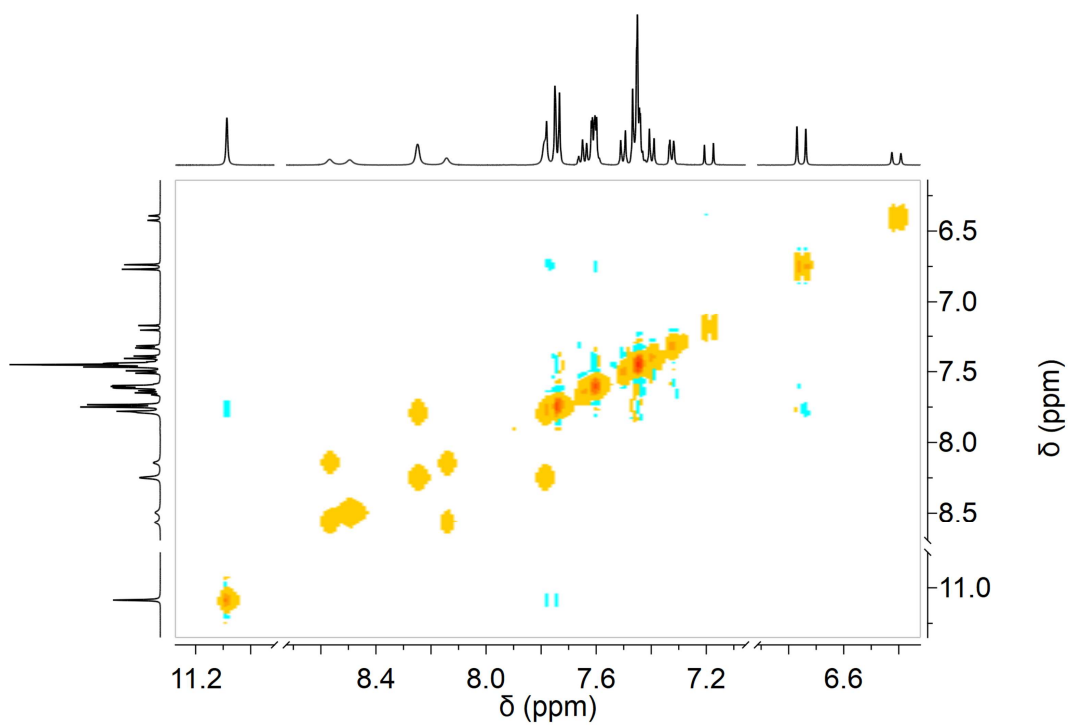


Figura A115. Espectro de NOESY de CT3.

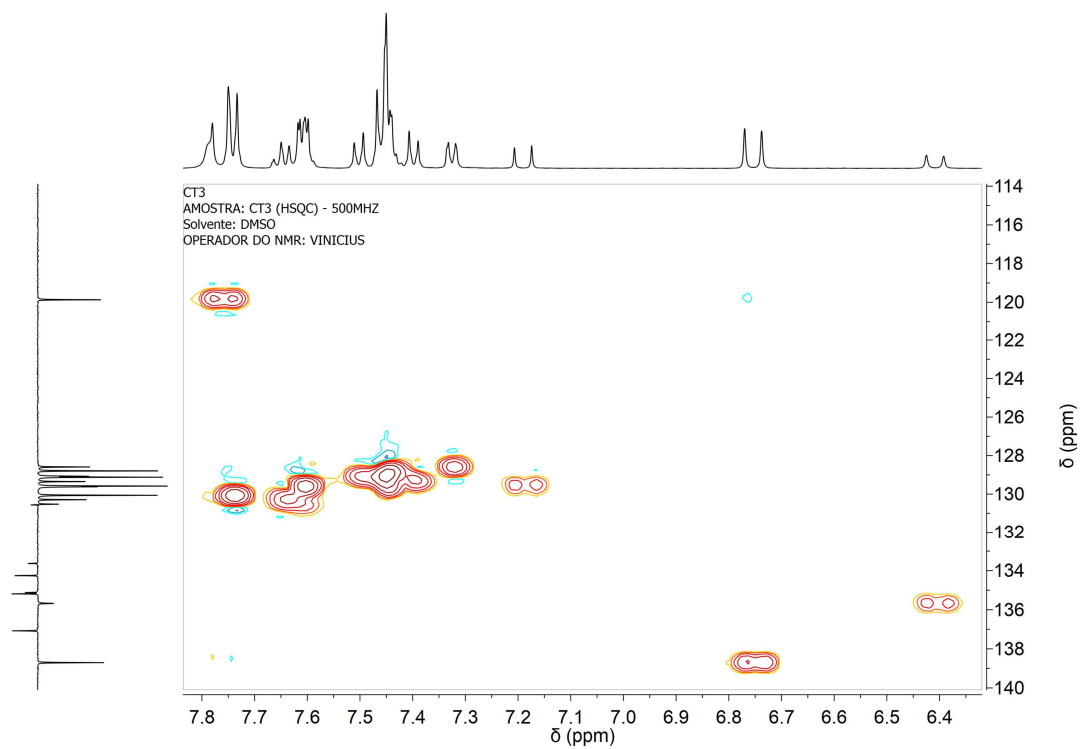


Figura A116. Espectro de HSQC de CT3.

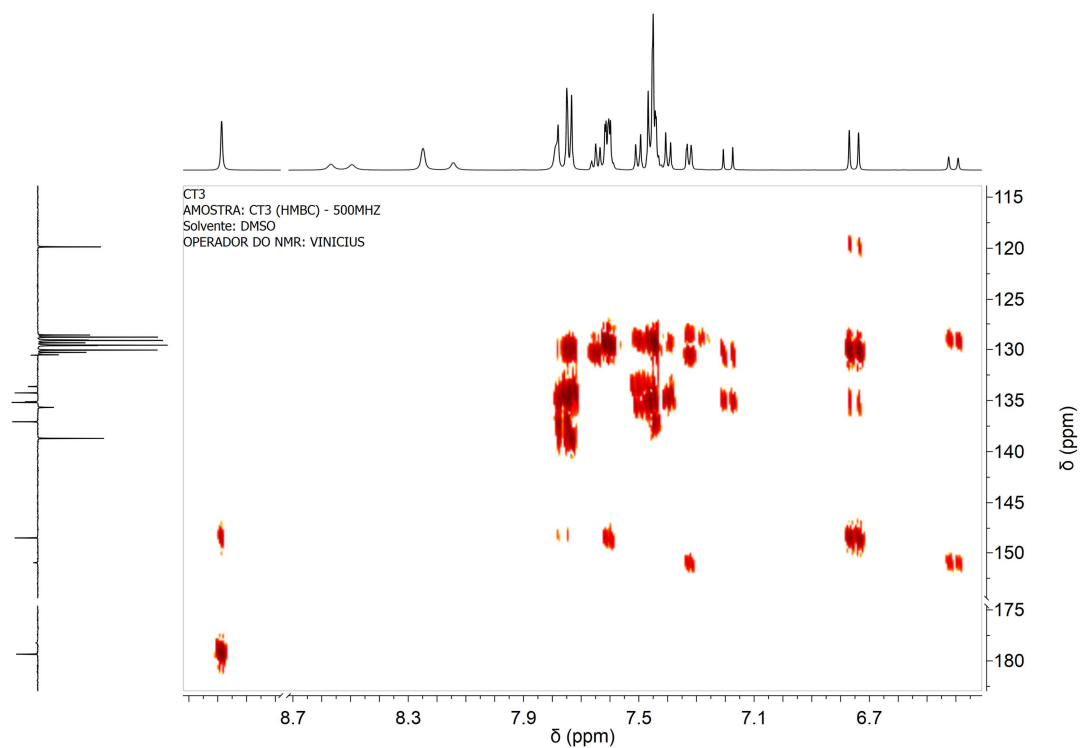
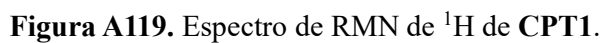
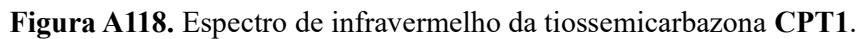


Figura A117. Espectro de HMBC de CT3.



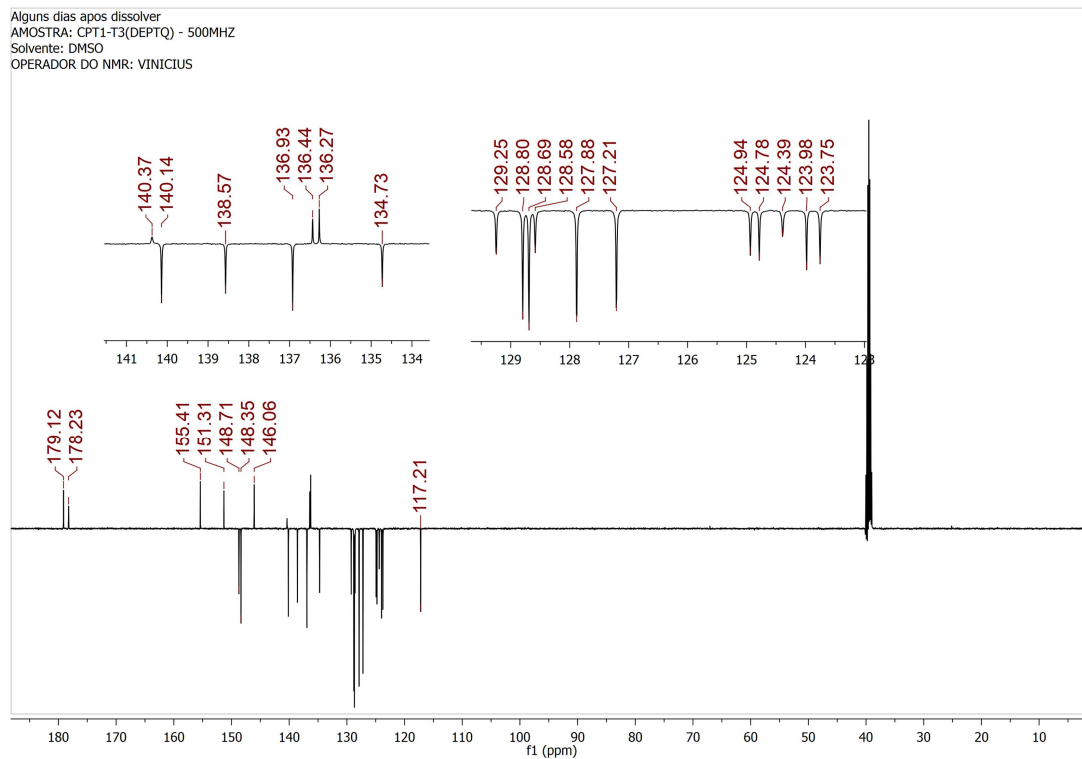


Figura A120. Espectro de RMN de ^{13}C de **CPT1**.

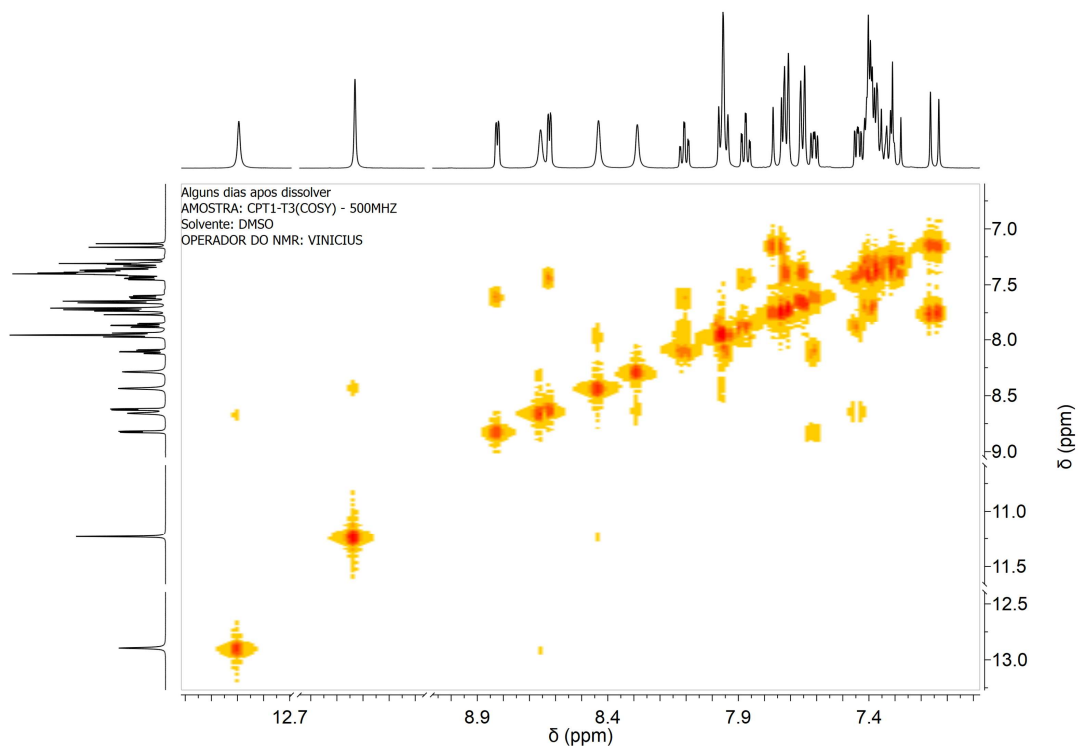


Figura A121. Espectro de COSY de **CPT1**.

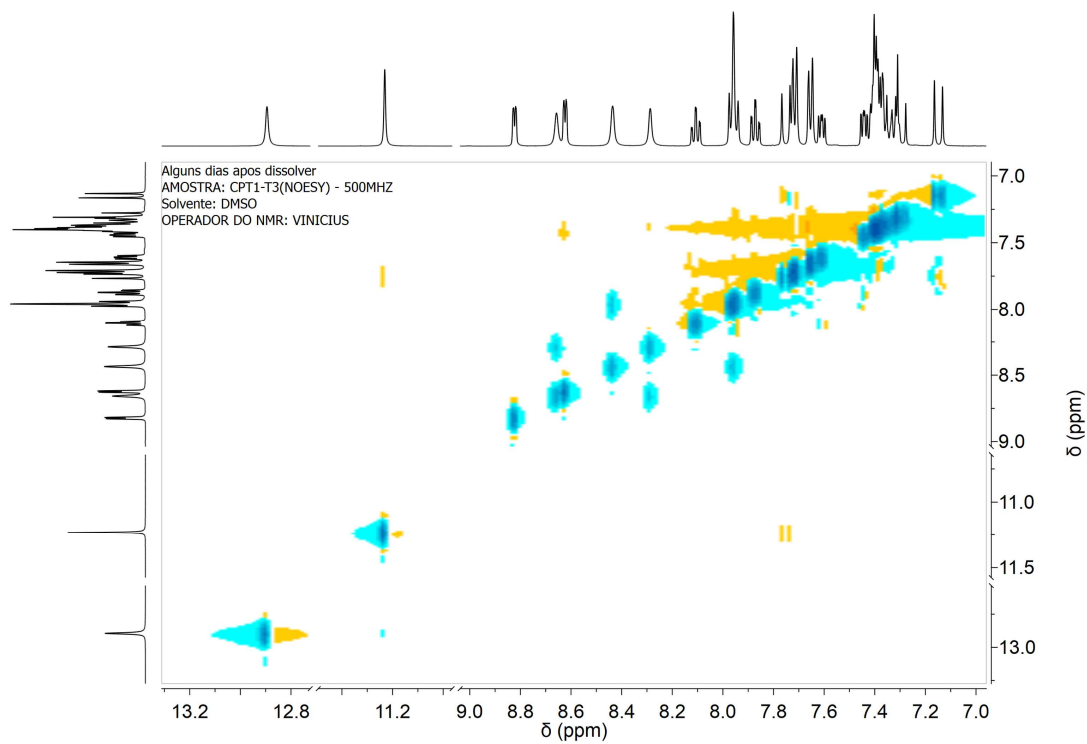


Figura A122. Espectro de NOESY de CPT1.

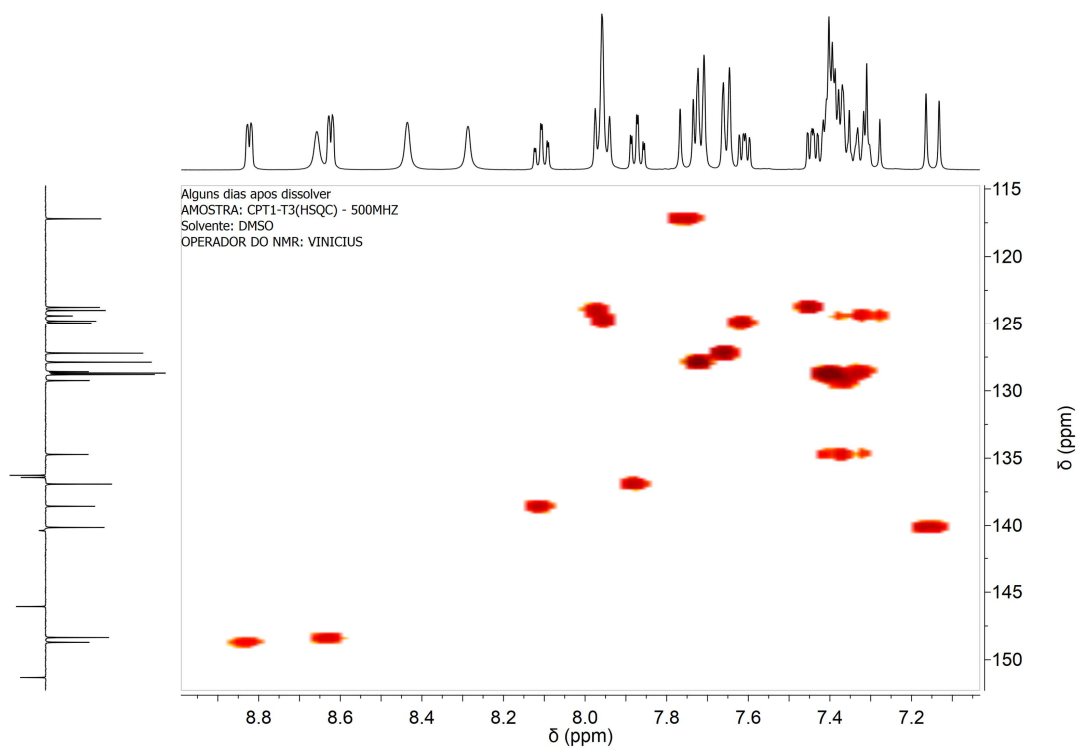


Figura A123. Espectro de HSQC de CPT1.

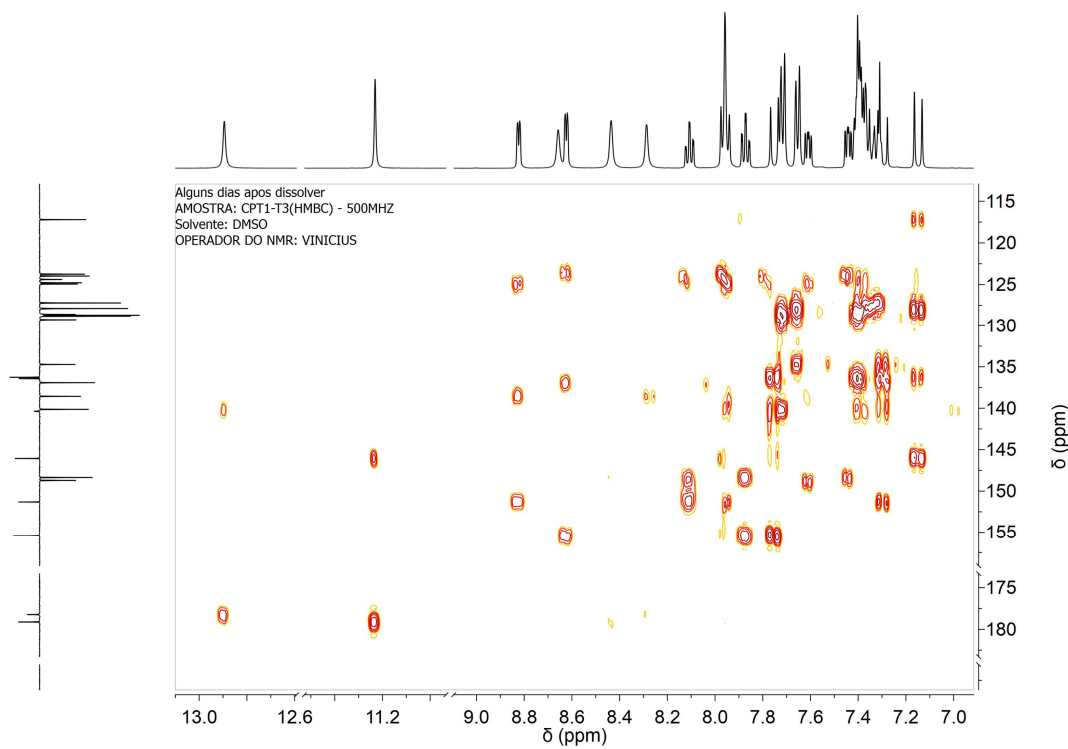


Figura A124. Espectro de HMBC de CPT1.

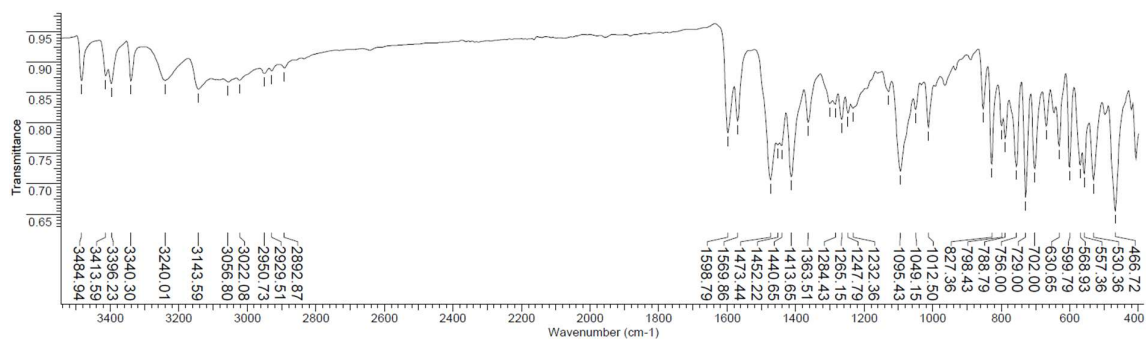


Figura A125. Espectro de infravermelho da tiosemicarbazona HCPT1.

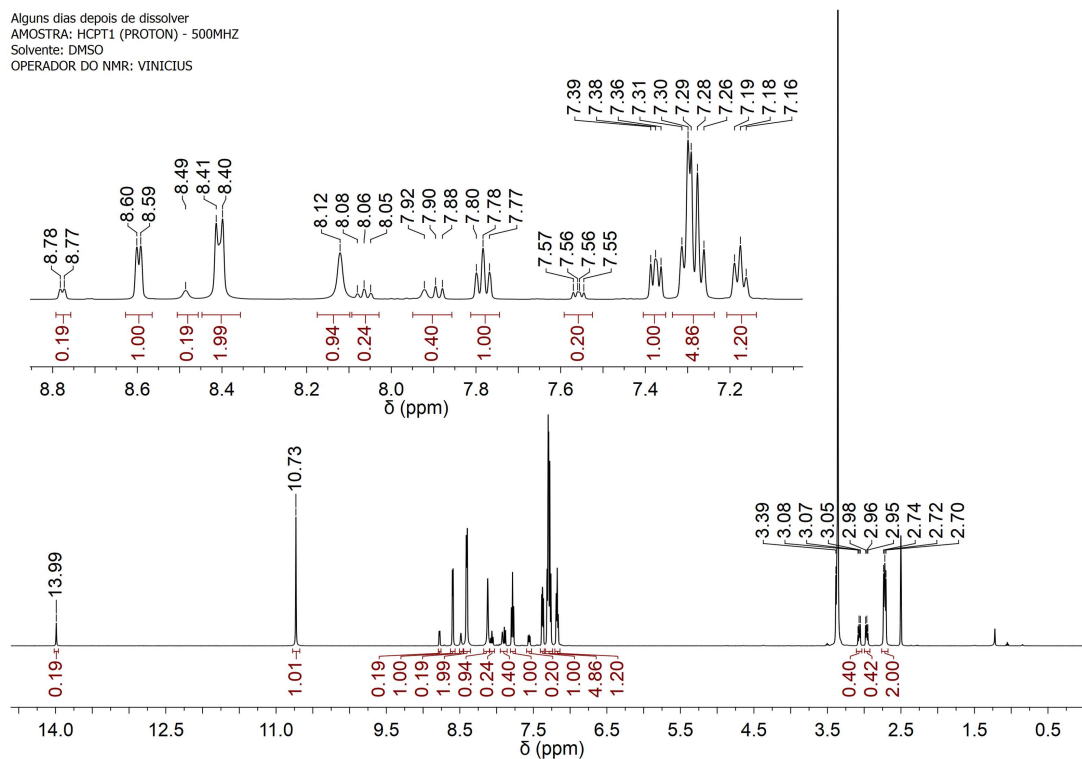


Figura A126. Espectro de RMN de ^1H de HCPT1.

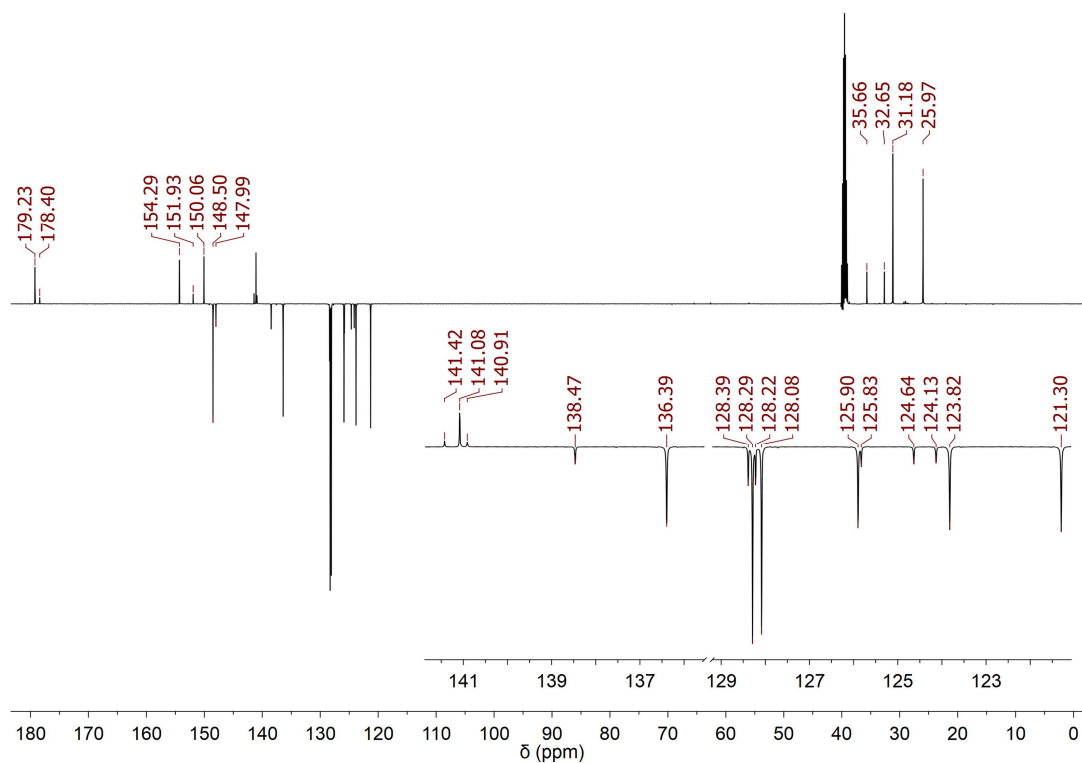


Figura A127. Espectro de RMN de ^{13}C de HCPT1.

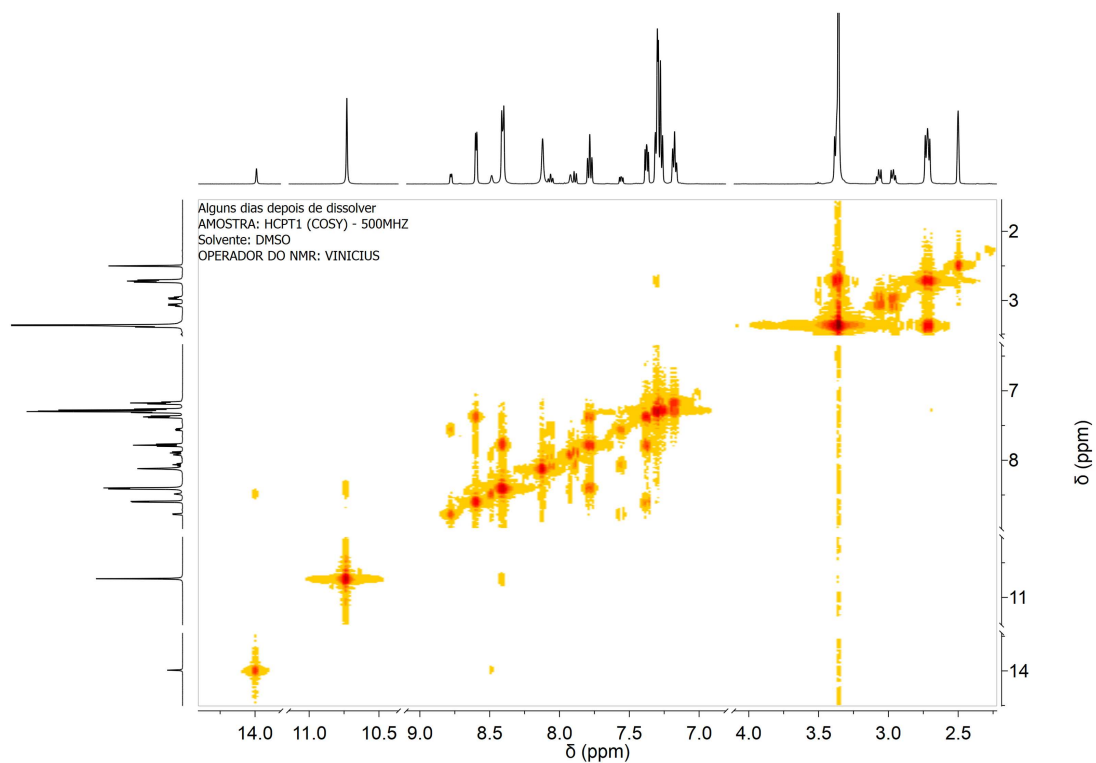


Figura A128. Espectro de COSY de **HCPT1**.

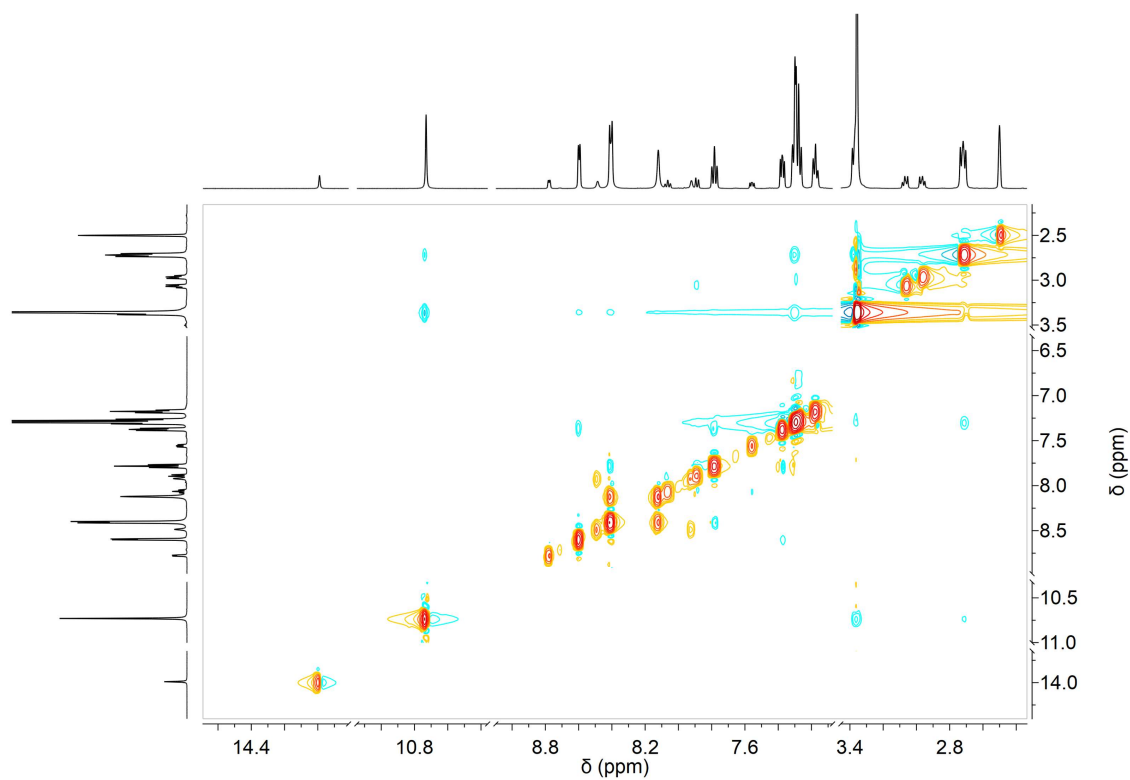


Figura A129. Espectro de NOESY de **HCPT1**.

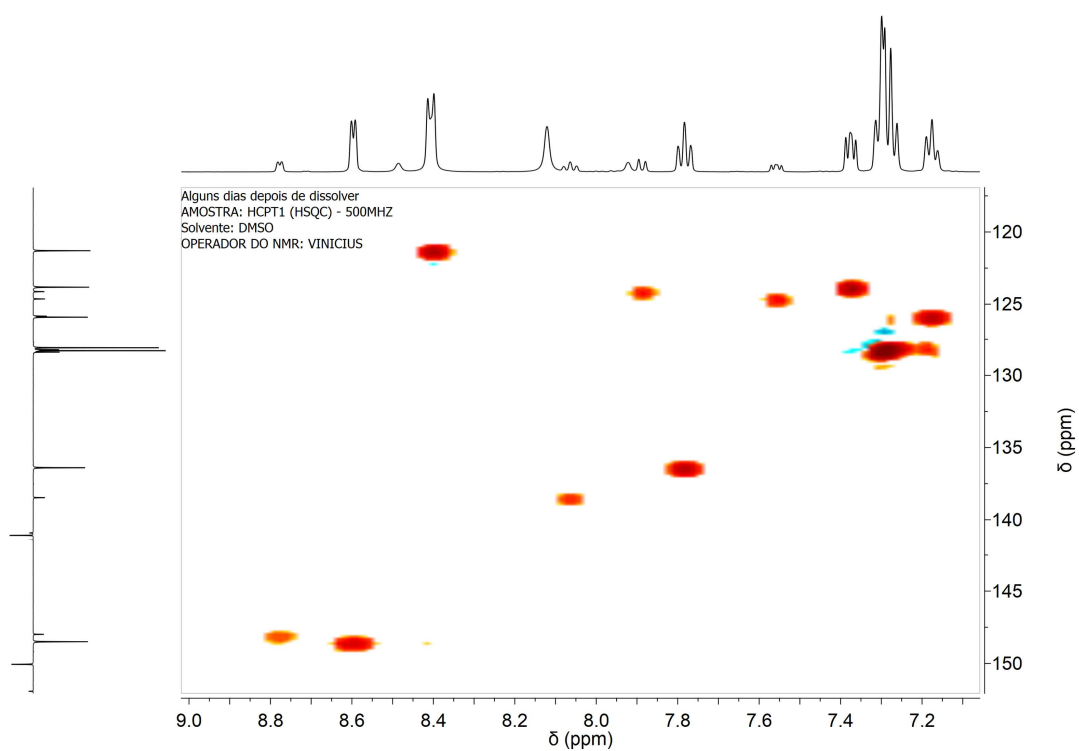


Figura A130. Espectro de HSQC de HCPT1.

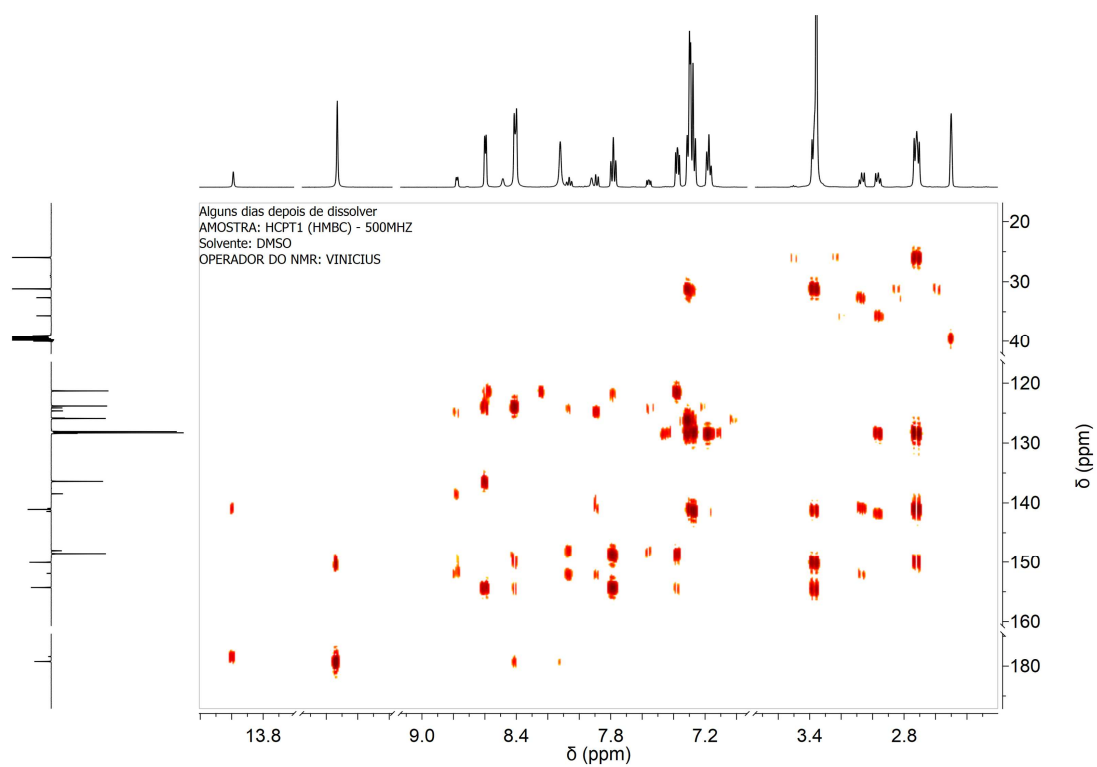


Figura A131. Espectro de HMBC de HCPT1.

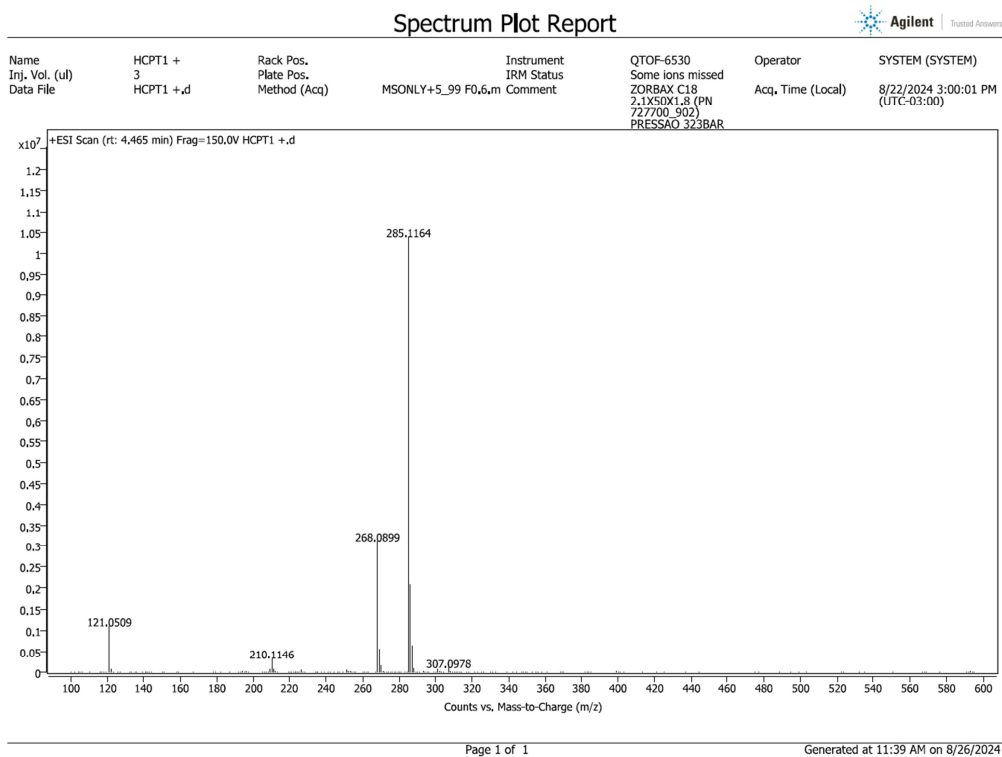


Figura A132. HRMS de HCPT1.

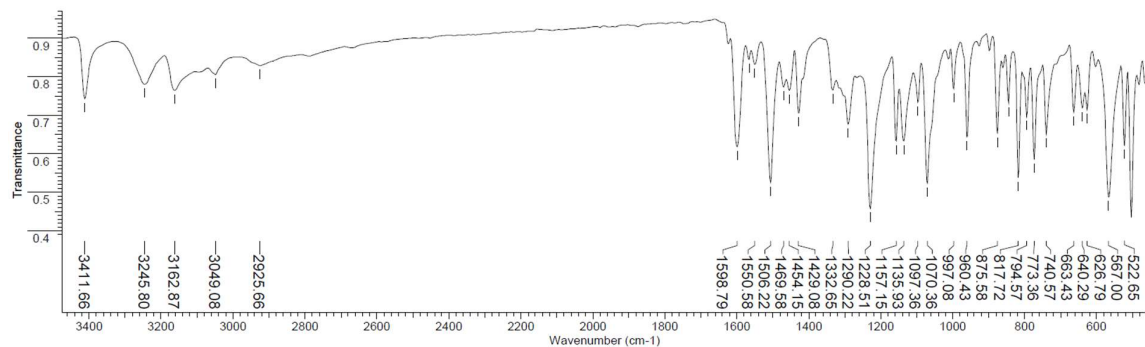


Figura A133. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CPT2.

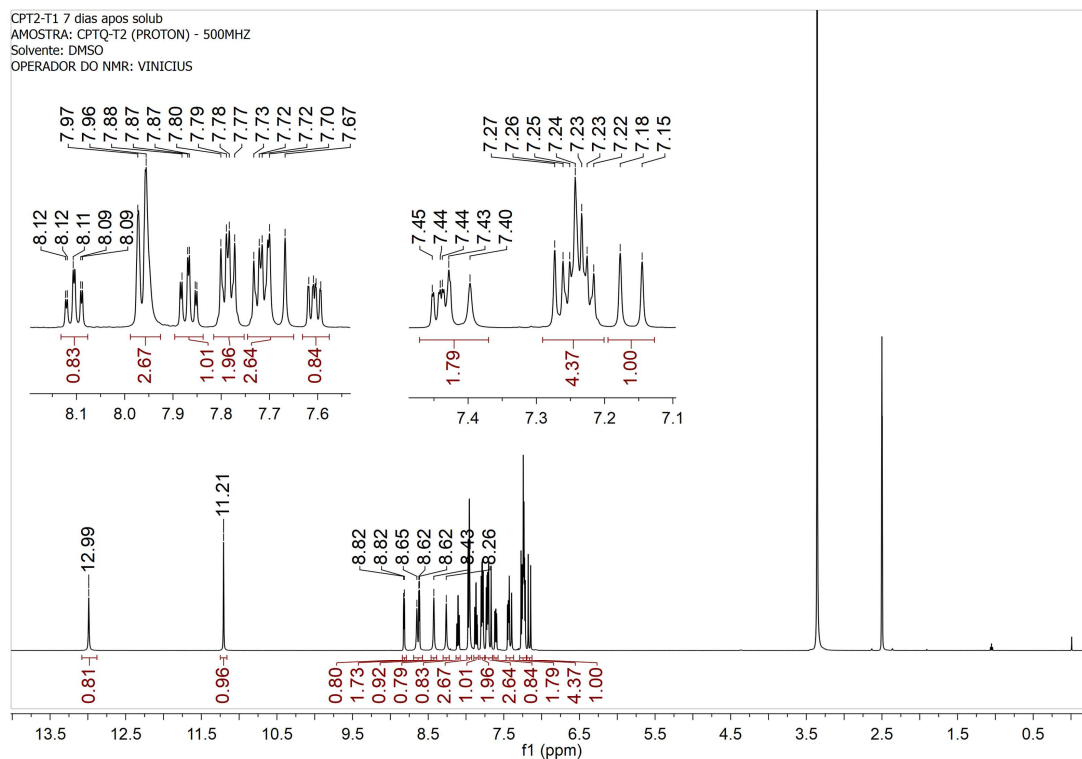


Figura A134. Espectro de RMN de ^1H de CPT2.

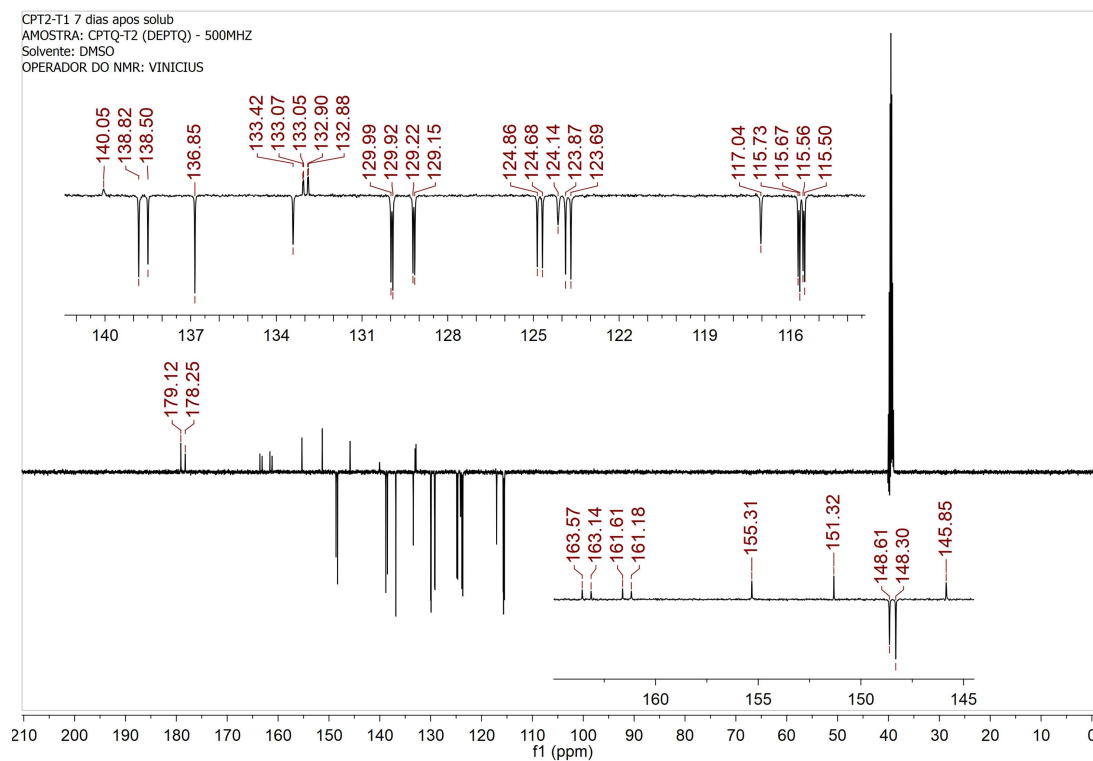


Figura A135. Espectro de RMN de ^{13}C de CPT2.

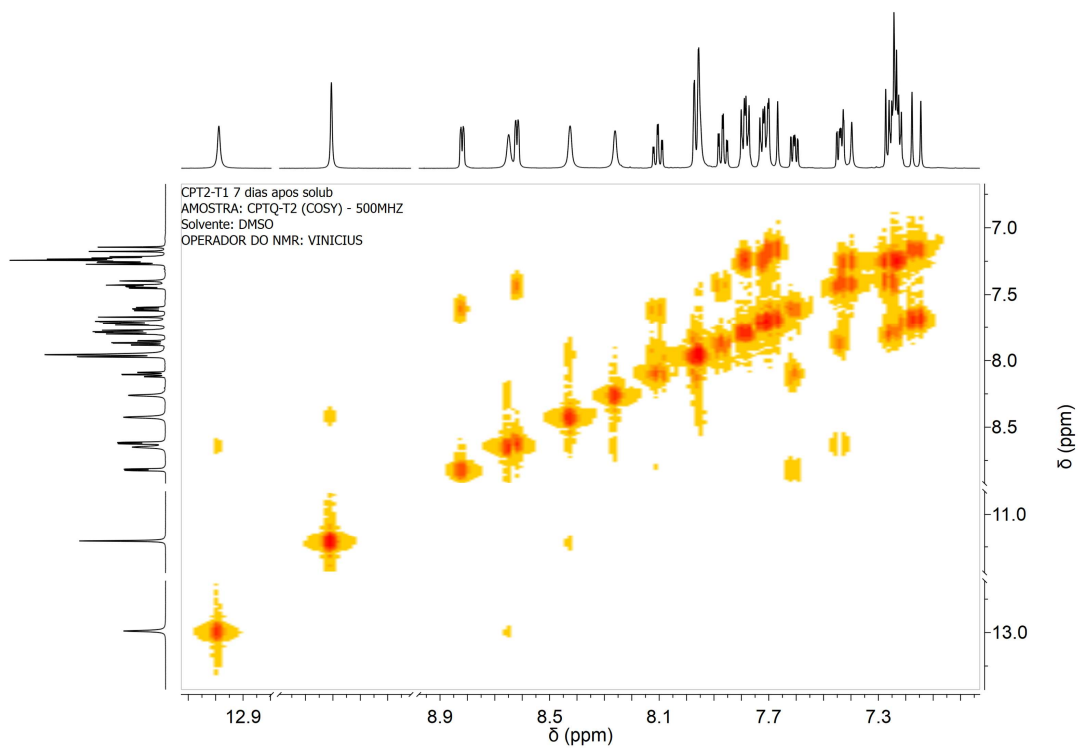


Figura A136. Espectro de COSY de CPT2.

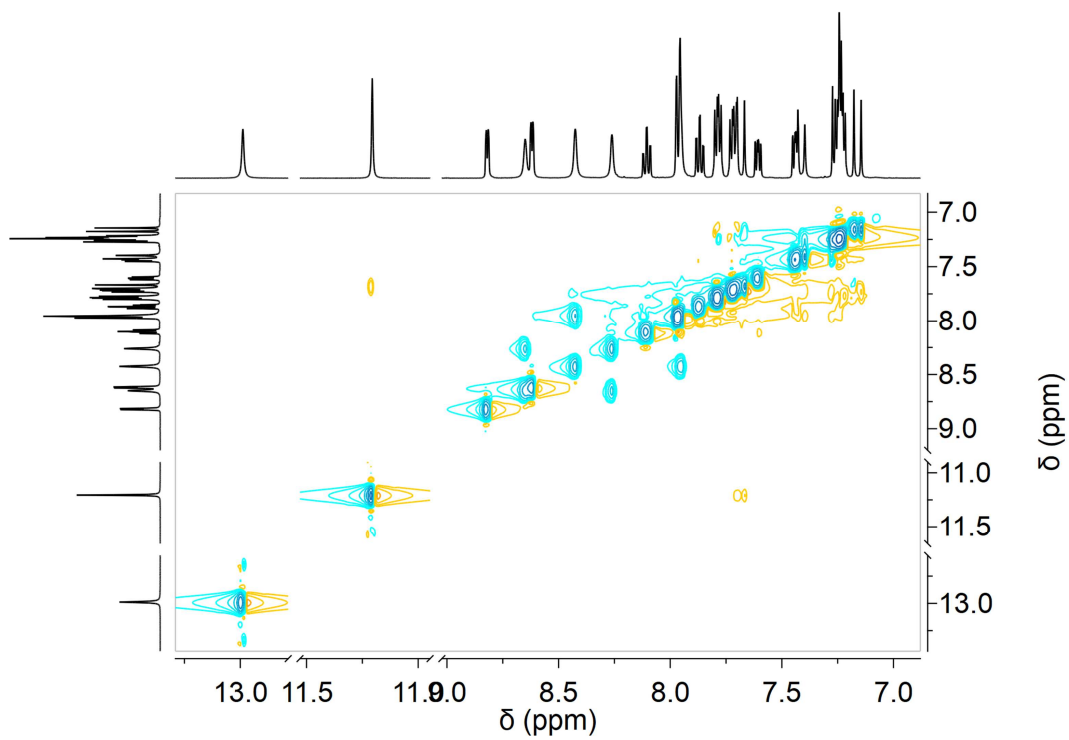


Figura A137. Espectro de NOESY de CPT2.

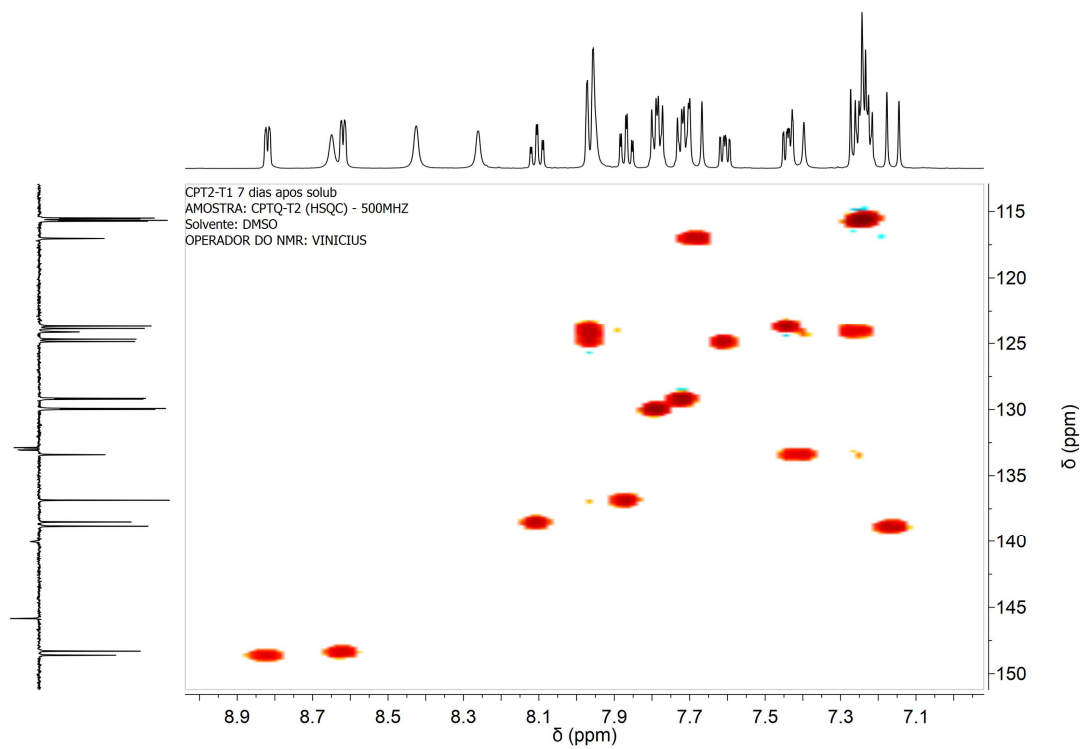


Figura A138. Espectro de HSQC de CPT2.

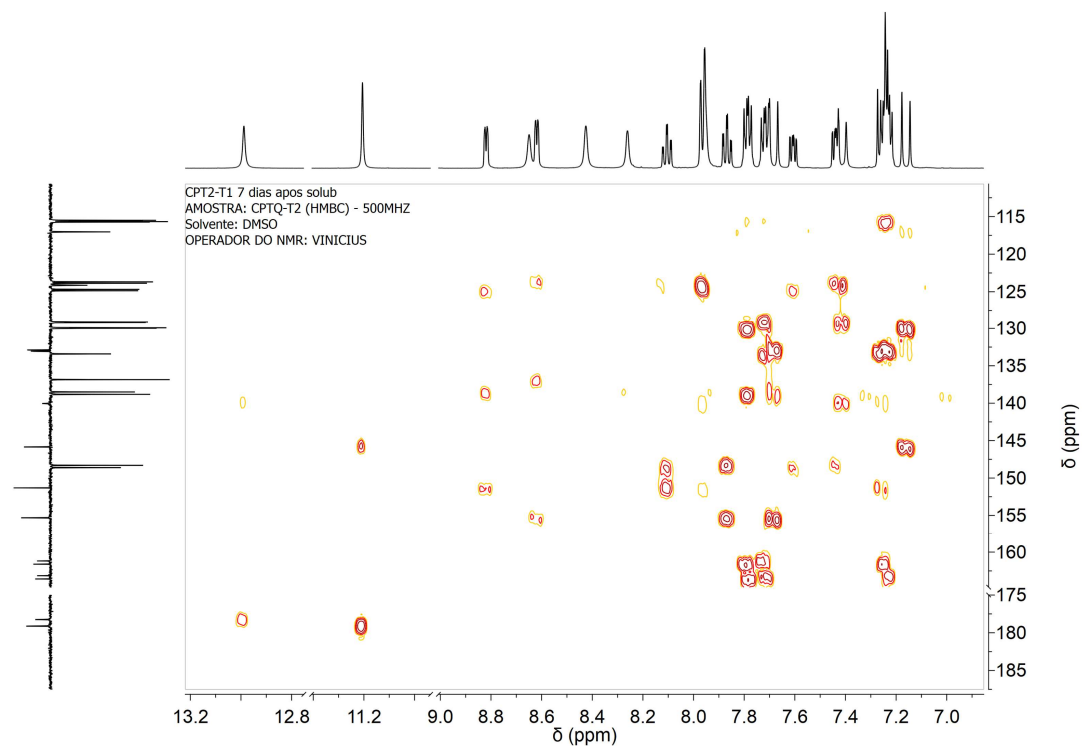


Figura A139. Espectro de HMBC de CPT2.

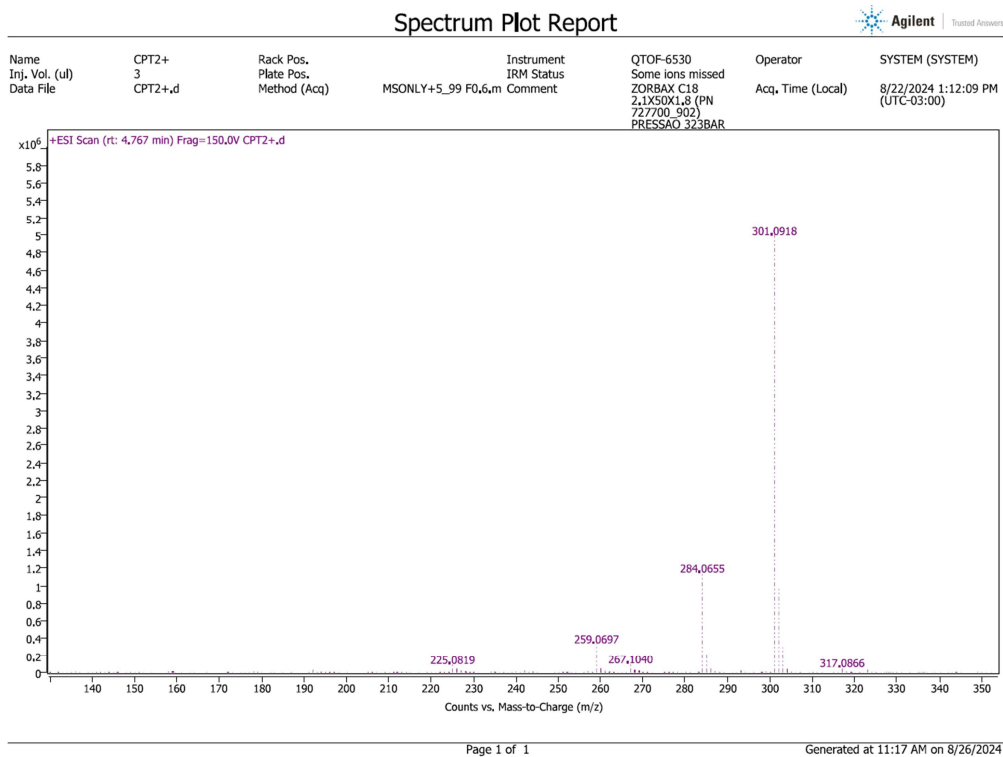


Figura A140. HRMS de CPT2.

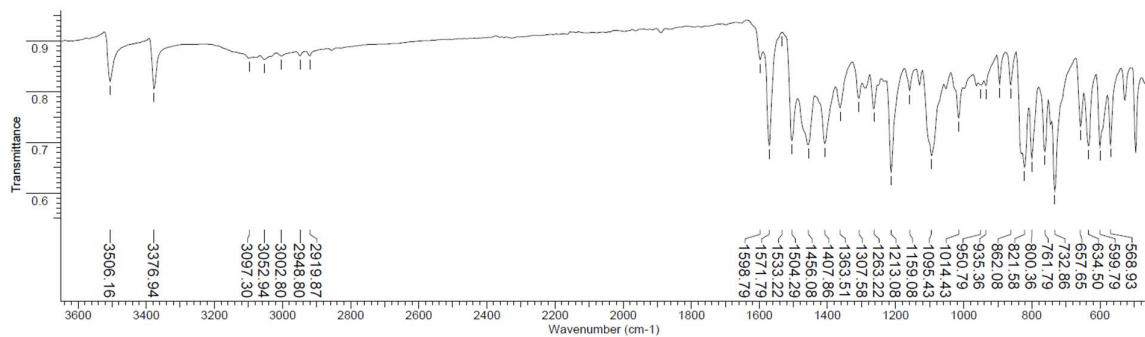


Figura A141. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona HCPT2.

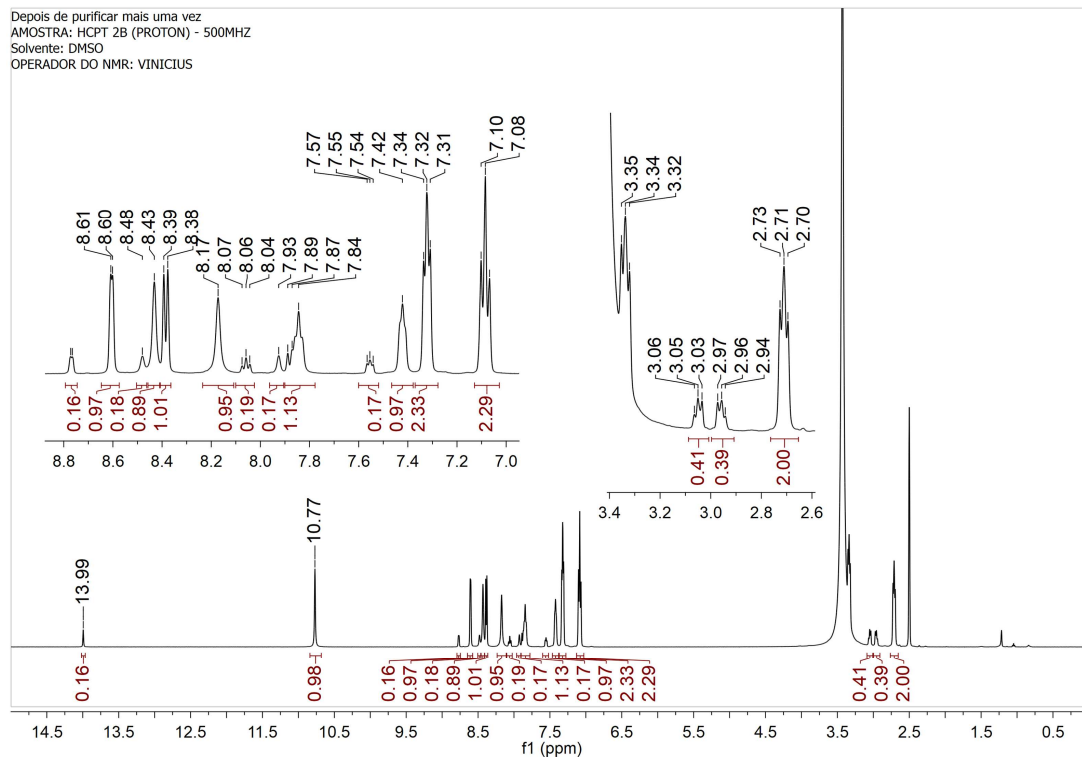


Figura A142. Espectro de RMN de ^1H de HCPT2.

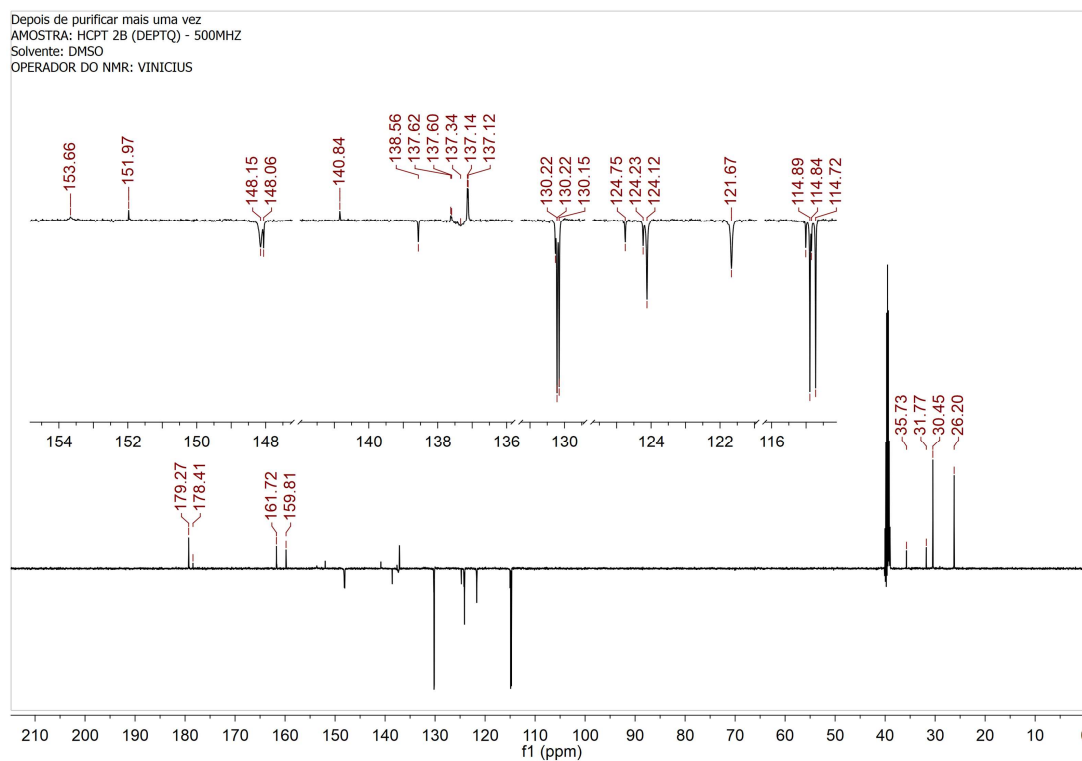


Figura A143. Espectro de RMN de ^{13}C de HCPT2.

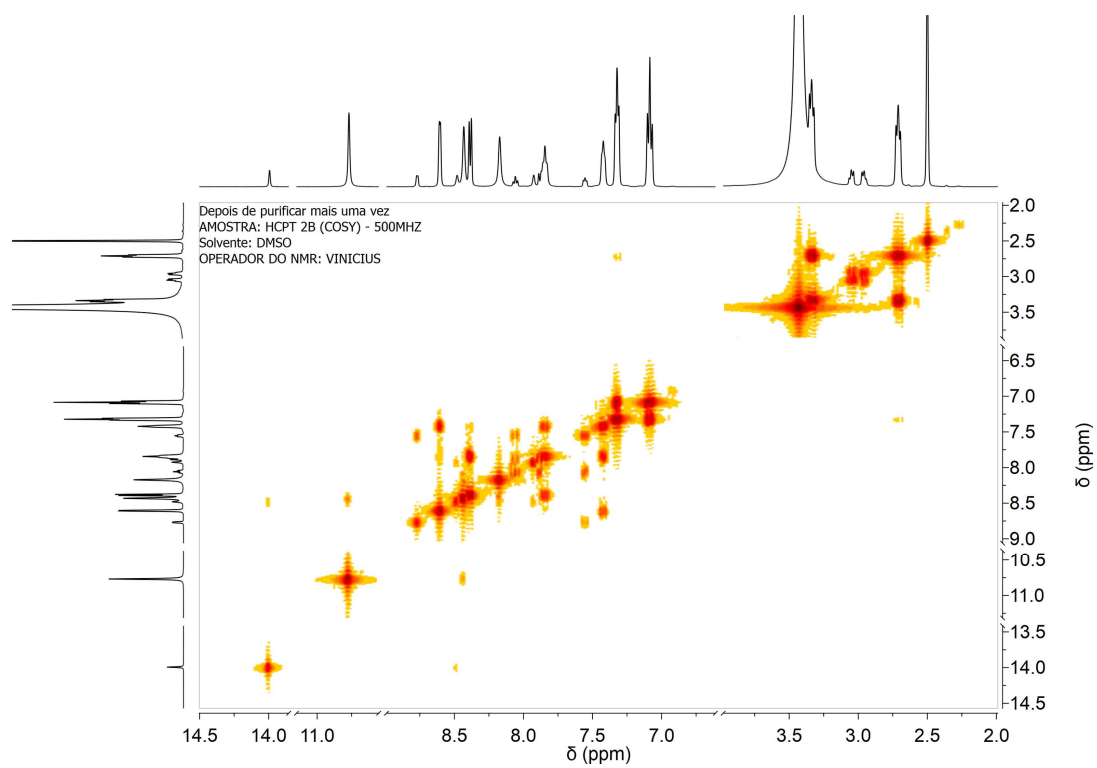


Figura A144. Espectro de COSY de **HCPT2**.

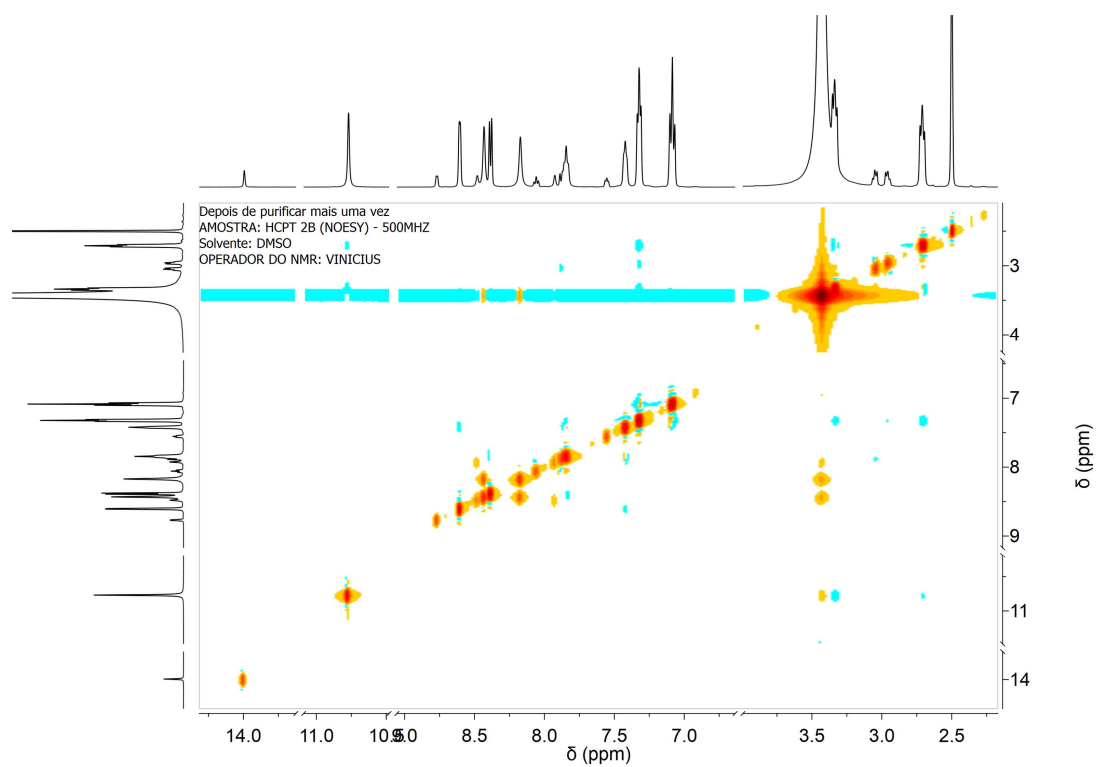


Figura A145. Espectro de NOESY de **HCPT2**.

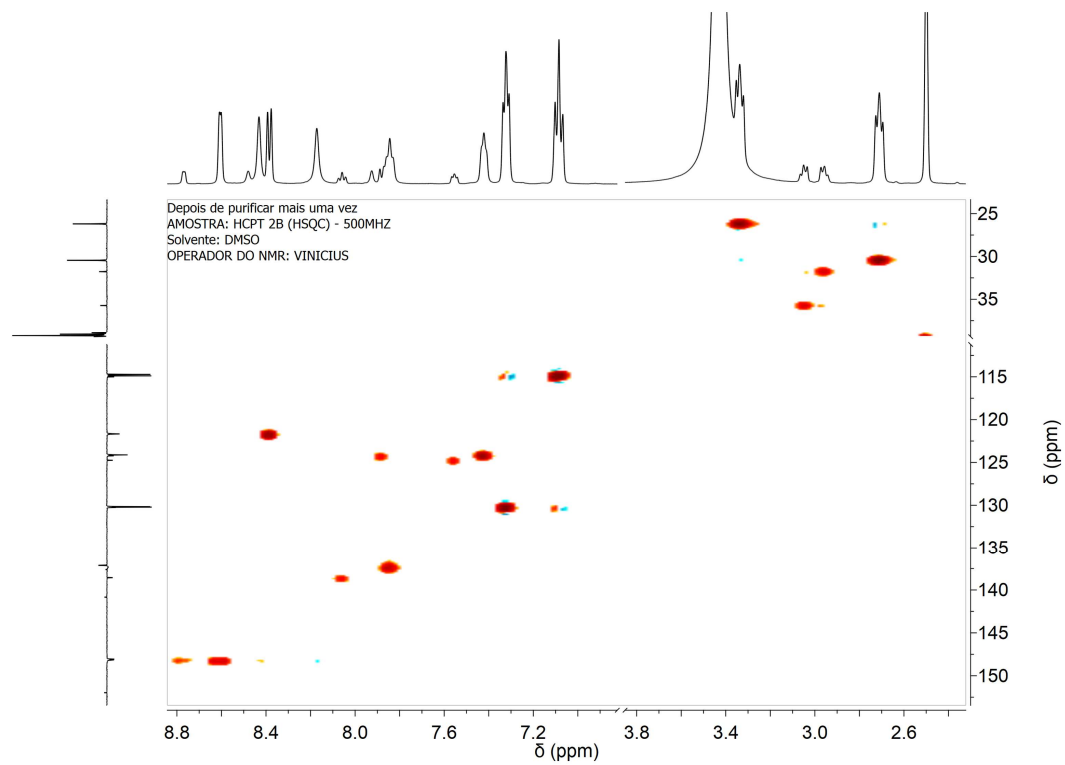


Figura A146. Espectro de HSQC de **HCPT2**.

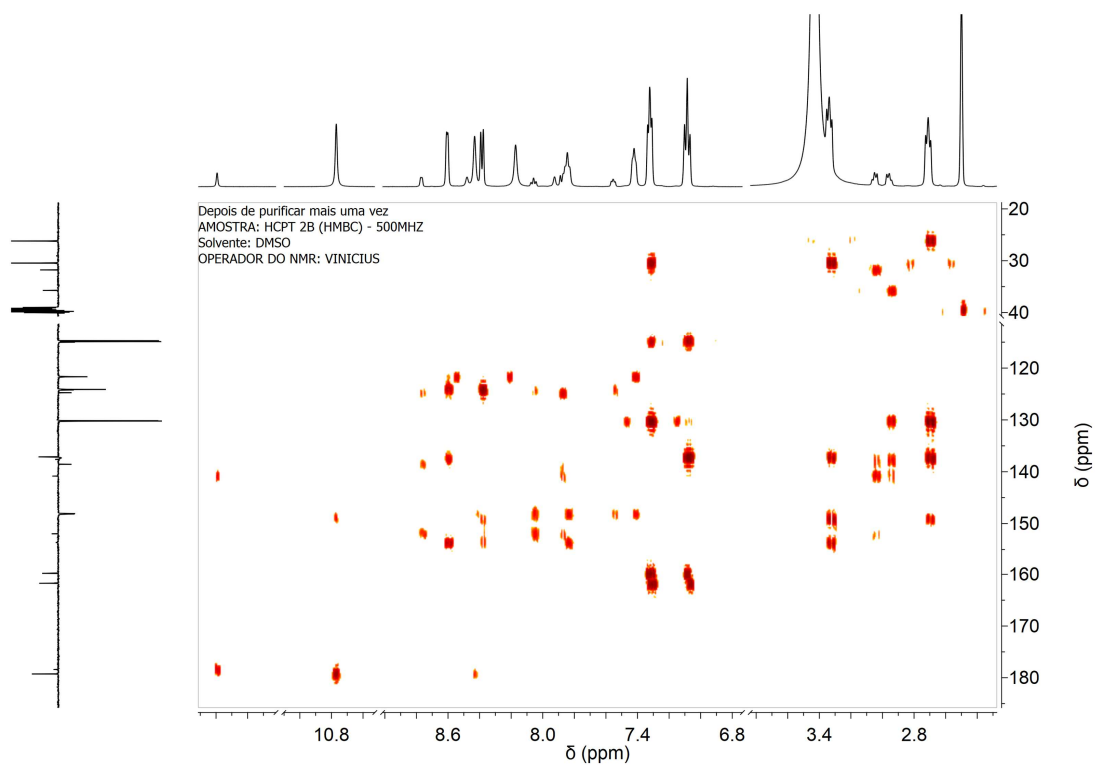


Figura A147. Espectro de HMBC de **HCPT2**.

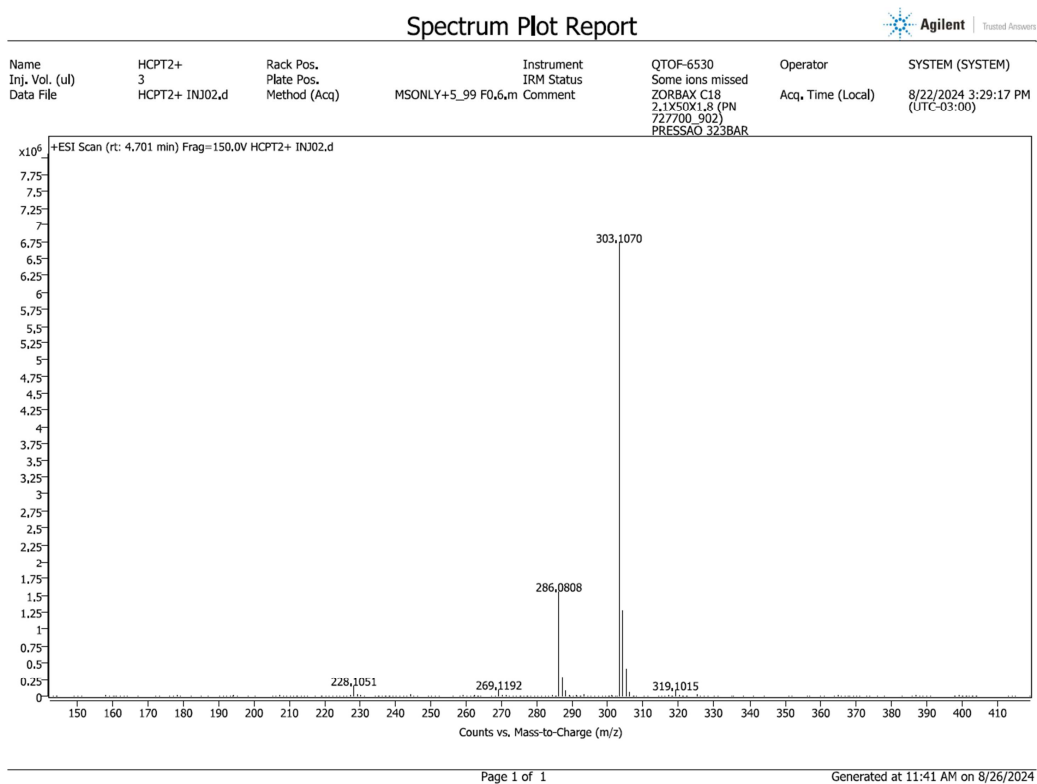


Figura A148. HRMS de HCPT2.

- Derivados avaliados não avaliados ensaios biológicos: CT4-13, CPT3-8.

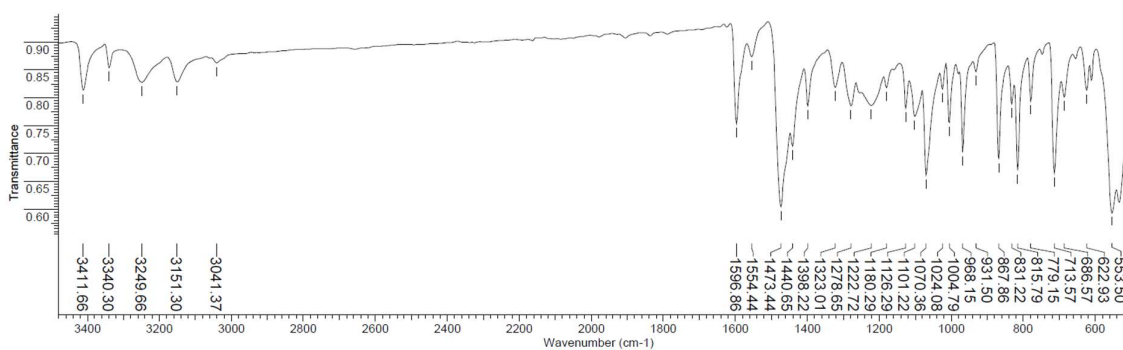


Figura A149. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CT4.

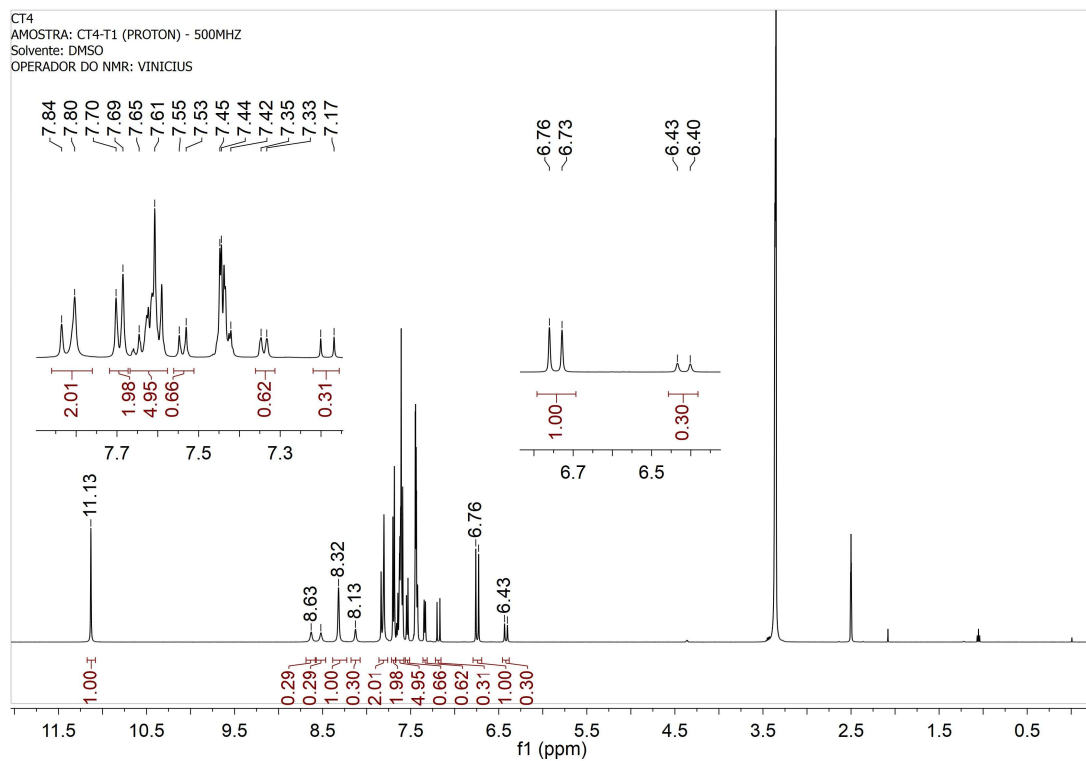


Figura A150. Espectro de RMN de ^1H de CT4.

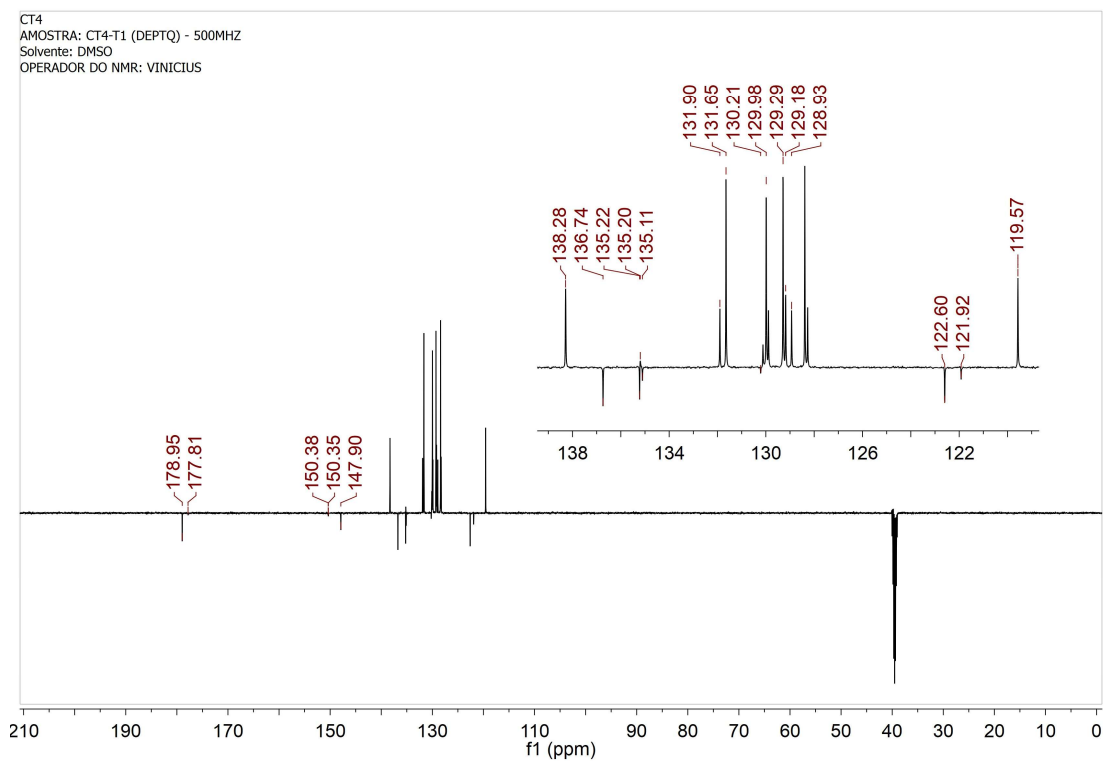


Figura A151. Espectro de RMN de ^{13}C de CT4.

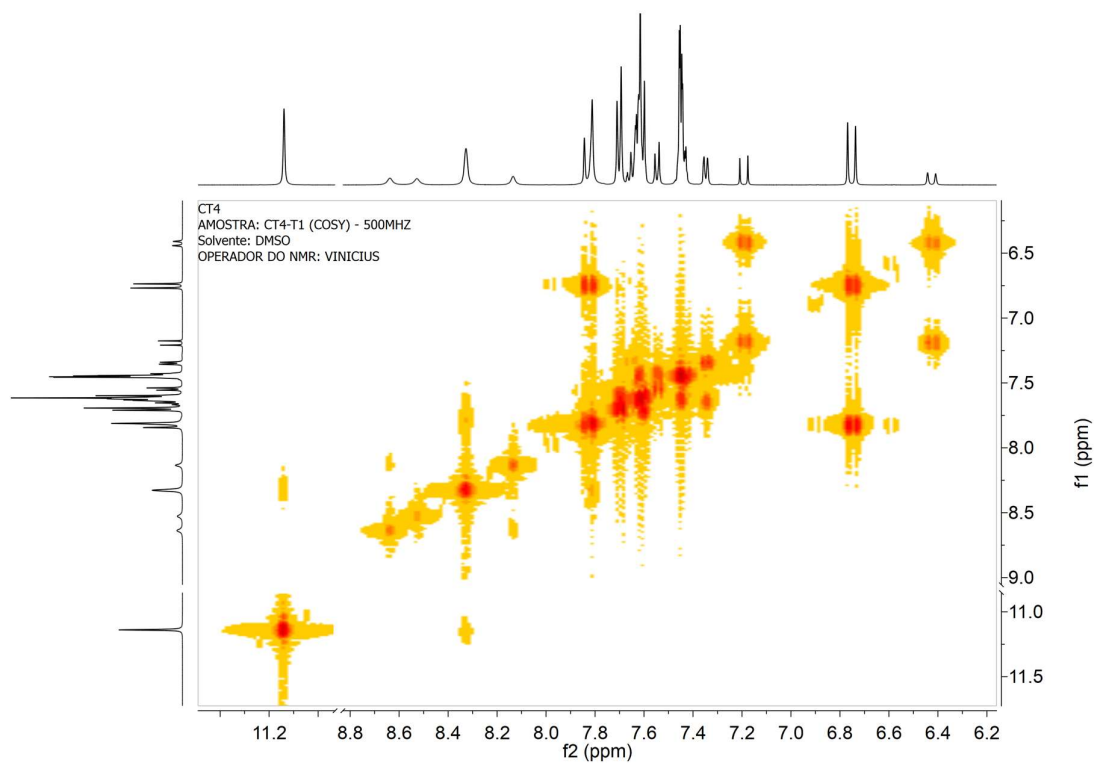


Figura A152. Espectro de COSY de CT4.

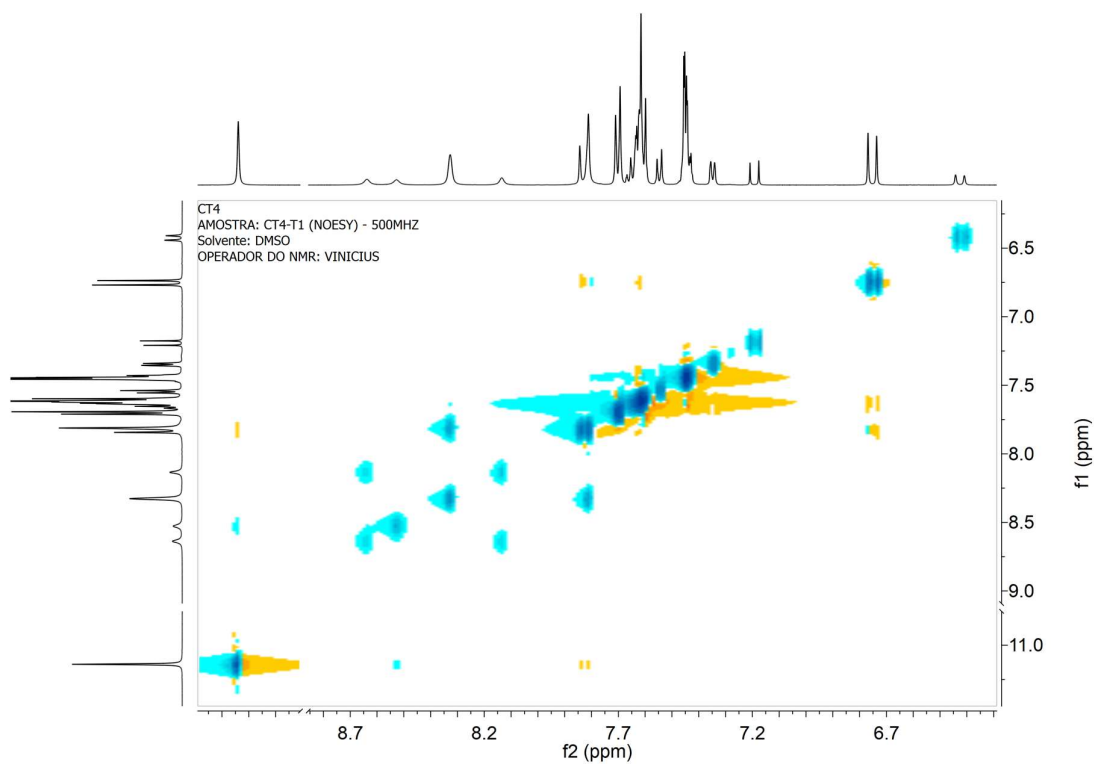


Figura A153. Espectro de NOESY de CT4.

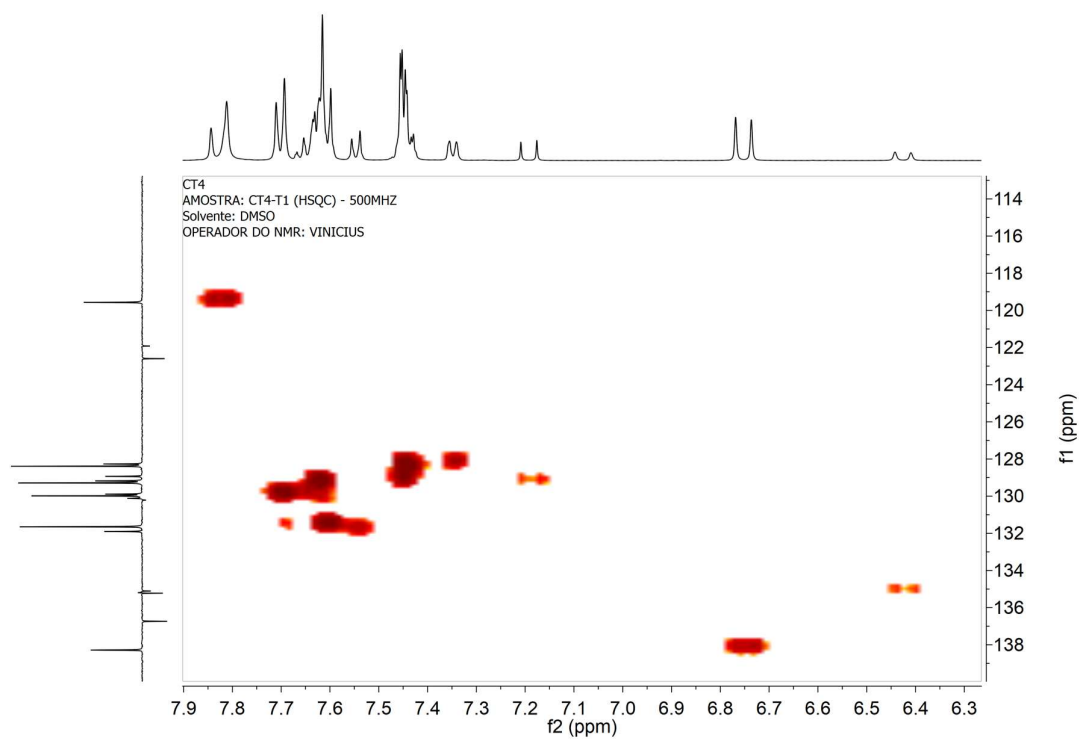


Figura A154. Espectro de HSQC de CT4.

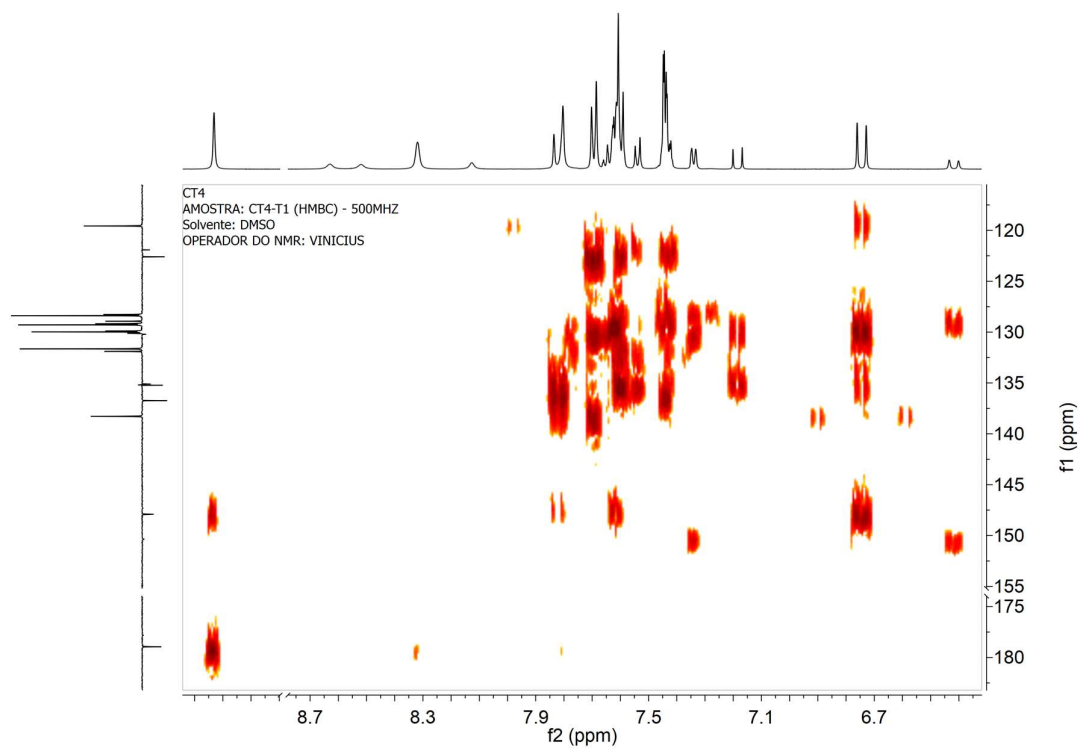


Figura A155. Espectro de HMBC de CT4.

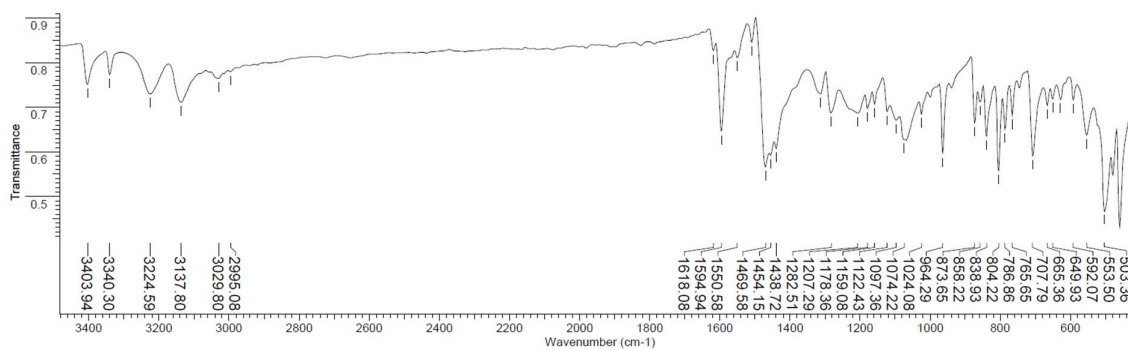


Figura A156. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CT5.

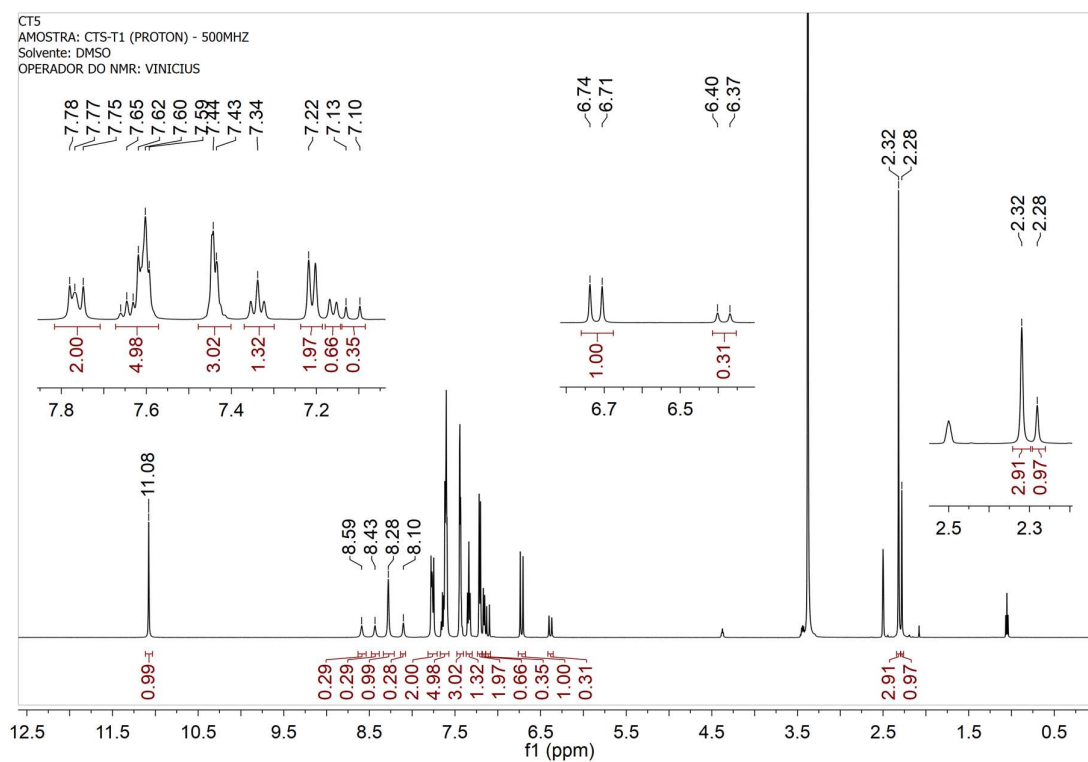


Figura A157. Espectro de RMN de ^1H de CT5.

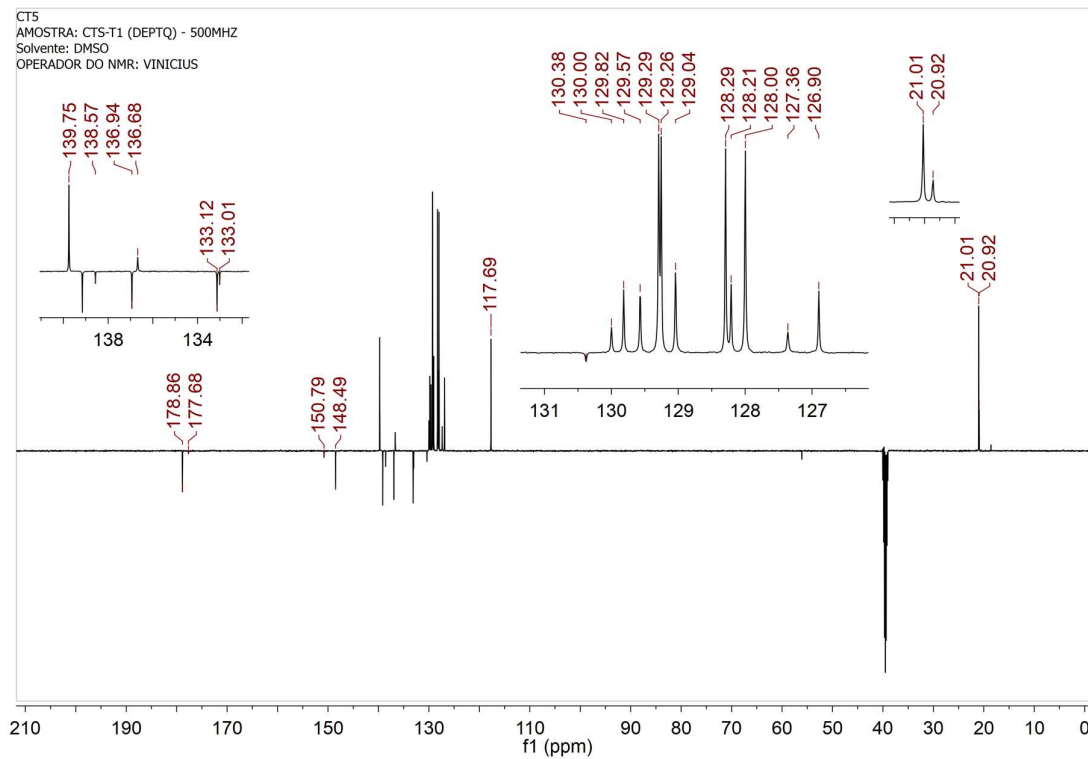


Figura A158. Espectro de RMN de ^1H de CT5.

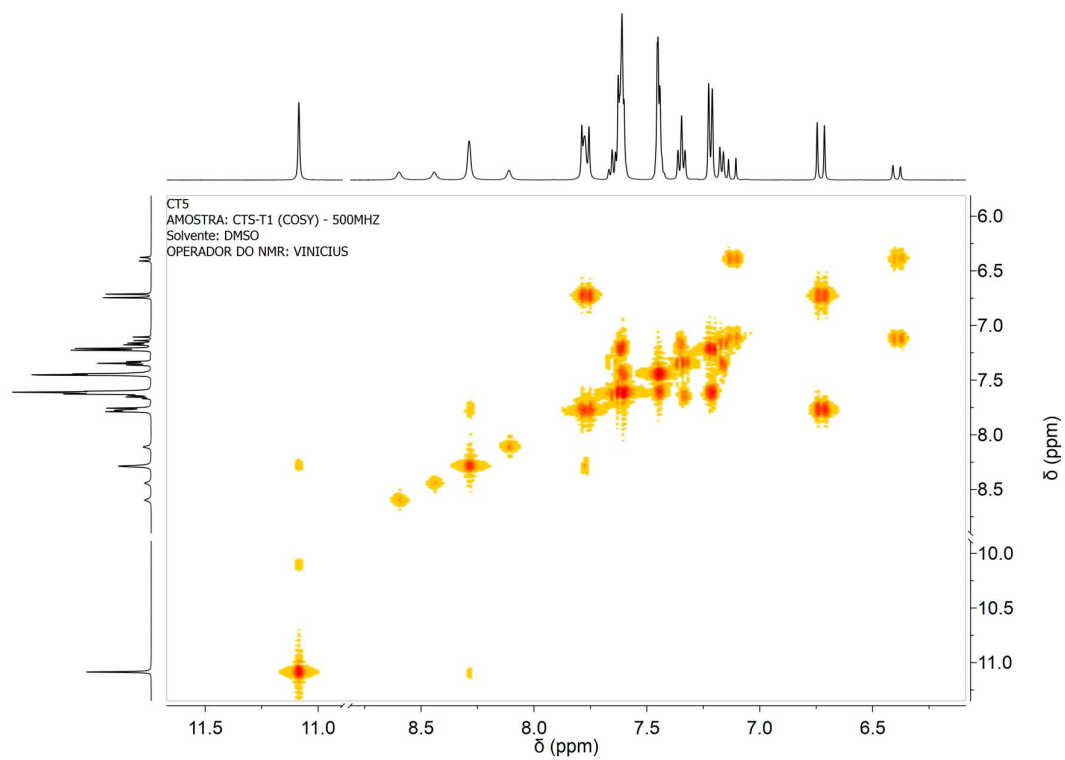


Figura A159. Espectro de COSY de CT5.

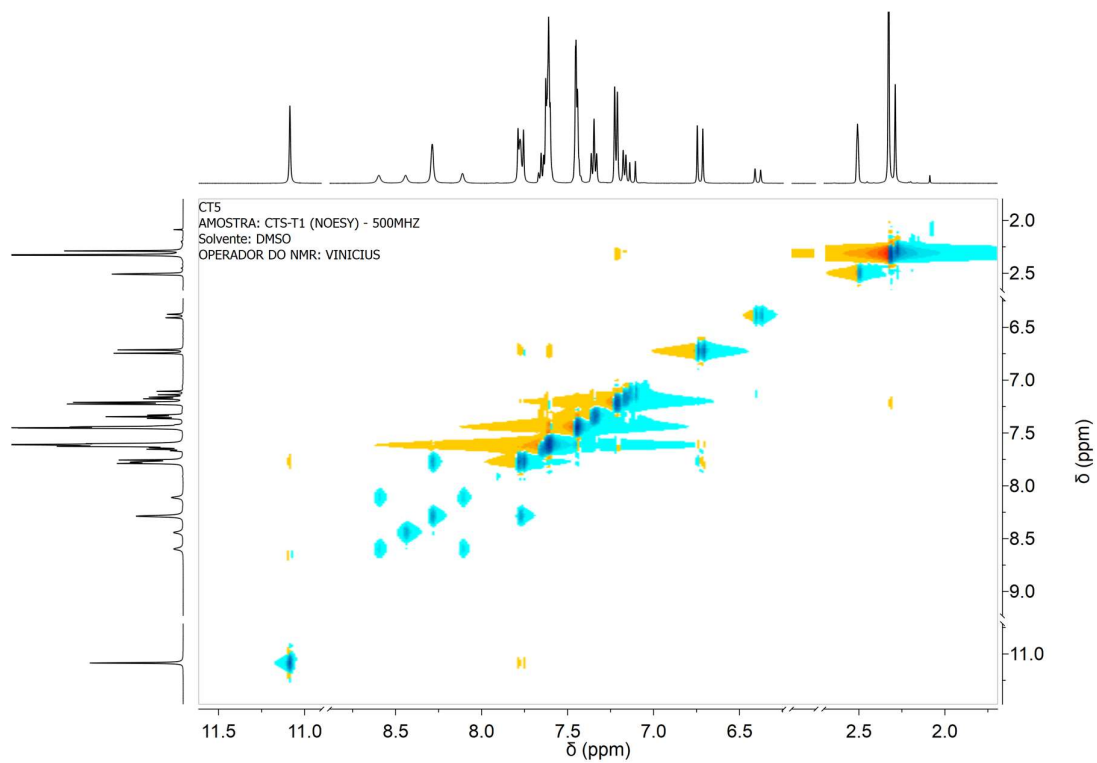


Figura A160. Espectro de NOESY de CT5.

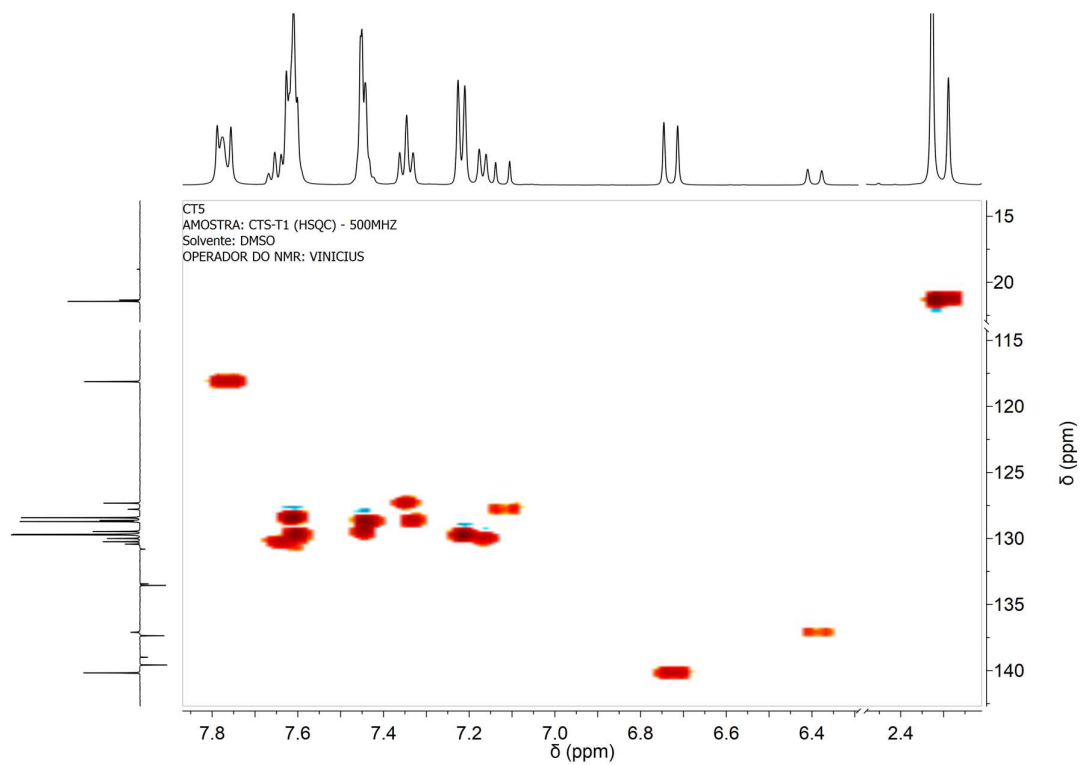


Figura A161. Espectro de HSQC de CT5.

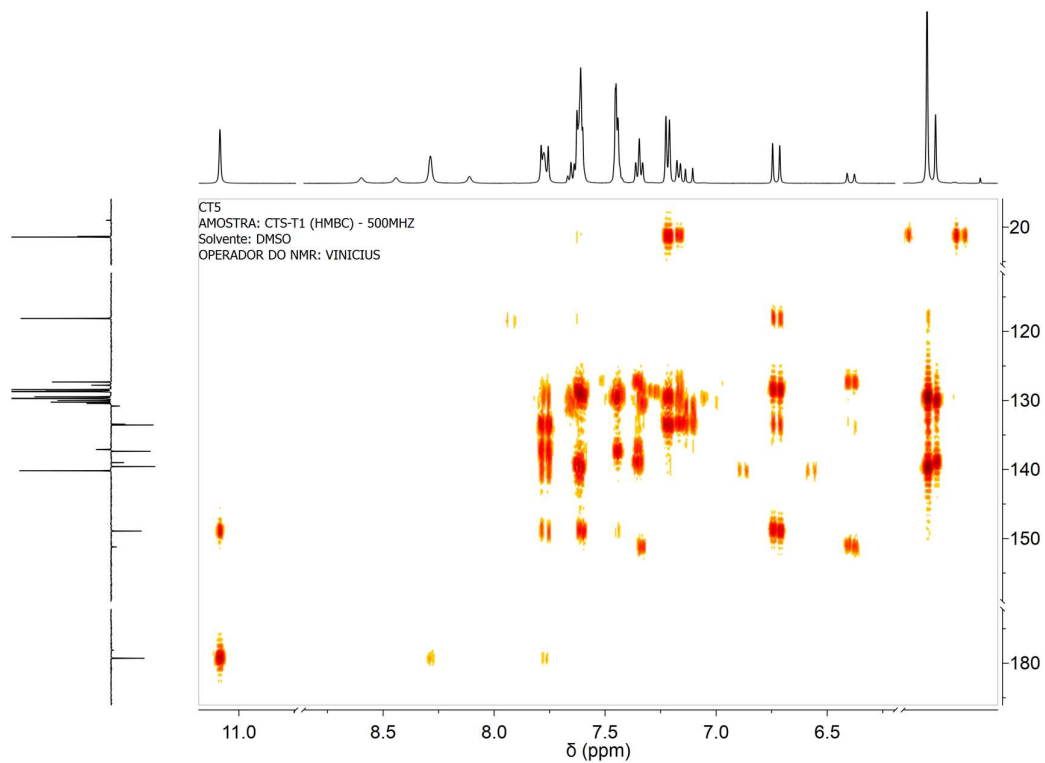


Figura A162. Espectro de HMBC de CT5.

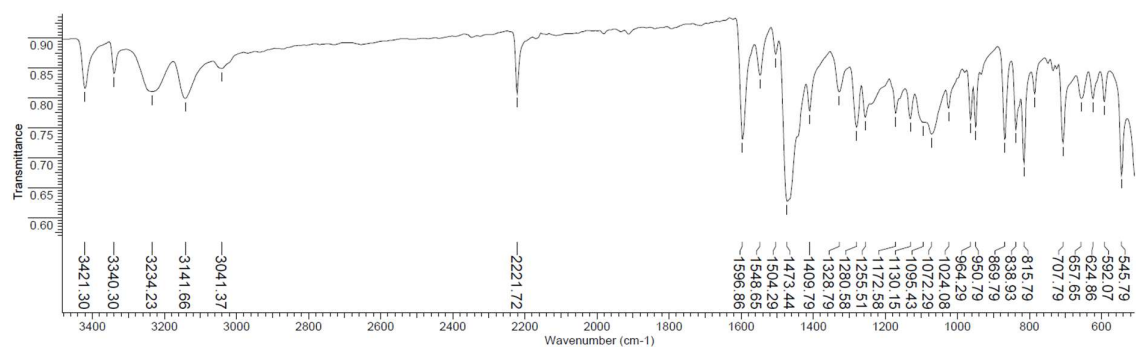


Figura A163. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CT6.

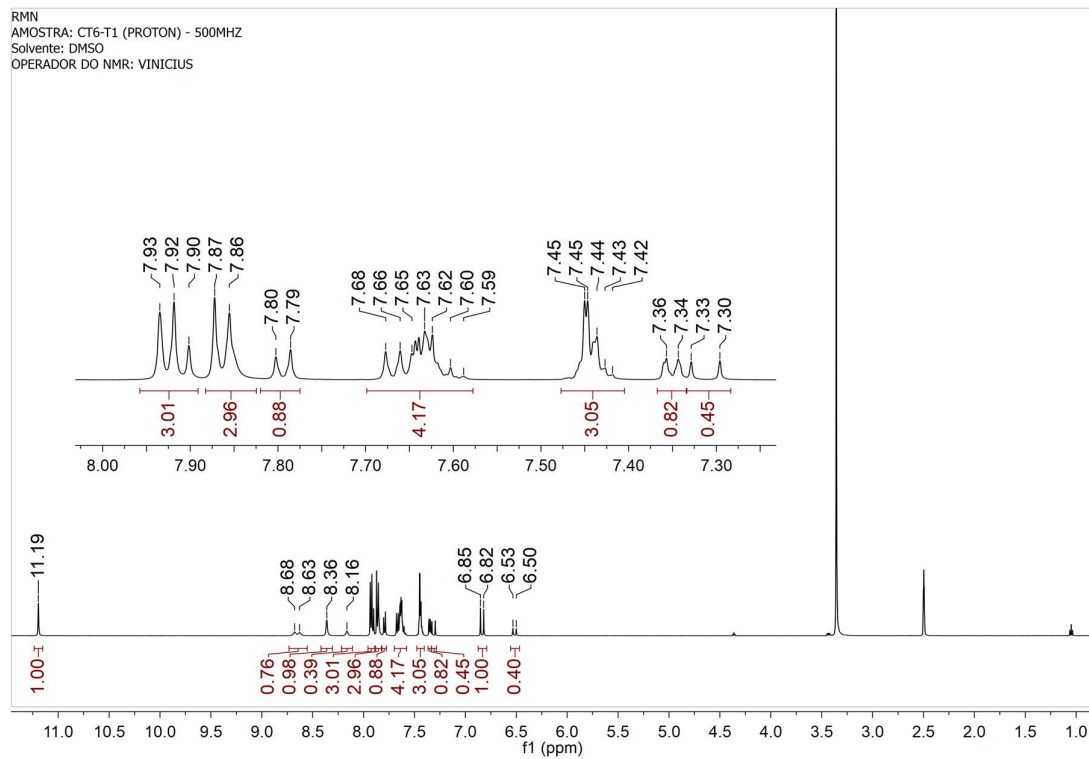


Figura A164. Espectro de RMN de ^1H de CT6.

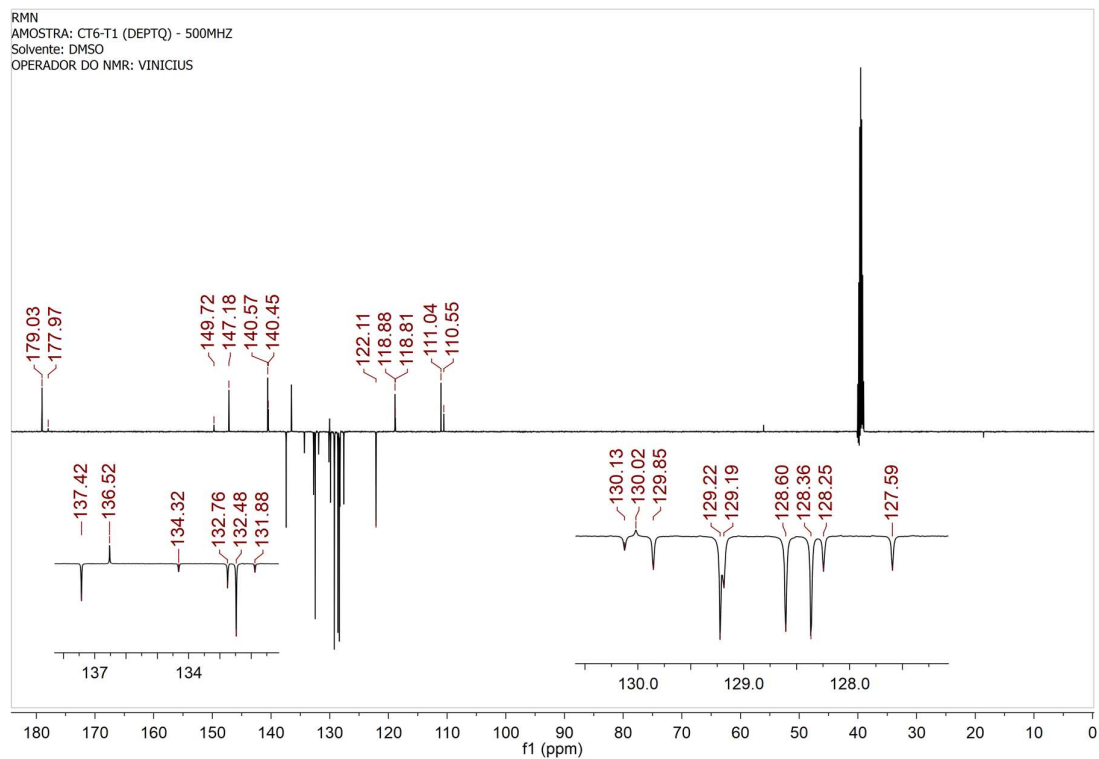


Figura A165. Espectro de RMN de ^{13}C de CT6.

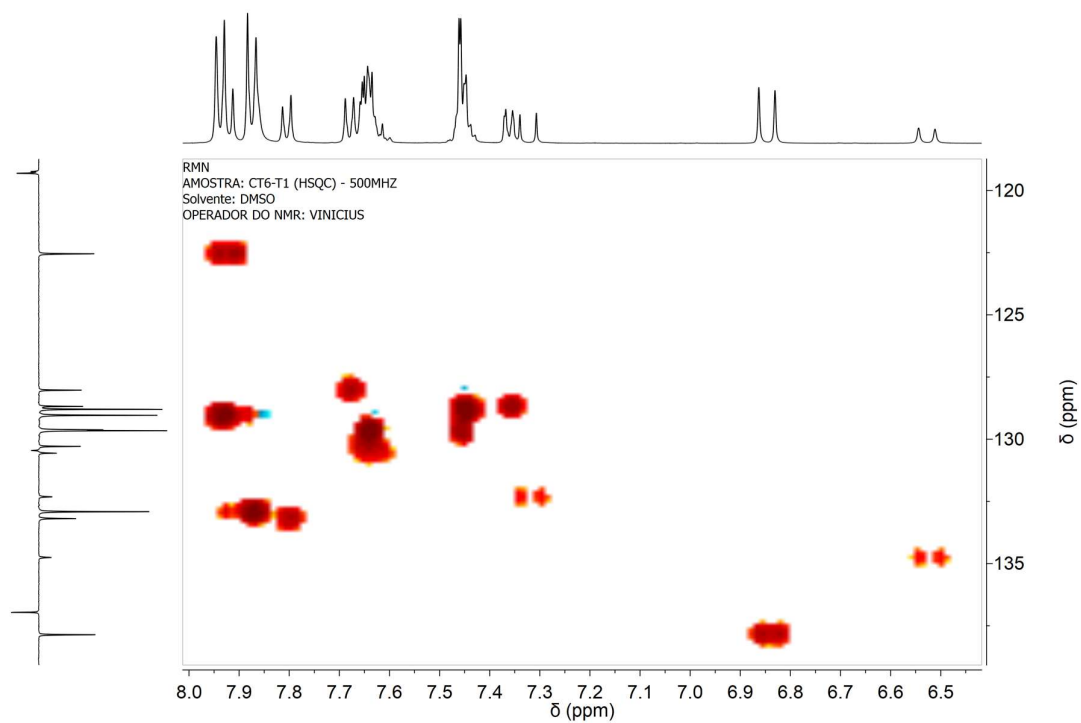


Figura A168. Espectro de HSQC de CT6.

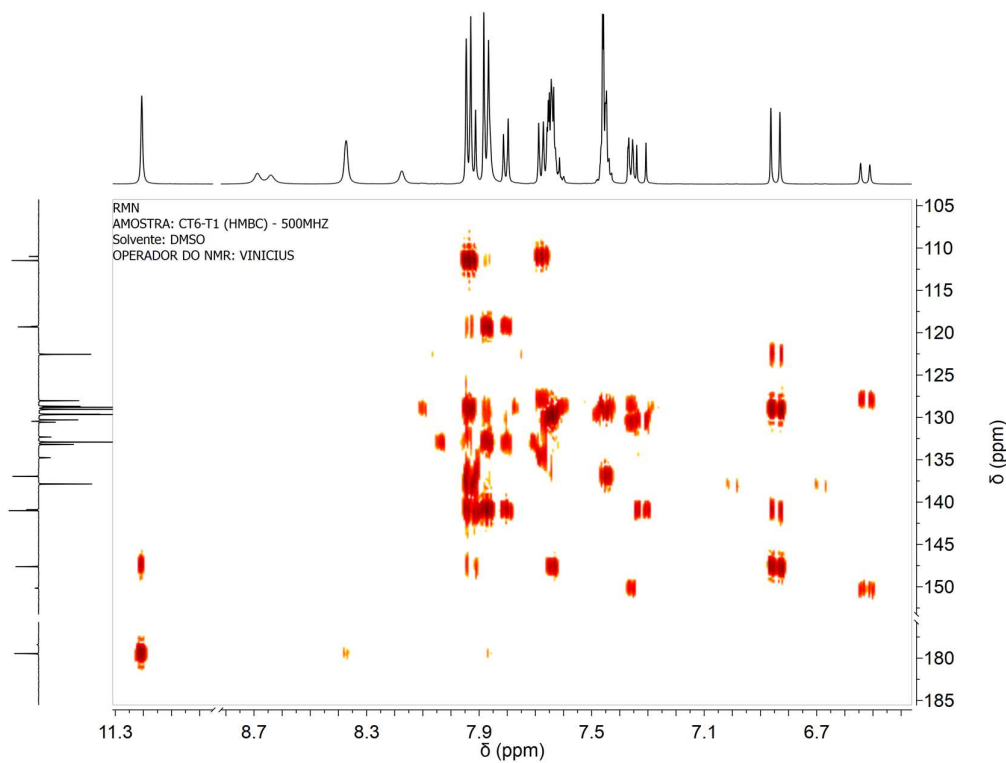


Figura A169. Espectro de HMBC de CT6.

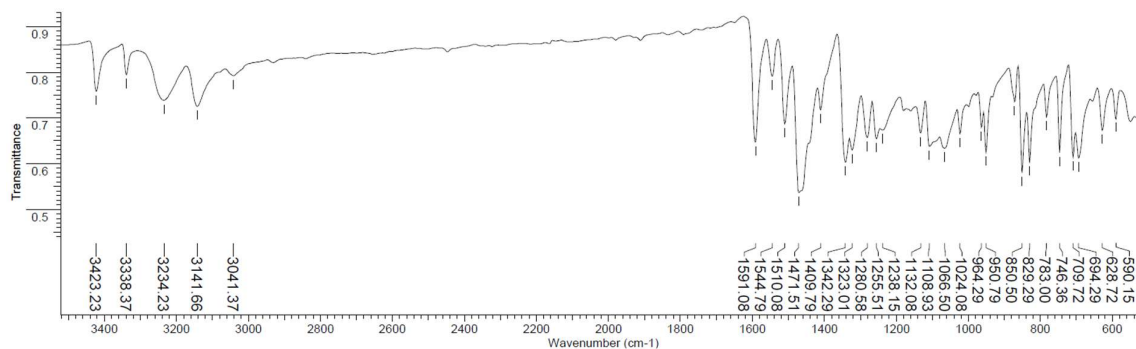


Figura A170. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CT7.

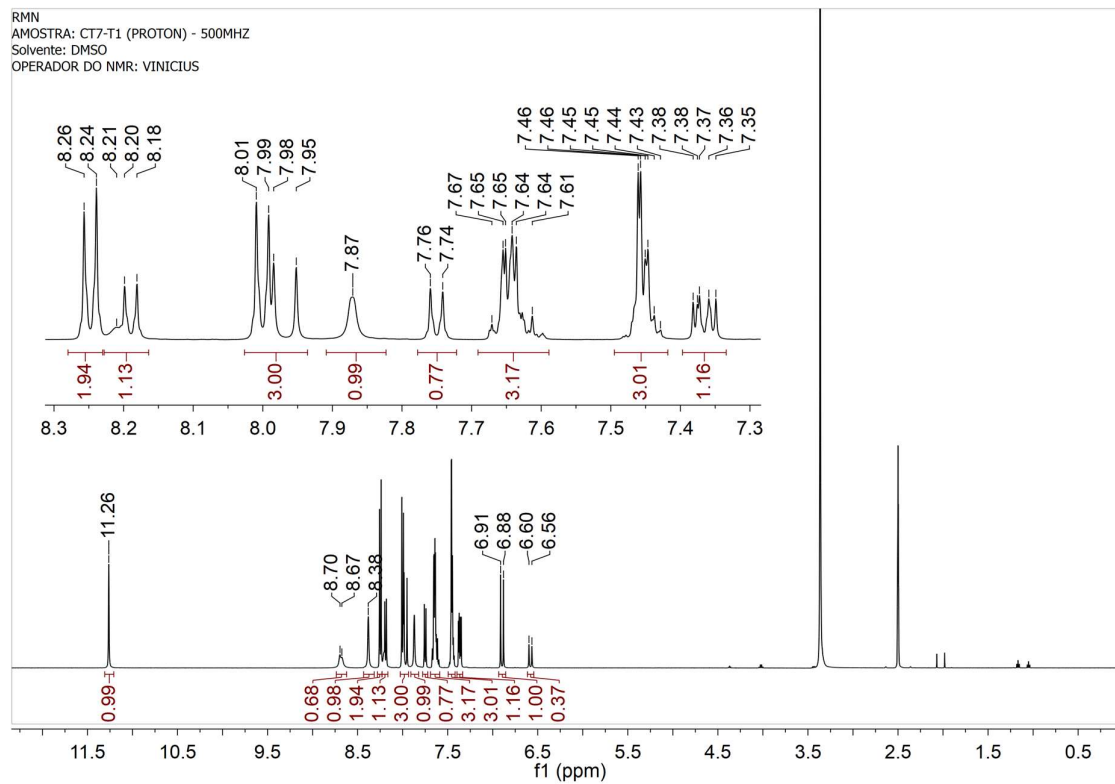


Figura A171. Espectro de RMN de ^1H de CT7.

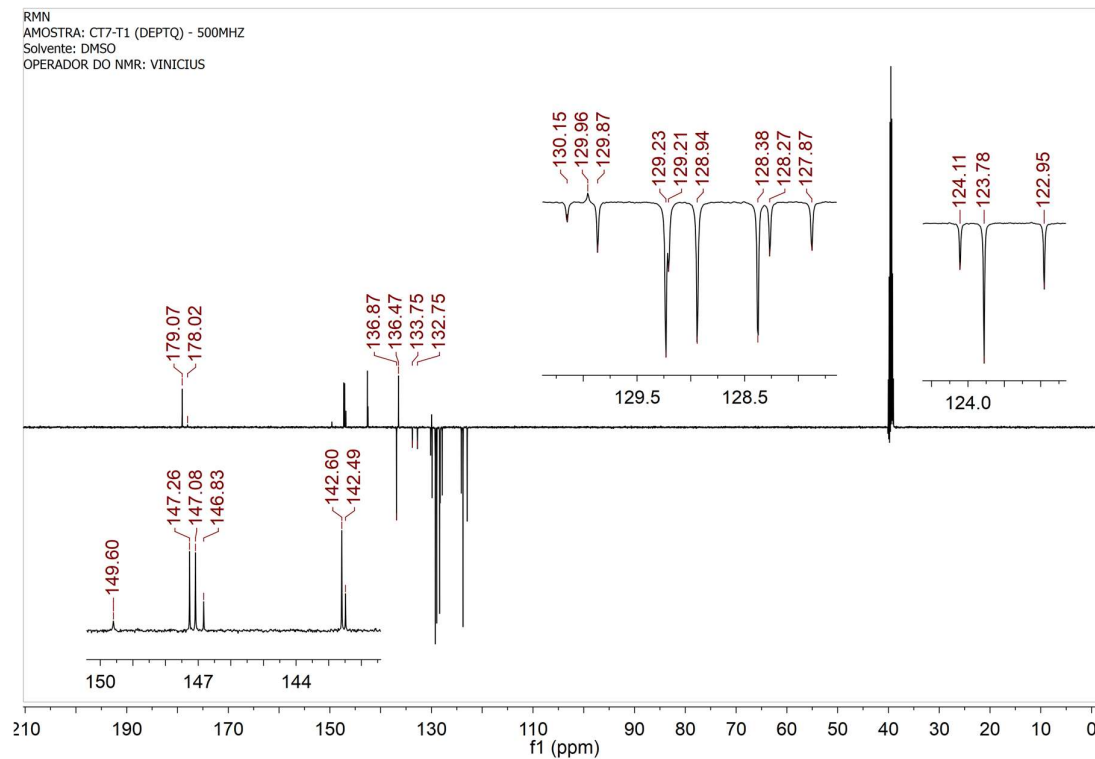


Figura A172. Espectro de RMN de ^{13}C de CT7.

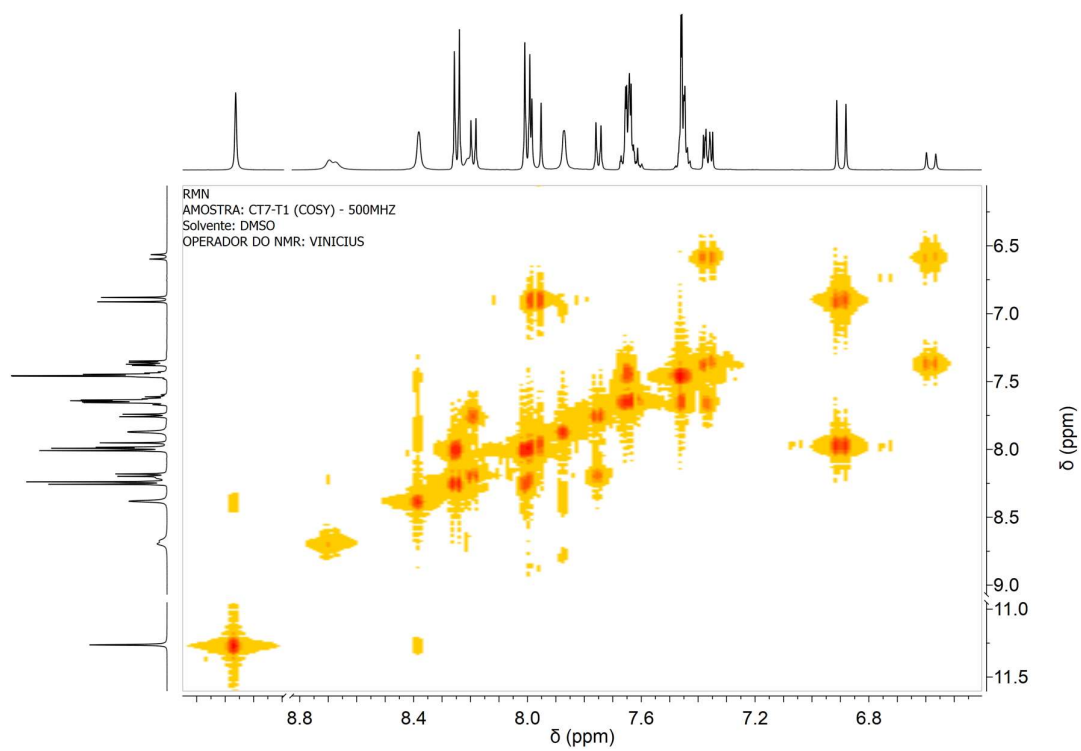


Figura A173. Espectro de COSY de CT7.

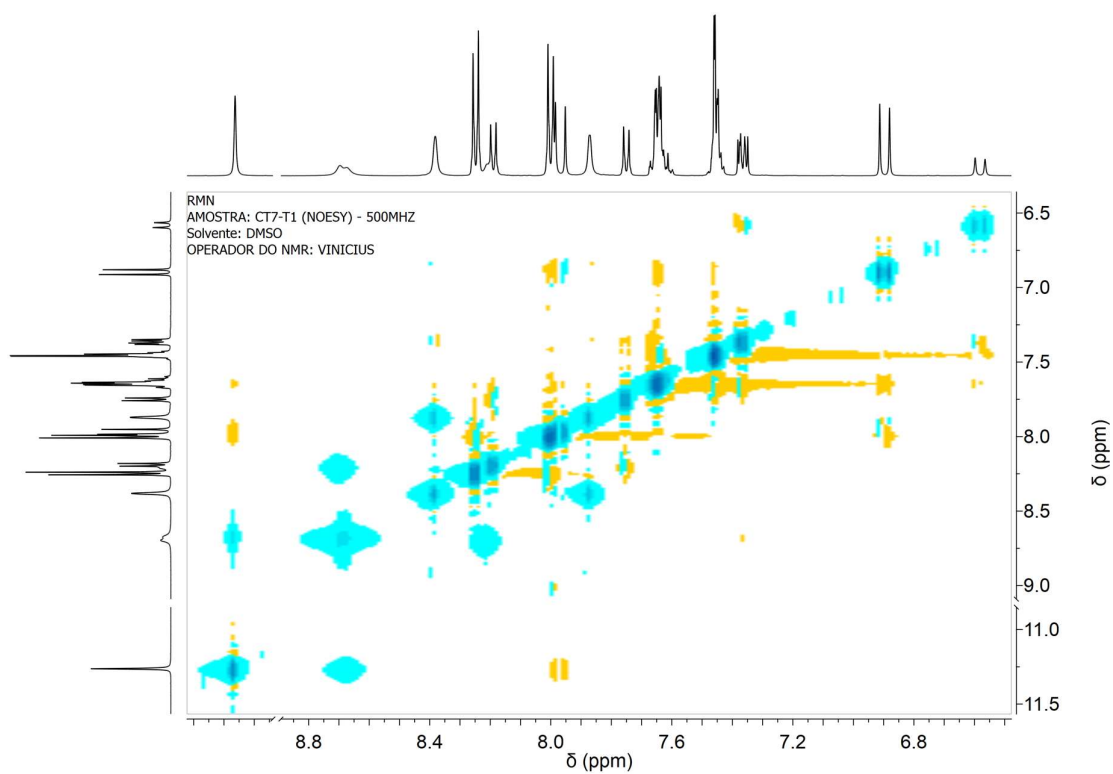


Figura A174. Espectro de NOESY de CT7.

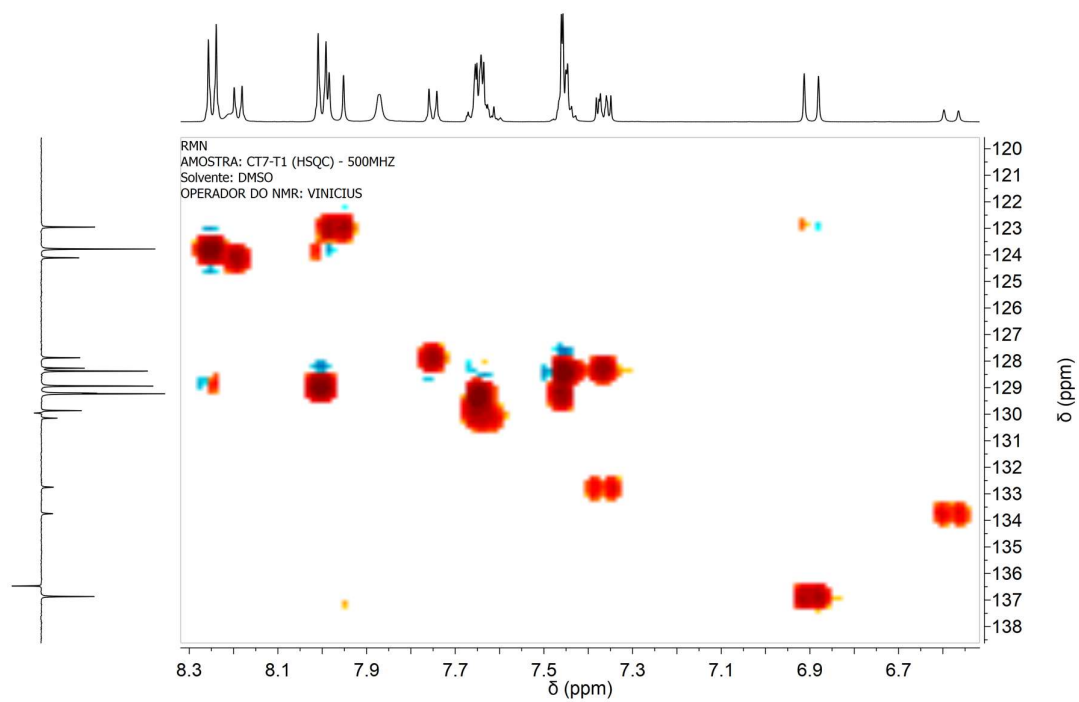


Figura A175. Espectro de HSQC de CT7.

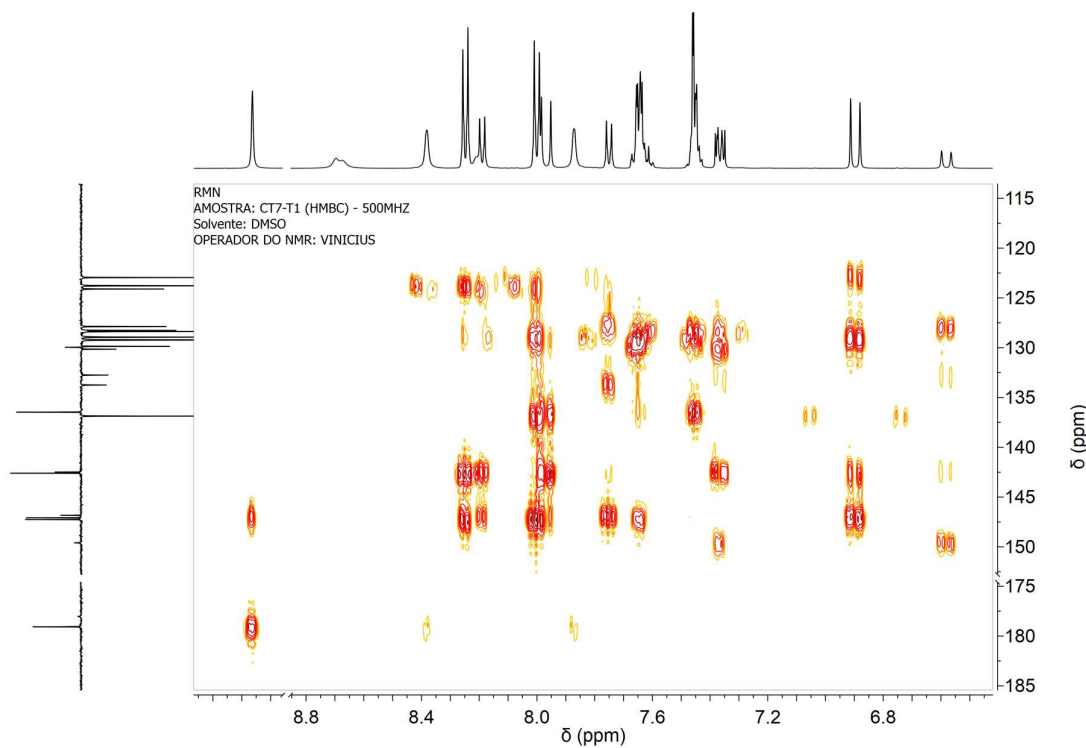


Figura A176. Espectro de HMBC de CT7.

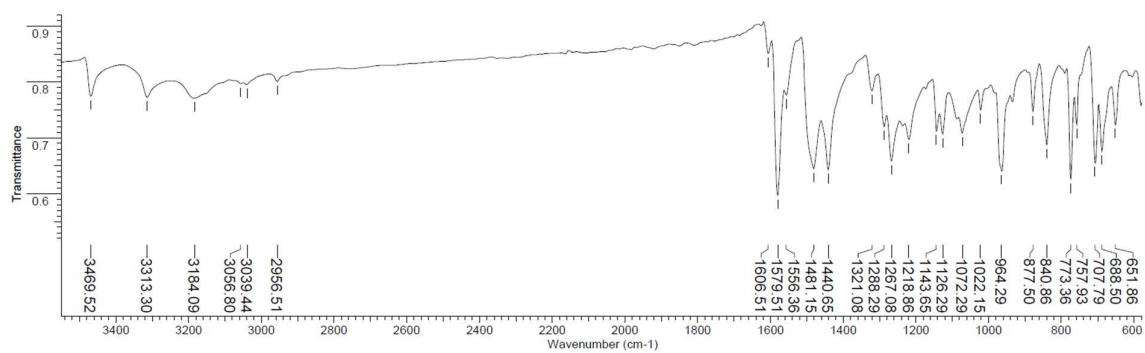


Figura A177. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CT8.

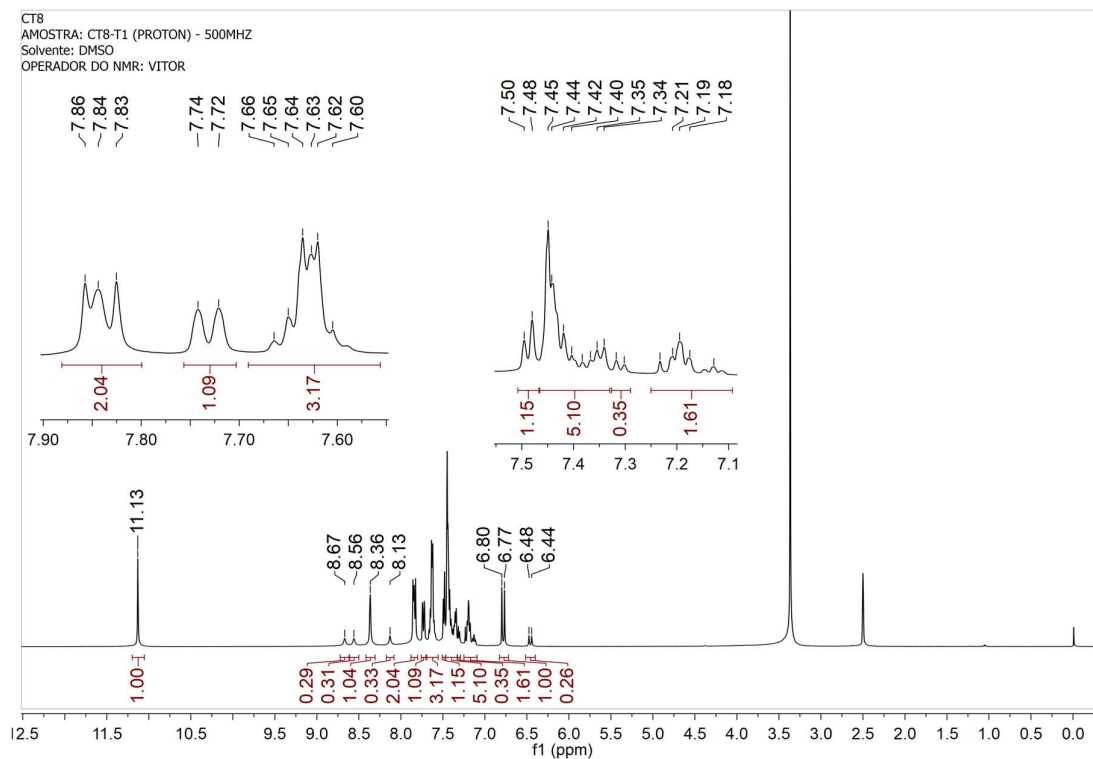


Figura A178. Espectro de RMN de ^1H de CT8.

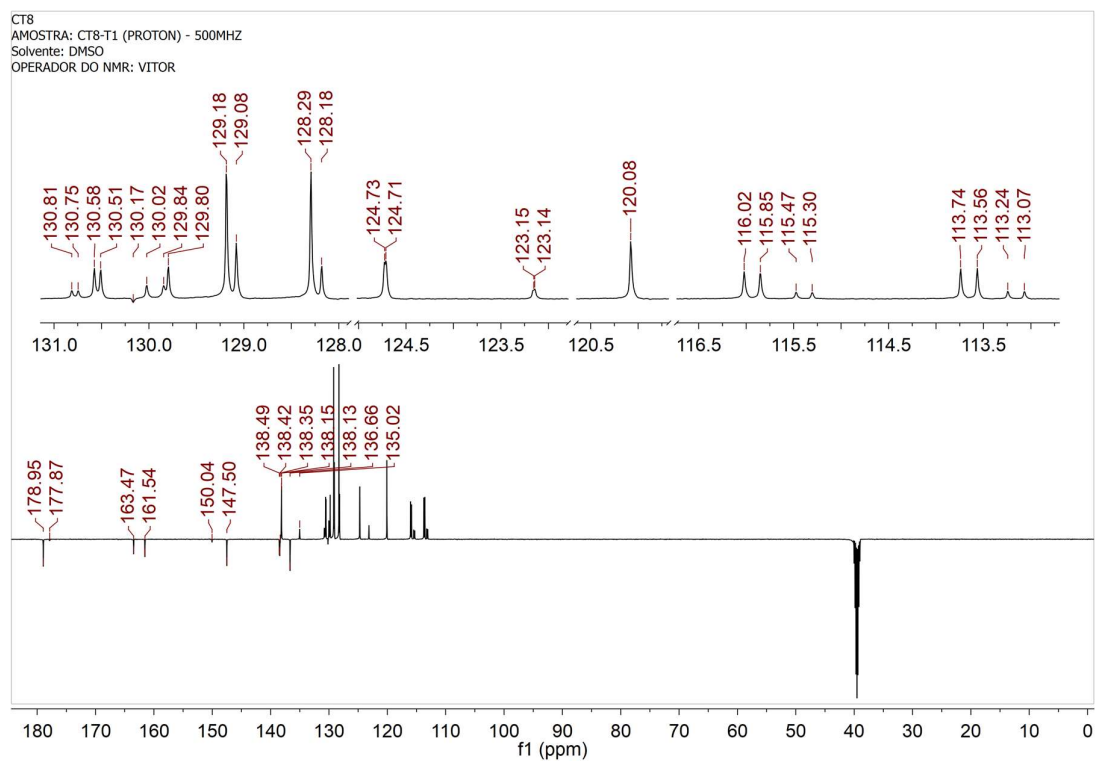


Figura A179. Espectro de RMN de ^{13}C de CT8.

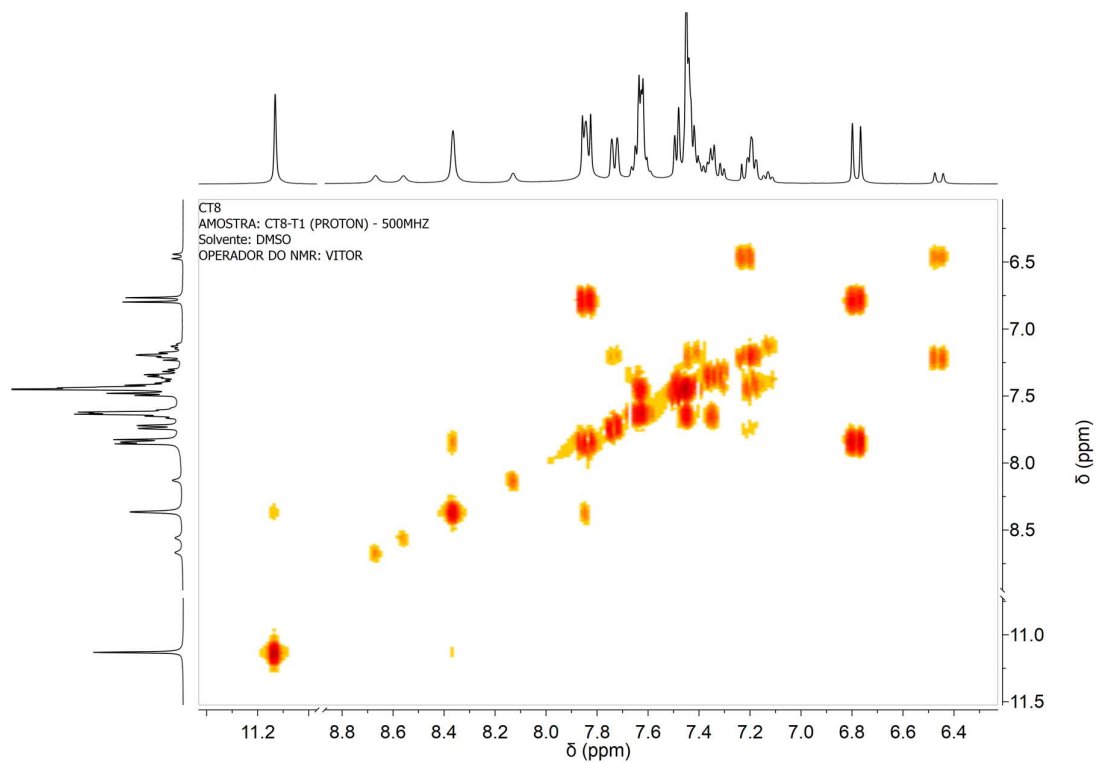


Figura A180. Espectro de COSY de CT8.

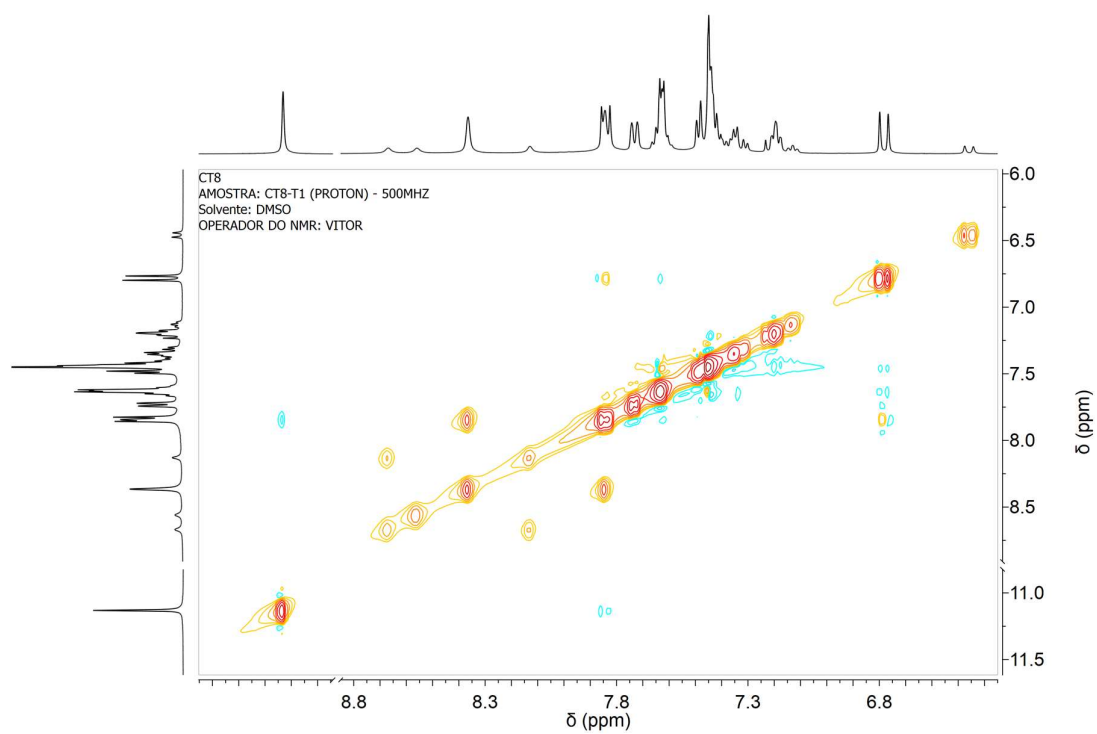


Figura A181. Espectro de NOESY de CT8.

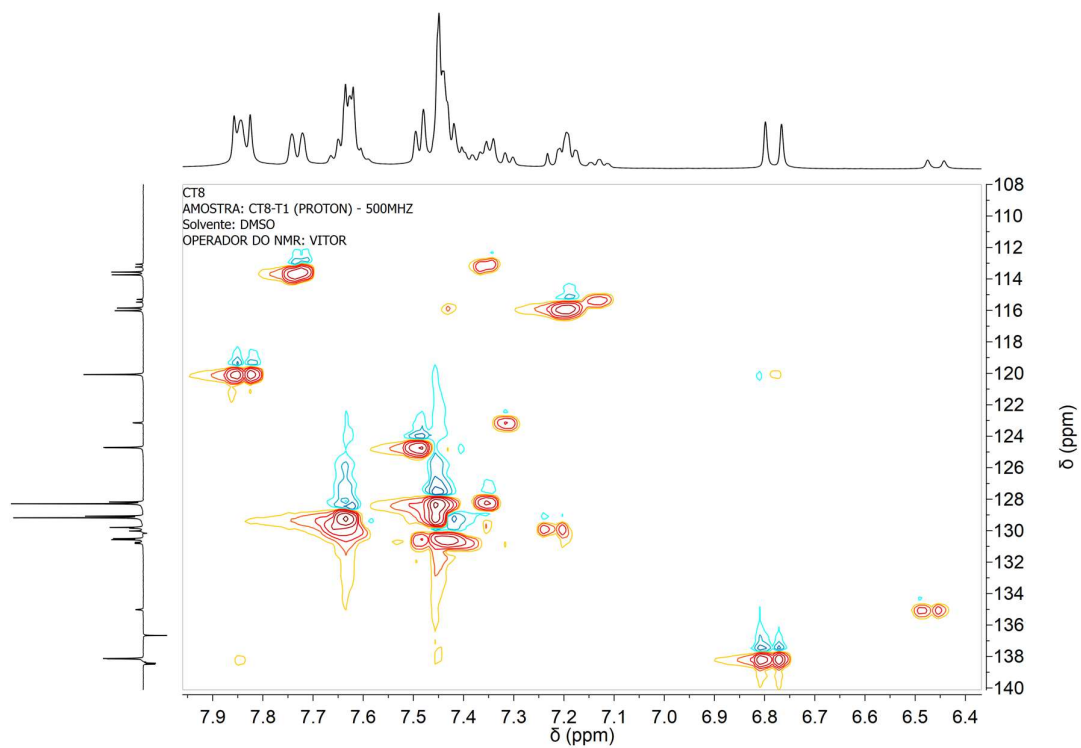


Figura A182. Espectro de HSQC de CT8.

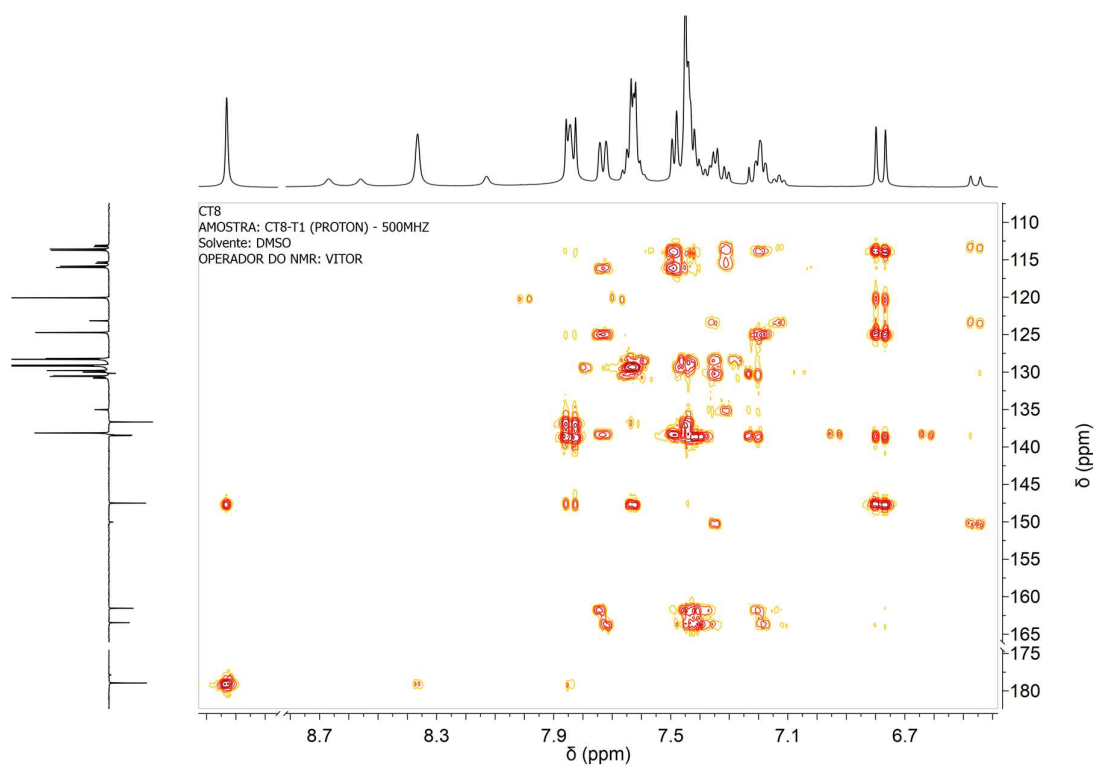


Figura A183. Espectro de HMBC de CT8.

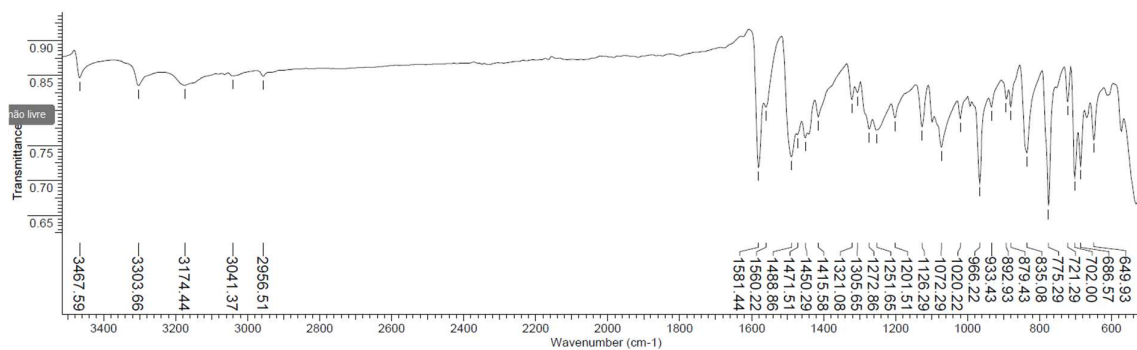


Figura A184. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CT9.

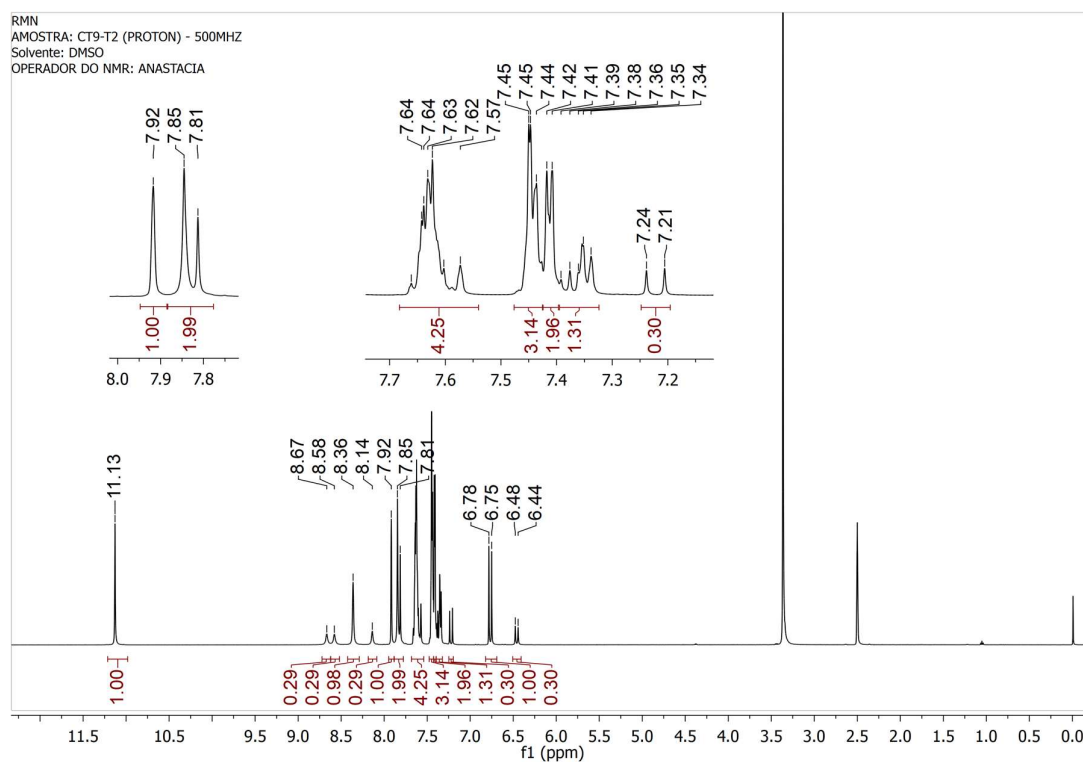


Figura A185. Espectro de RMN de ^1H de CT9.

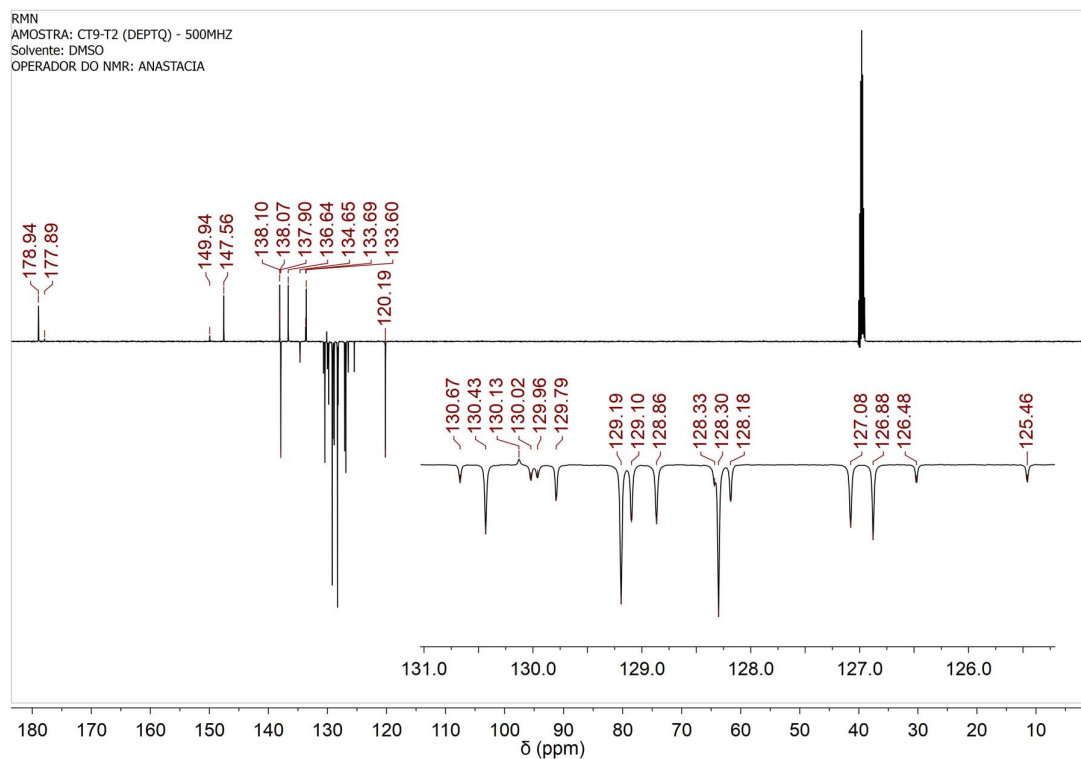


Figura A186. Espectro de RMN de ^{13}C de CT9.

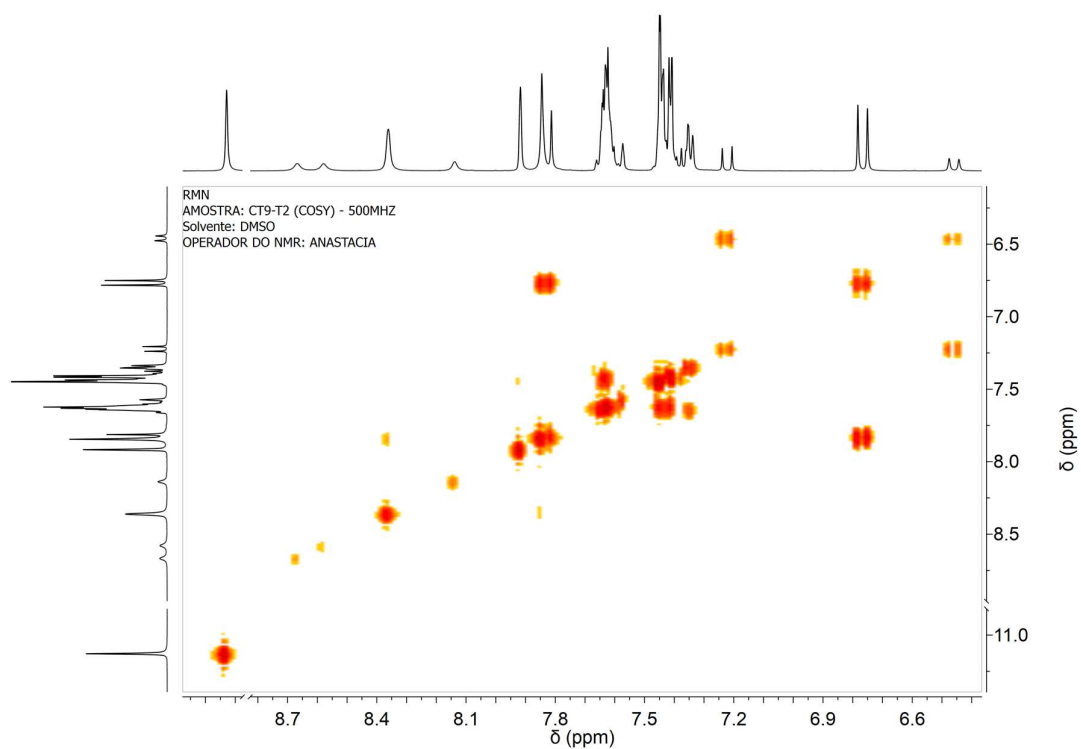


Figura A186. Espectro de COSY de CT9.

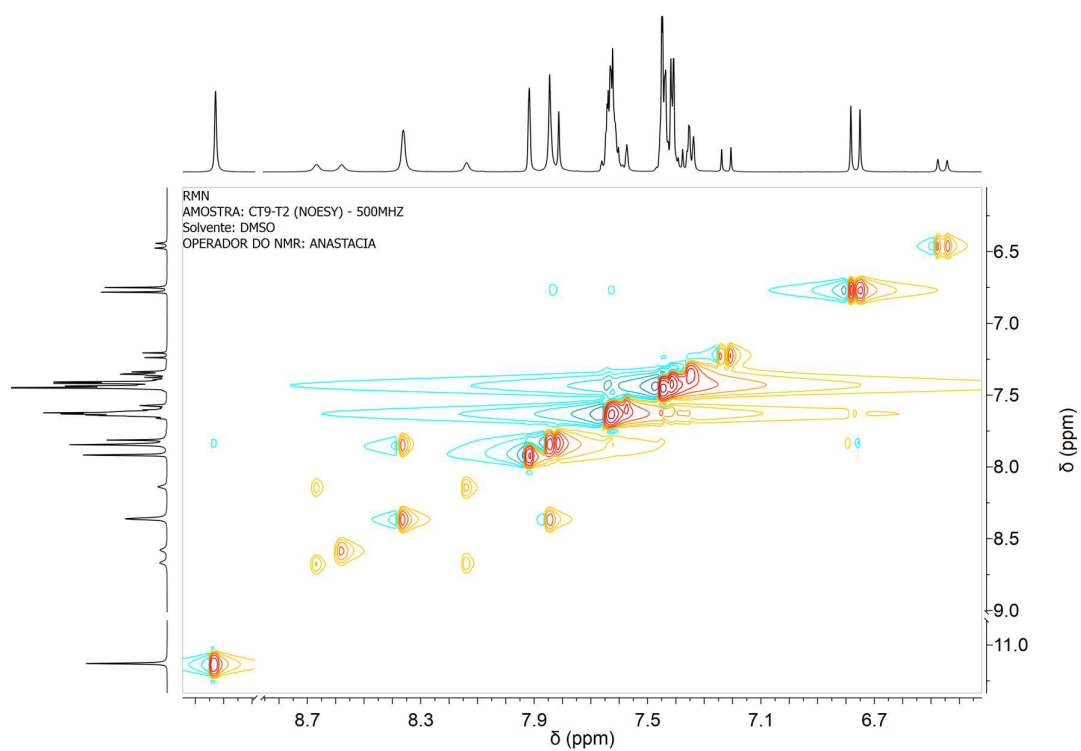


Figura A188. Espectro de NOESY de CT9.

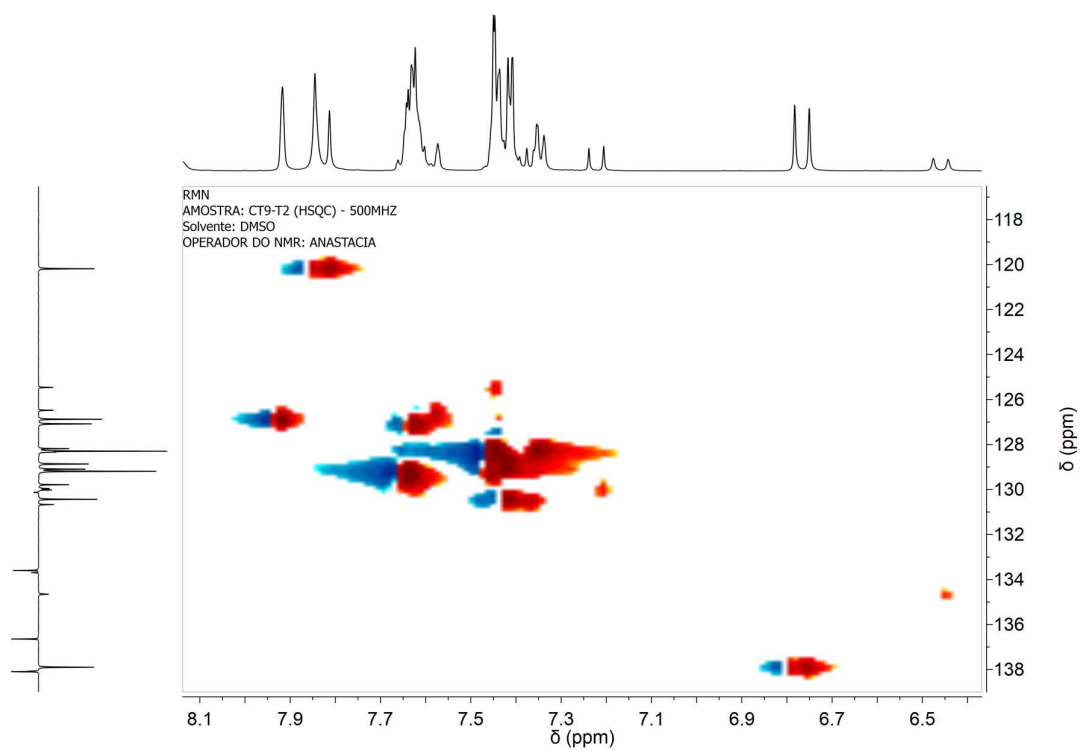


Figura A189. Espectro de HSQC de CT9.

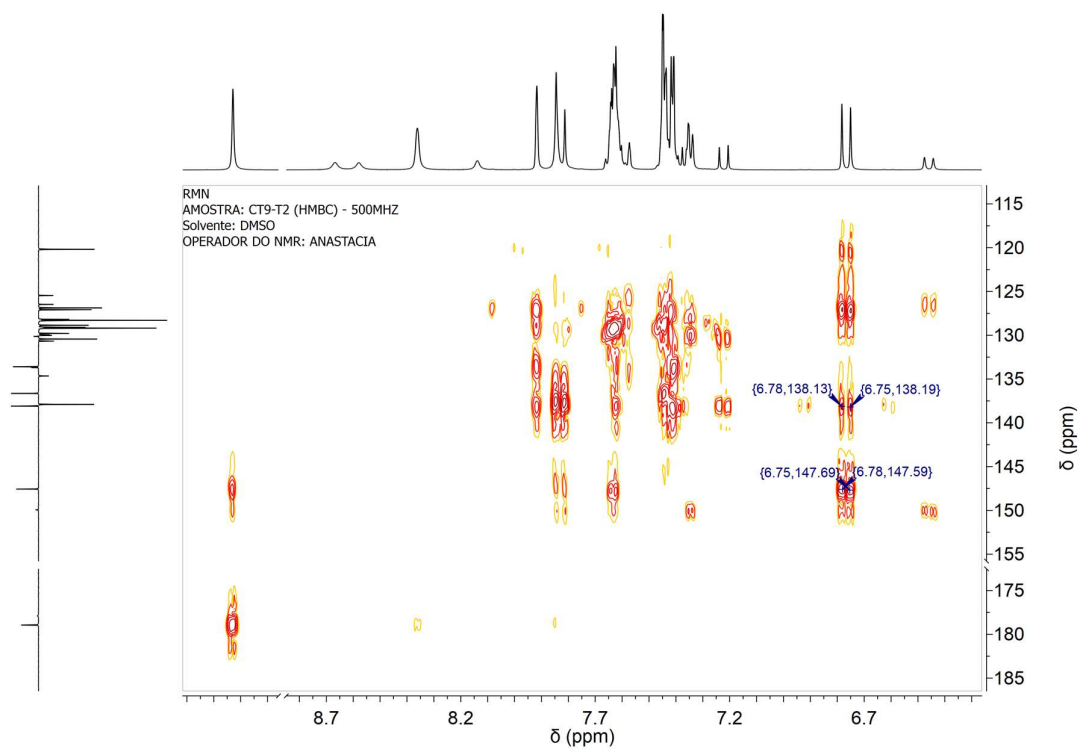


Figura A190. Espectro de HMBC de CT9.

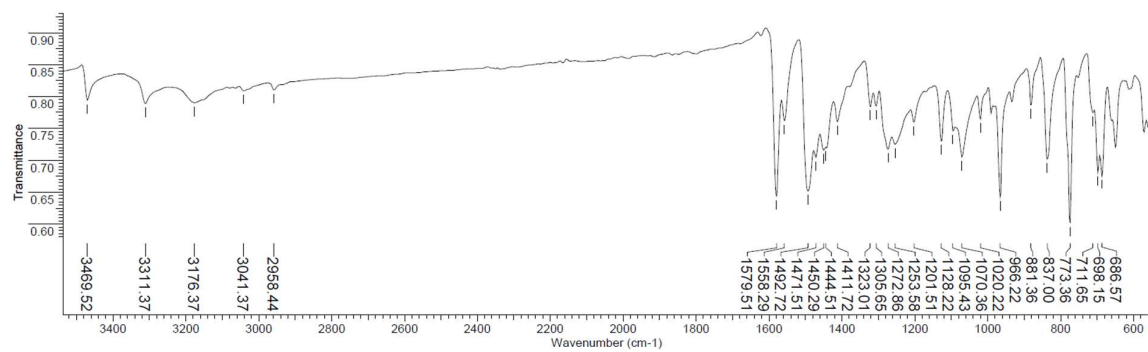


Figura A191. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CT10.

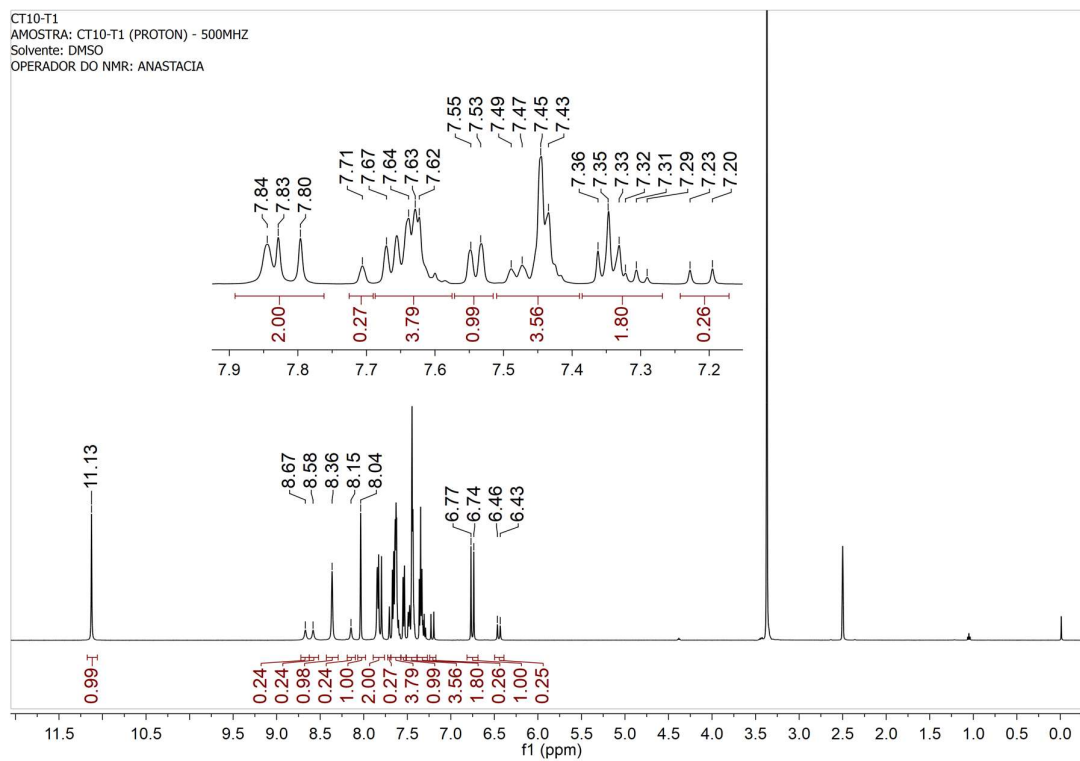


Figura A192. Espectro de RMN de ^1H de CT10.

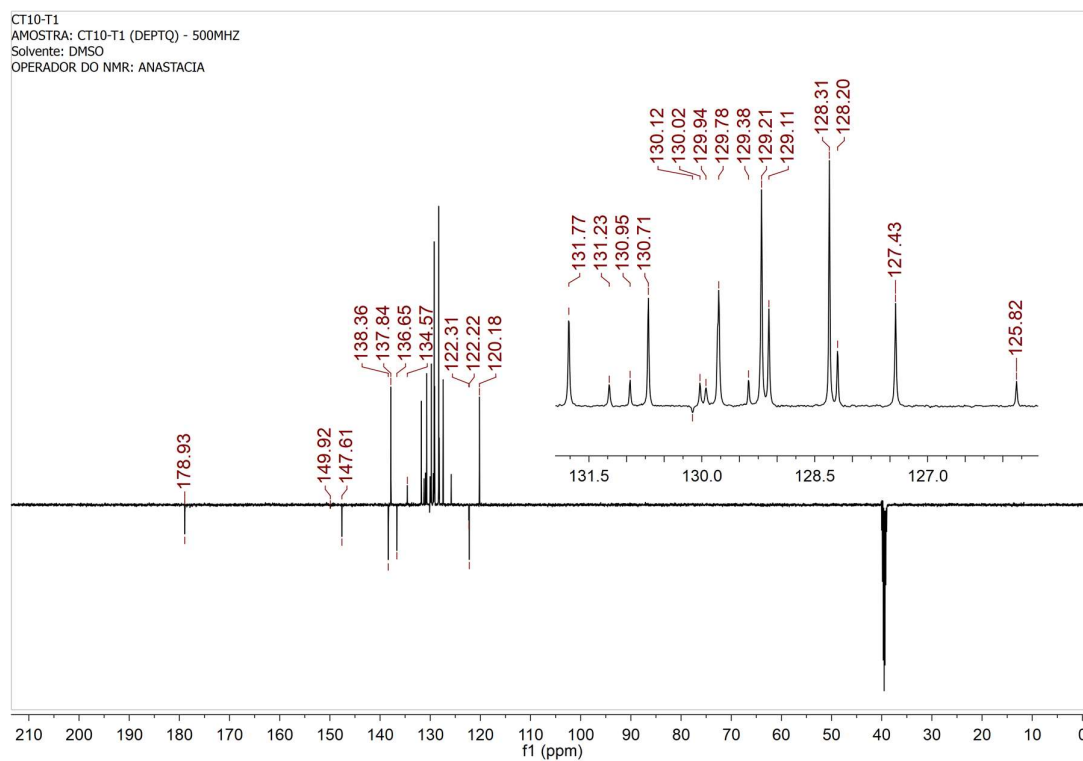


Figura A193. Espectro de RMN de ^{13}C de CT10.

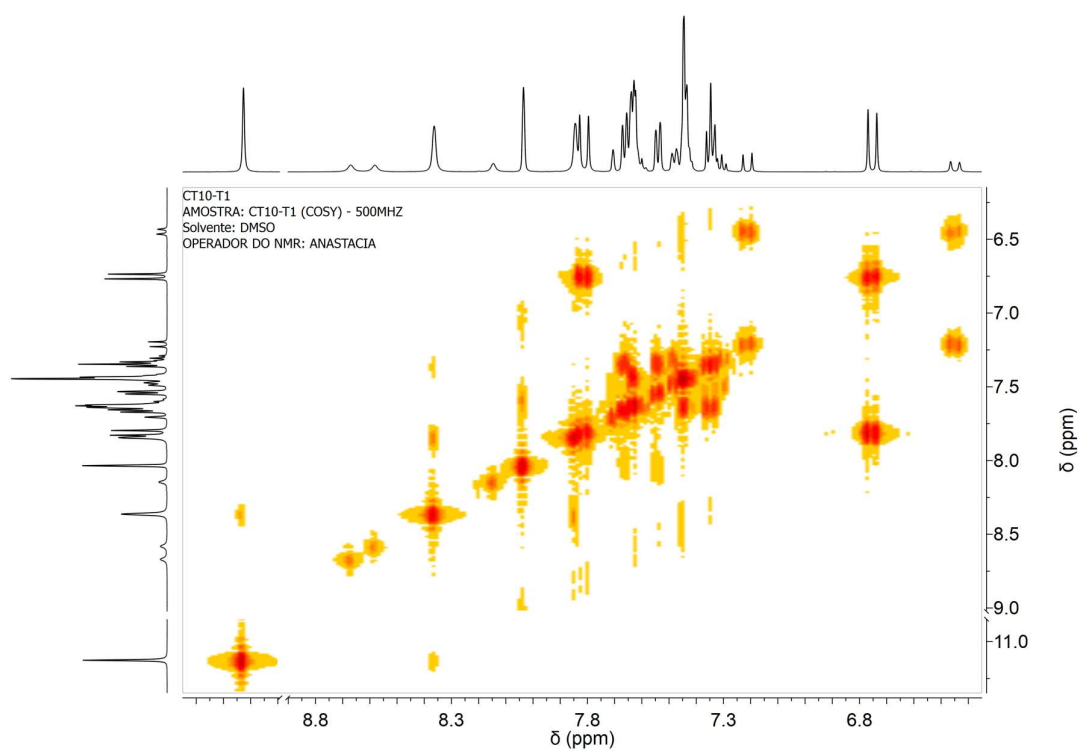


Figura A194. Espectro de COSY de CT10.

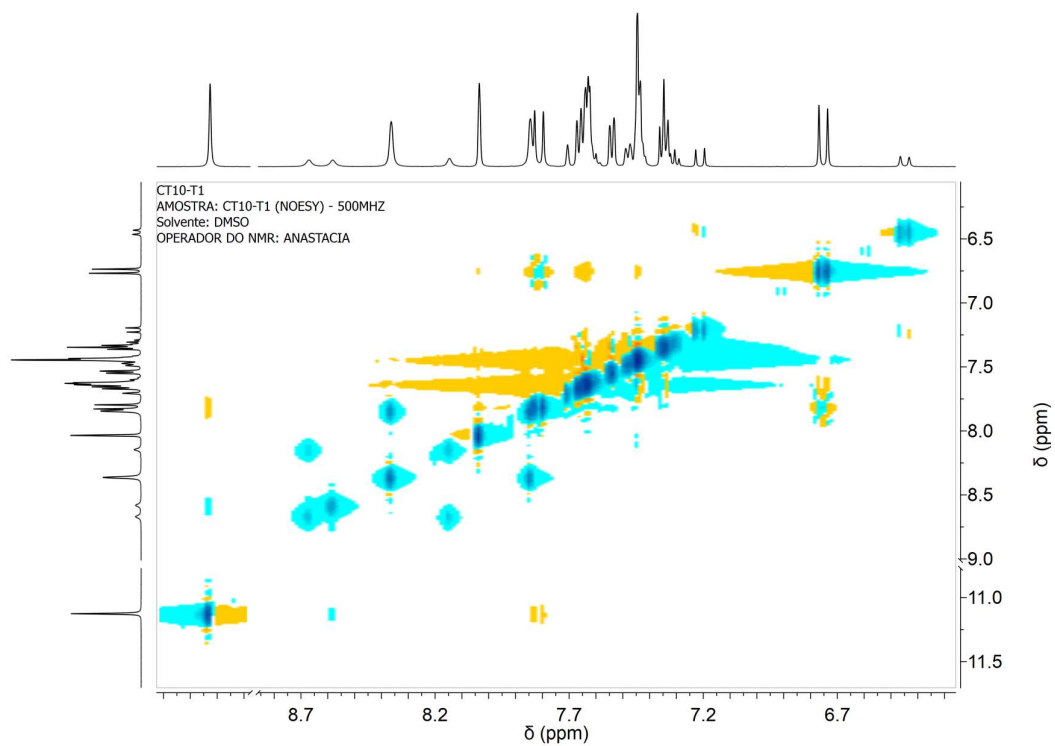


Figura A195. Espectro de NOESY de CT10.

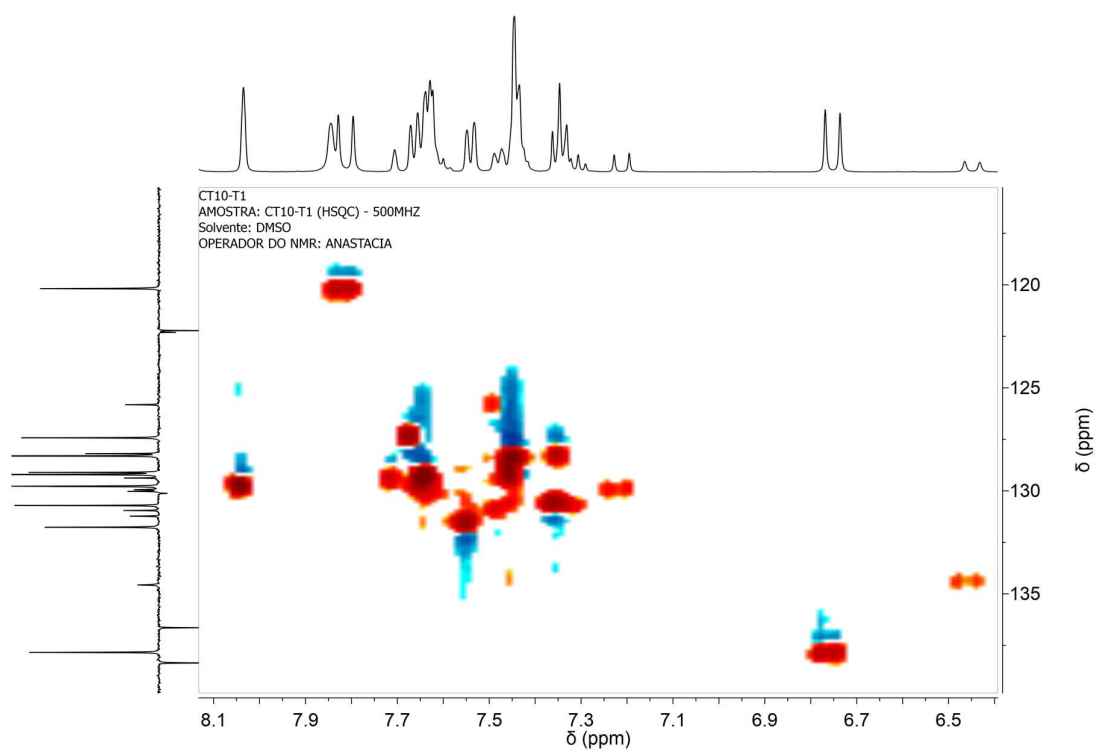


Figura A196. Espectro de HSQC de CT10.

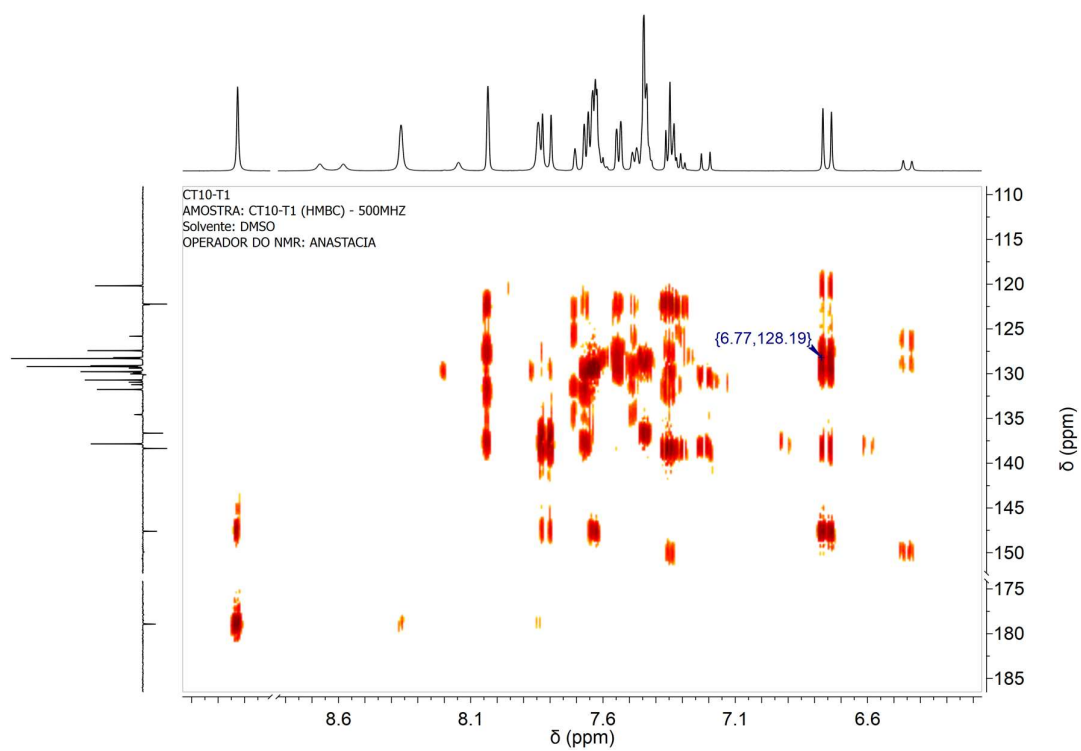
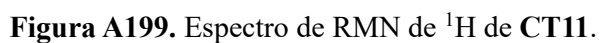
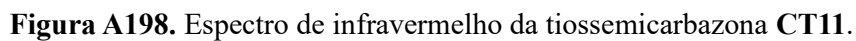


Figura A197. Espectro de HMBC de CT10.



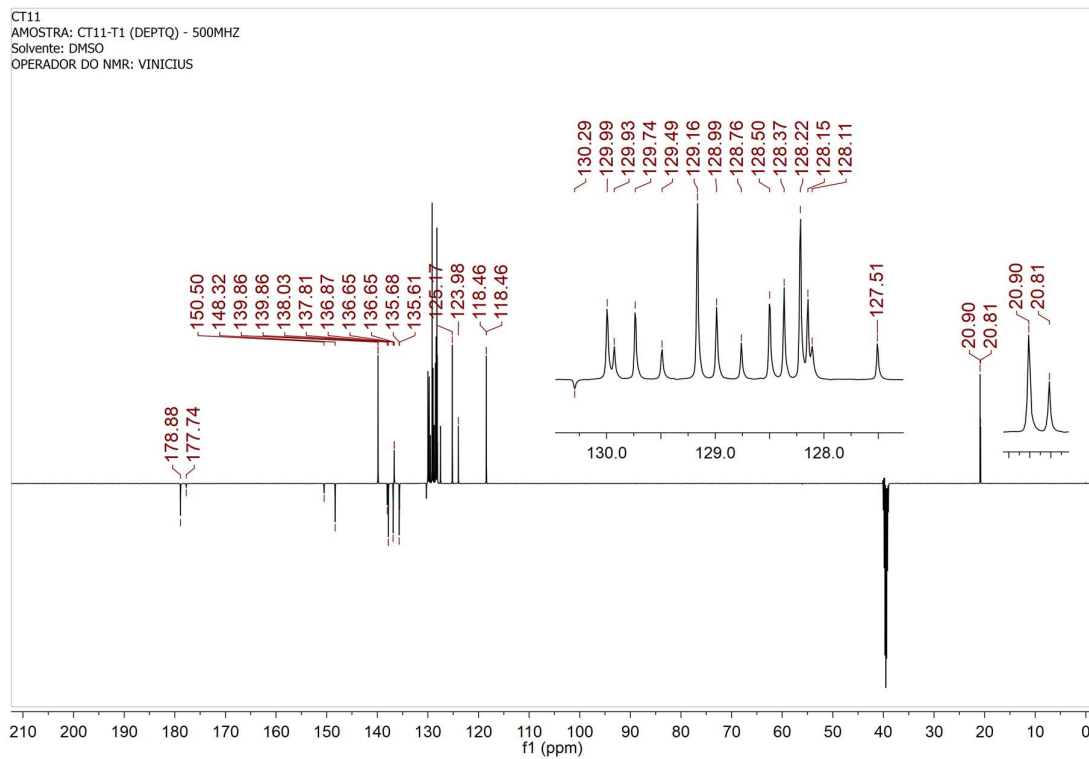


Figura A200. Espectro de RMN de ^{13}C de CT11.

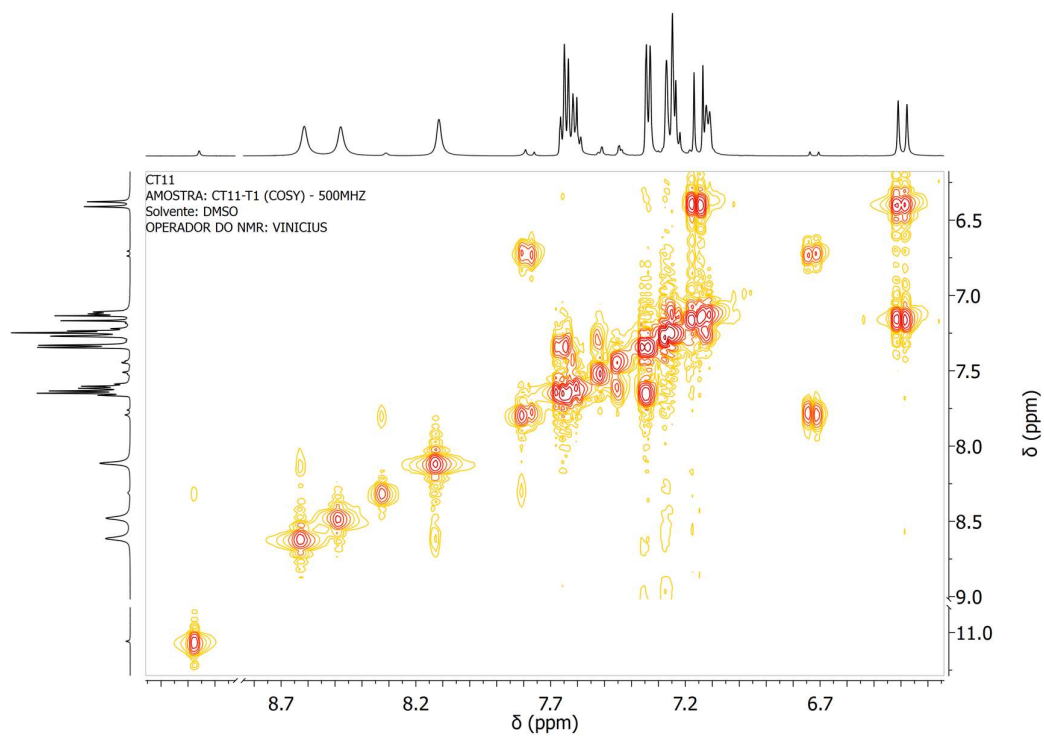


Figura A201. Espectro de COSY de CT11.

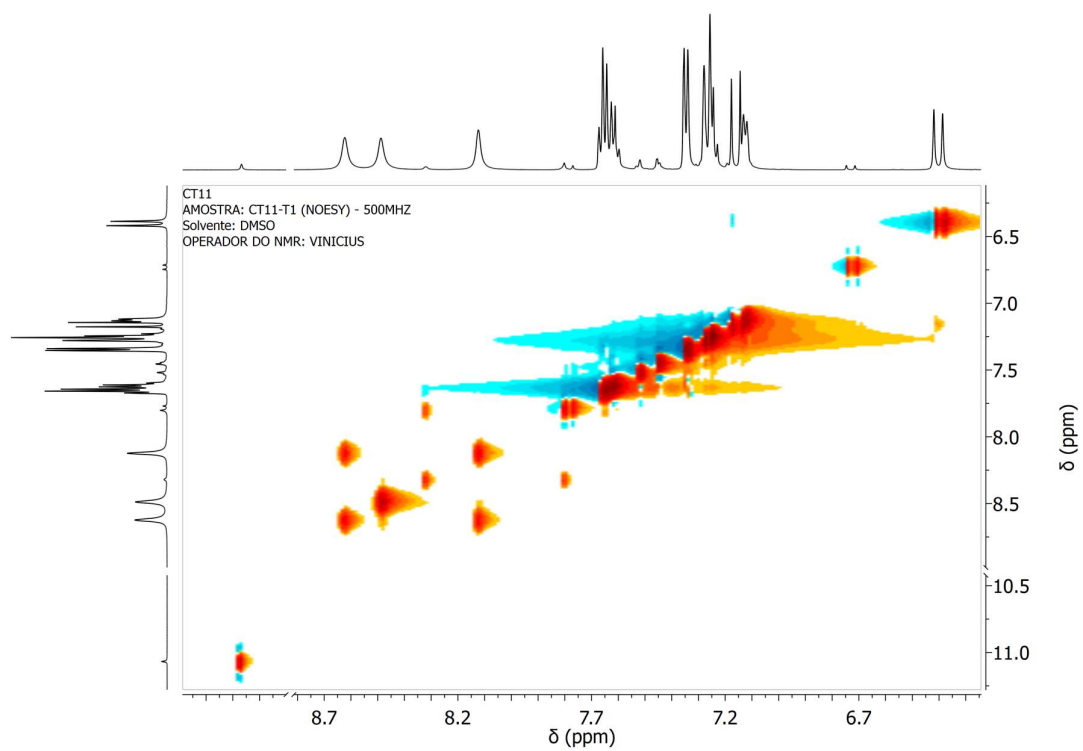


Figura A202. Espectro de NOESY de CT11.

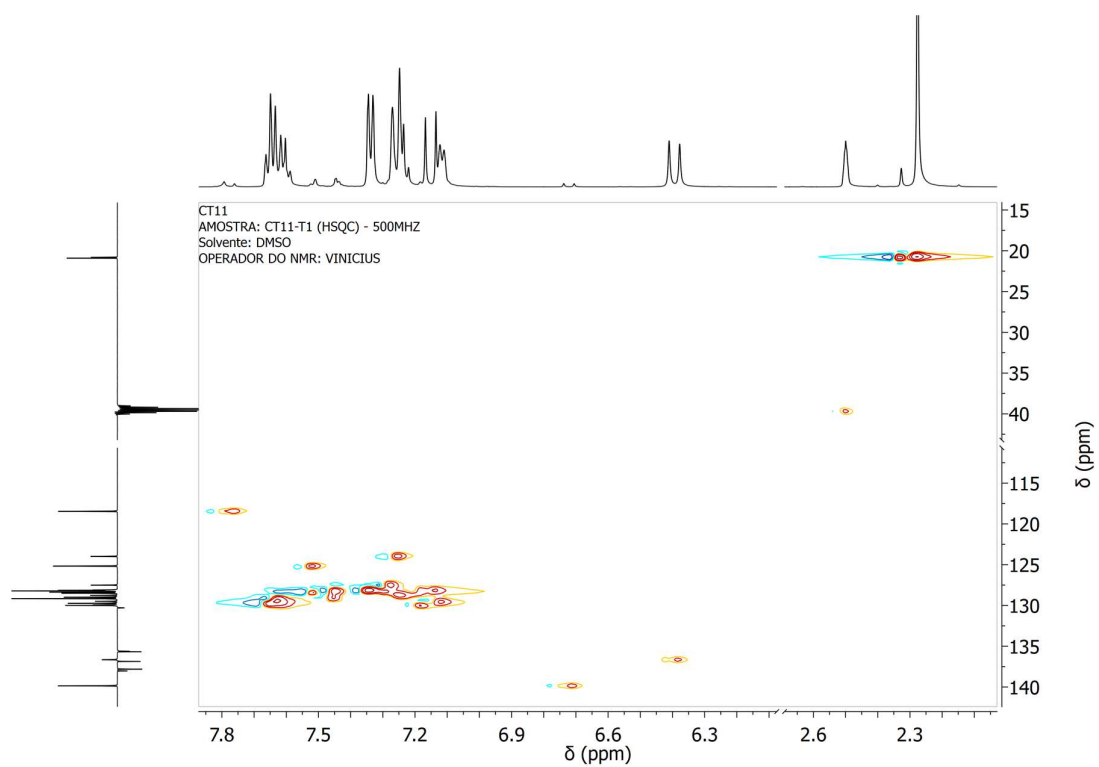


Figura A203. Espectro de HSQC de CT11.

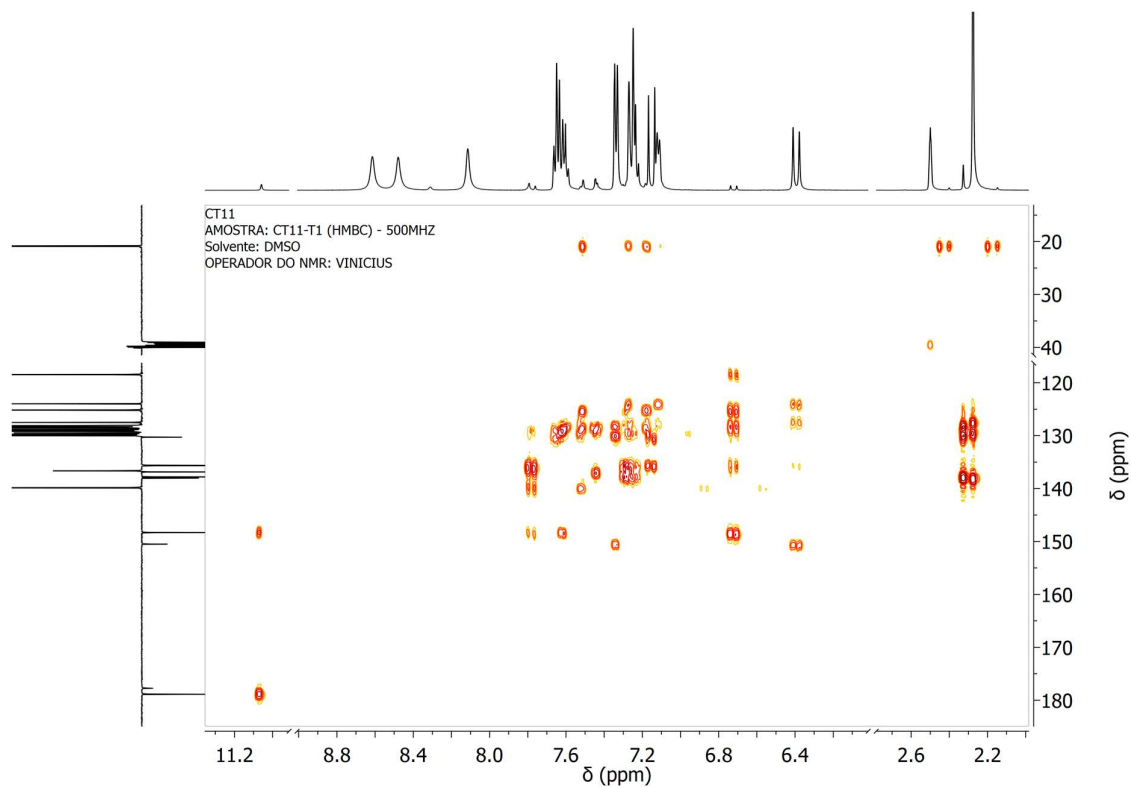


Figura A204. Espectro de HMBC de CT11.

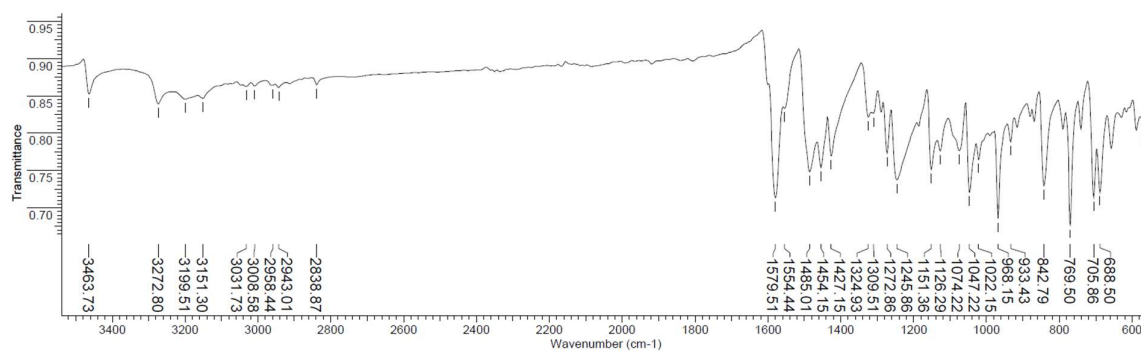


Figura A205. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CT12.

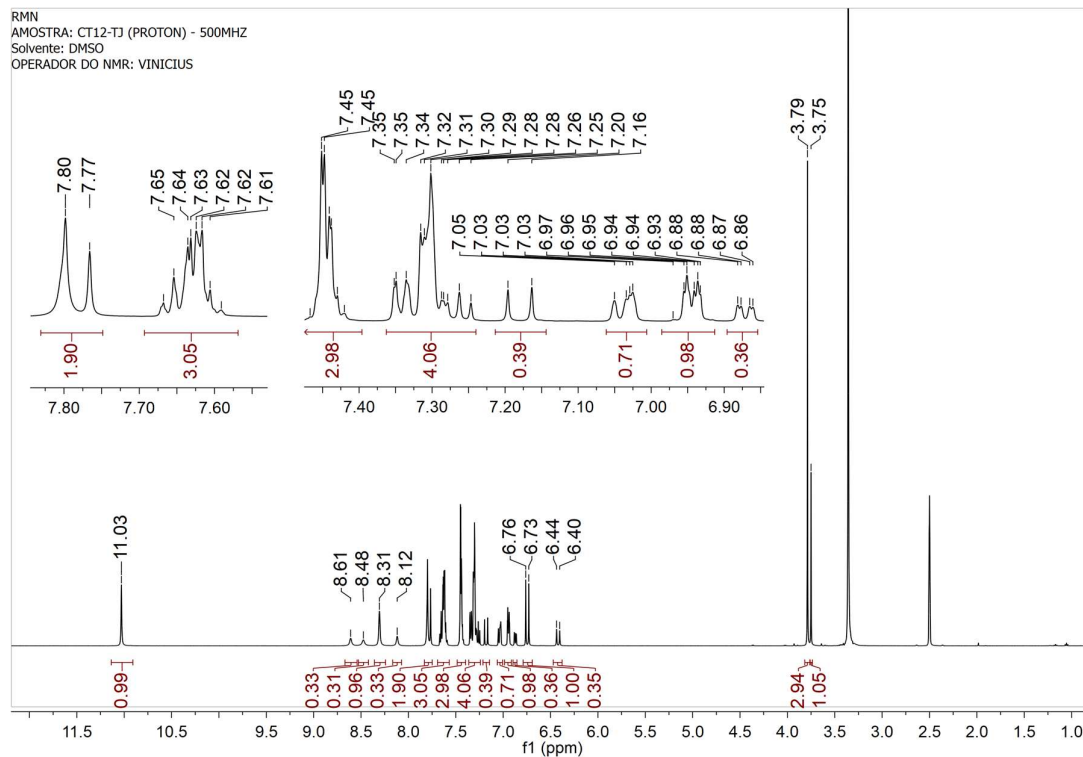


Figura A206. Espectro de RMN de ^1H de CT12.

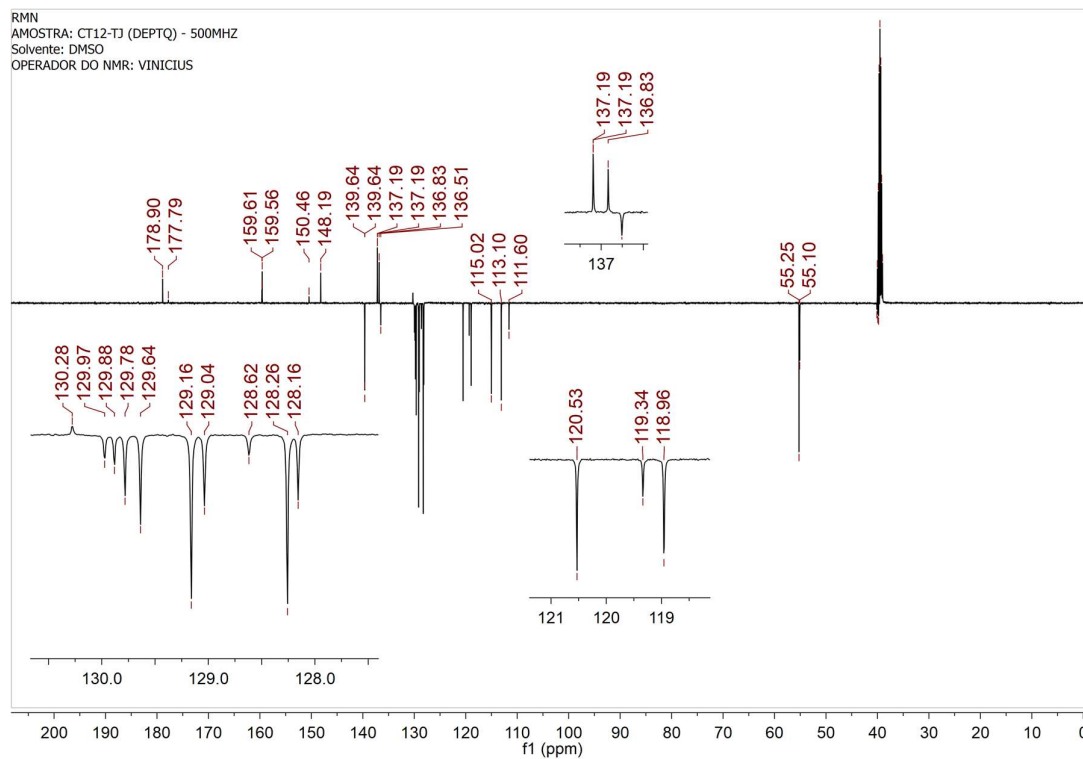


Figura A207. Espectro de RMN de ^{13}C de CT12.

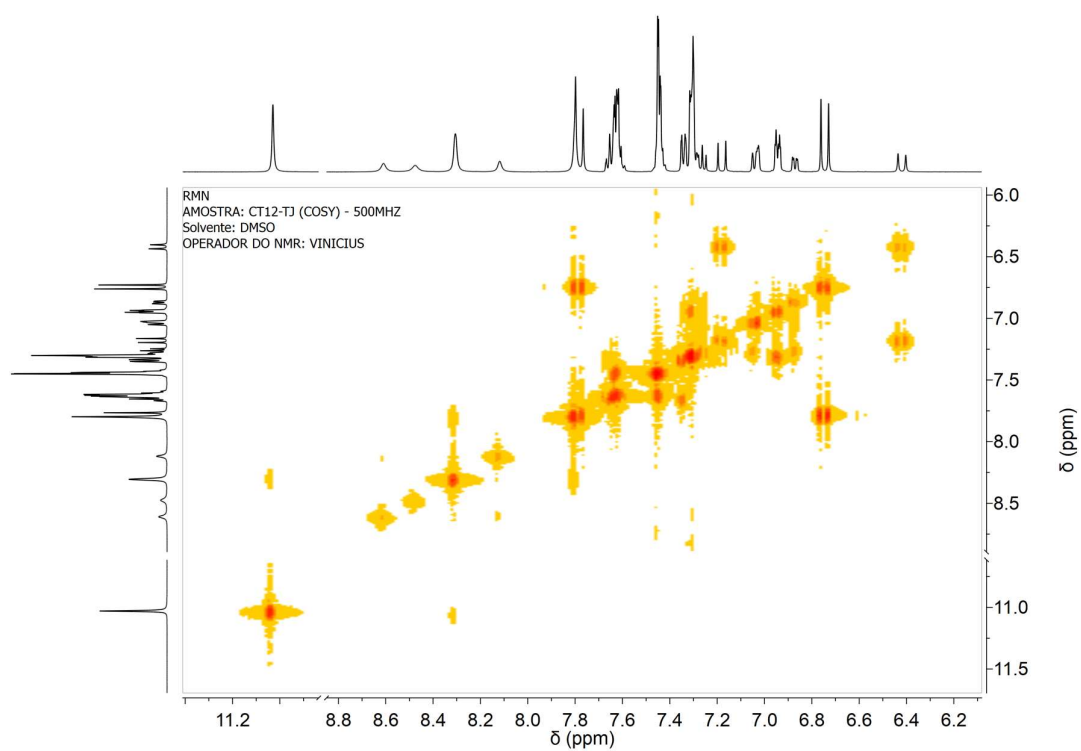


Figura A208. Espectro de COSY de CT12.

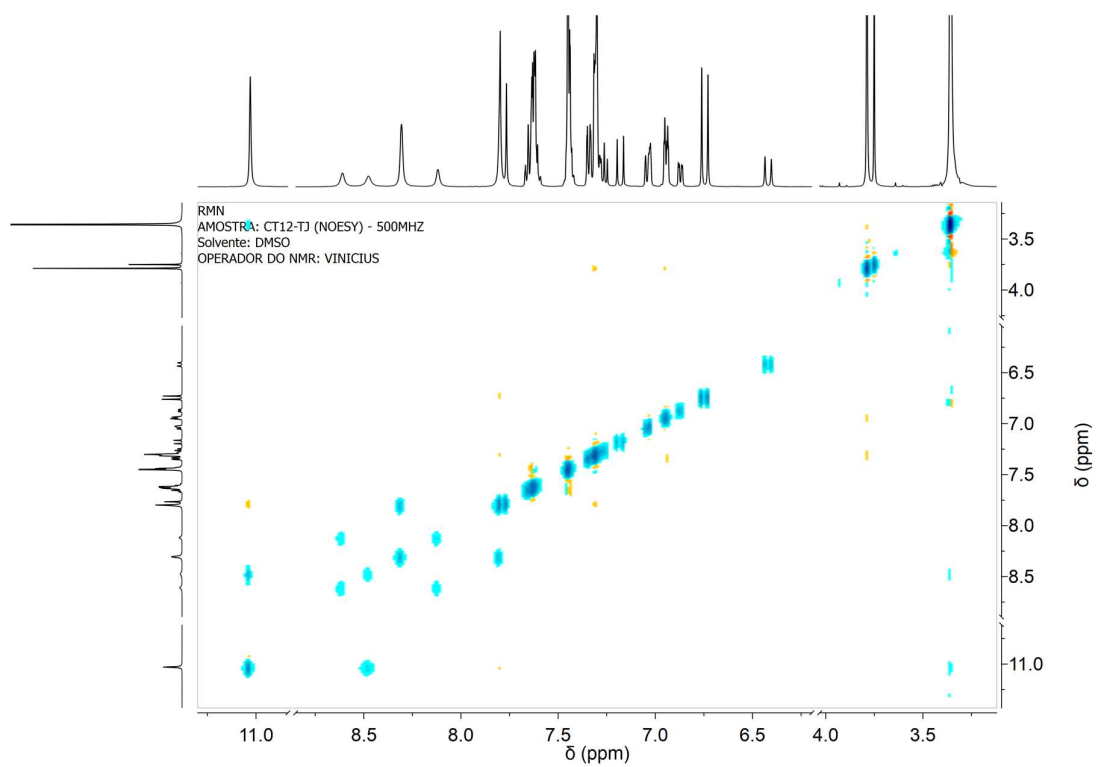


Figura A209. Espectro de NOESY de CT12.

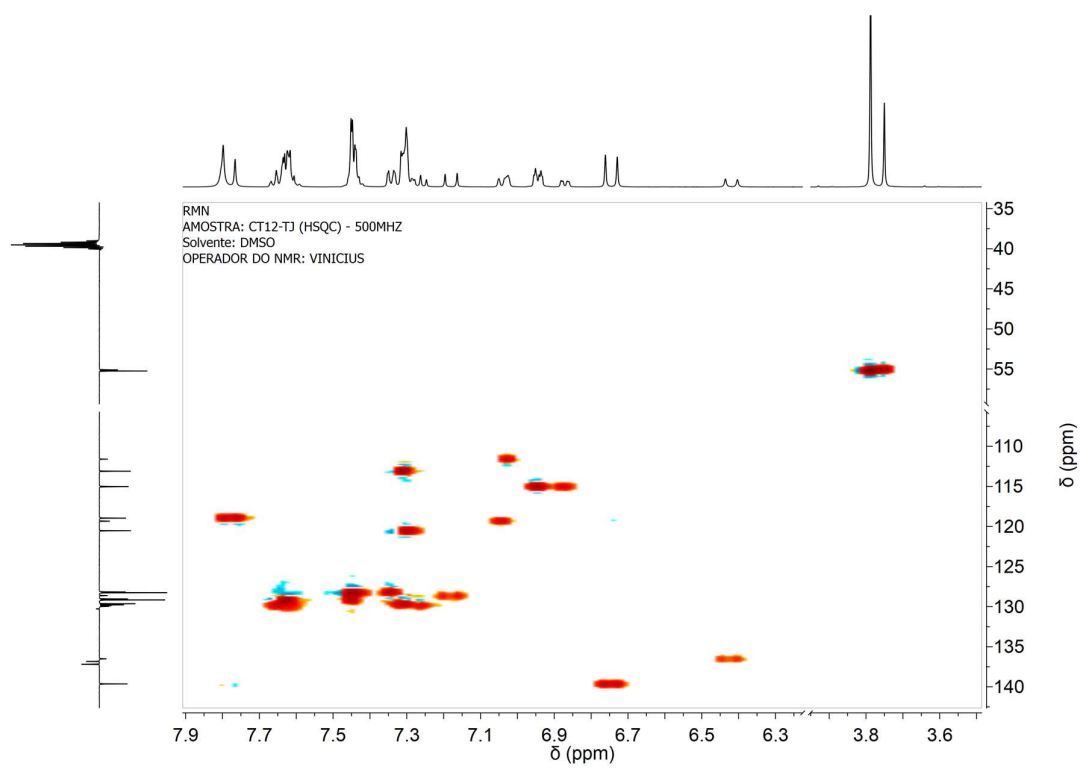


Figura A210. Espectro de HSQC de CT12.

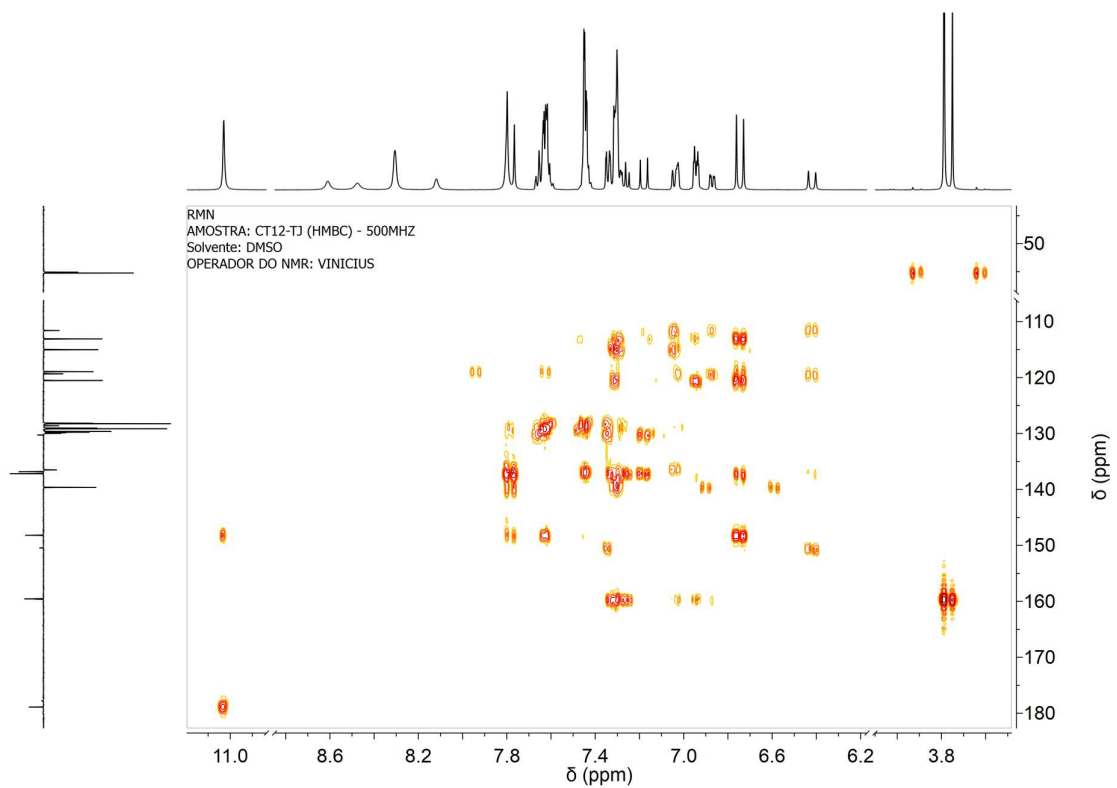


Figura A211. Espectro de HMBC de CT12.

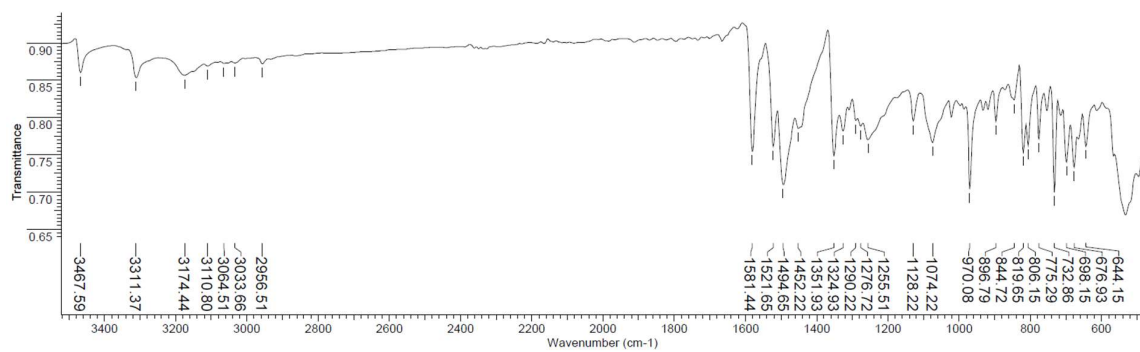


Figura A212. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CT13.

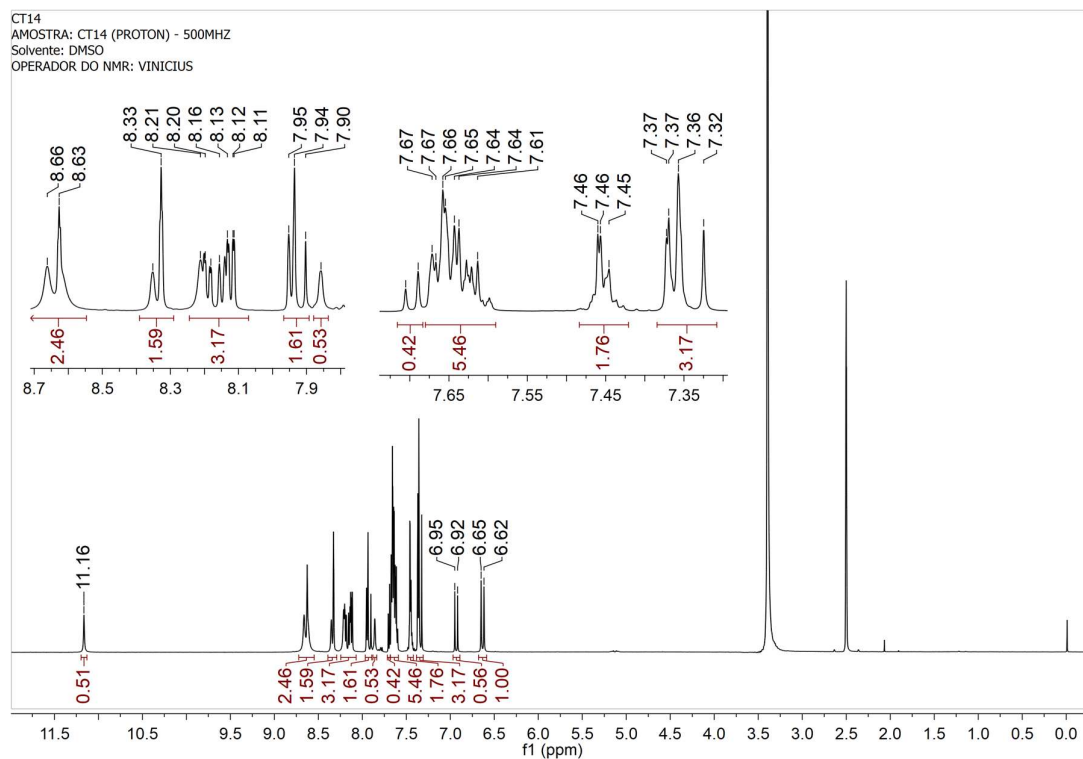


Figura A213. Espectro de RMN de ^1H de **CT13** (código antigo: CT14).

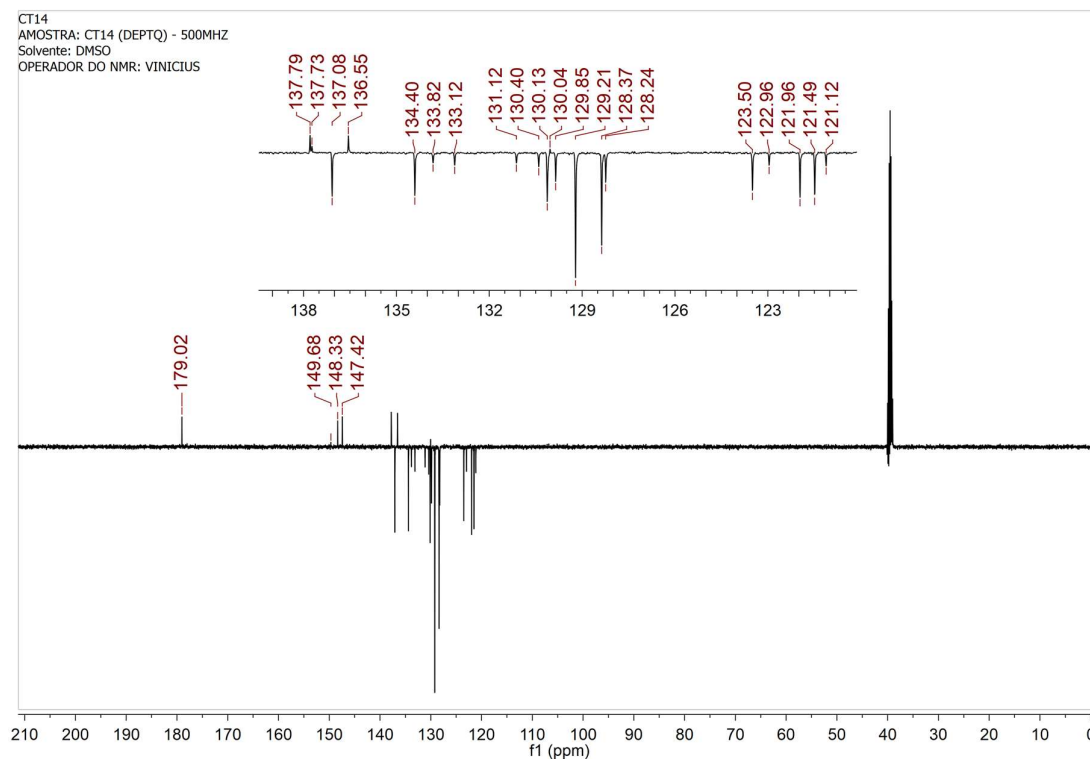


Figura A214. Espectro de RMN de ^{13}C de **CT13** (código antigo: CT14).

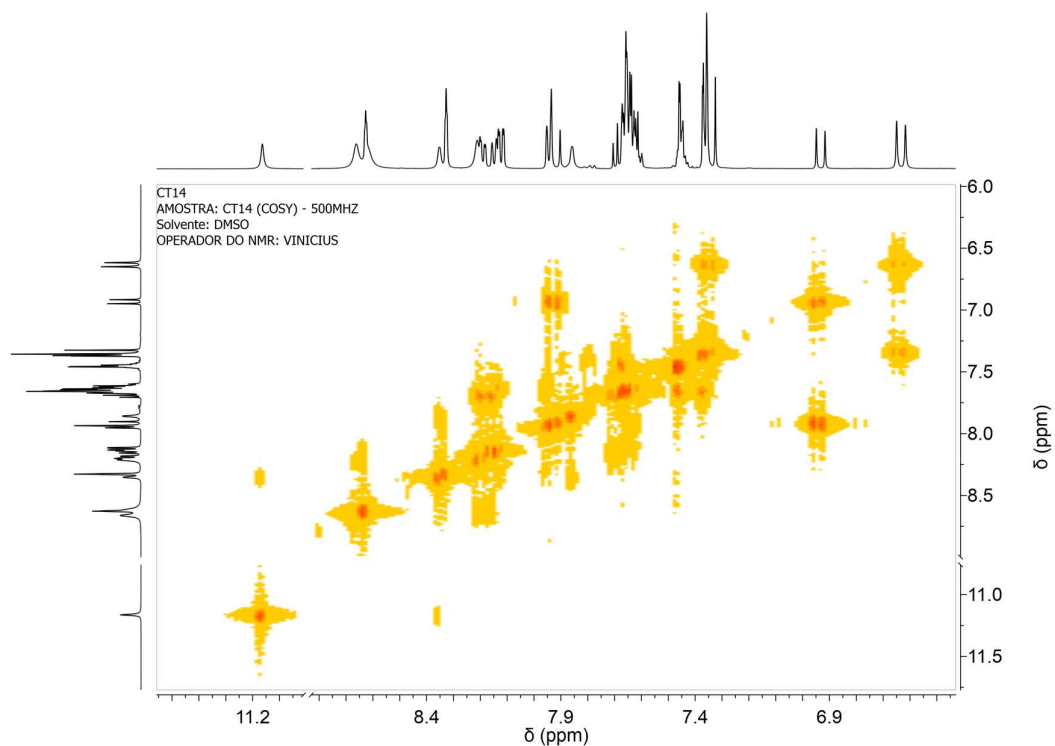


Figura A215. Espectro de COSY de CT13 (código antigo: CT14).

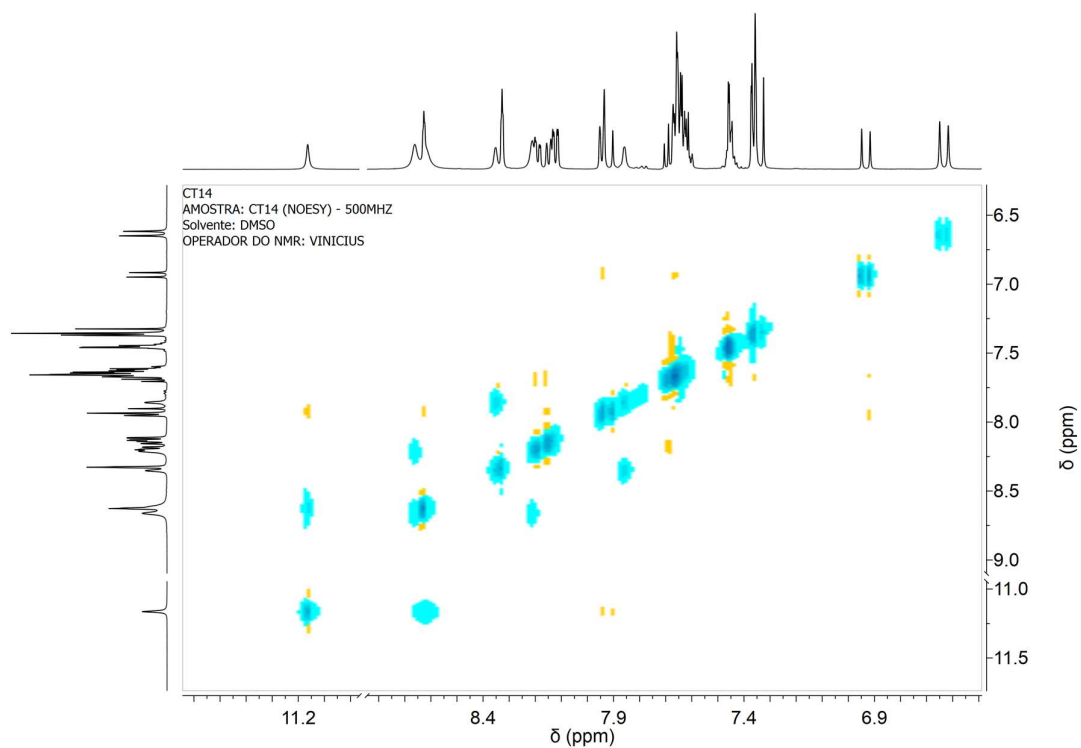


Figura A216. Espectro de NOESY de CT13 (código antigo: CT14).

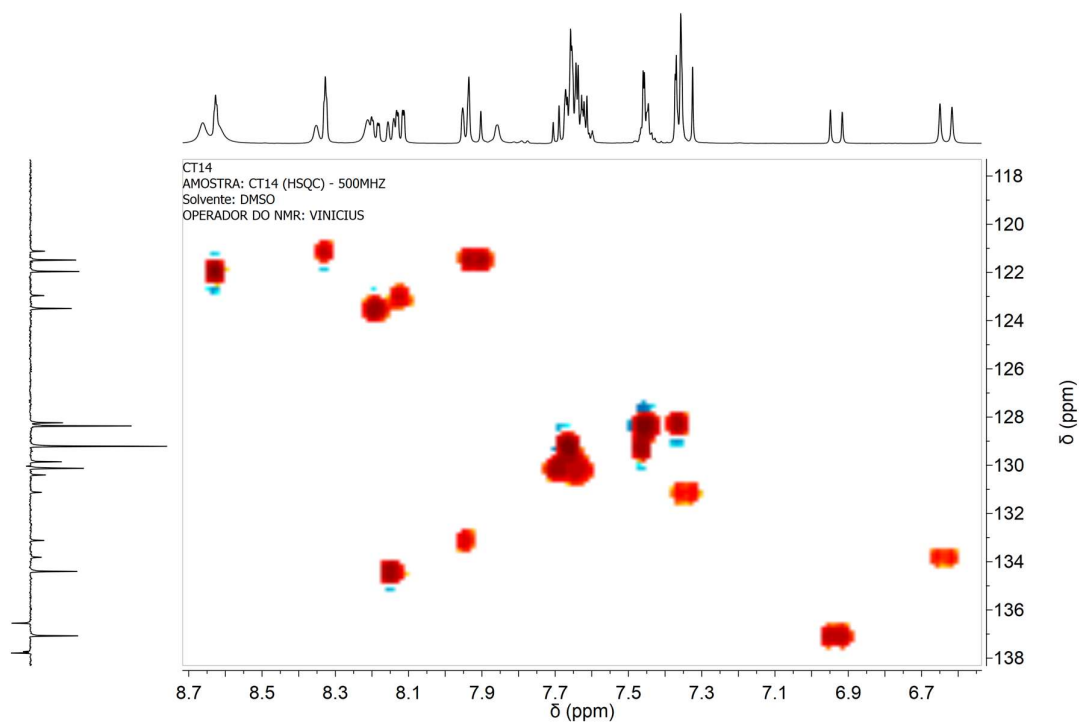


Figura A217. Espectro de HSQC de **CT13** (código antigo: CT14).

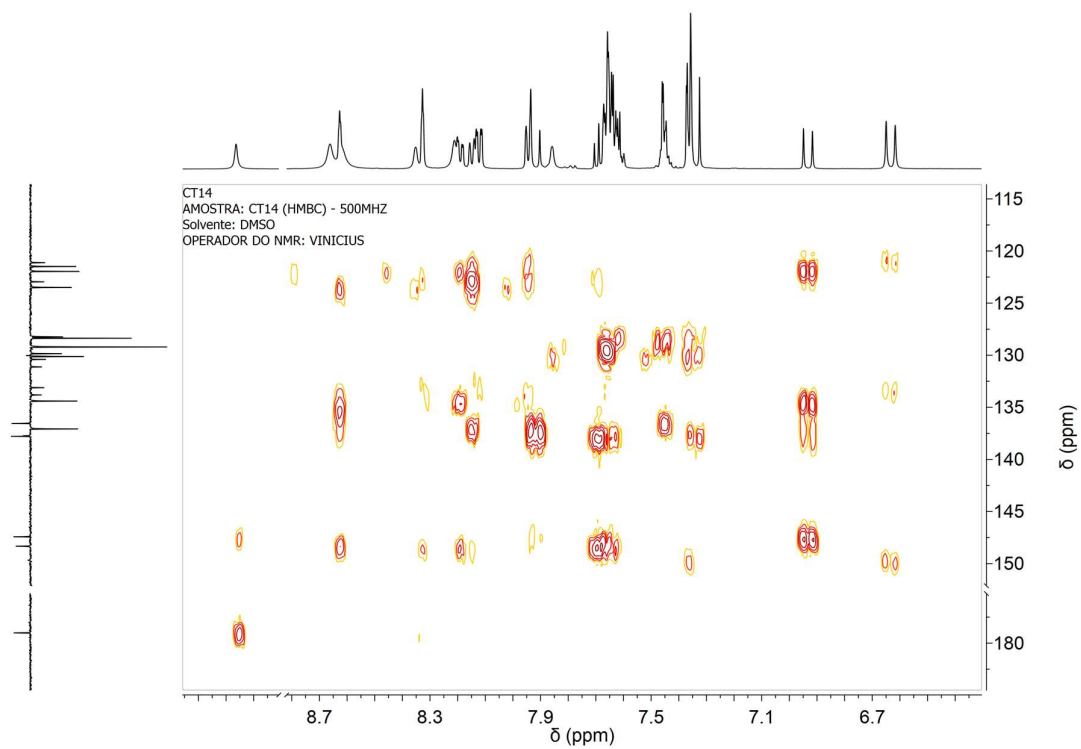
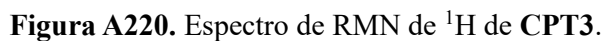
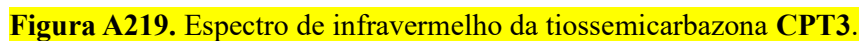


Figura A218. Espectro de HSQC de **CT13** (código antigo: CT14).



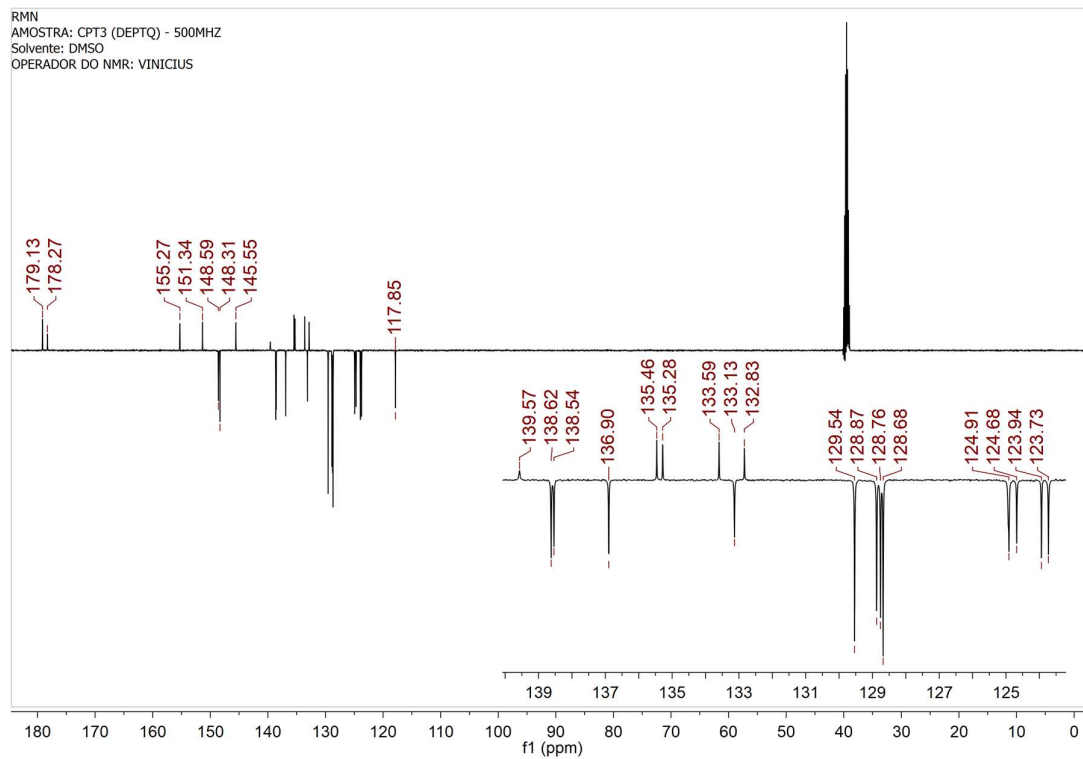


Figura A221. Espectro de RMN de ^{13}C de CPT3.

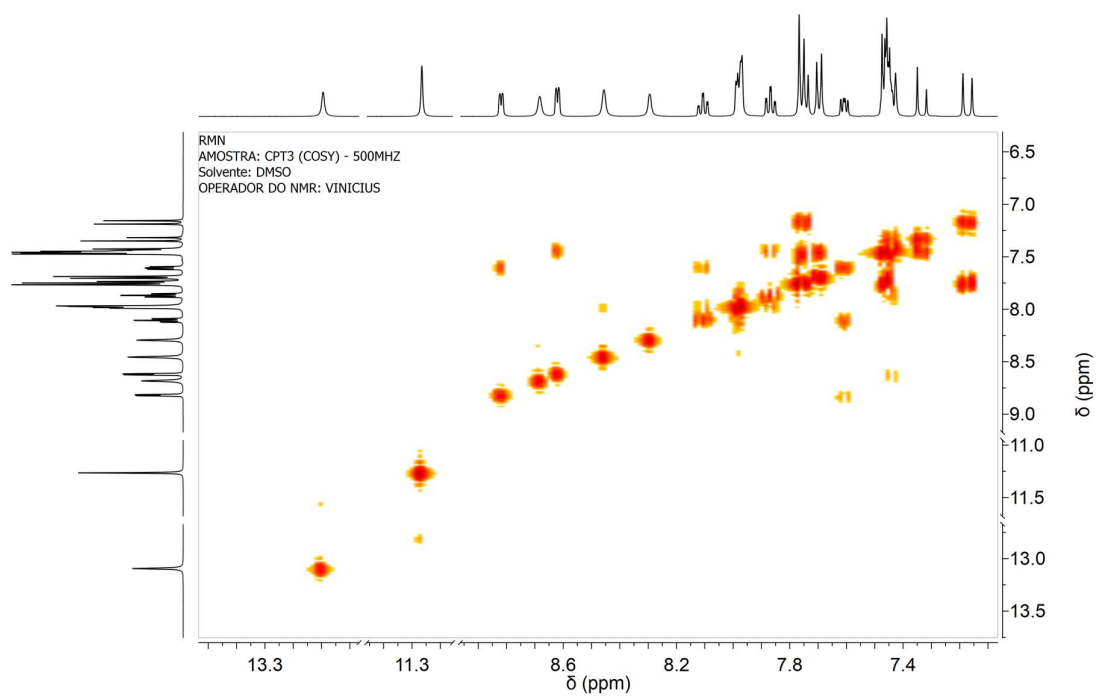


Figura A222. Espectro de COSY de CPT3.

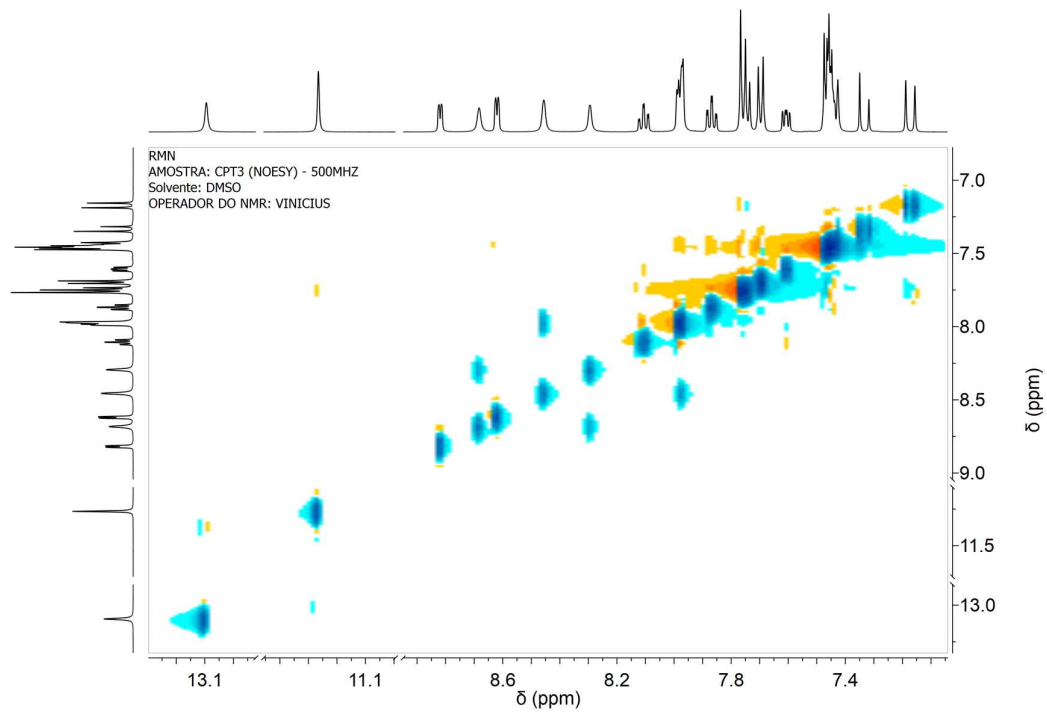


Figura A223. Espectro de NOESY de CPT3.

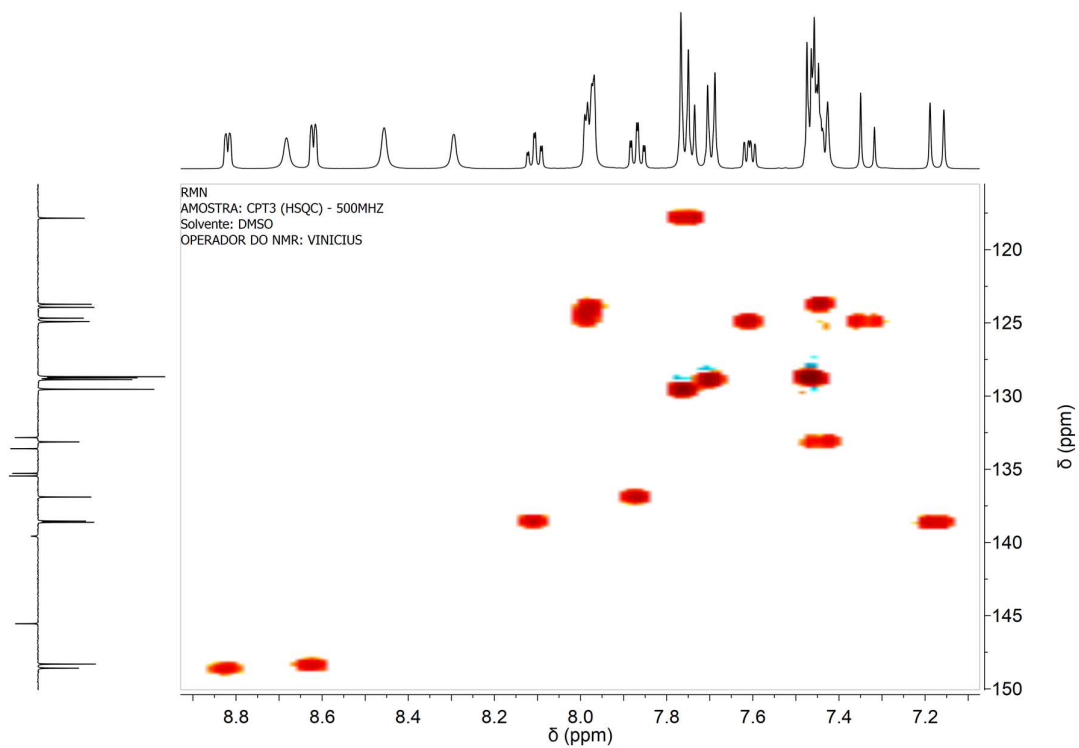


Figura A224. Espectro de HSQC de CPT3.

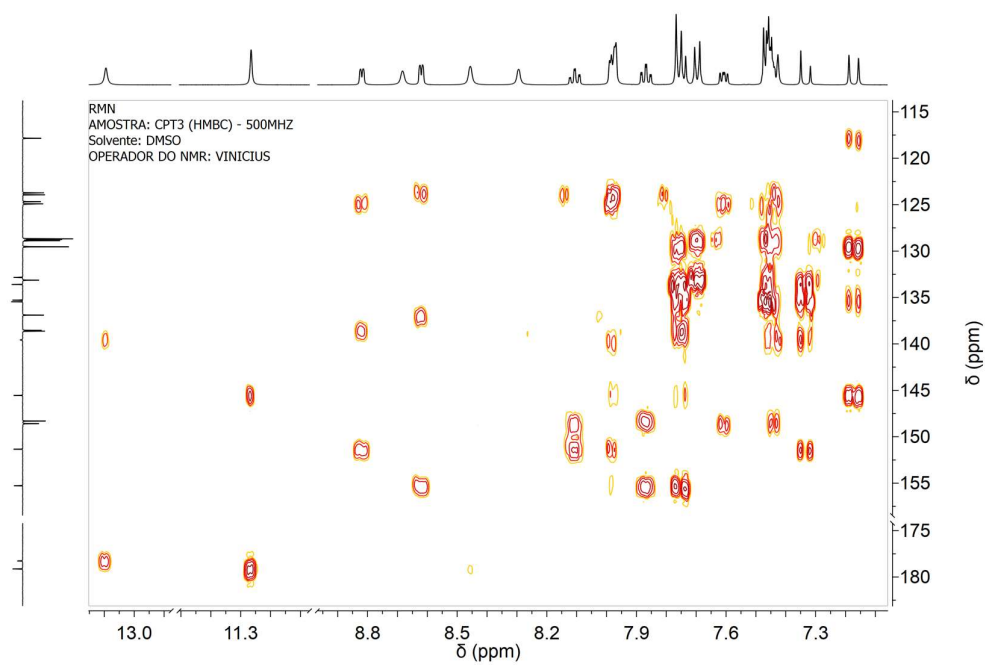


Figura A225. Espectro de HMBC de **CPT3**.

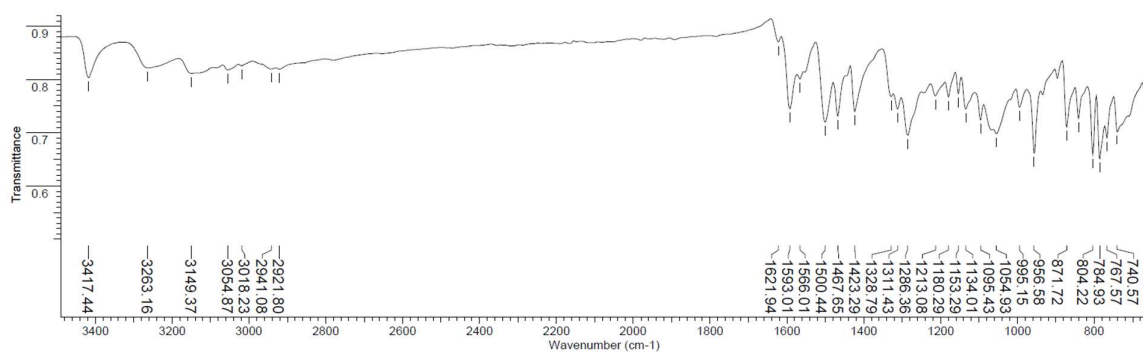


Figura A226. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona **CPT4**.

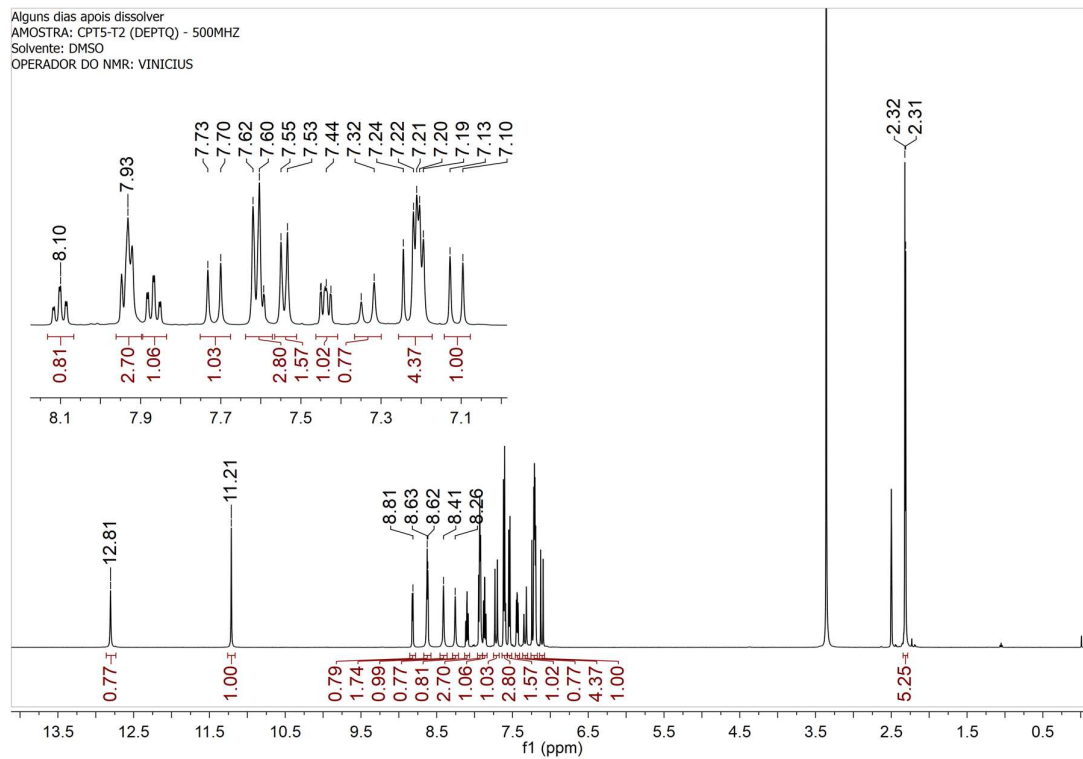


Figura A227. Espectro de RMN de ^1H de **CPT4** (Código antigo CPT5).

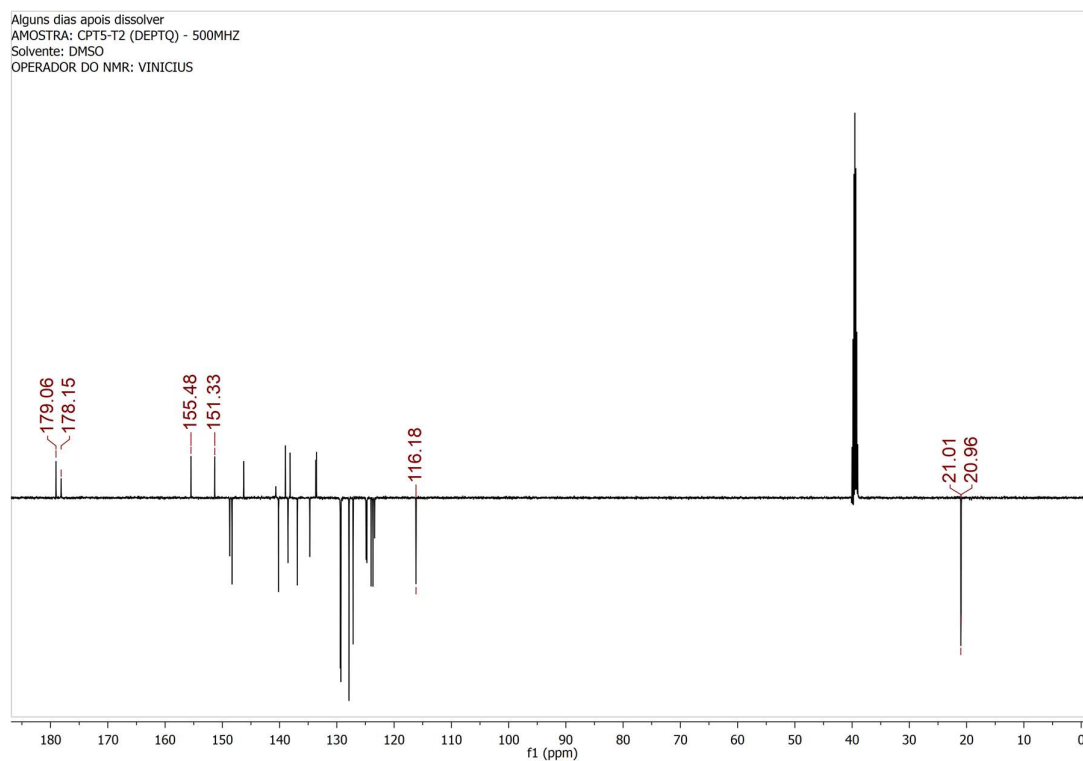


Figura A228. Espectro de RMN de ^{13}C de **CPT4** (Código antigo CPT5).

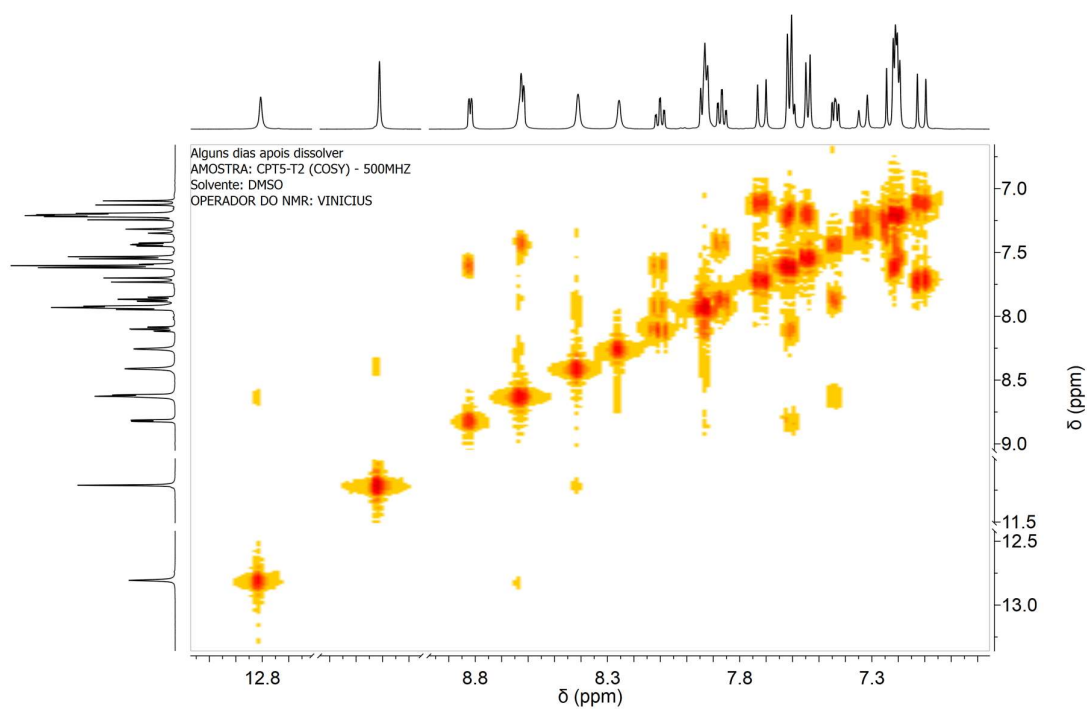


Figura A229. Espectro de COSY de **CPT4** (Código antigo CPT5).

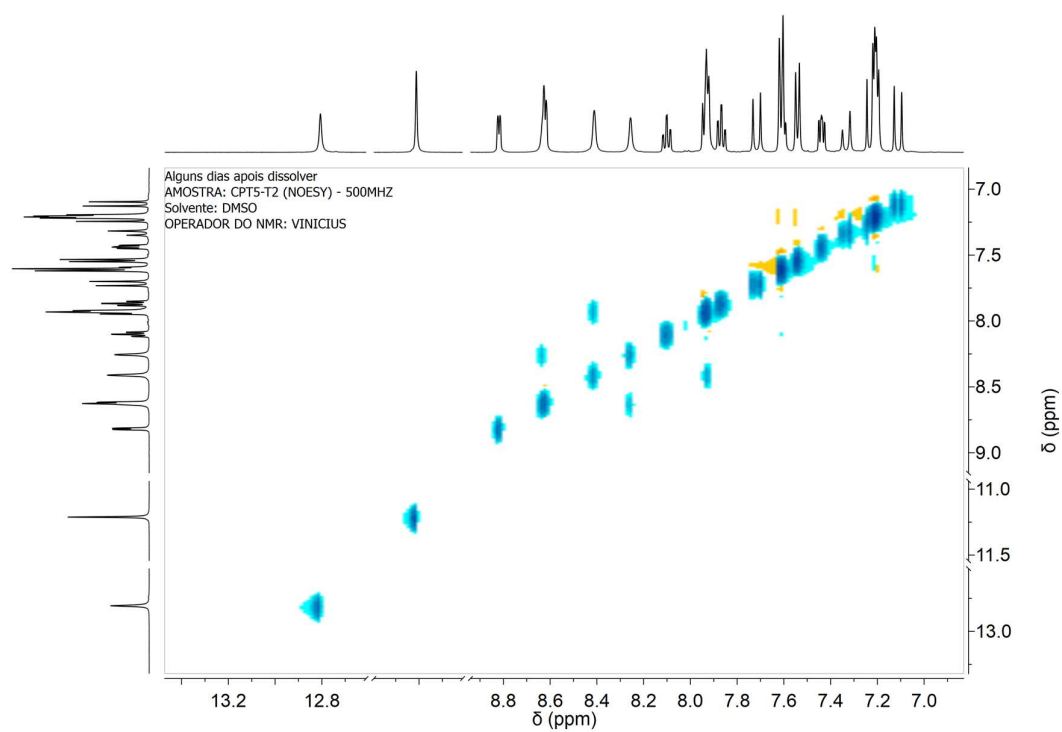


Figura A230. Espectro de NOESY de **CPT4** (Código antigo CPT5).

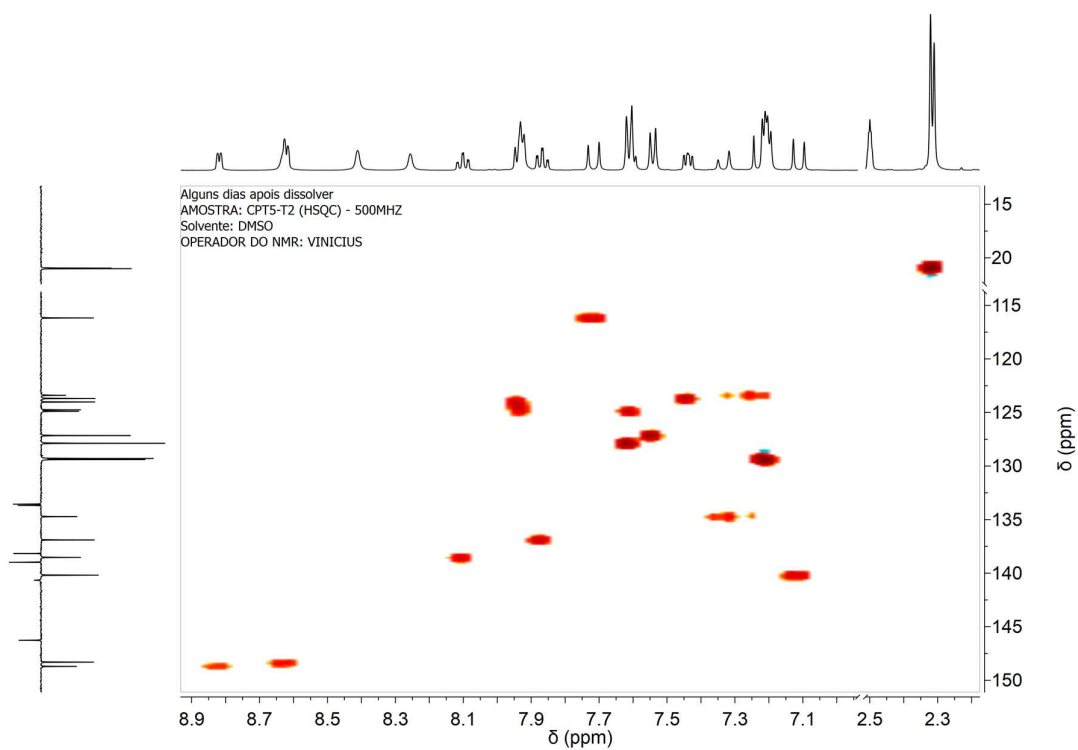


Figura A231. Espectro de HSQC de **CPT4** (Código antigo CPT5).

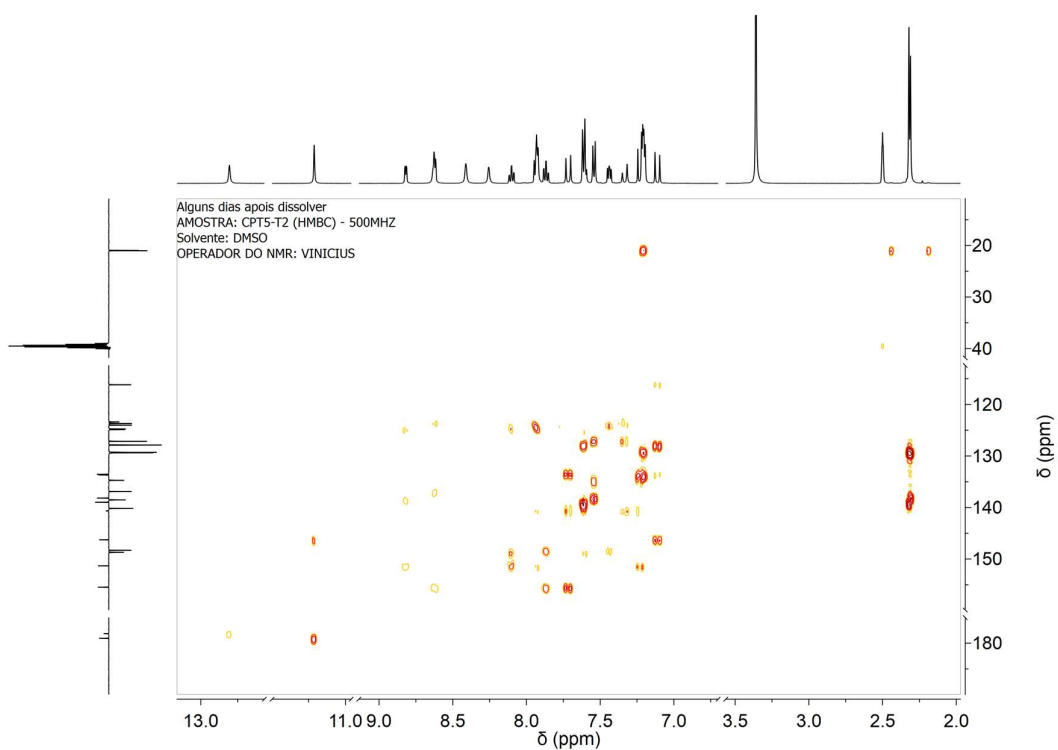


Figura A232. Espectro de HMBC de **CPT4** (Código antigo CPT5).

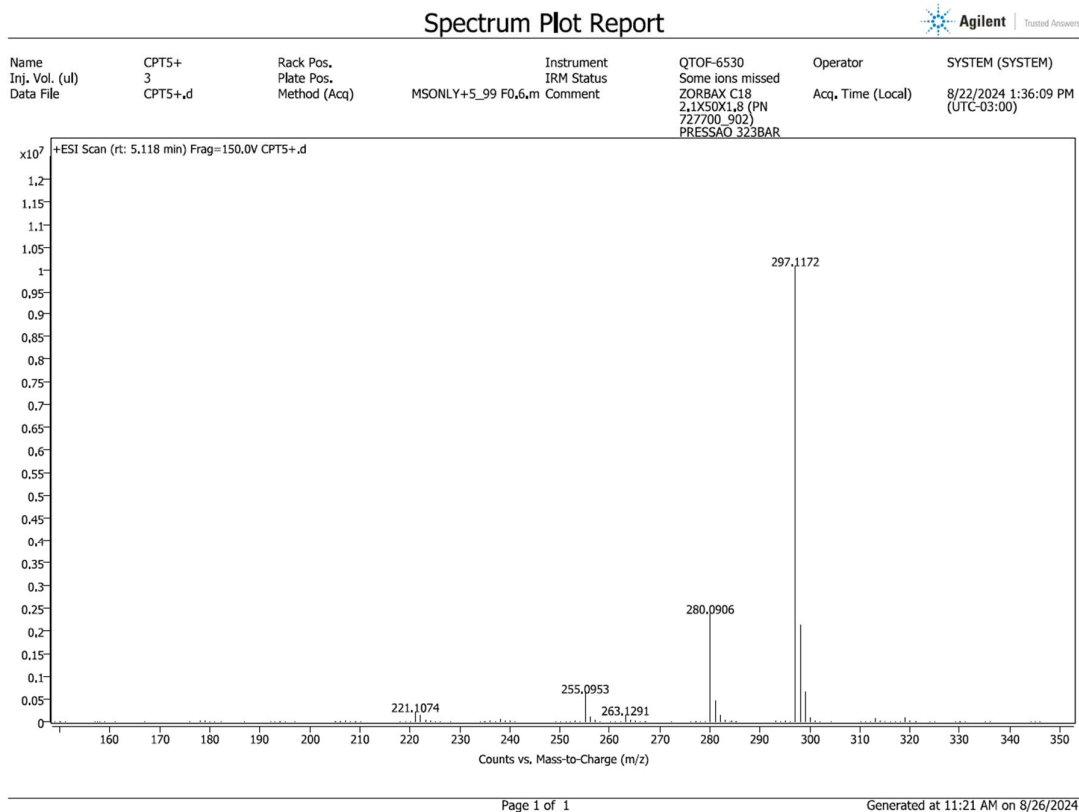


Figura A233. HRMS de CPT4 (Código antigo CPT5).

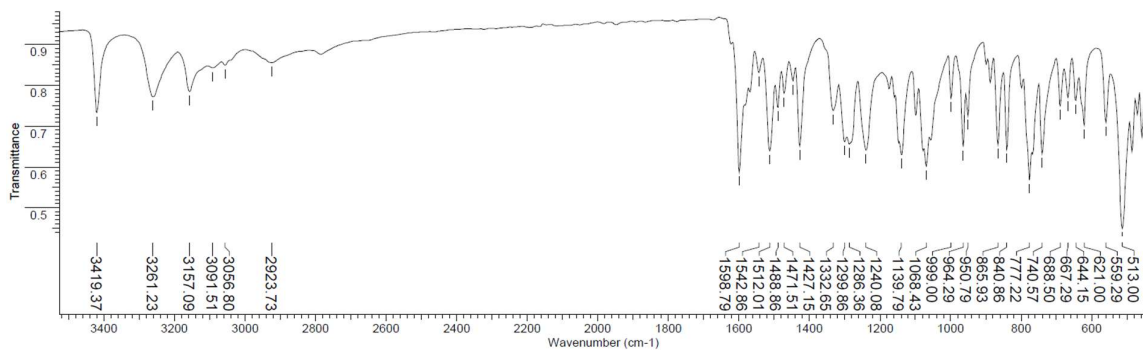


Figura A234. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CPT5 (código antigo CPT7).

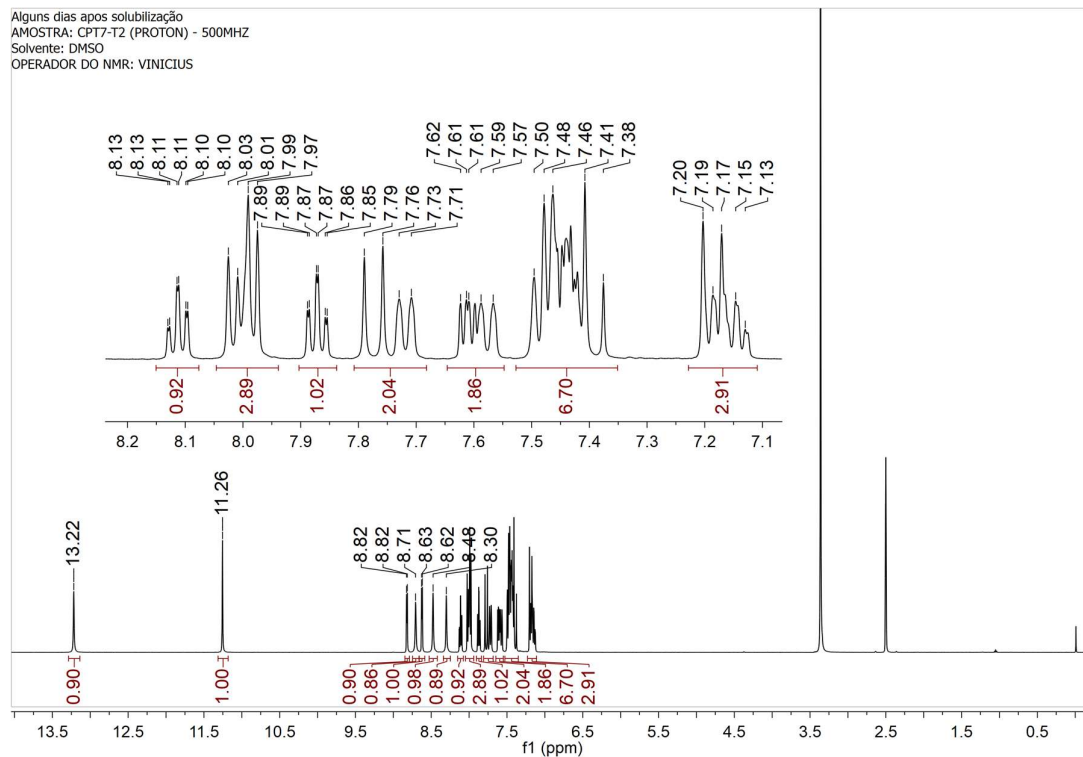


Figura A235. Espectro de RMN de ^1H de **CPT5** (código antigo CPT7).

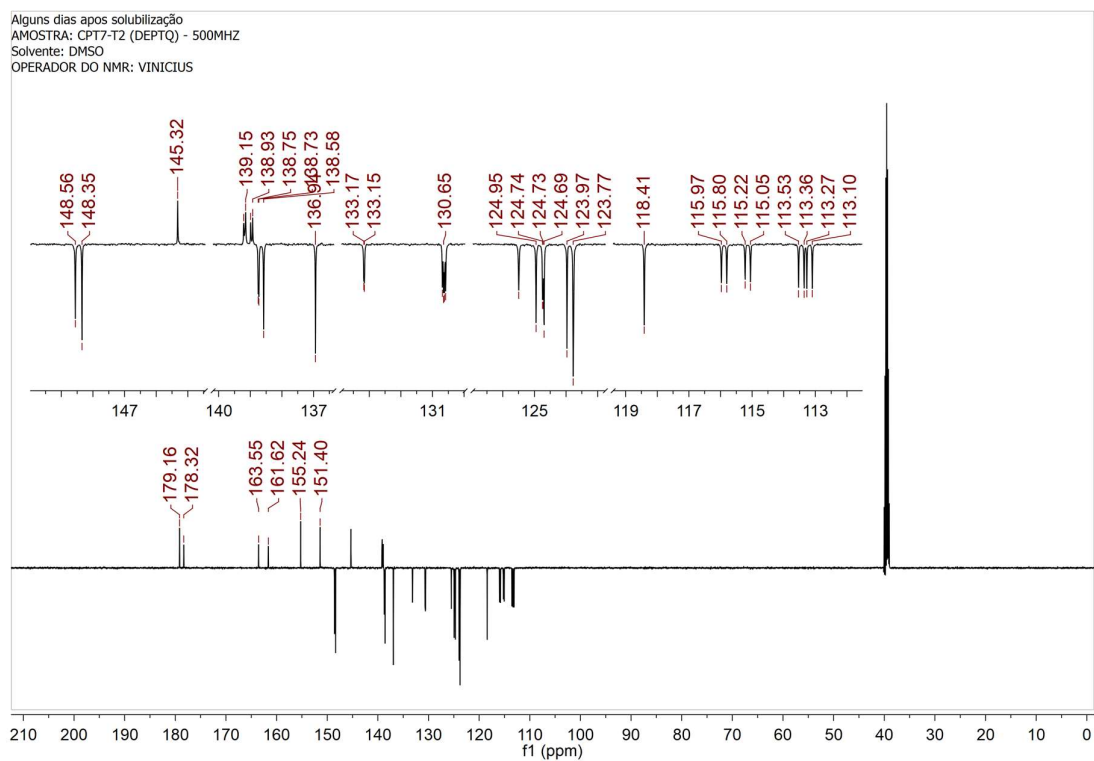


Figura A236. Espectro de RMN de ^{13}C de **CPT5** (código antigo CPT7).

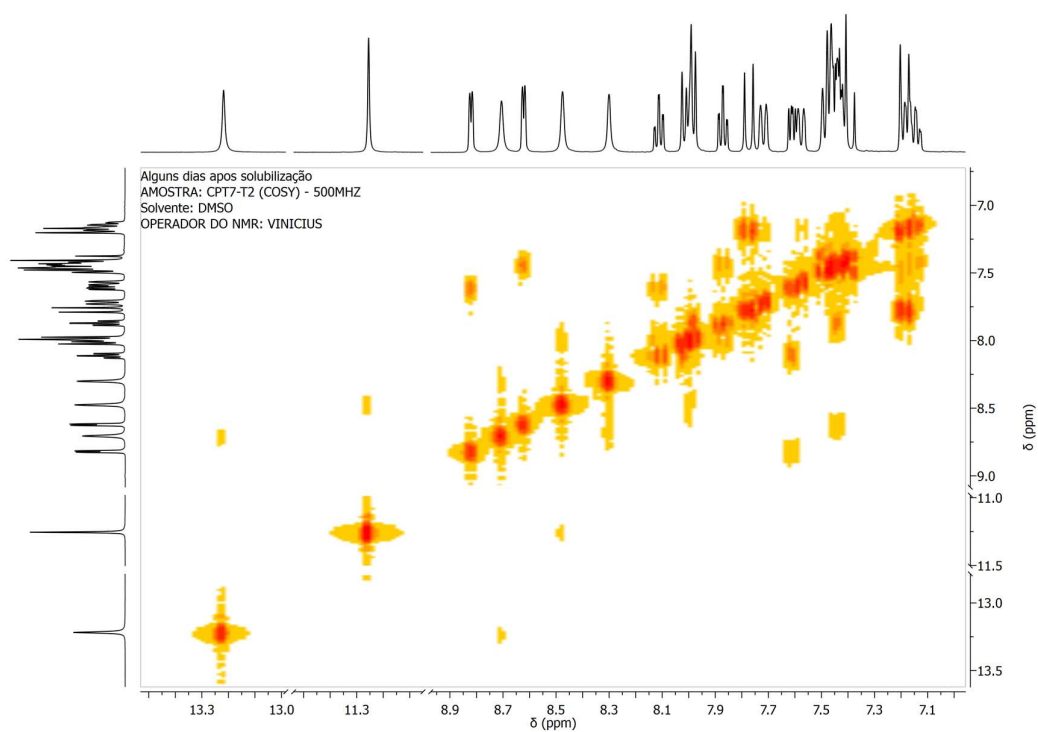


Figura A237. Espectro de COSY de **CPT5** (código antigo CPT7).

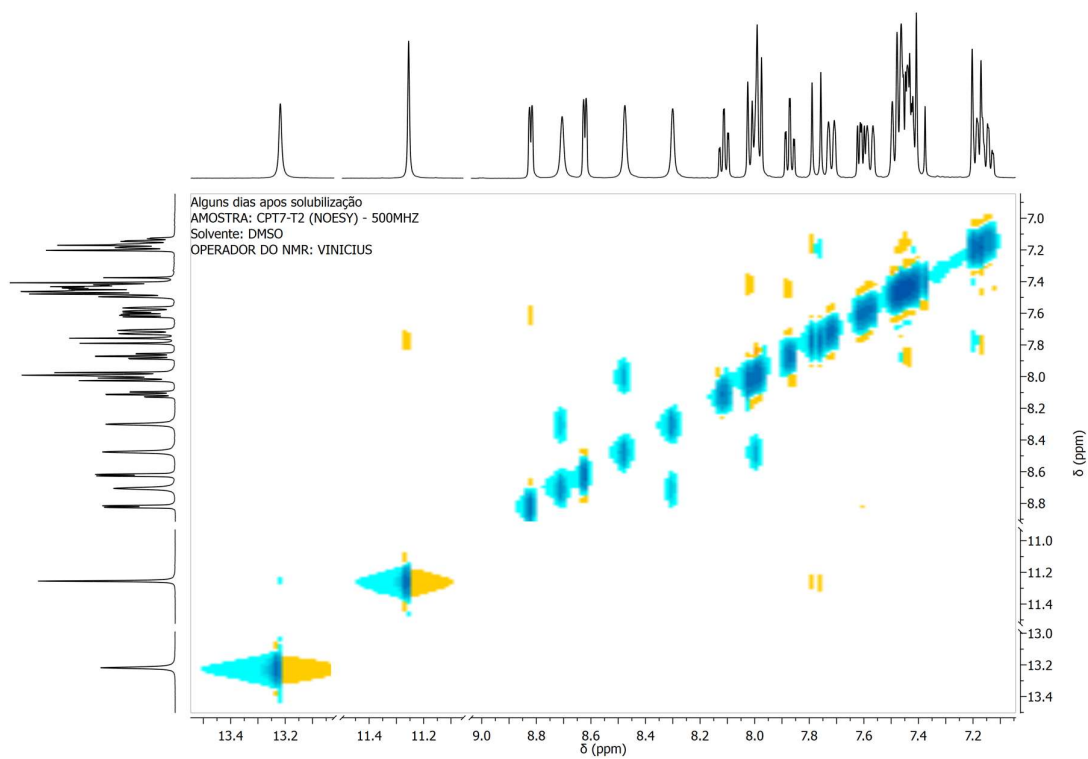


Figura A238. Espectro de NOESY de **CPT5** (código antigo CPT7).

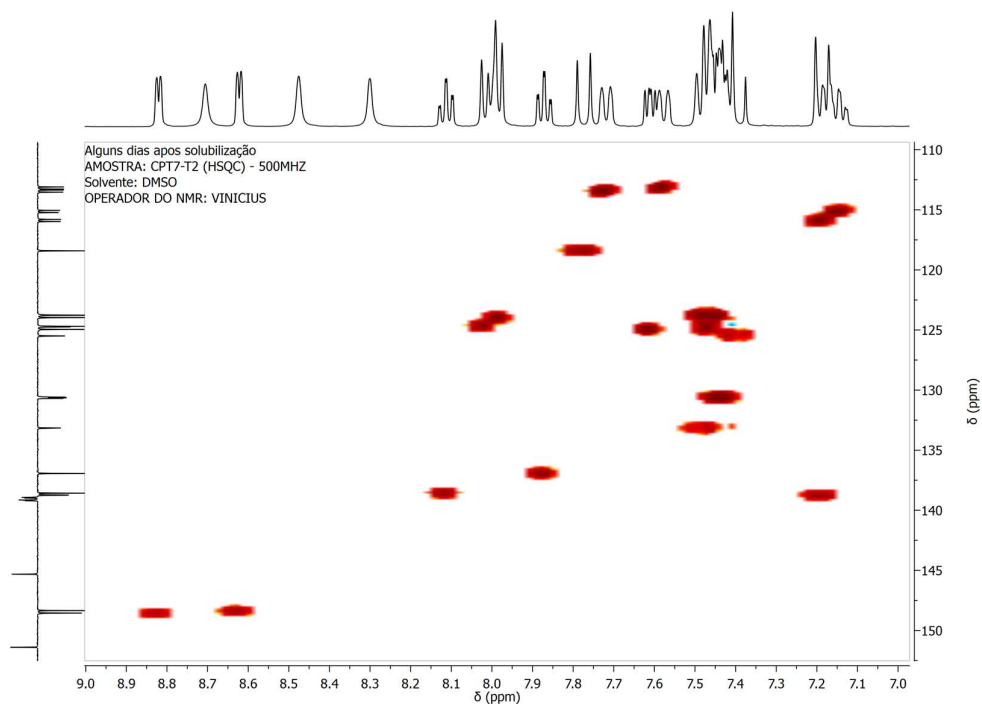


Figura A239. Espectro de HSQC de **CPT5** (código antigo CPT7).

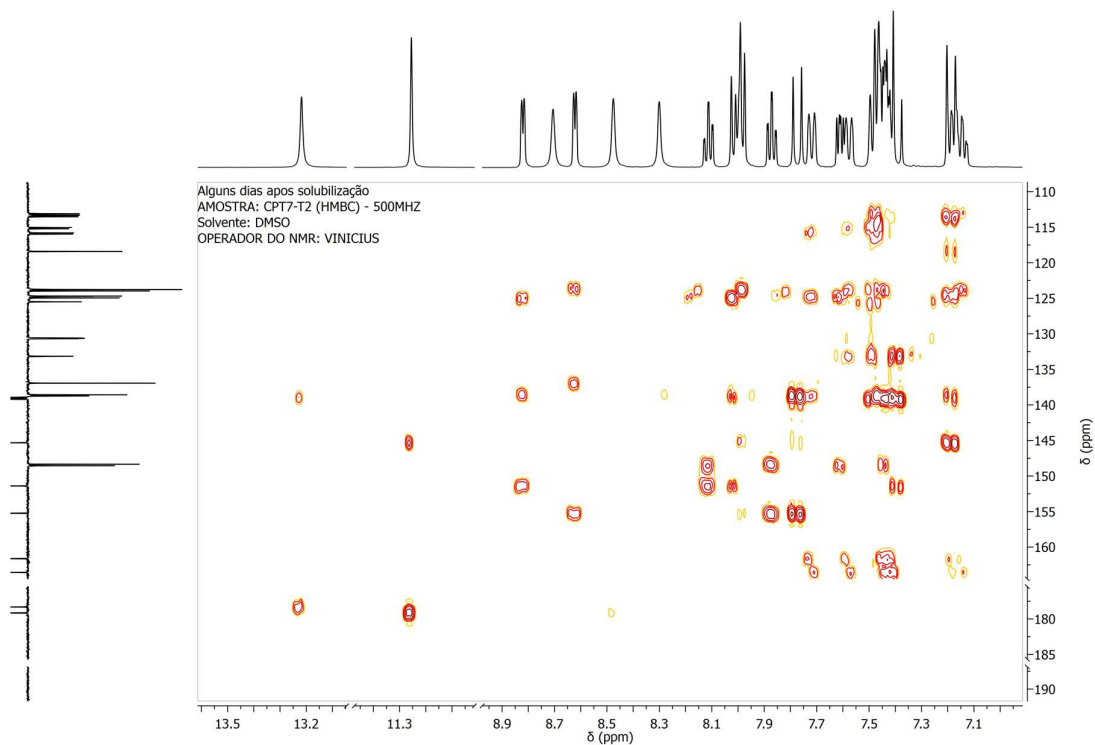


Figura A240. Espectro de HSQC de CPT5 (código antigo CPT7).

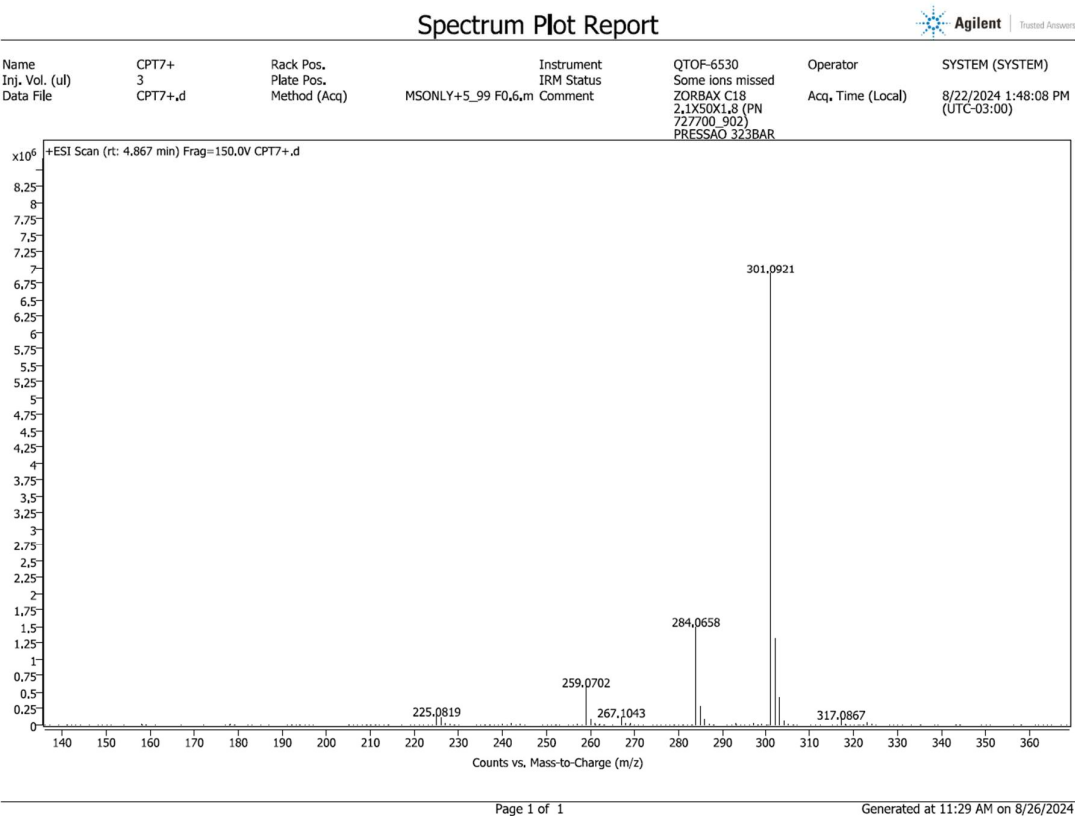


Figura A241. HRMS de CPT5 (código antigo CPT7).

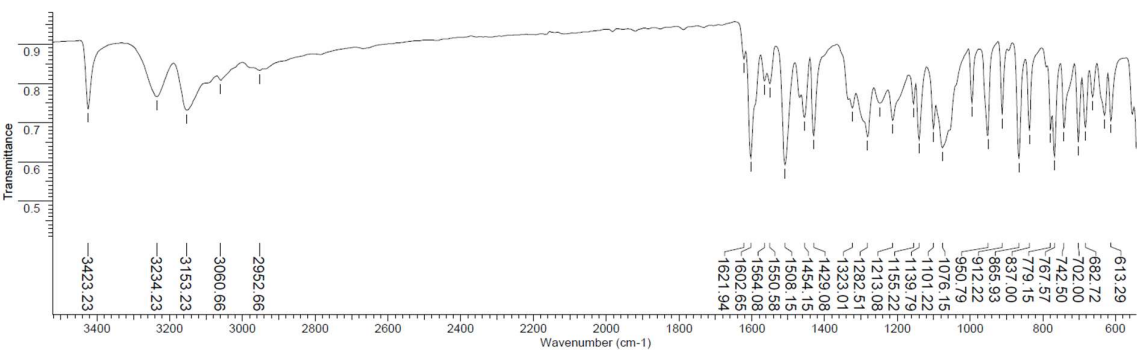


Figura A242. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CPT6 (código antigo CPT8).

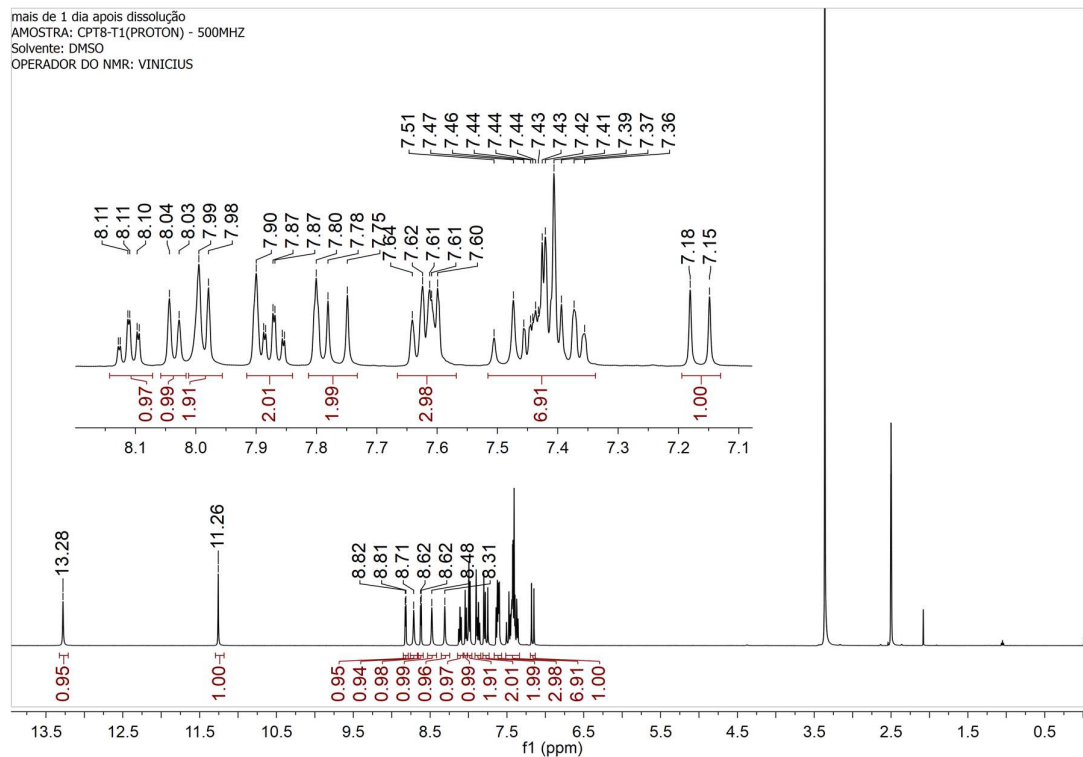


Figura A243. Espectro de RMN de ^1H de **CPT6** (código antigo CPT8).

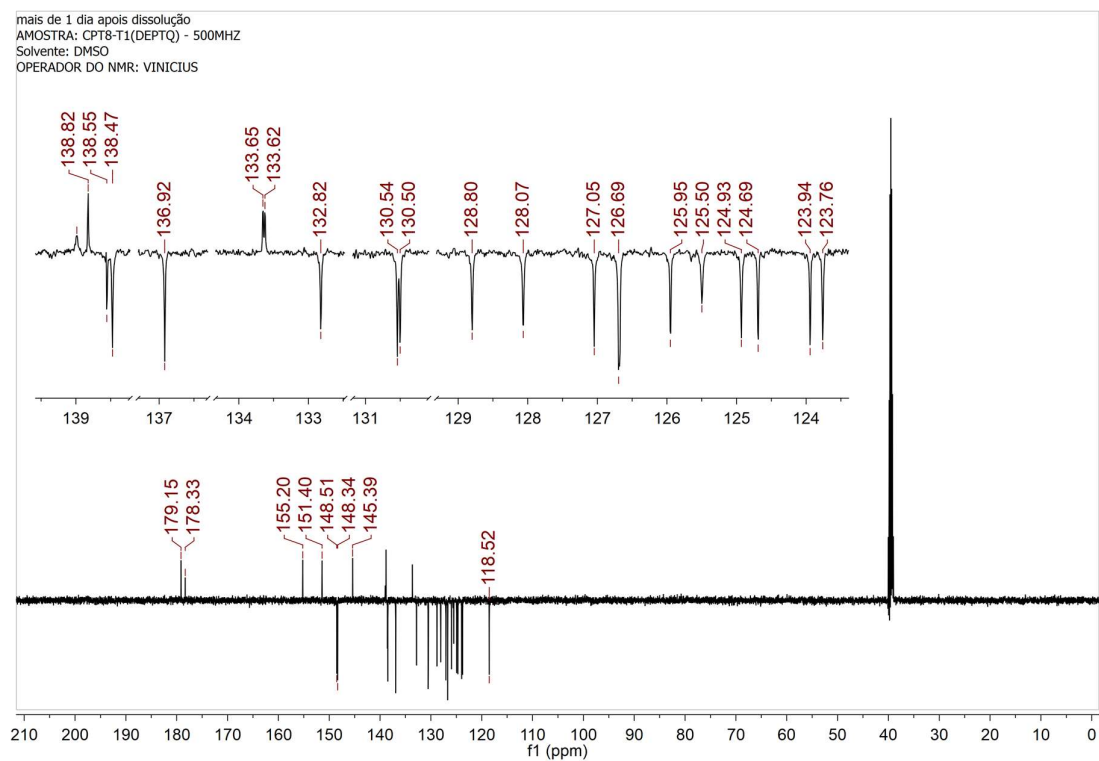


Figura A244. Espectro de RMN de ^{13}C de **CPT6** (código antigo CPT8).

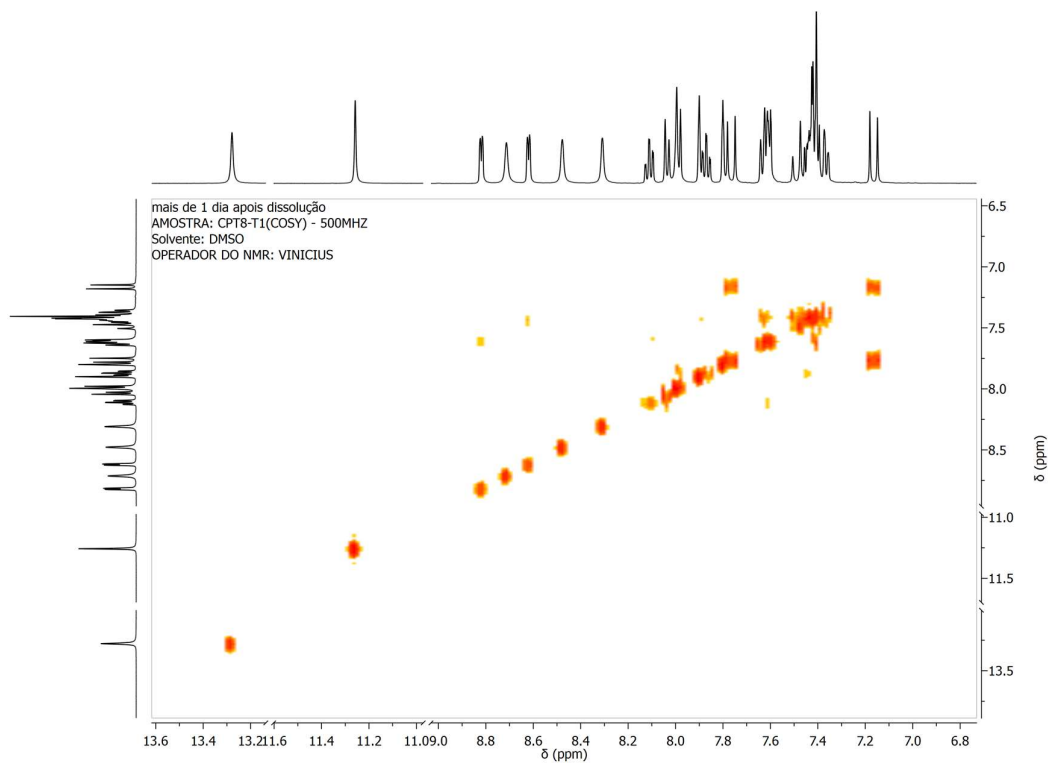


Figura A245. Espectro de COSY de **CPT6** (código antigo CPT8).

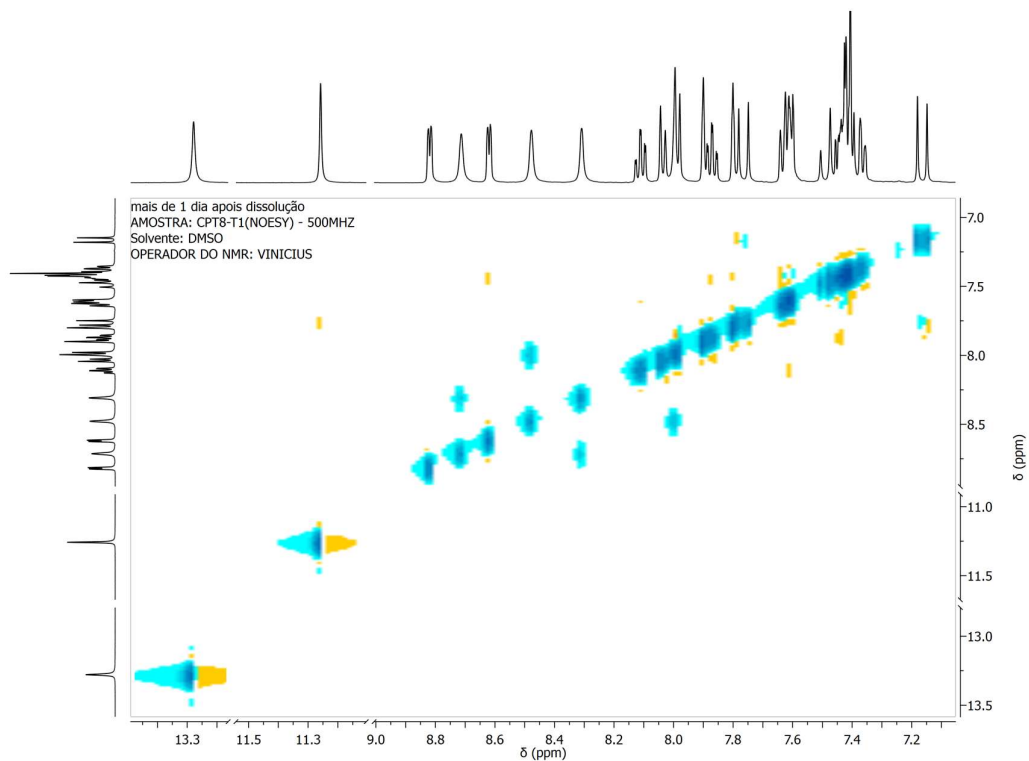


Figura A246. Espectro de NOESY de **CPT6** (código antigo CPT8).

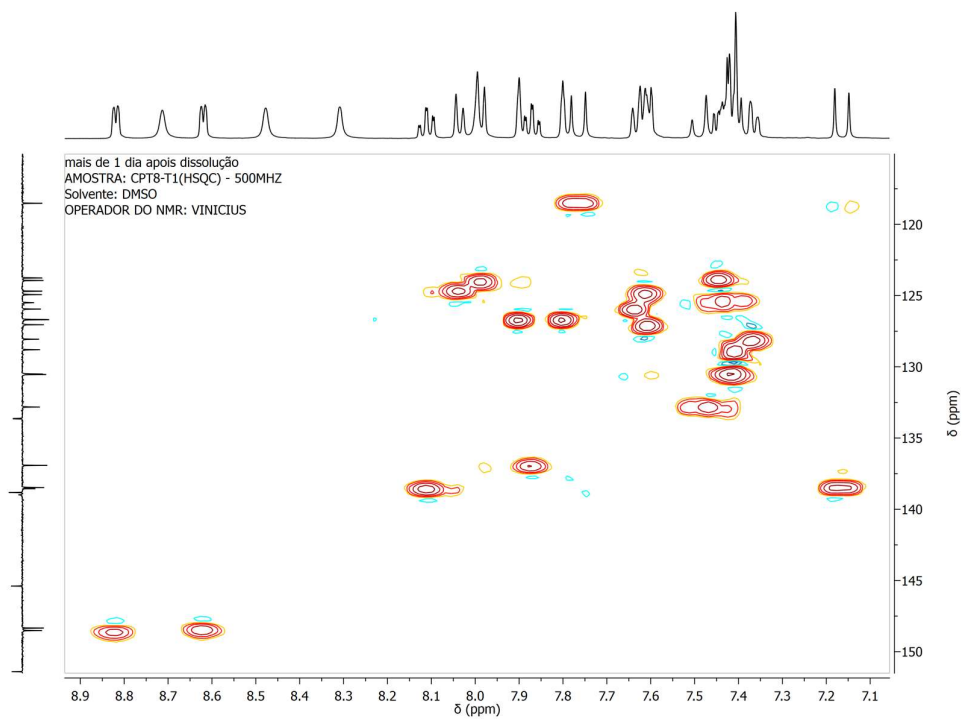


Figura A247. Espectro de HSQC de **CPT6** (código antigo CPT8).

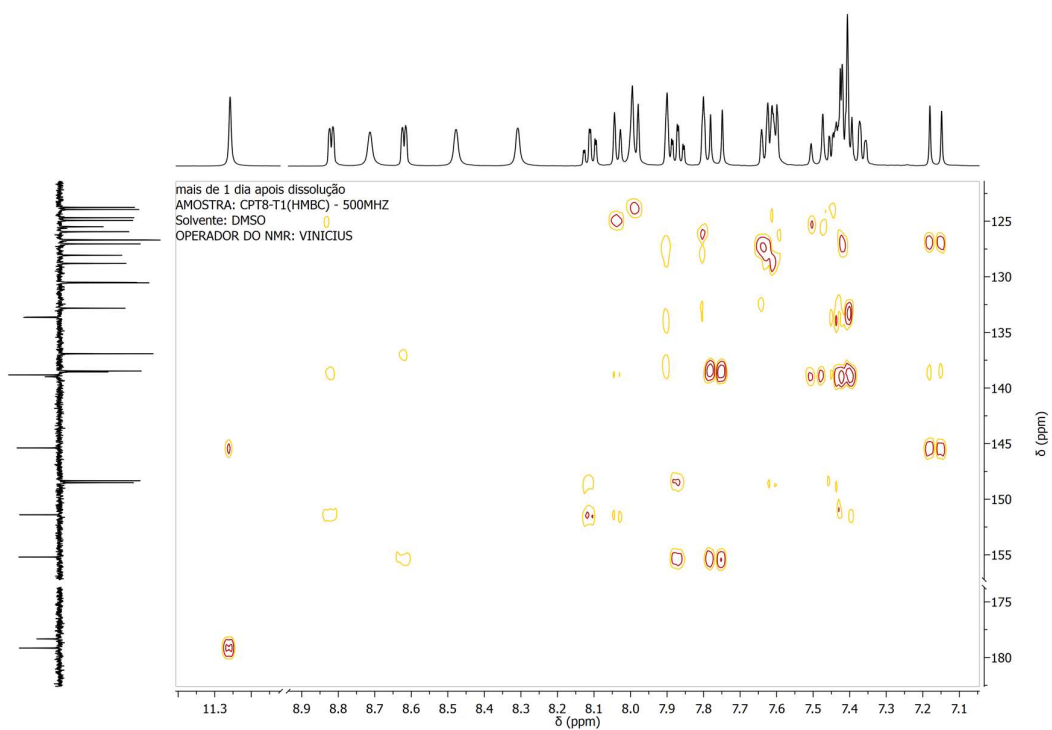
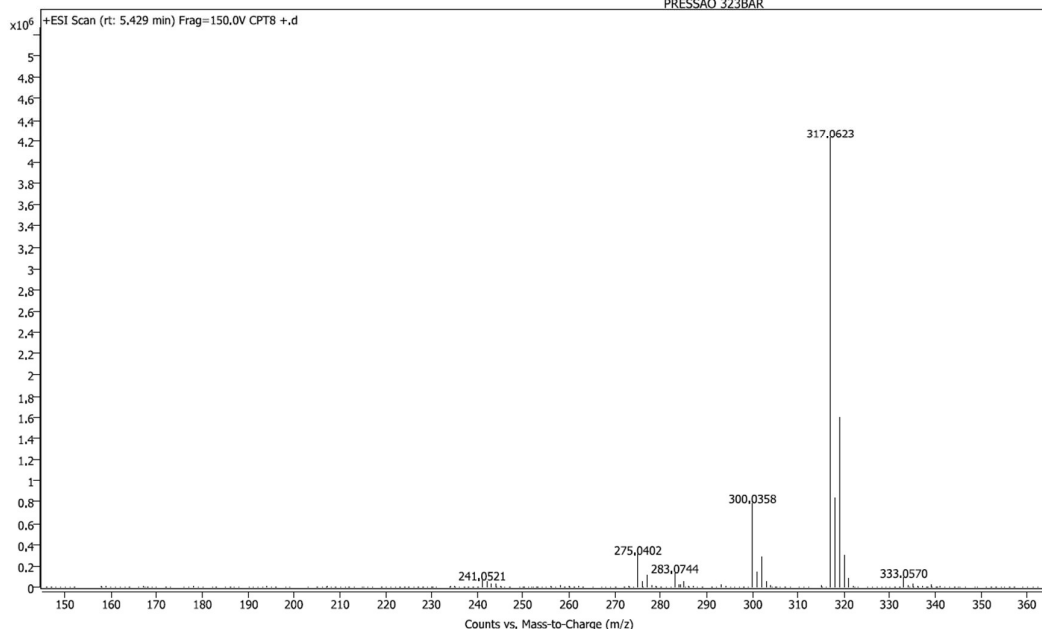


Figura A248. Espectro de HMBC de **CPT6** (código antigo CPT8).

Spectrum Plot Report



Name	CPT8 +	Rack Pos.	Instrument	QTOF-6530	Operator	SYSTEM (SYSTEM)
Inj. Vol. (ul)	3	Plate Pos.	IRM Status	Some ions missed	Acq. Time (Local)	8/22/2024 2:00:05 PM
Data File	CPT8 +.d	Method (Acq)	MSONLY+5_99 F0,6,m	ZORBAX C18 2.1X50X1.8 (PN 727700_902) PRESSAO 323BAR		(UTC-03:00)



Page 1 of 1

Generated at 11:31 AM on 8/26/2024

Figura A249. HRMS de CPT6 (código antigo CPT8).

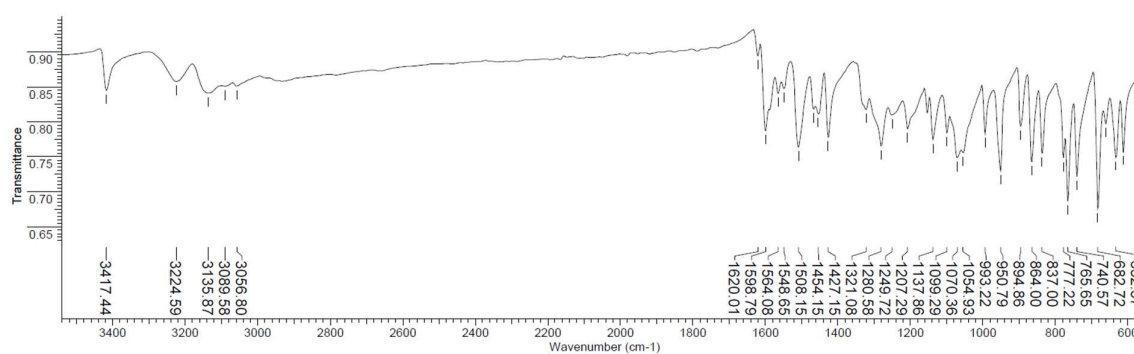


Figura A250. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CPT7 (código antigo CPT9).

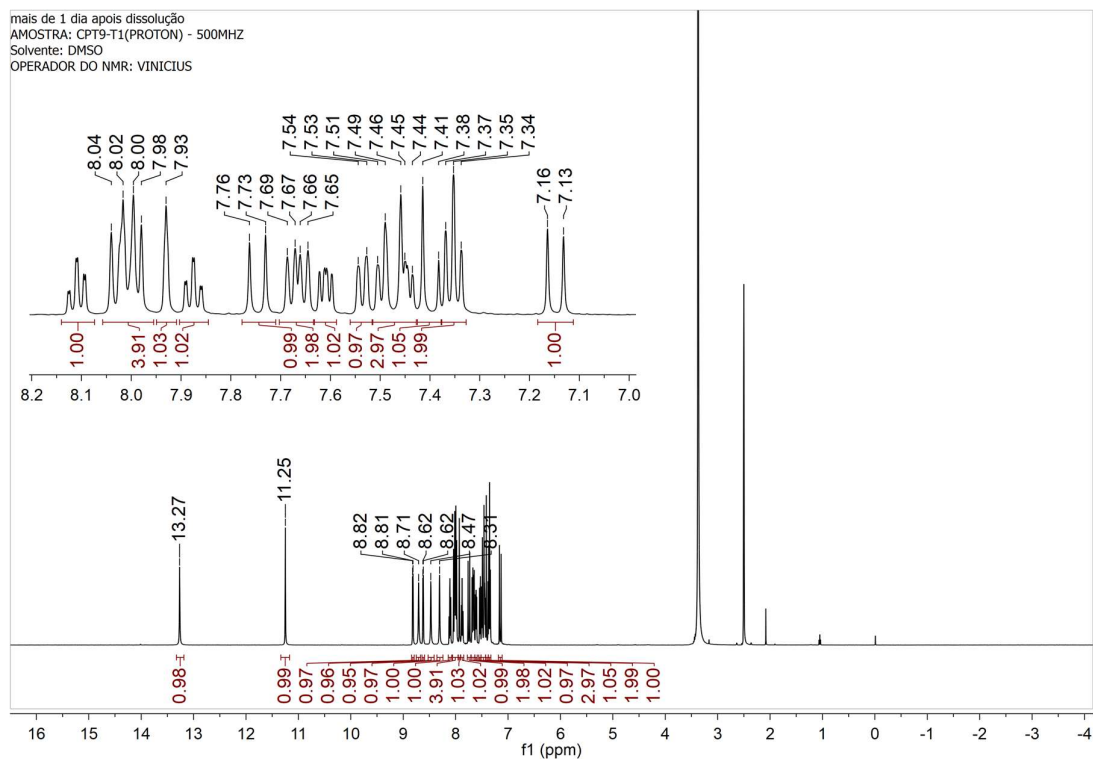


Figura A251. Espectro de RMN de ^1H de **CPT7** (código antigo CPT9).

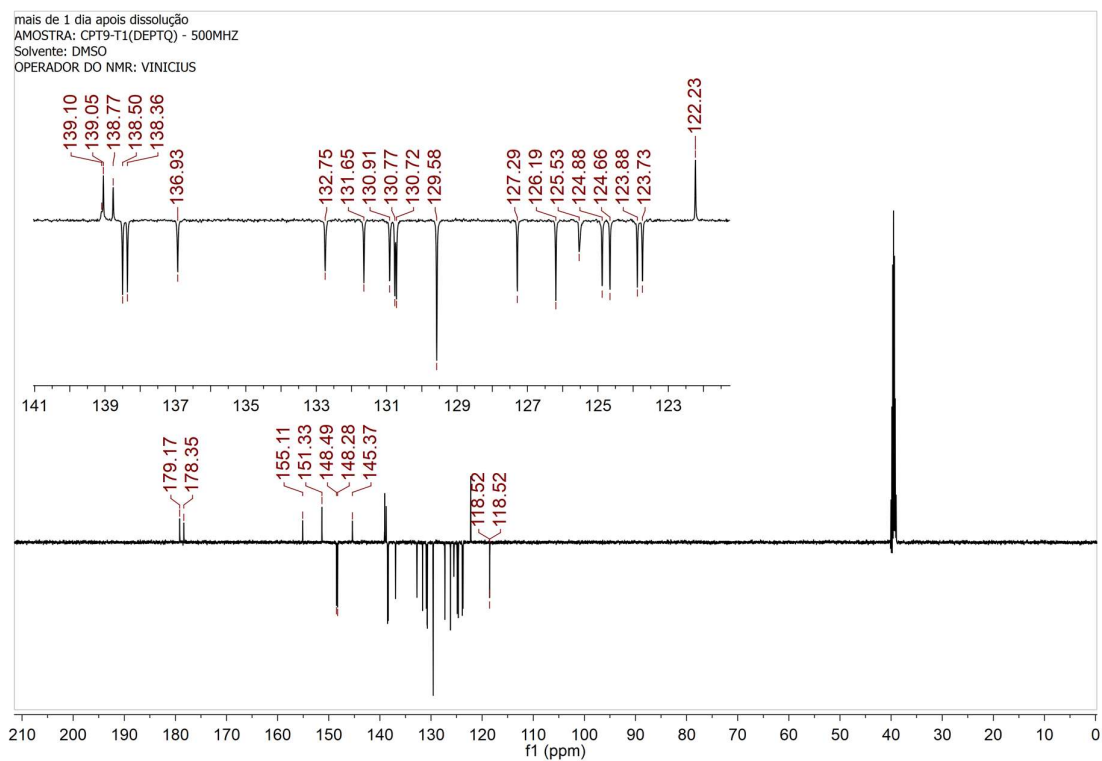


Figura A252. Espectro de RMN de ^{13}C de **CPT7** (código antigo CPT9).

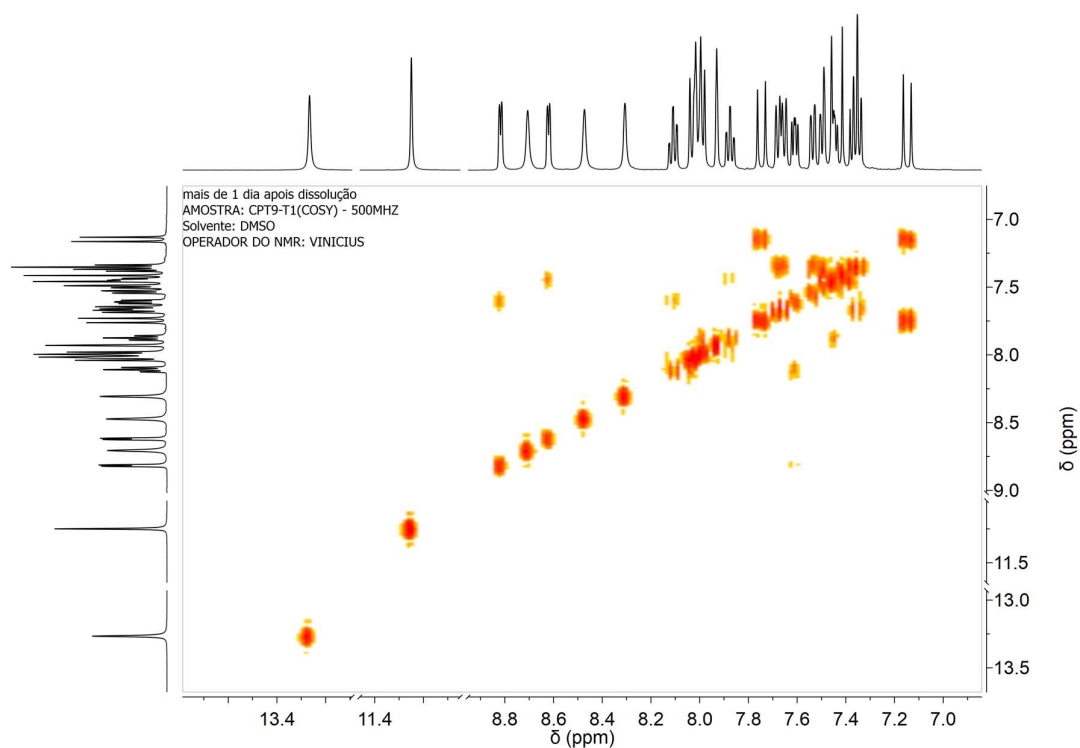


Figura A253. Espectro de COSY de **CPT7** (código antigo CPT9).

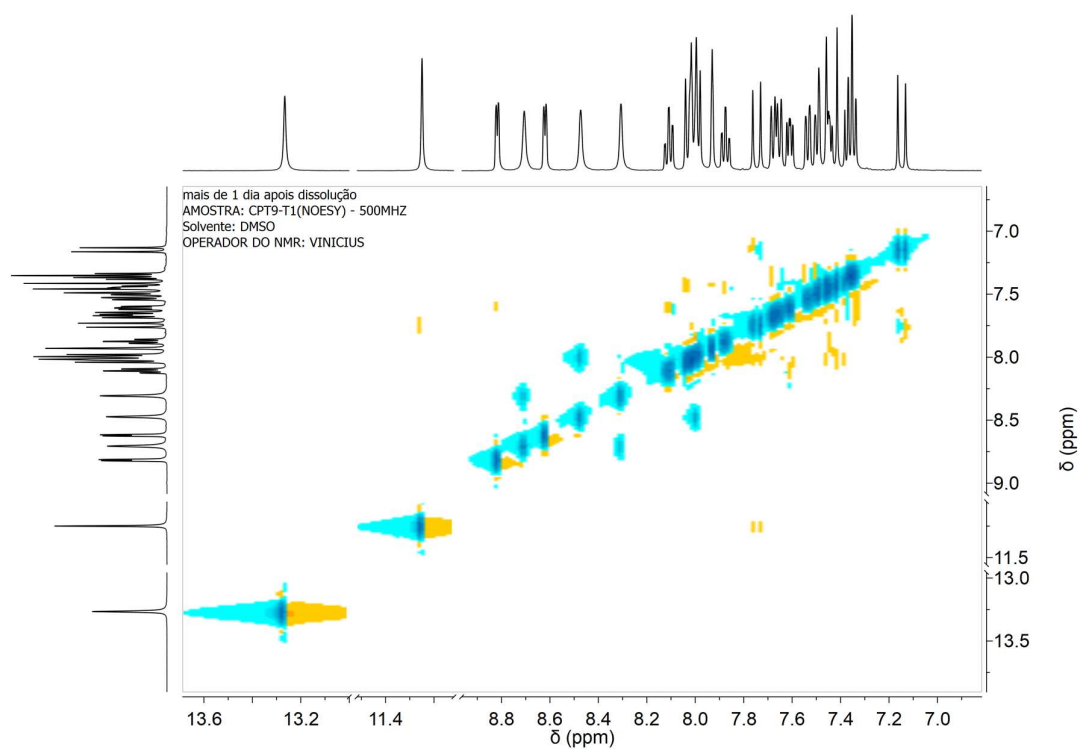


Figura A254. Espectro de NOESY de **CPT7** (código antigo CPT9).

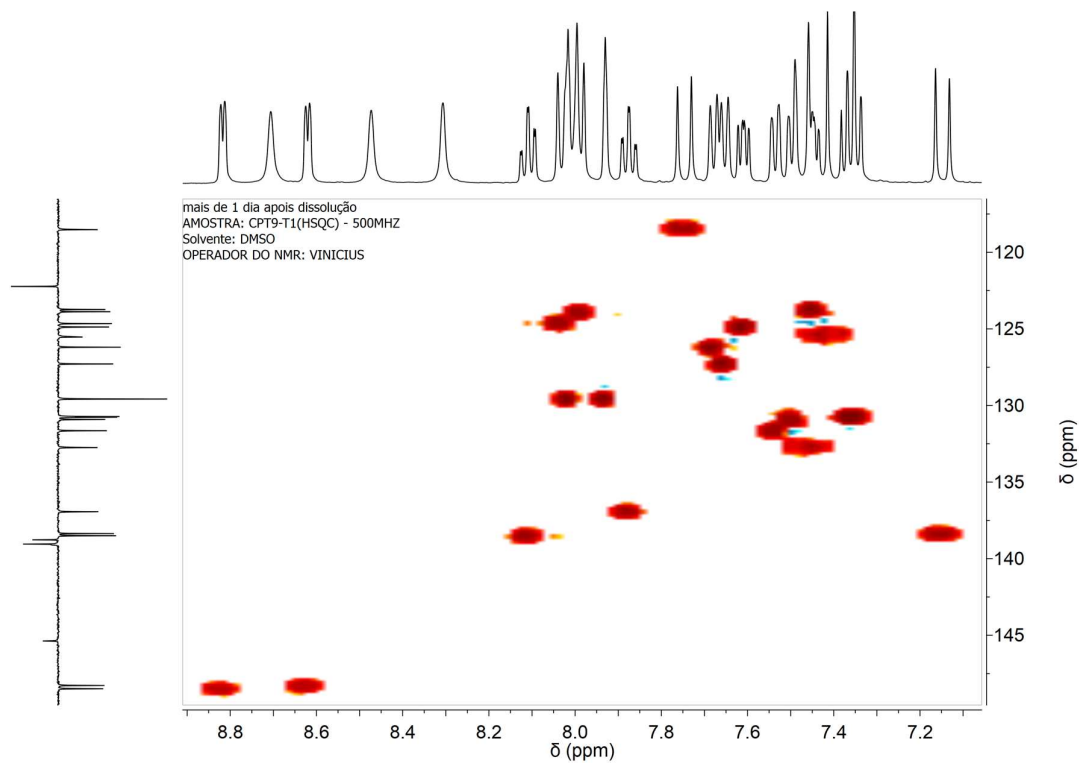


Figura A255. Espectro de HSQC de **CPT7** (código antigo CPT9).

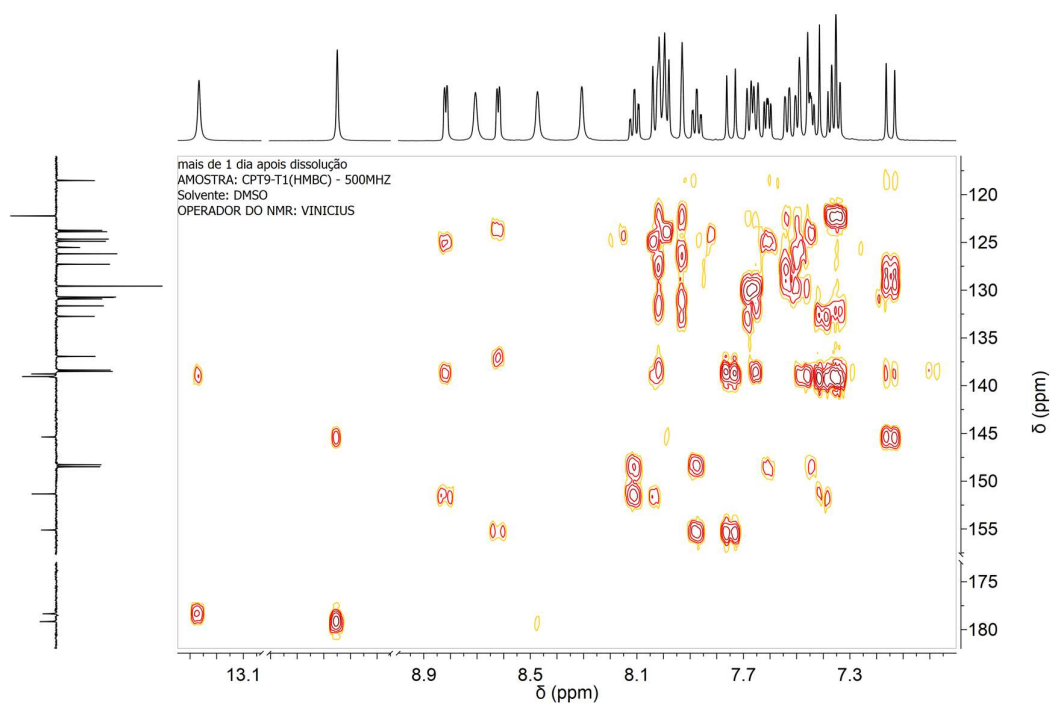


Figura A256. Espectro de HMBC de **CPT7** (código antigo CPT9).

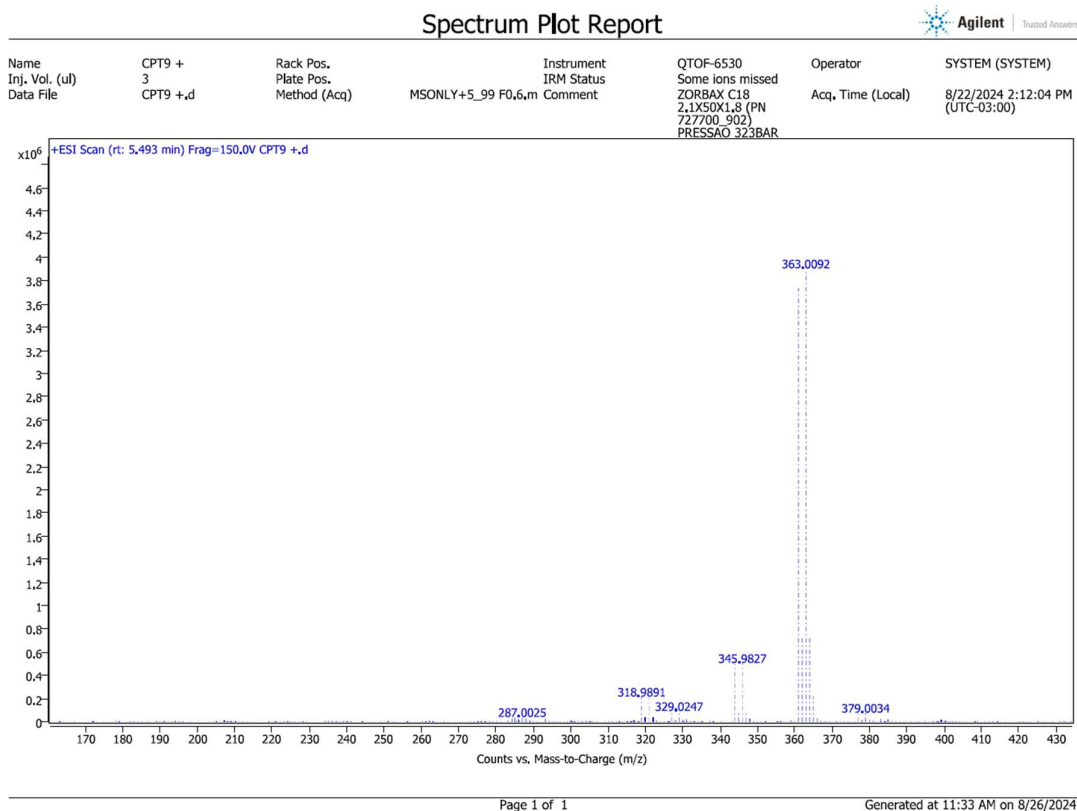


Figura A257. HRMS de CPT7 (código antigo CPT9).

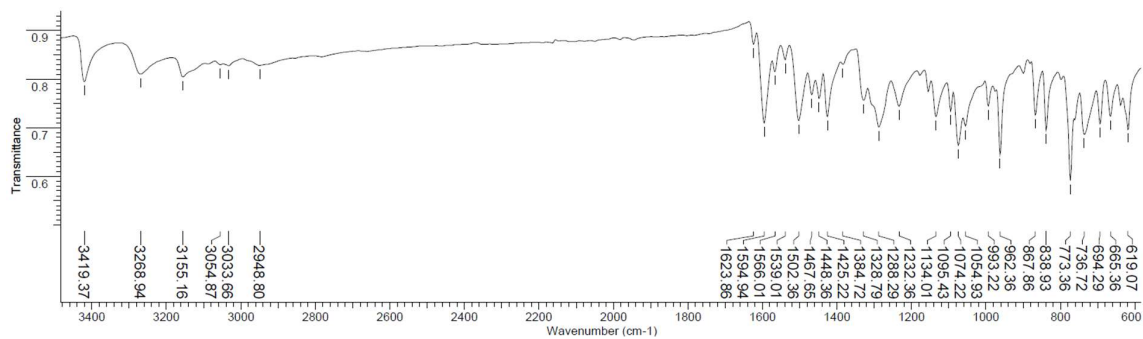


Figura A258. Espectro de infravermelho da tiossemicarbazona CPT8 (código antigo CPT10).

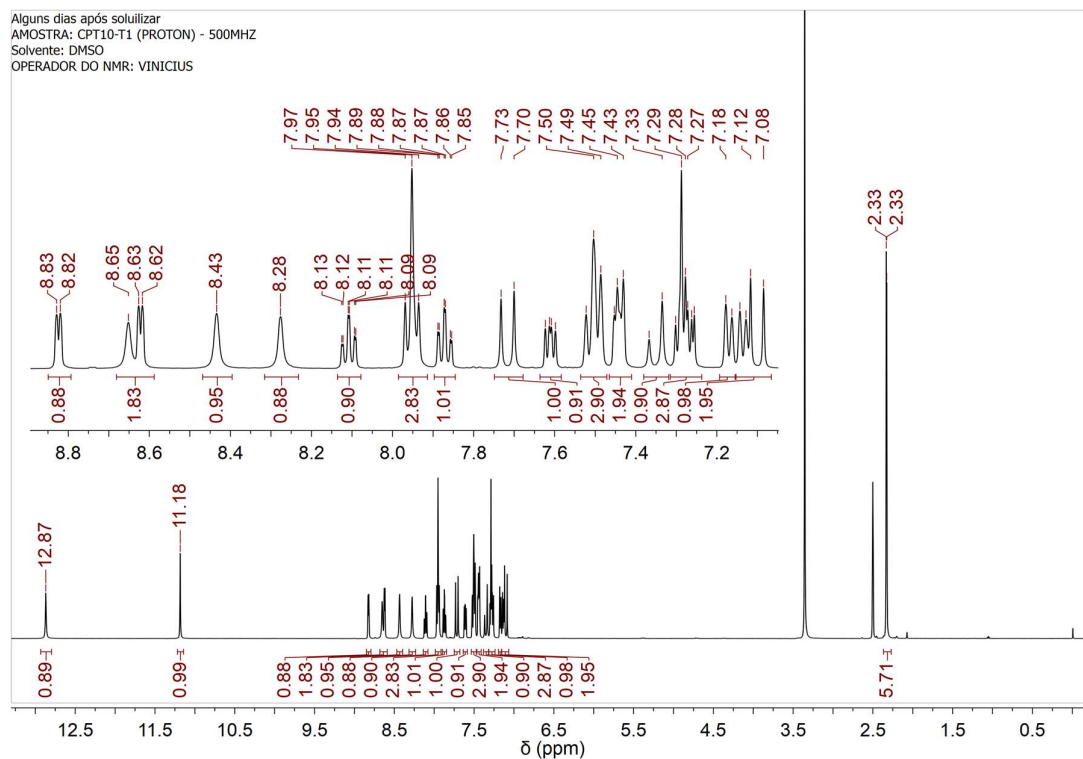


Figura A259. Espectro de RMN de ^1H de **CPT8** (código antigo CPT10).

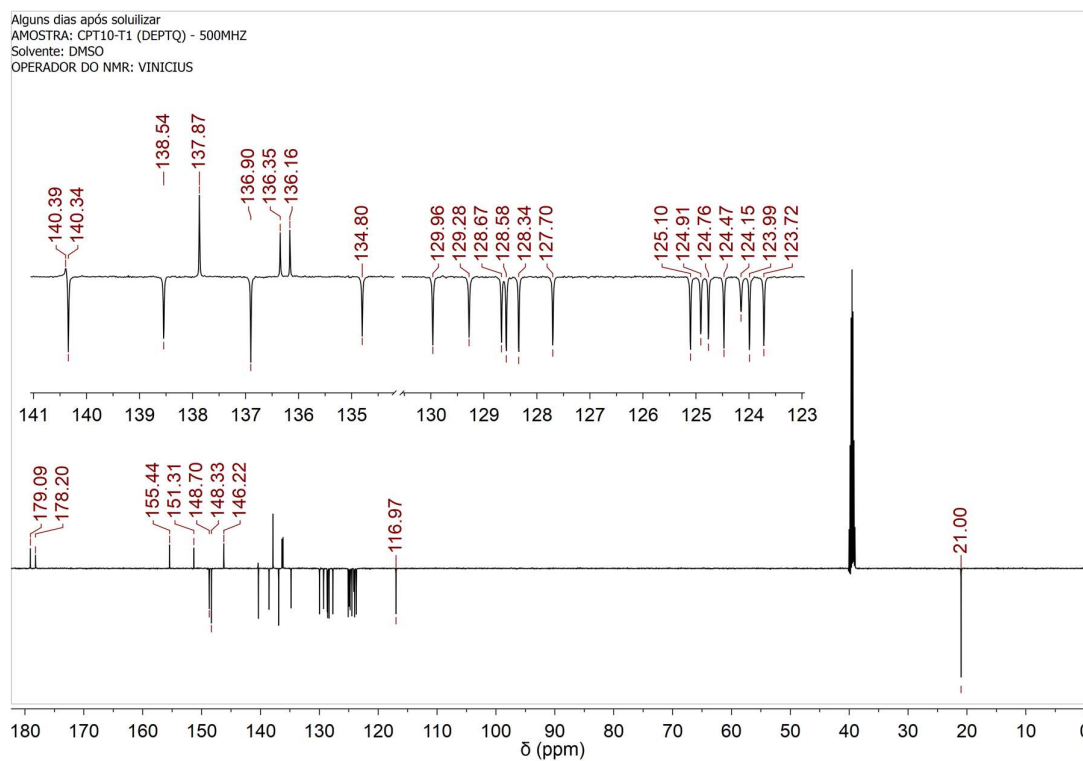


Figura A260. Espectro de RMN de ^{13}C de **CPT8** (código antigo CPT10).

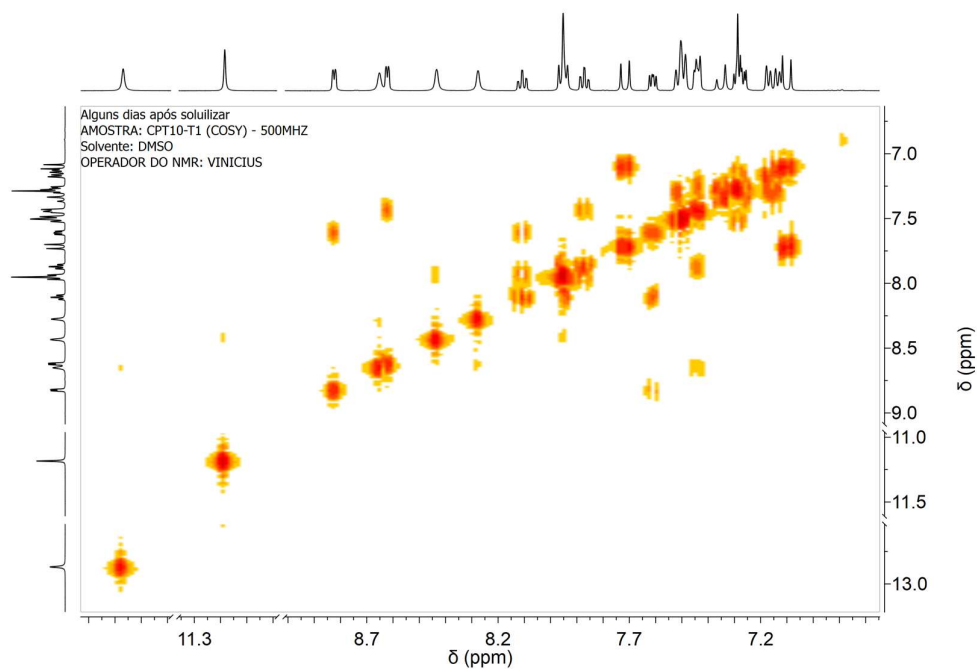


Figura A261. Espectro de COSY de **CPT8** (código antigo CPT10).

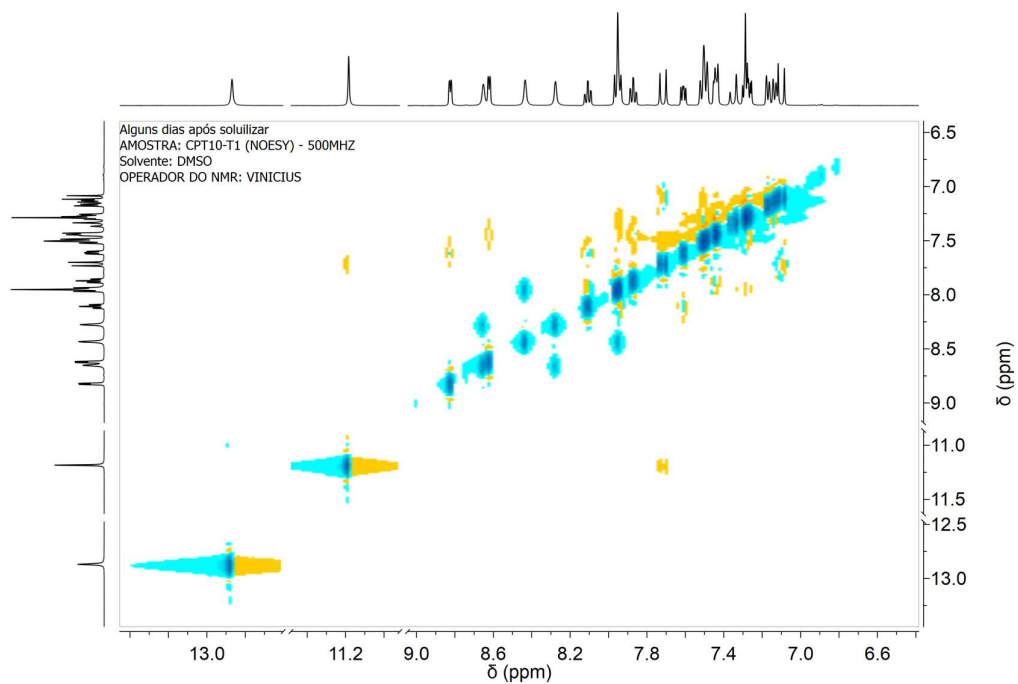


Figura A262. Espectro de NOESY de **CPT8** (código antigo CPT10).

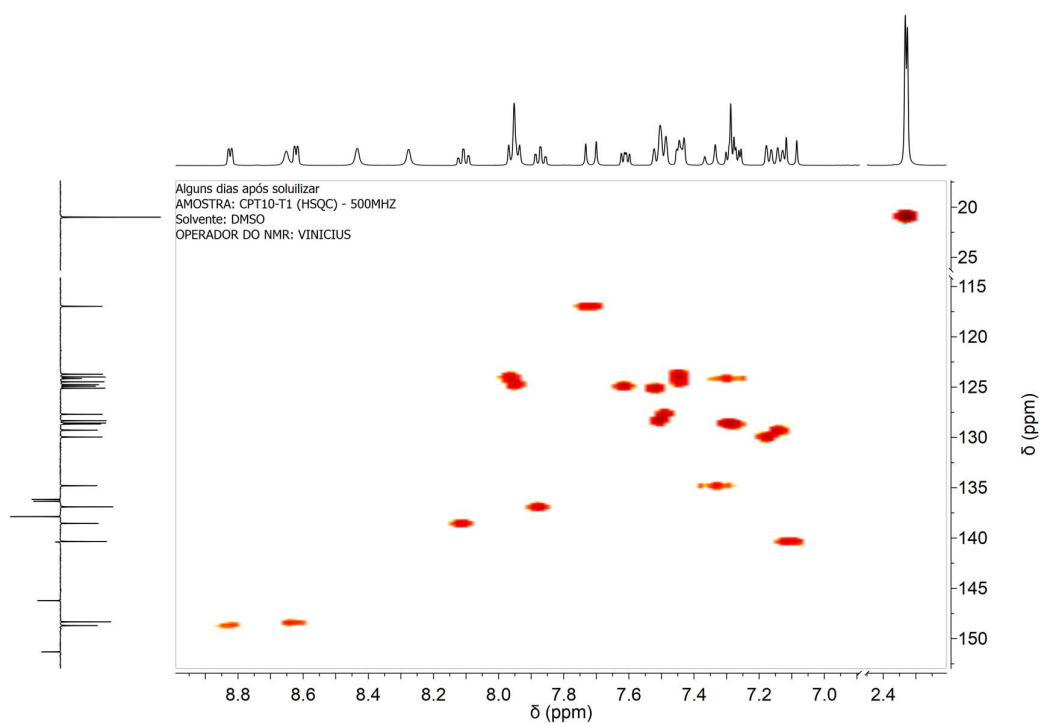


Figura A263. Espectro de HSQC de **CPT8** (código antigo CPT10).

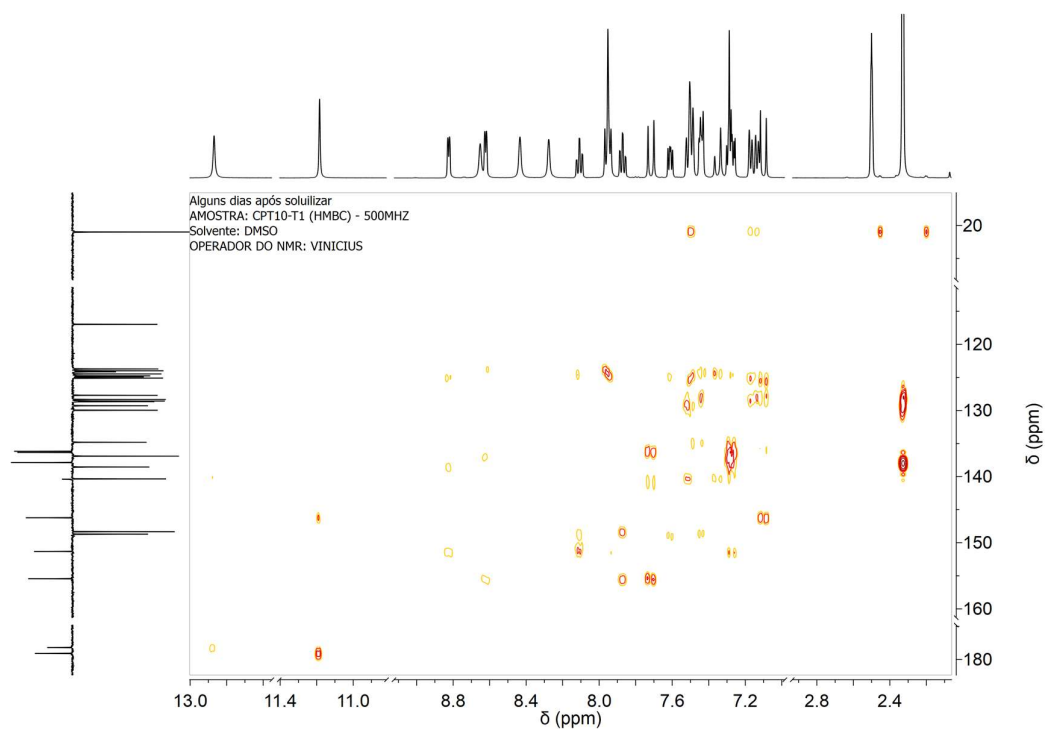


Figura A264. Espectro de HMBC de **CPT8** (código antigo CPT10).

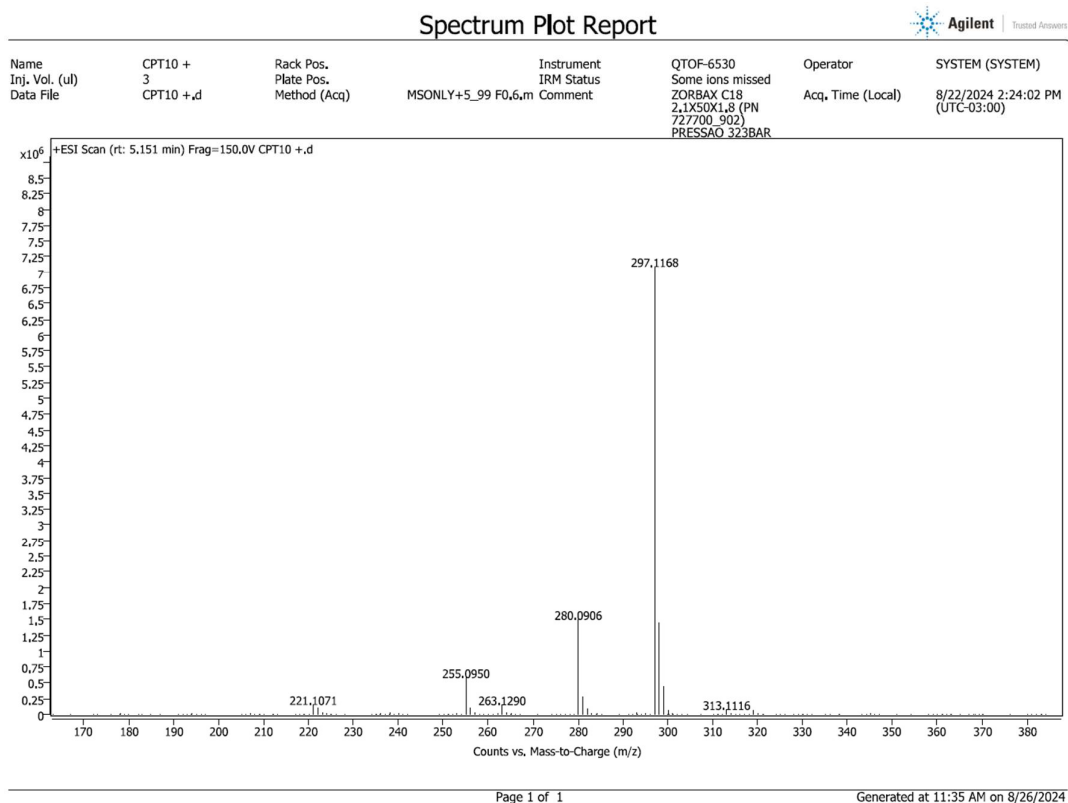


Figura A265. HRMS de CPT8 (código antigo CPT10).

- Resultados das previsões realizadas pela plataforma SwissADME para as tiossemicarbazonas

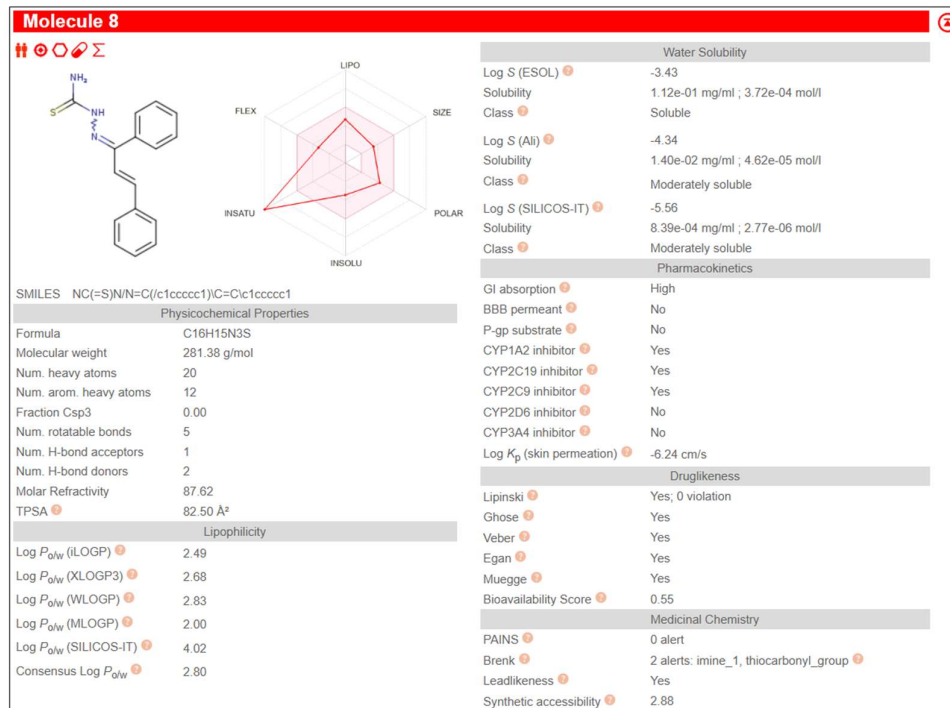


Figura A266. Resultado SwissADME (CT1).

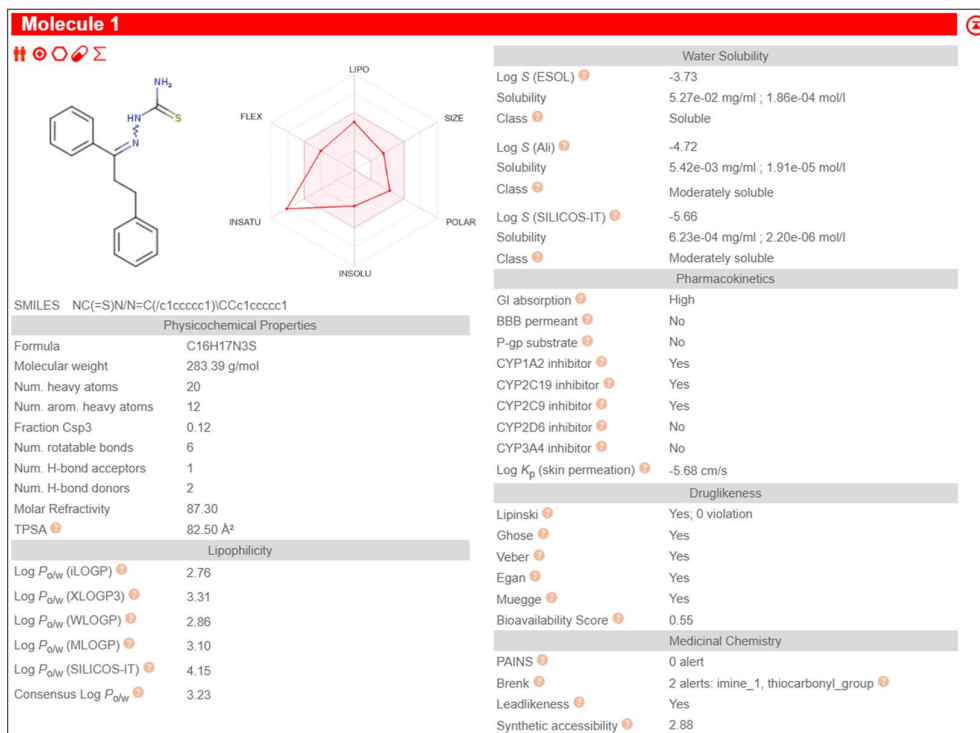


Figura A267. Resultado SwissADME (HCT1).

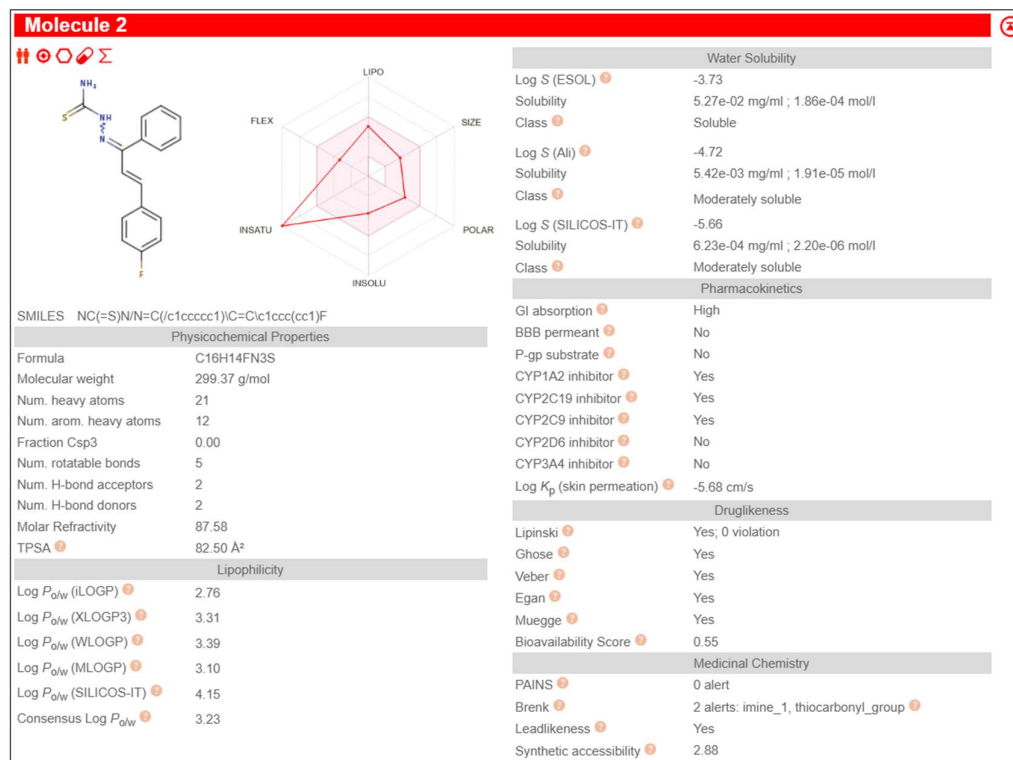


Figura A268. Resultado SwissADME (CT2).

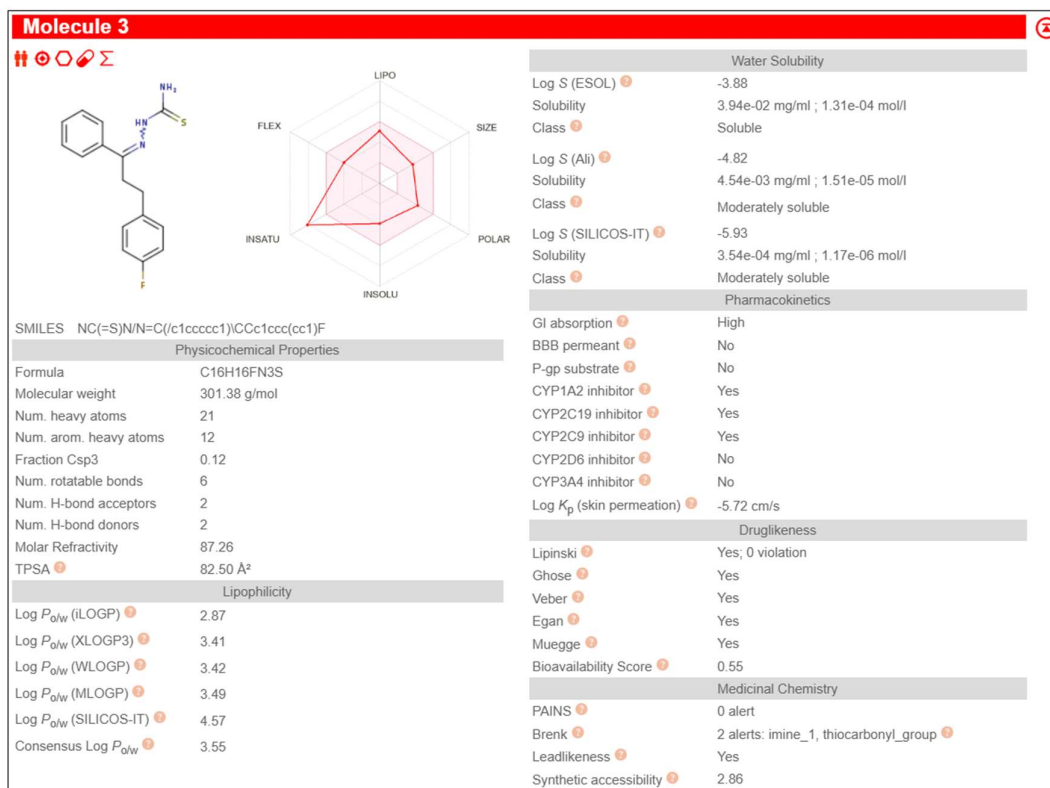


Figura A269. Resultado SwissADME (HCT2).

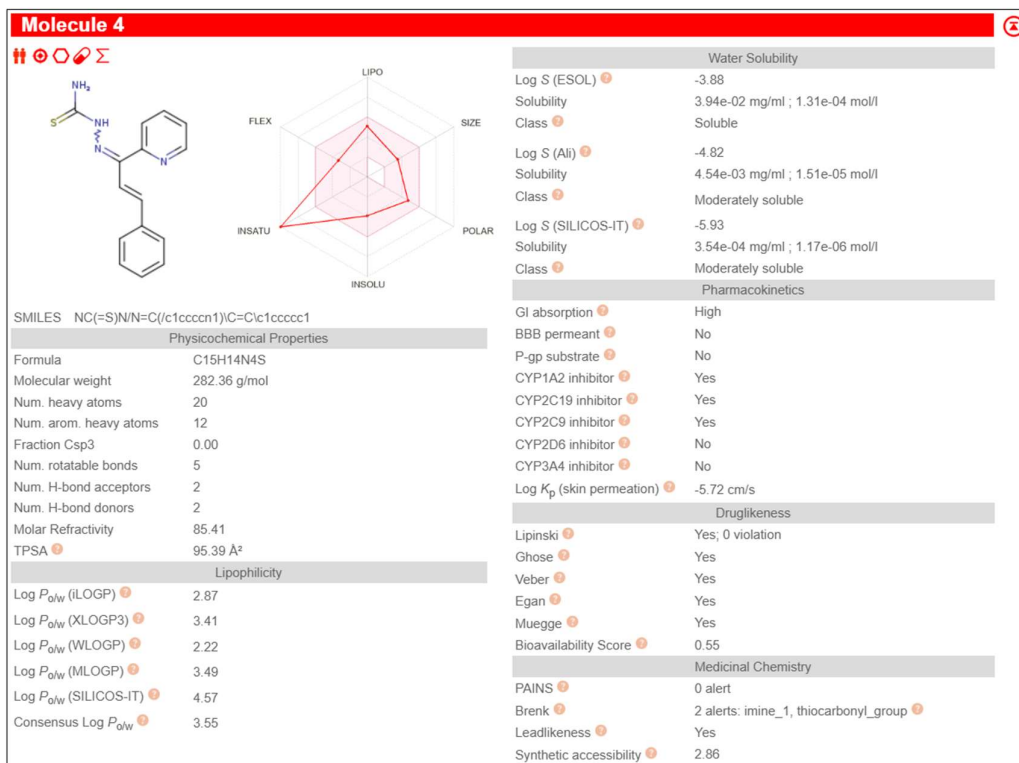


Figura A270. Resultado SwissADME (CPT1).

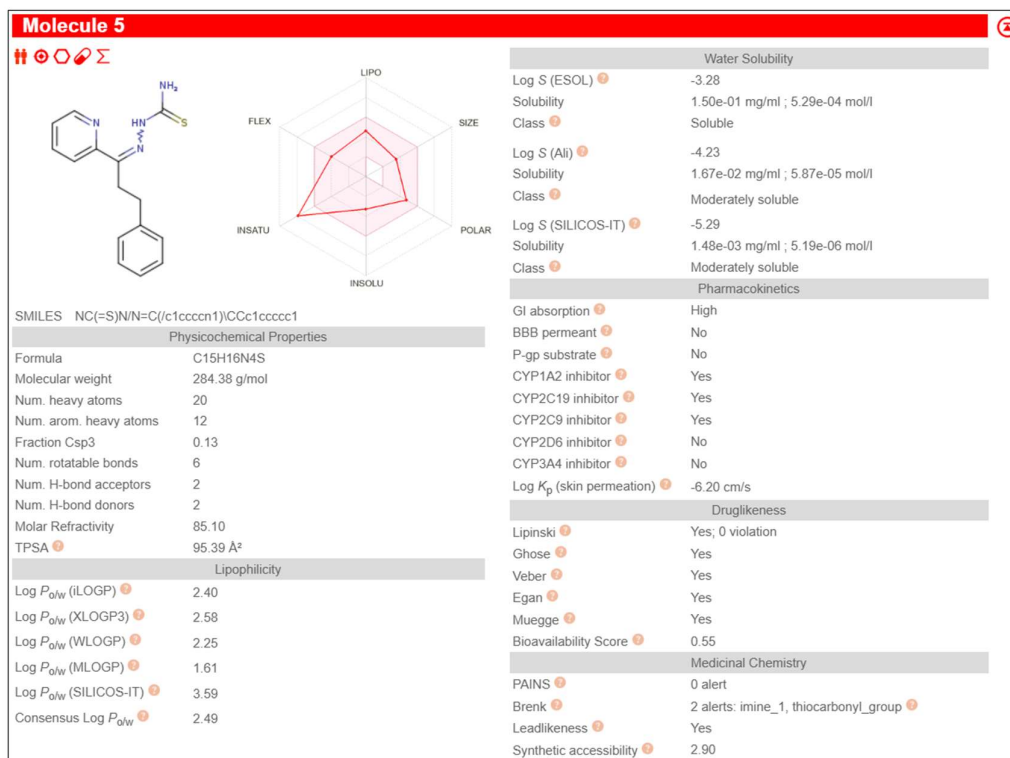


Figura A271. Resultado SwissADME (HCPT1).

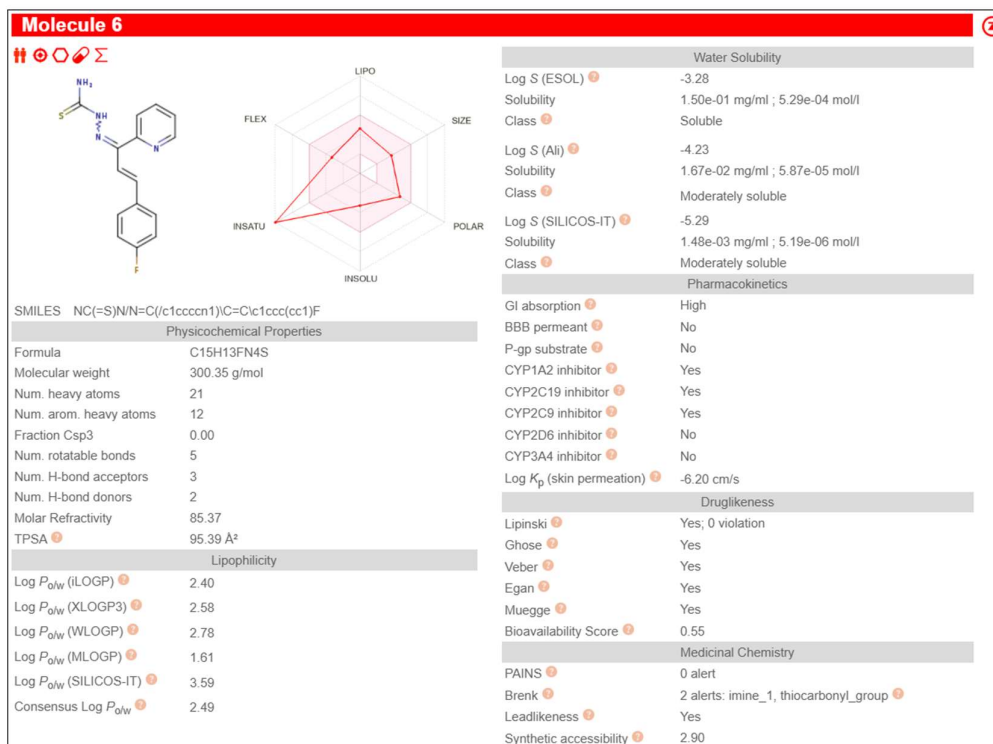


Figura A272. Resultado SwissADME (CPT2).

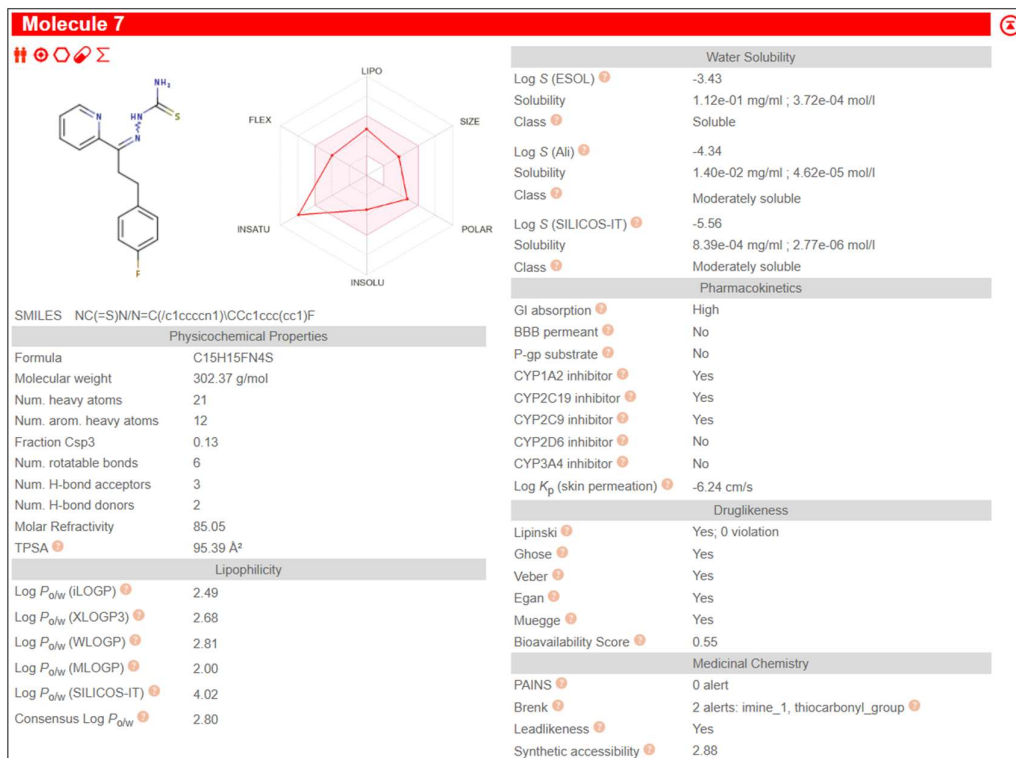


Figura A273. Resultado SwissADME (HCPT2).

- Certificado de análise do soro fetal bovino utilizado nos ensaios de citotoxicidade

gibco

Certificate of Analysis

QC Code: LTI

FBS, Qualified

Lot Number: 210635K
Item Number: 12657
Expiration Date: DEC2028
Storage Temp: <= -10C
Country of Origin: Brazil

For research use or further manufacturing use only. Serum and blood proteins are not for direct administration into humans or animals.

TEST	TEST ID	SPECIFICATION	RESULT	UNITS
Albumin	ELECTR0029	1.70 - 3.50	2.33	g/100ml
Alpha Globulin	ELECTR0030	0.70 - 2.00	1.49	g/100ml
Appearance (Liquid)	SOLAPP0066	Satisfactory	Satisfactory	
Bacterial	STERI0024	Negative	Negative	
Beta Globulin	ELECTR0032	0.30 - 0.90	0.34	g/100ml
BVD	VIRUS0159	Tested	Tested	
Diploid Growth	HDFG0001	0.70 - 1.40	0.95	
Documentation	DOC0014	Satisfactory	Satisfactory	
Electro Profile	ELECTR0035	Typical	Typical	
Endotoxin	ENDO0068	0.000 - 50	<=0.0400	EU/mL
Fungal	STERI0027	Negative	Negative	
Gamma Globulin	ELECTR0034	10.00 - 200.00	196.92	ug/ml
Haemoglobin	HAEMO0023	1.00 - 30.00	14.94	mg/100ml
IBR	VIRUS0161	Negative	Negative	
Mycoplasma	MYCO0026	Negative	Negative	
Osmolality	OSMO0025	280 - 340	303.00	mOsm/kg H2O
pH	PH0037	6.90 - 7.80	7.34	pH Units
PI3	VIRUS0160	Negative	Negative	
Relative Cloning Efficiency	CLON0003	0.70 - 1.40	1.00	
Relative Myeloma/Hybridoma	CCMISC0021	0.70 - 1.40	1.10	
Relative Plating Efficiency	PLATE0006	0.70 - 1.40	1.00	
Total Protein	PROTEI0035	3.50 - 5.50	4.16	g/100ml
Toxicity	CYTOX0008	Satisfactory	Satisfactory	

Product Size Catalogue Numbers: 100ml = 12657011; 500ml = 12657029

M. Rodger

Quality Systems Department Date: 09-Feb-2024

References

- DOC0014: BMR review carried out - Test Reference

- Ftalazinonas

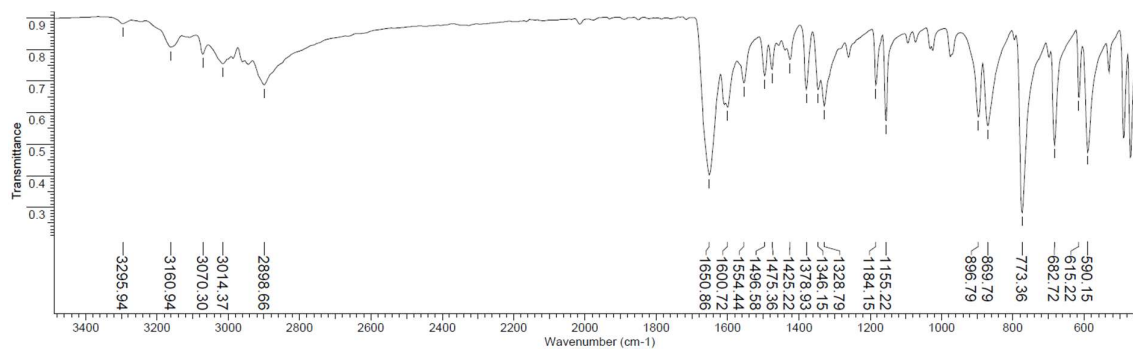


Figura A274. Espectro de infravermelho de A2

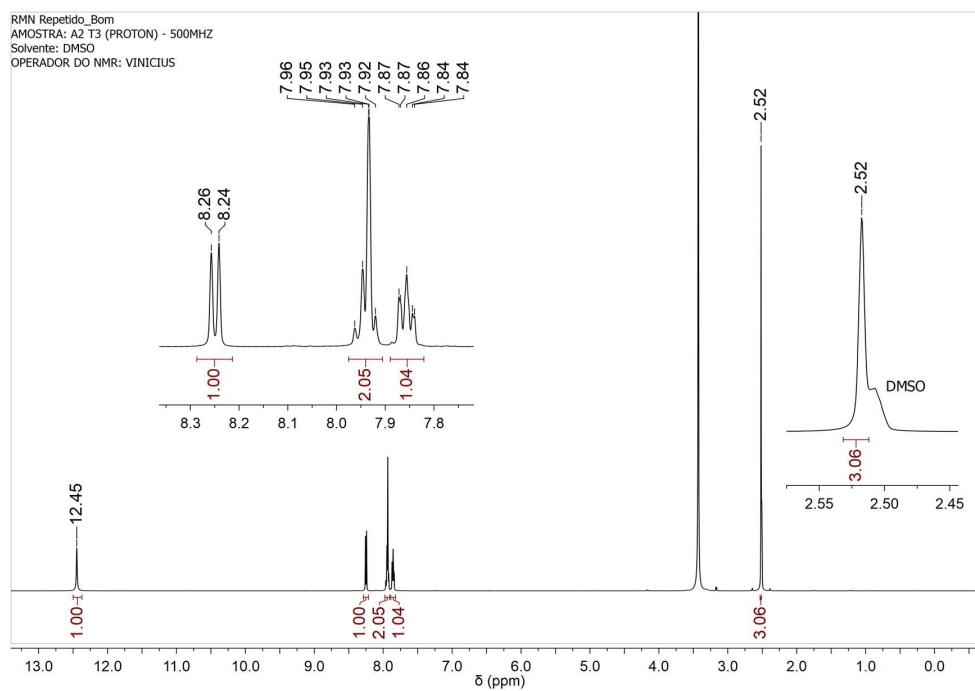


Figura A275. RMN de ^1H (A2)

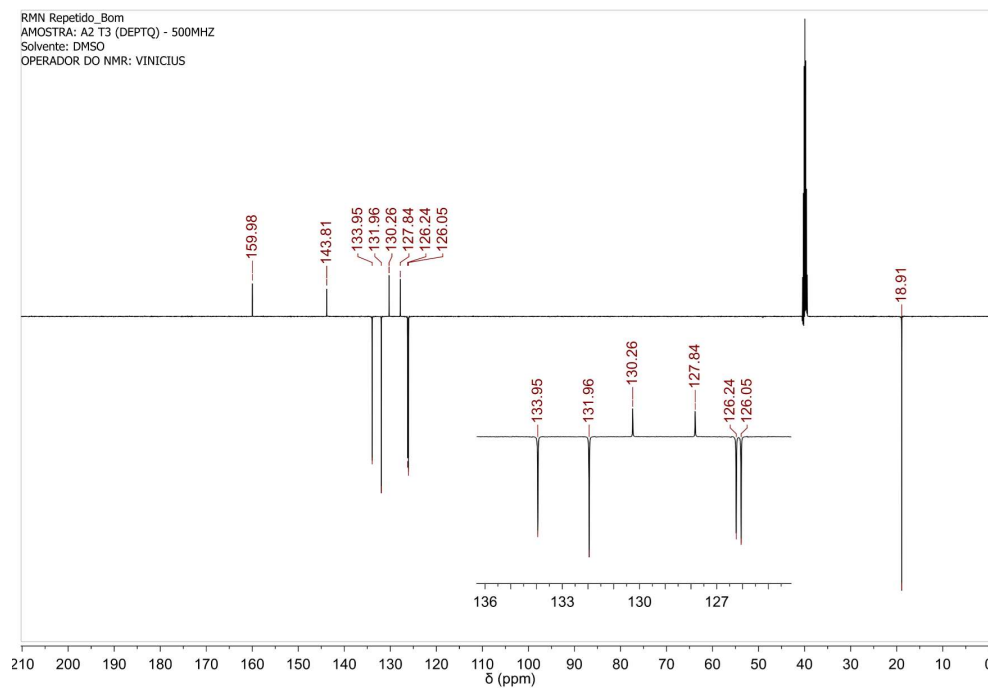


Figura A276. RMN de ^{13}C (A2)

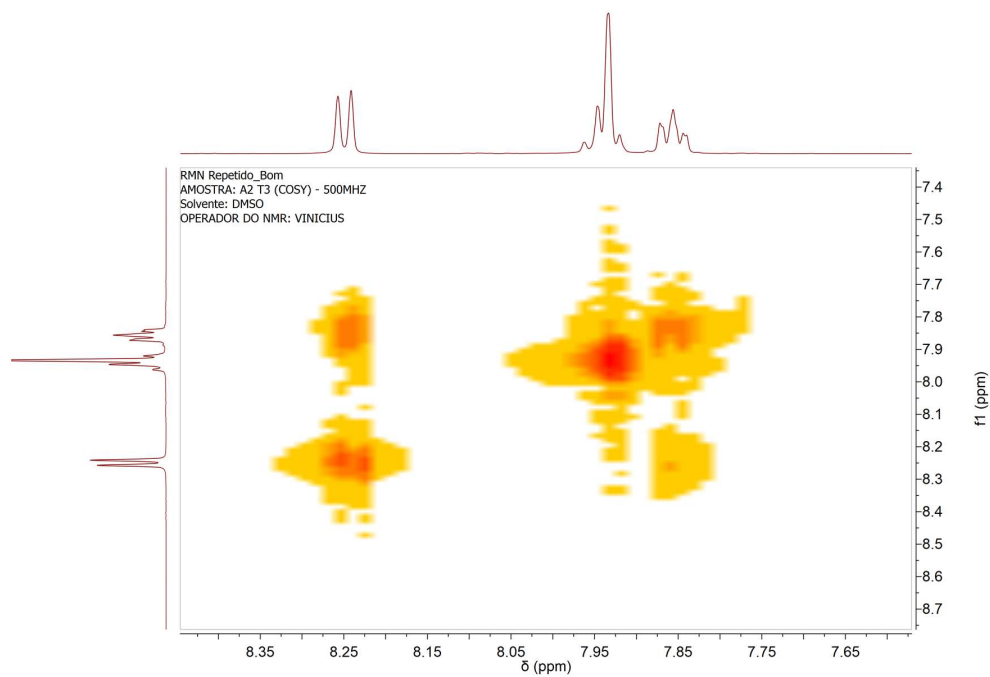


Figura A277. Espectro de COSY (A2).

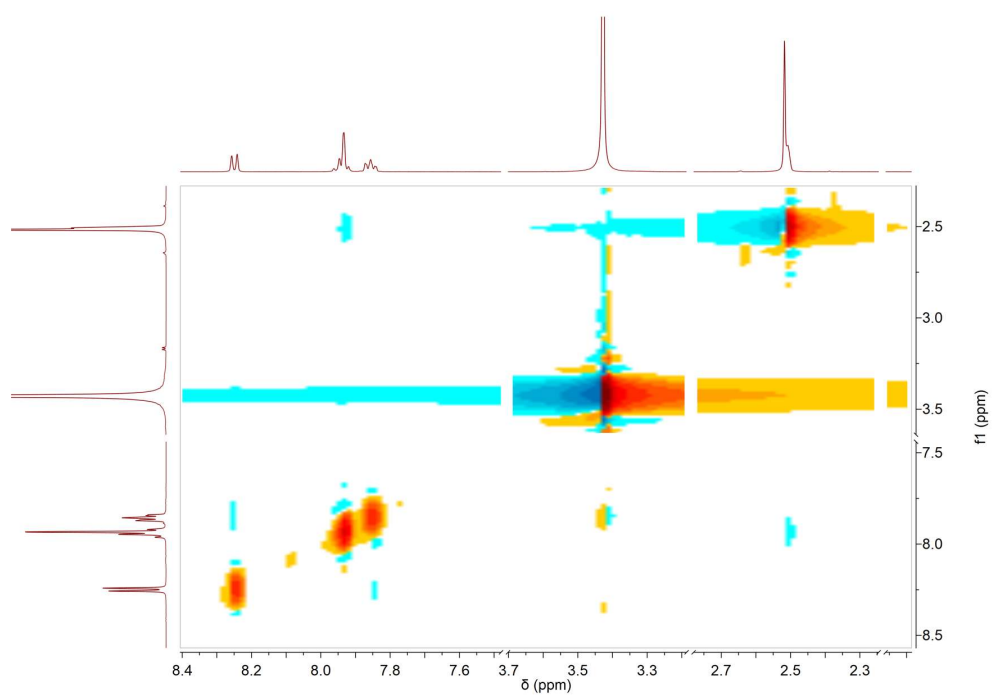


Figura A278. Espectro de NOESY (A2)

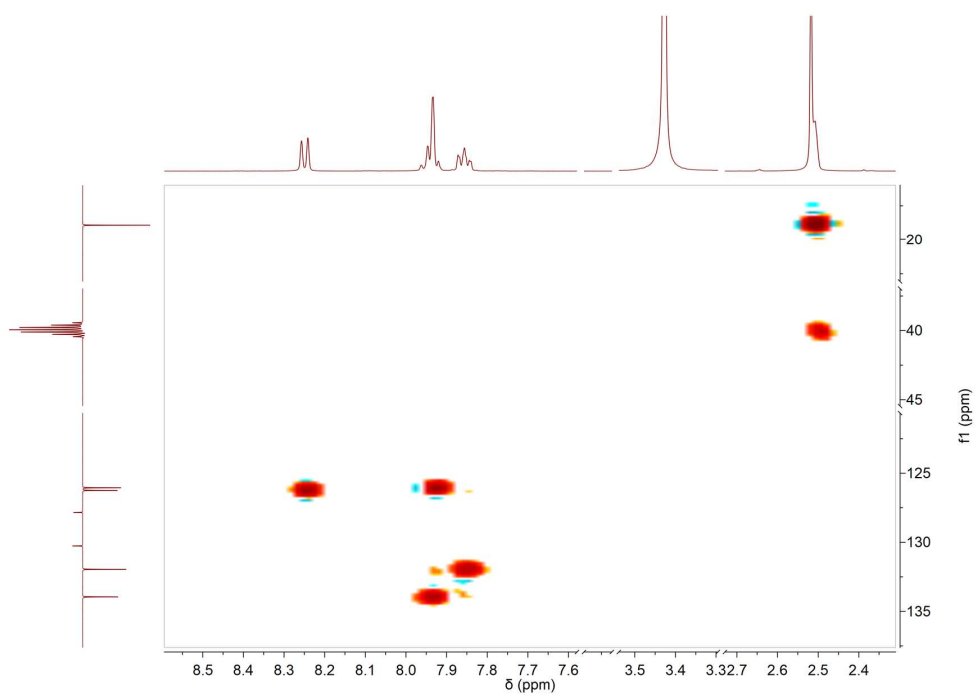


Figura A279. Espectro de HSQC (A2)

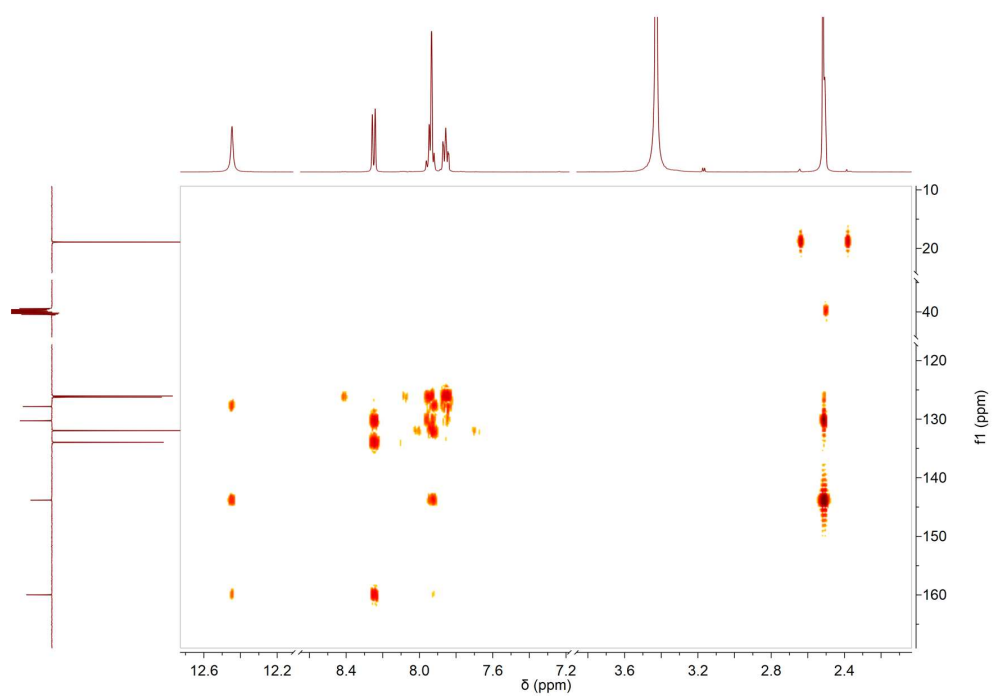


Figura A280. Espectro de HMBC (A2)

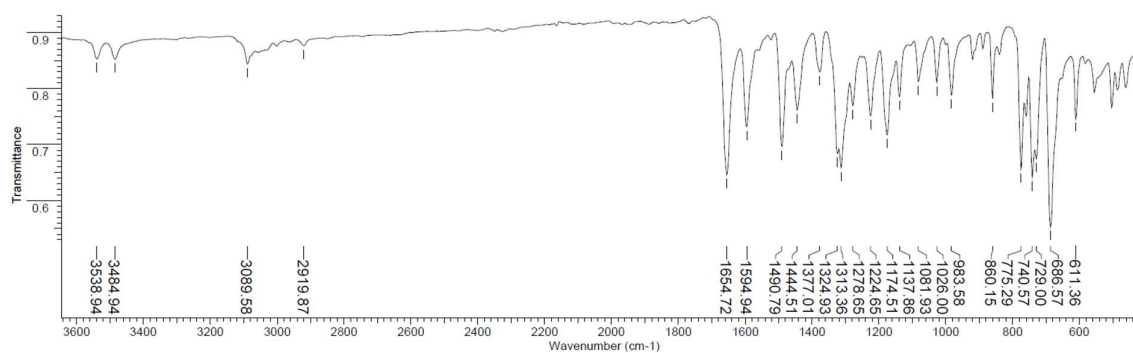


Figura A281. Espectro de IV do A3

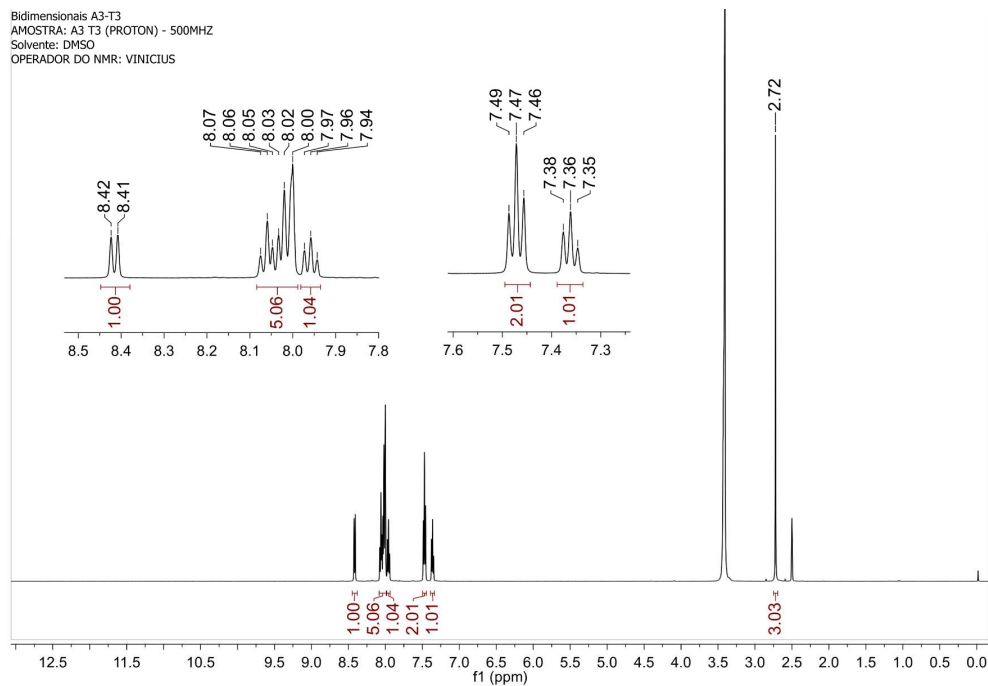


Figura A282. Espectro de RMN de ^1H (A3)

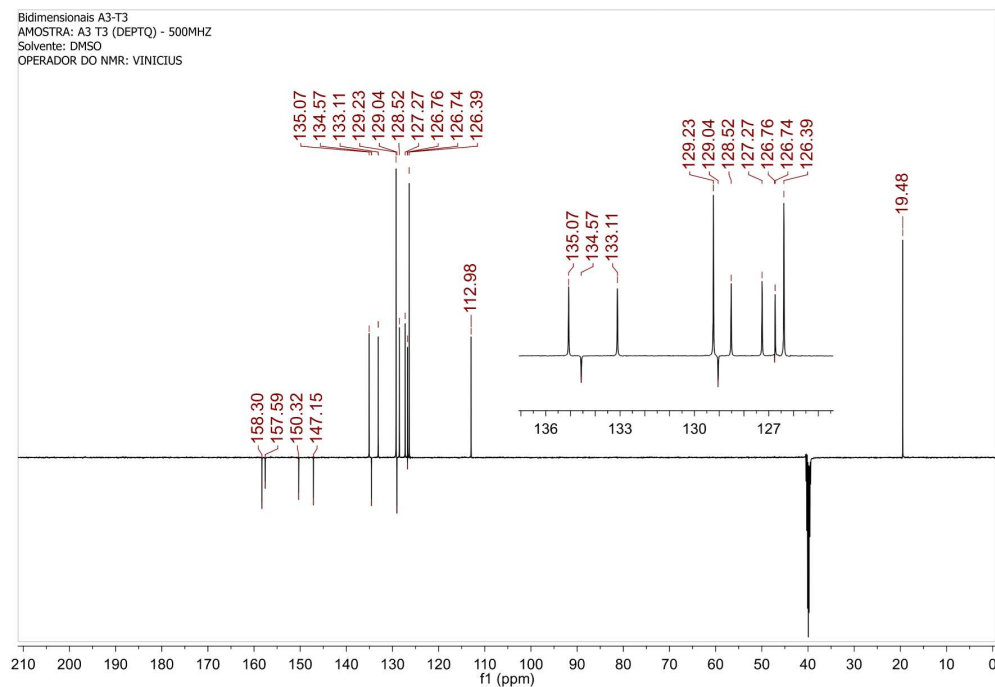


Figura A283. Espectro de RMN de ^{13}C (A3)

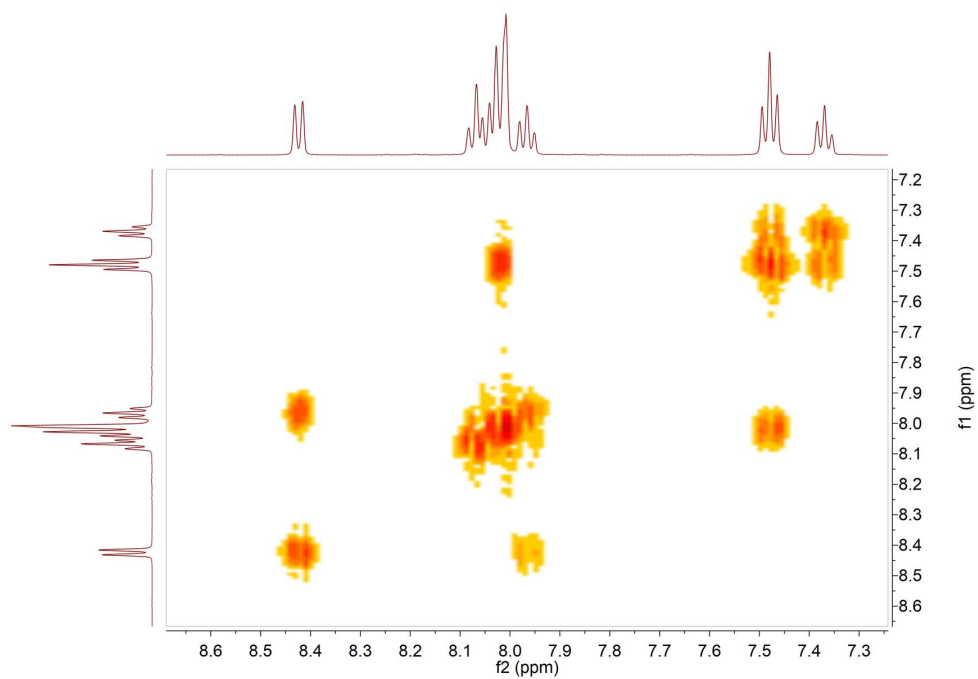


Figura A284. Espectro de COSY (A3)

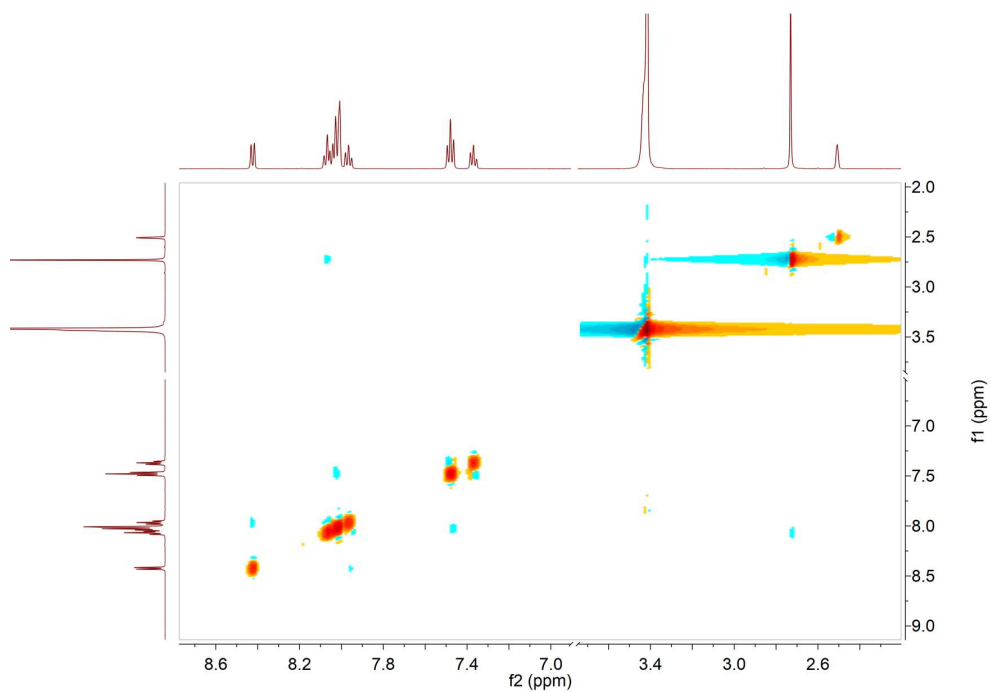


Figura A285. Espectro de NOESY (A3)

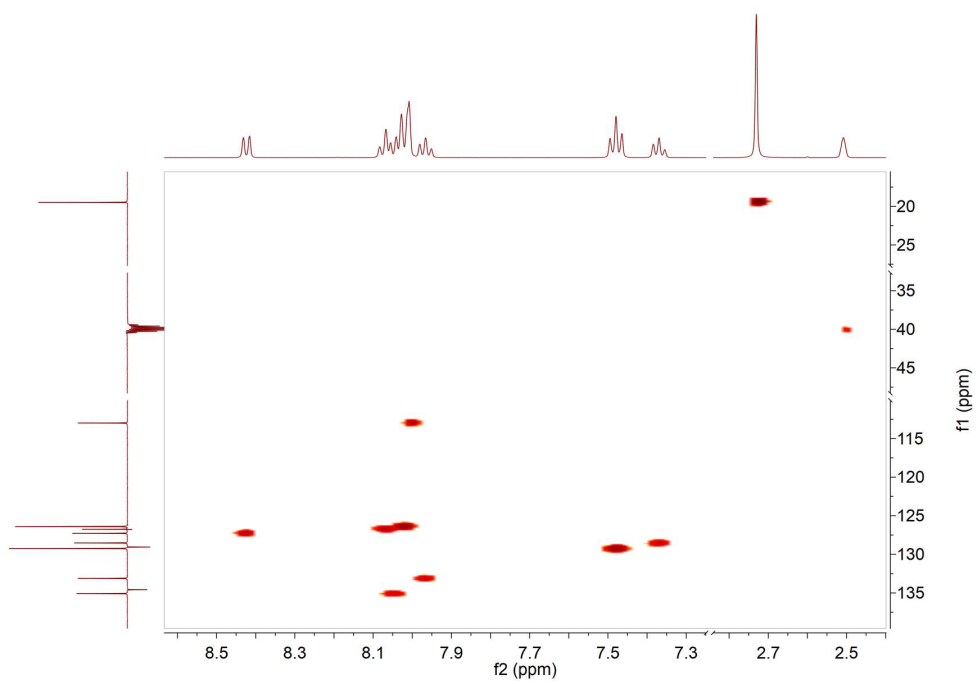


Figura A286. Espectro de HSQC (A3)

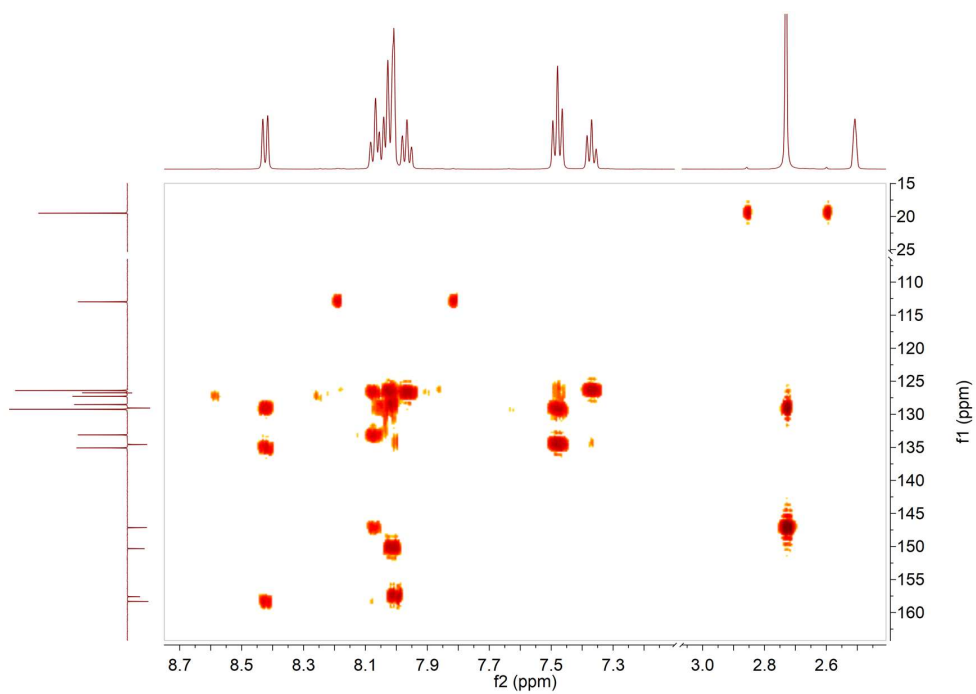


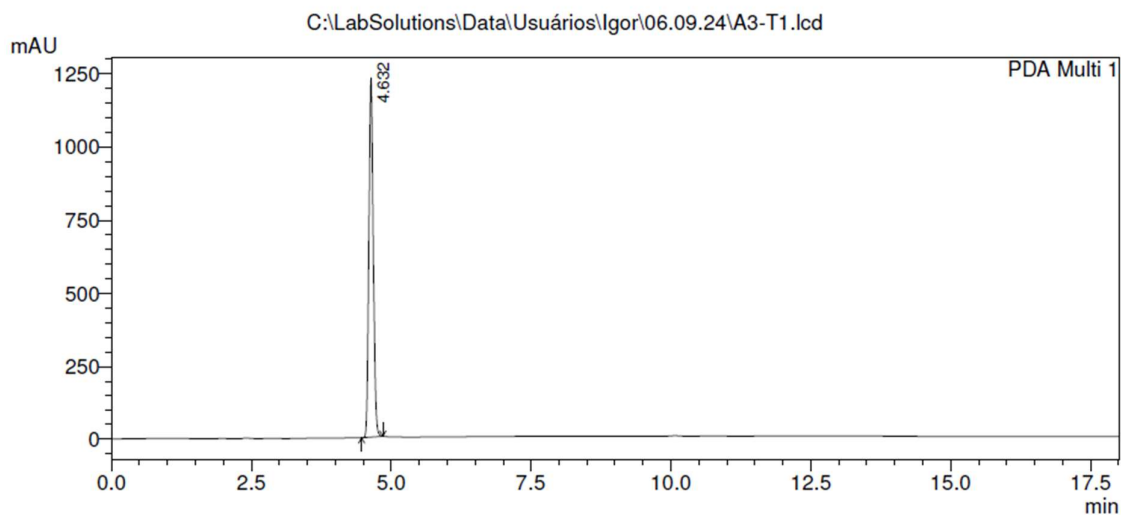
Figura A287. Espectro de HMBC (A3)

Detector DAD SPD-M20A, forno CTO-20A
 Coluna Betasil C18 (25cm x 4,6mm x 5um)- Thermo
 Método Heterociclos gradiente MEOH
 Solvente: B:MEOH (90%)_1% ACOH (10%)

Time (min)	Event	B.Conc	A.Conc
5.00	Pumps	90	10
10.00	Pumps	97	3
12.00	Pumps	97	3
17.00	Pumps	97	3
18.00	Controller	Stop	80

Fluxo 1,0mL/min- Volume 10Ul - pressão= 110gf/c
 Temperatura= 26C
 PDA=200-600nm (280) -15min

Data Acquired : 6/9/2024 07:15:54



PeakTable			
Ch1 254nm 4nm			
Peak#	Ret. Time	Area %	Height %
1	4.632	100.000	100.000
Total		100.000	100.000

Figura A288. Cromatograma obtido na análise de HPLC de A3.

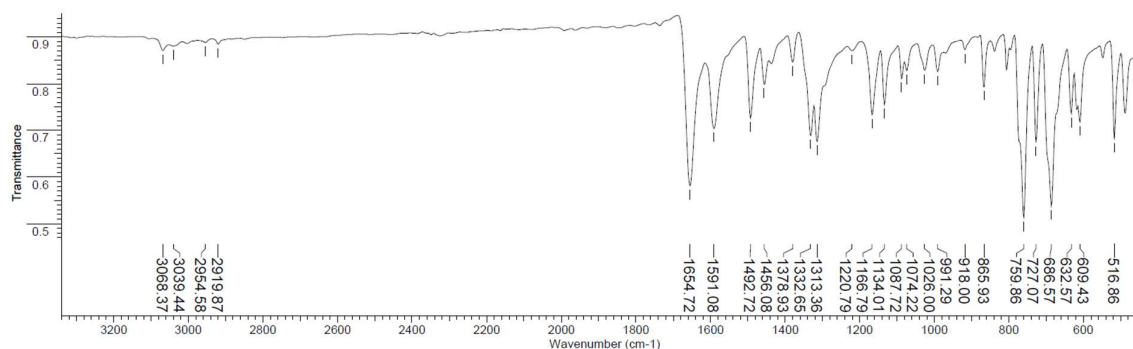


Figura A289. Espectro de IV do A4

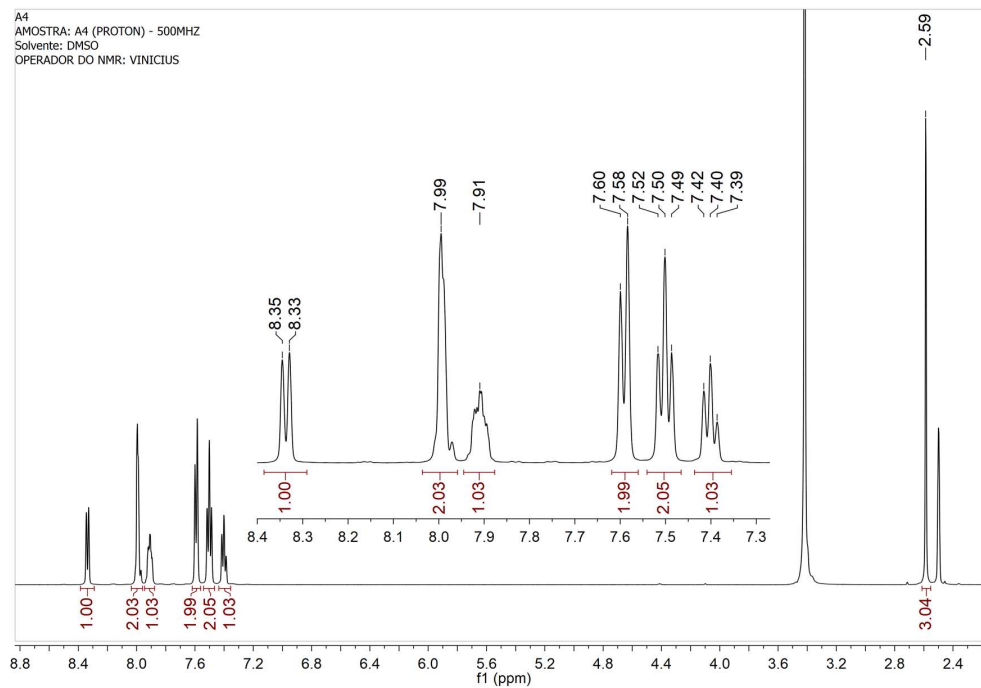


Figura A290. Espectro de RMN de ^1H (A4)

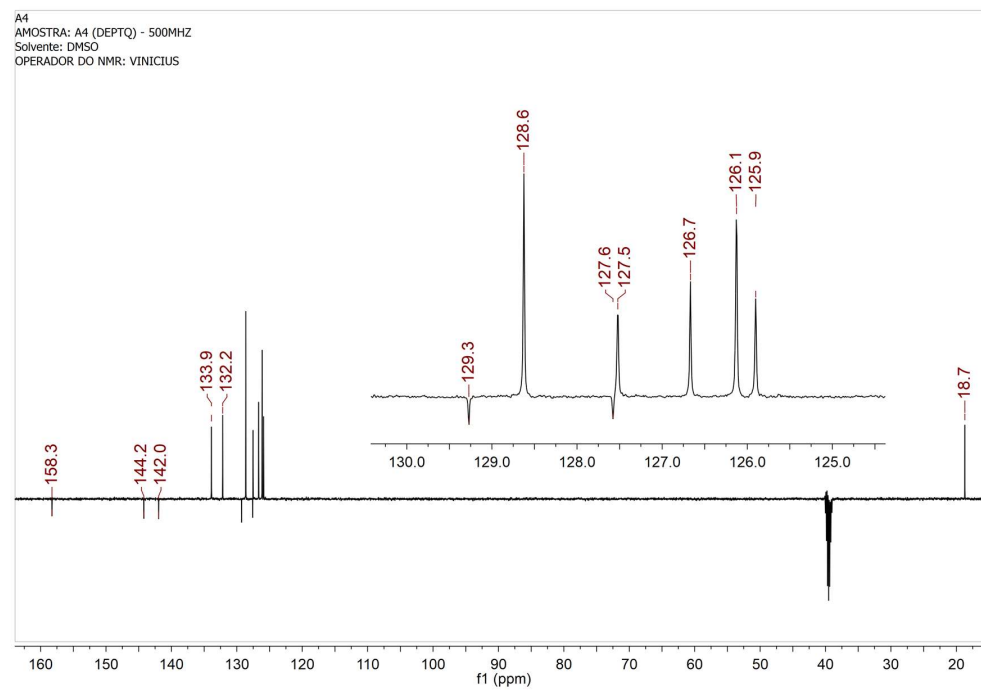


Figura A291. Espectro de RMN de ^{13}C (A4)

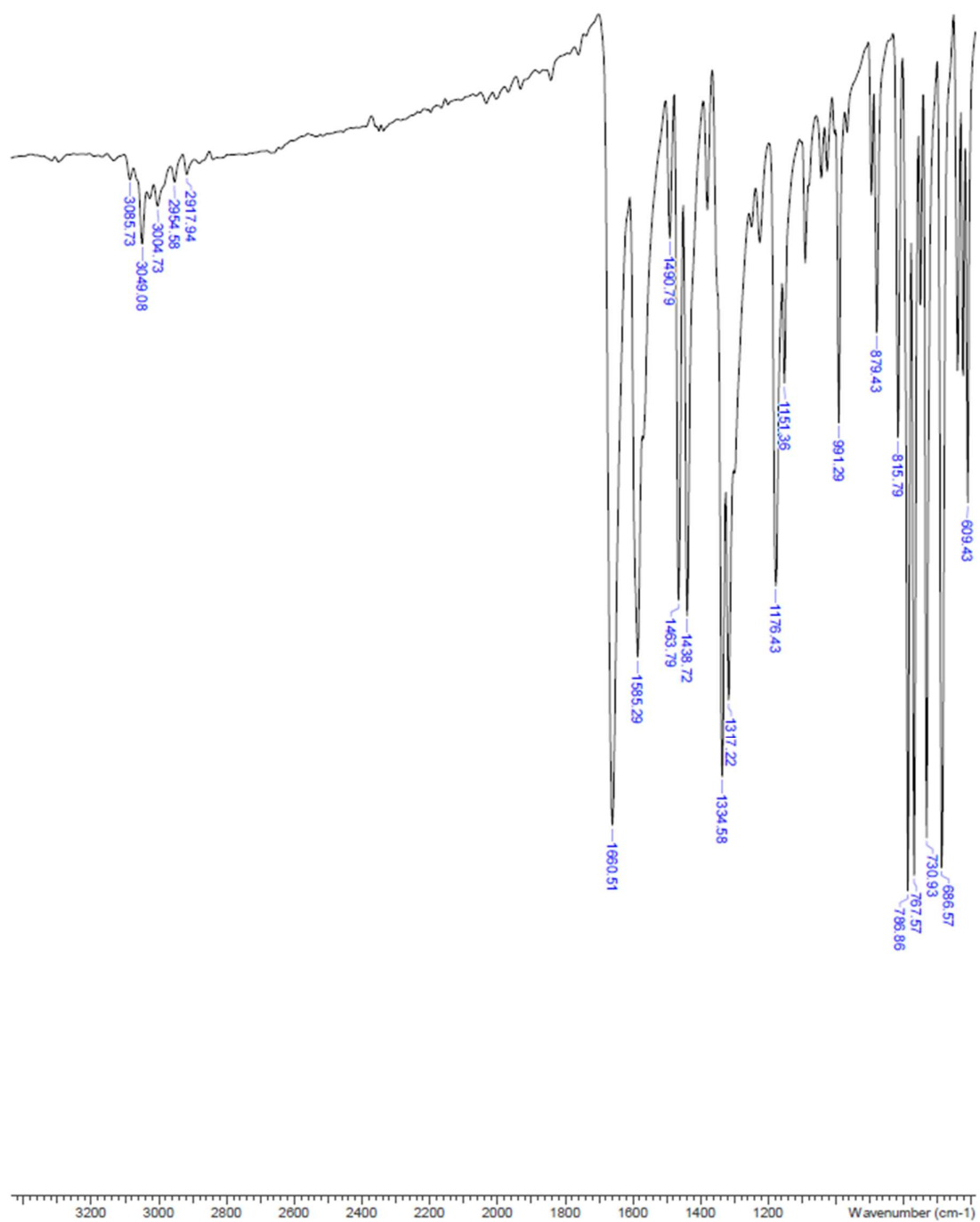


Figura A292. Infravermelho de A5

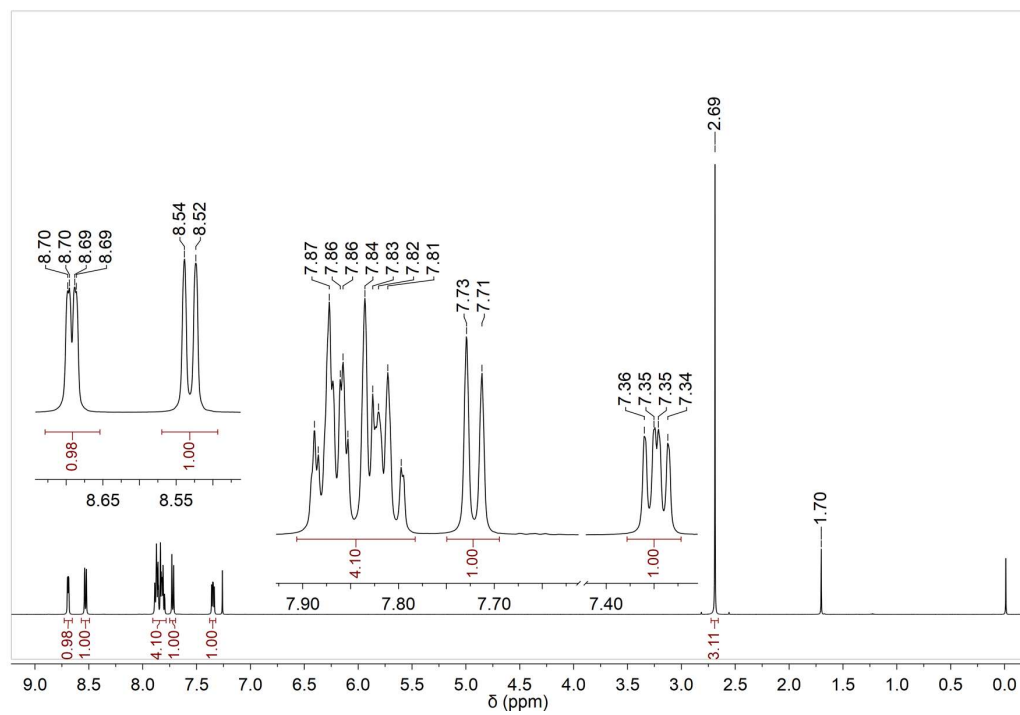


Figura A293. Espectro de RMN de ¹H (A5)

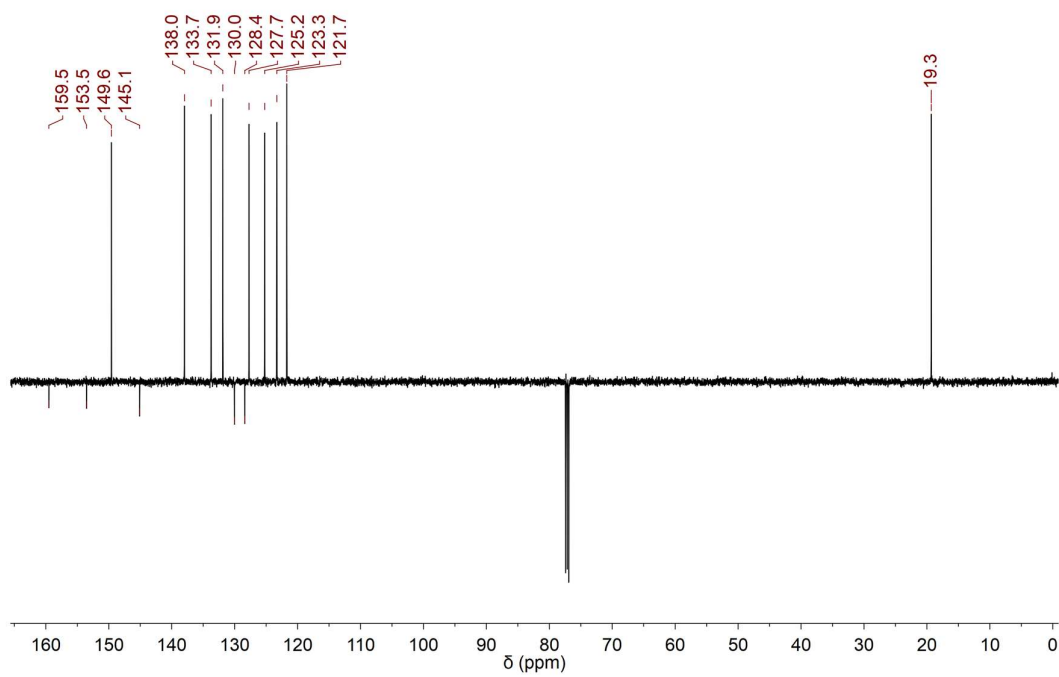


Figura A294. Espectro de RMN de ¹³C (A5)

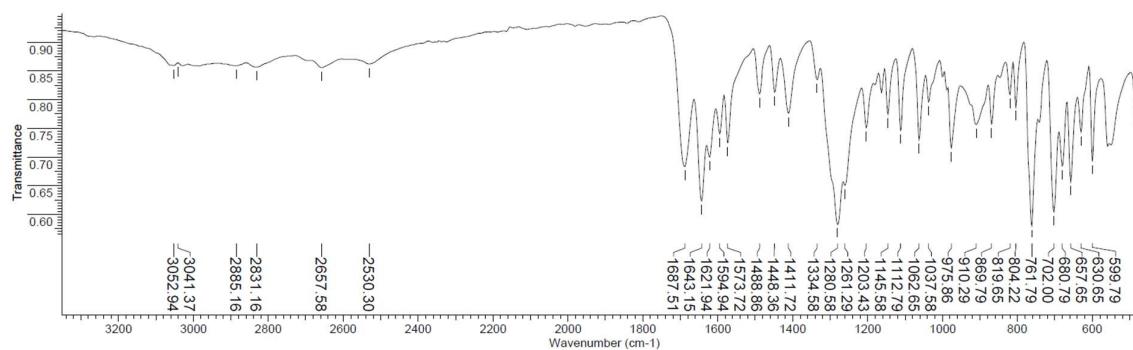


Figura A295. Espectro de IV do B1

B1
 AMOSTRA: B1 (PROTON) - 500MHZ
 Solvente: DMSO
 OPERADOR DO NMR: VINICIUS

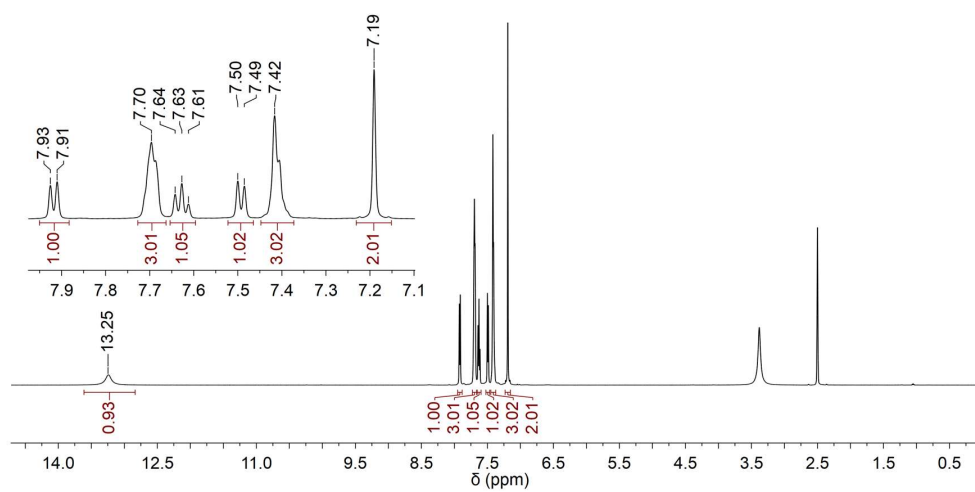


Figura A296. Espectro de RMN de ^1H (B1)

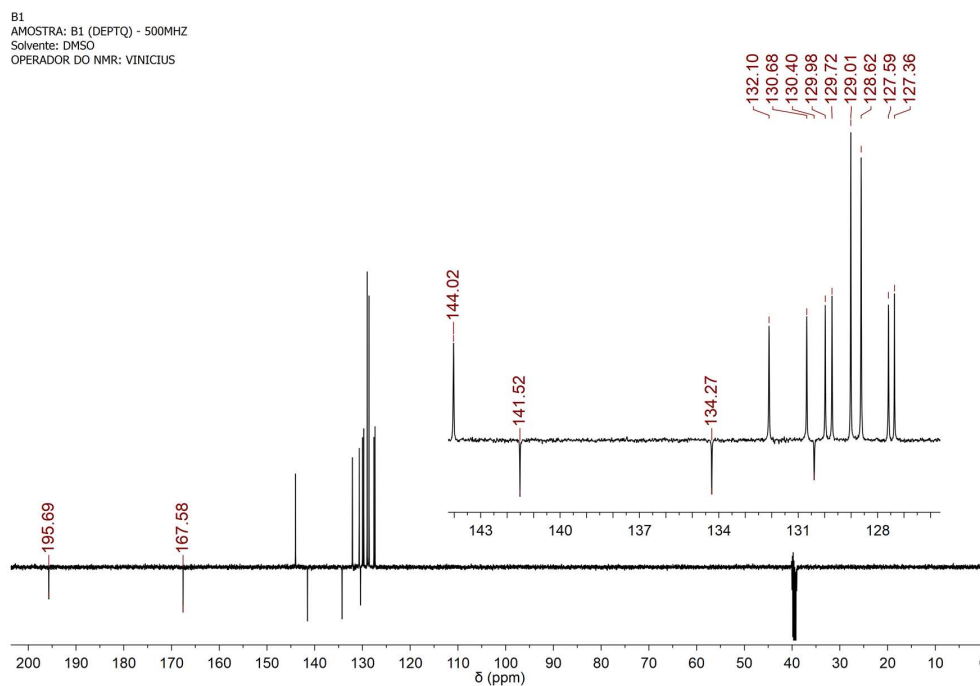


Figura A297. Espectro de RMN de ^{13}C (B1)

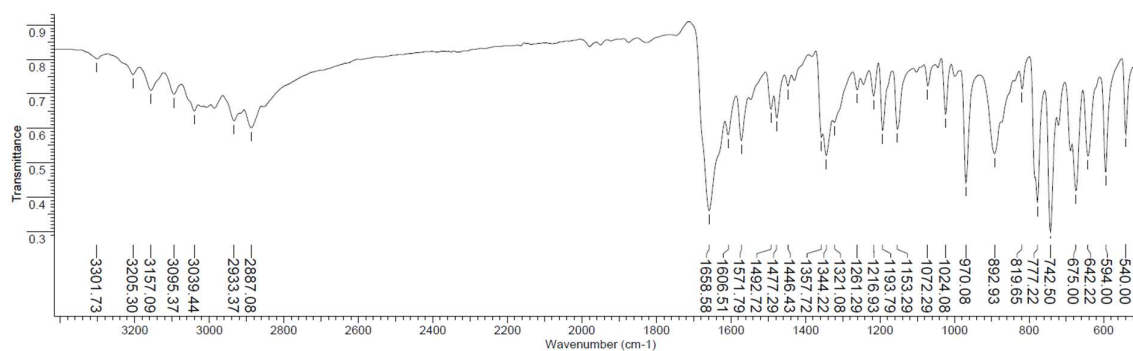


Figura A298. Espectro de IV do B2

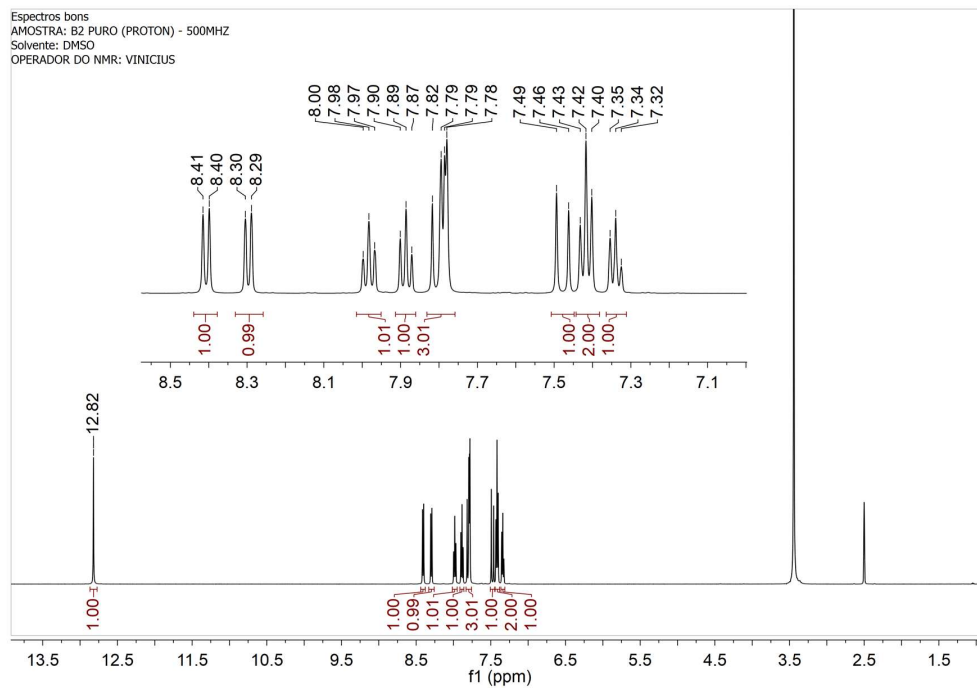


Figura A299. Espectro de RMN de ^1H (B2)

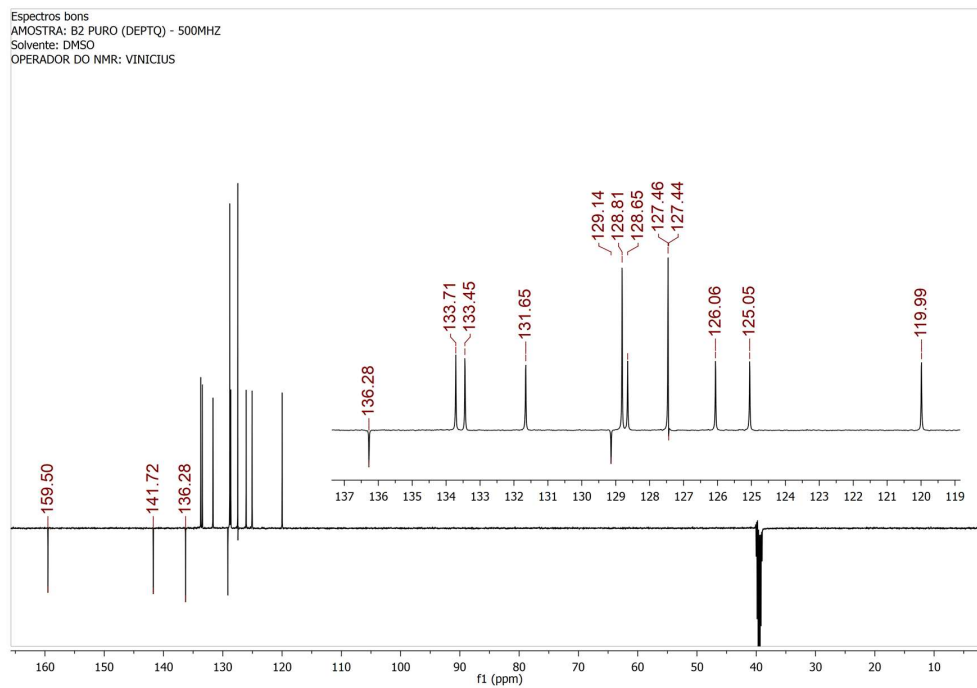


Figura A300. Espectro de RMN de ^{13}C (B2)

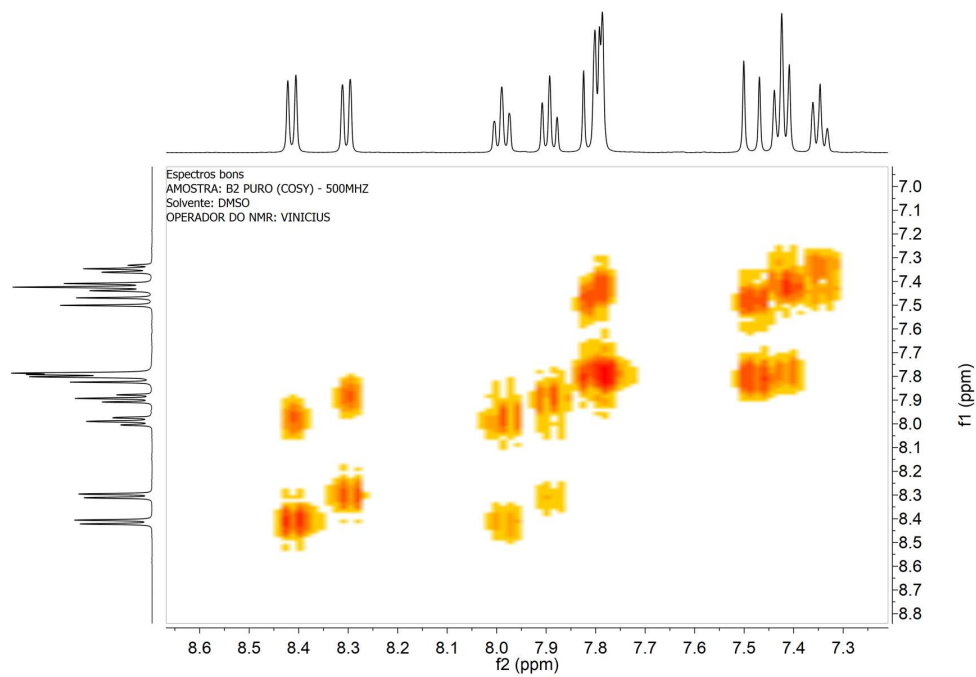


Figura A301. Espectro de COSY (B2)

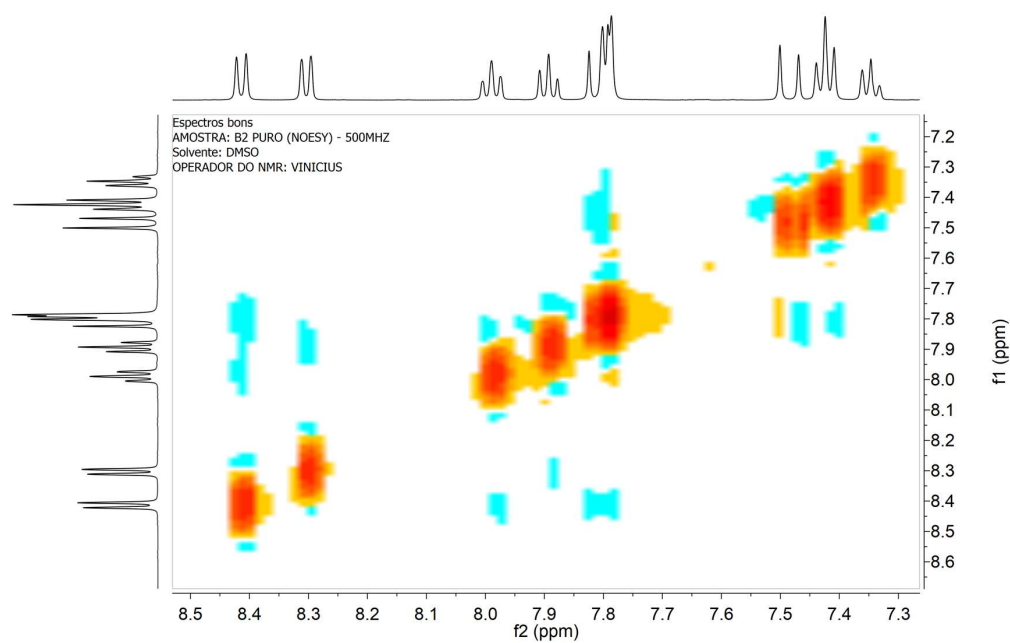


Figura A302. Espectro de NOESY (B2)

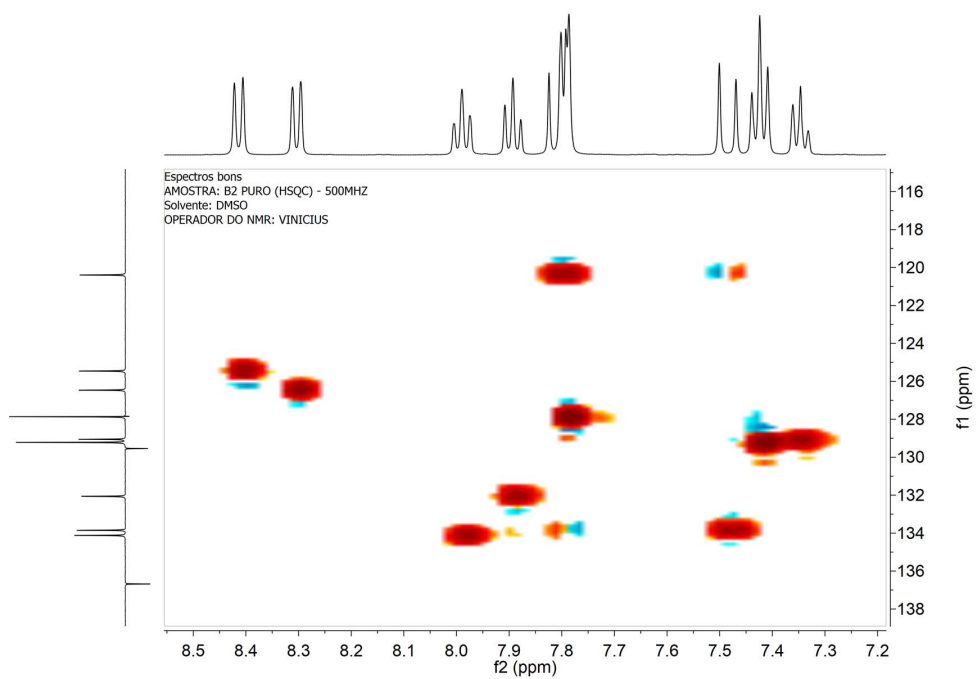


Figura A303. Espectro de HSQC (B2)

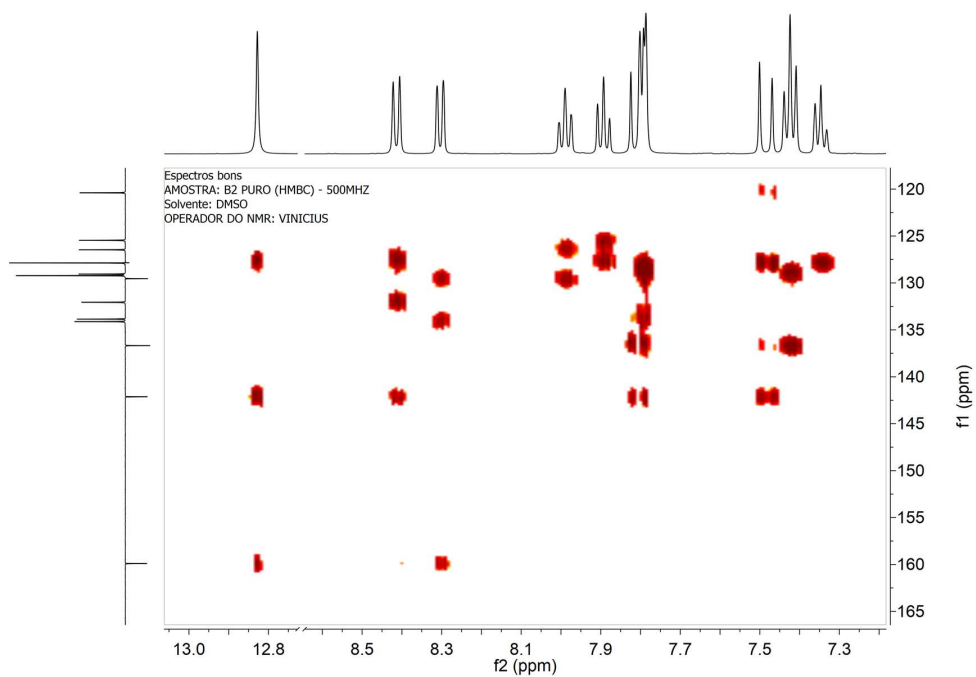


Figura A304. Espectro de HMBC (B2)

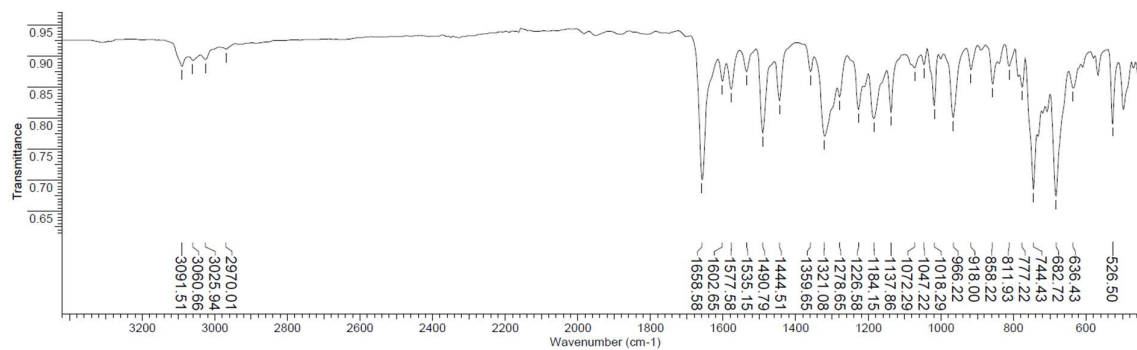


Figura A305. Espectro de IV do **B3**

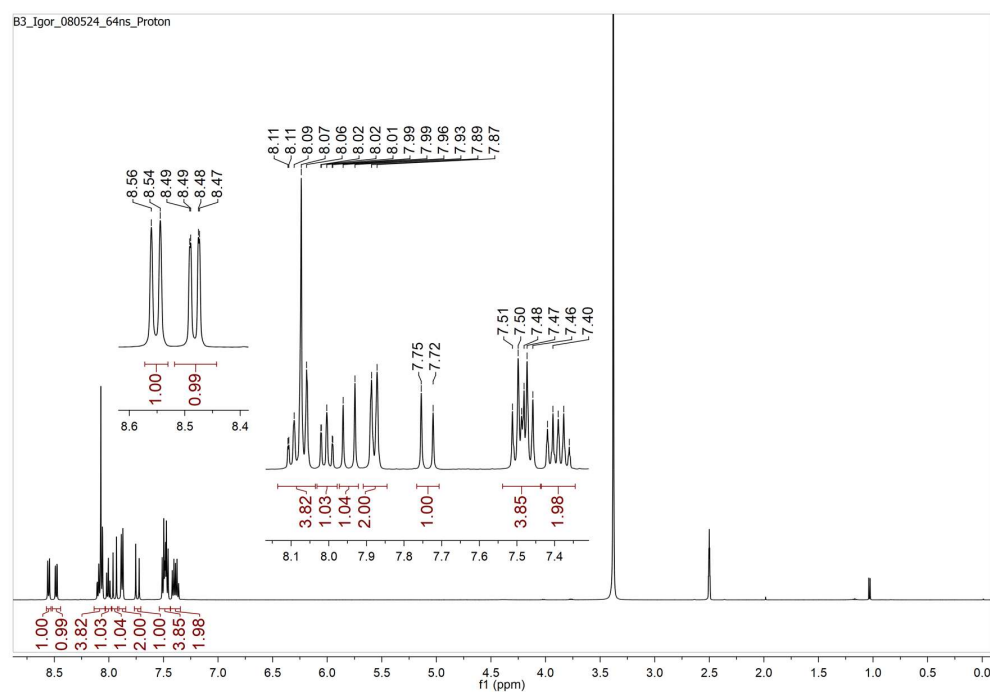


Figura A306. Espectro de RMN de ¹H (**B3**)

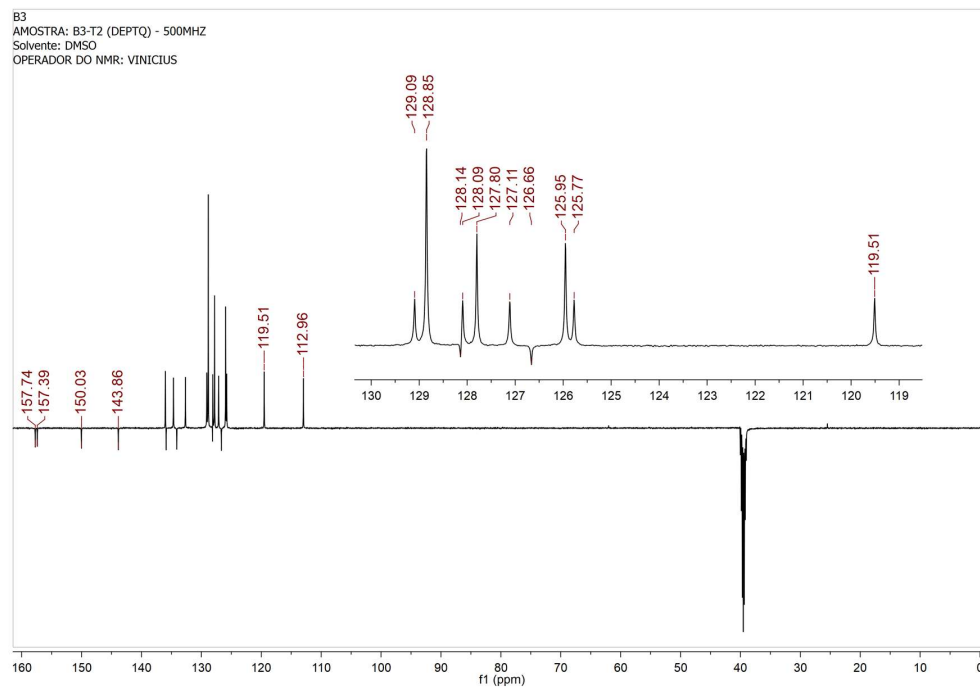


Figura A307. Espectro de RMN de ^{13}C (B3)

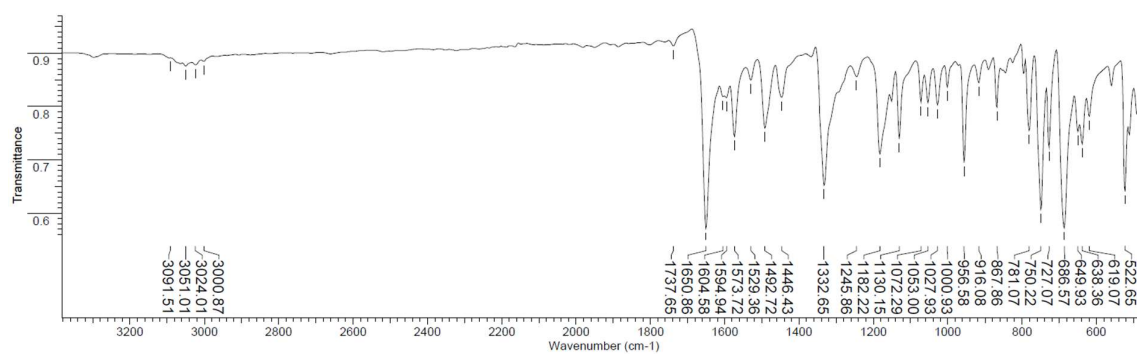


Figura A308. Espectro de IV do B4

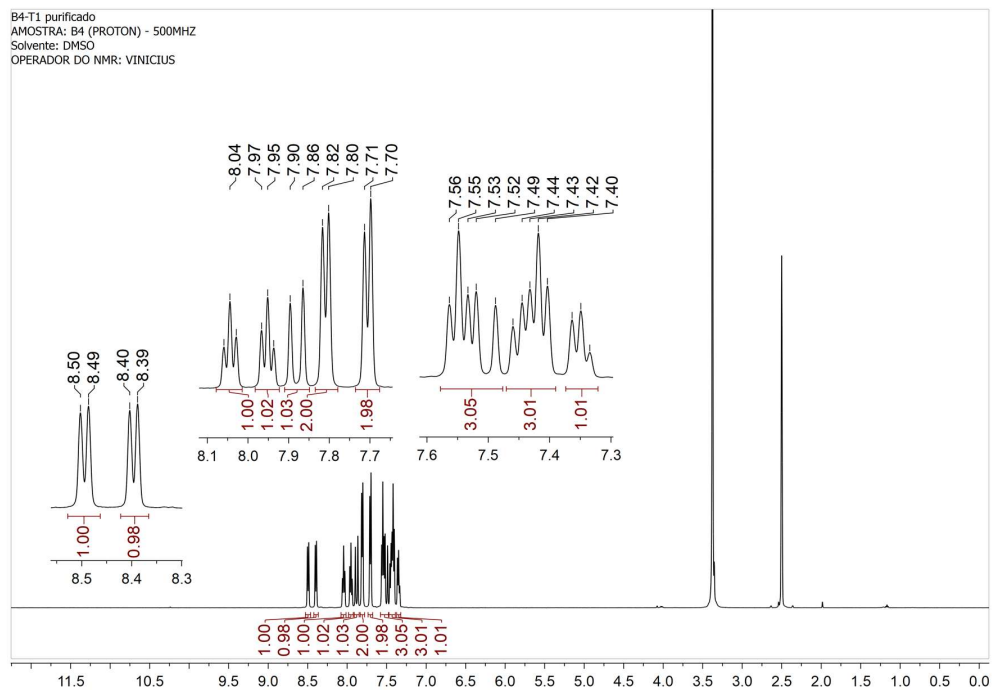


Figura A309. Espectro de RMN de ^1H (B4)

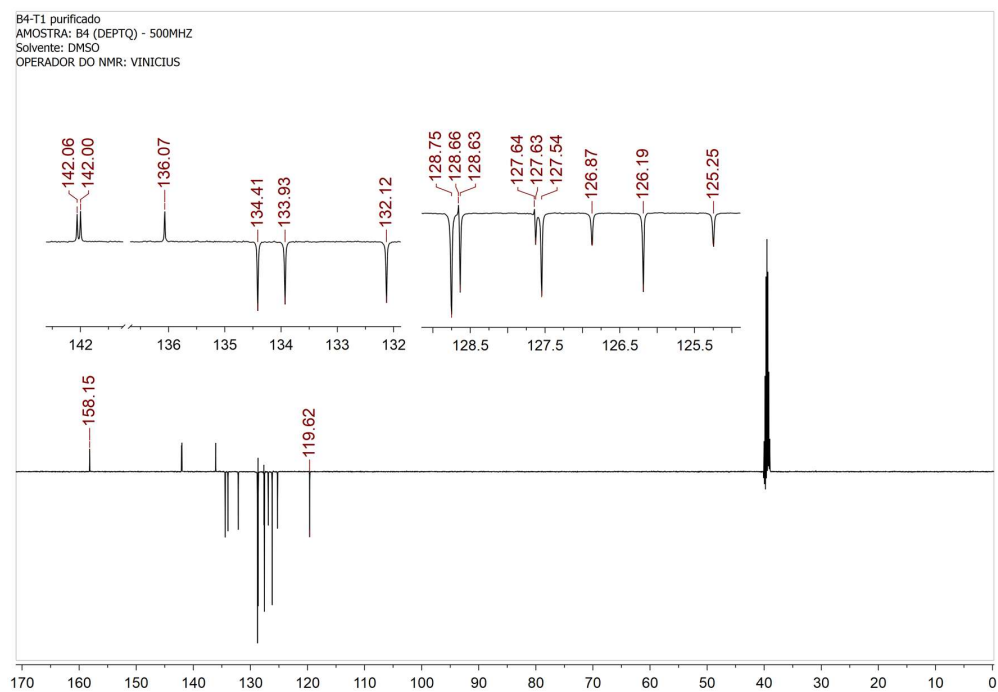


Figura A310. Espectro de RMN de ^{13}C (B4)

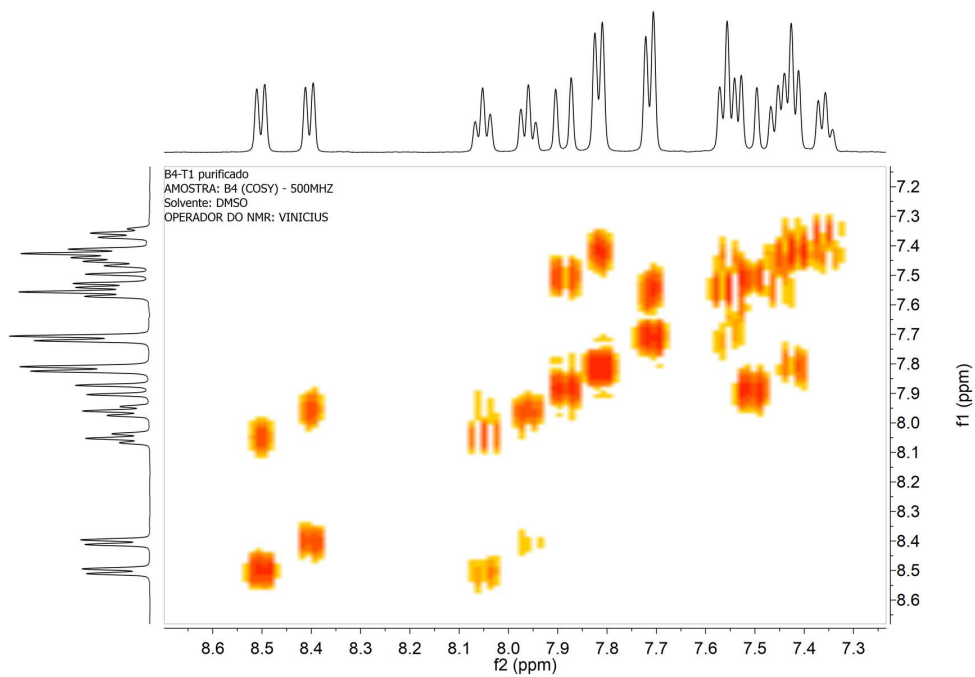


Figura A311. Espectro de COSY (B4)

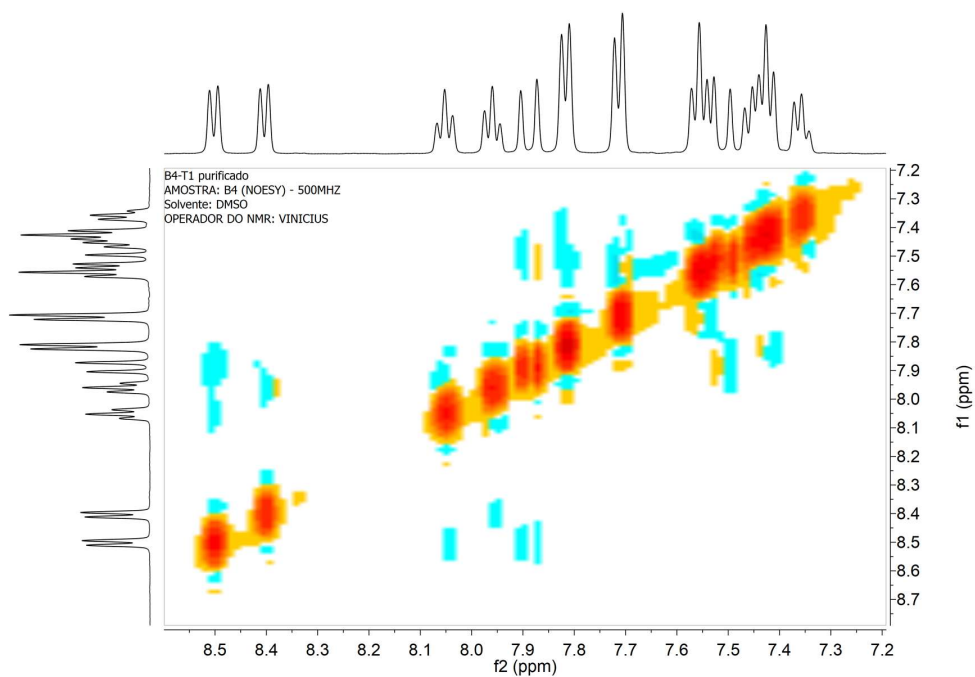


Figura A312. Espectro de NOESY (B4)

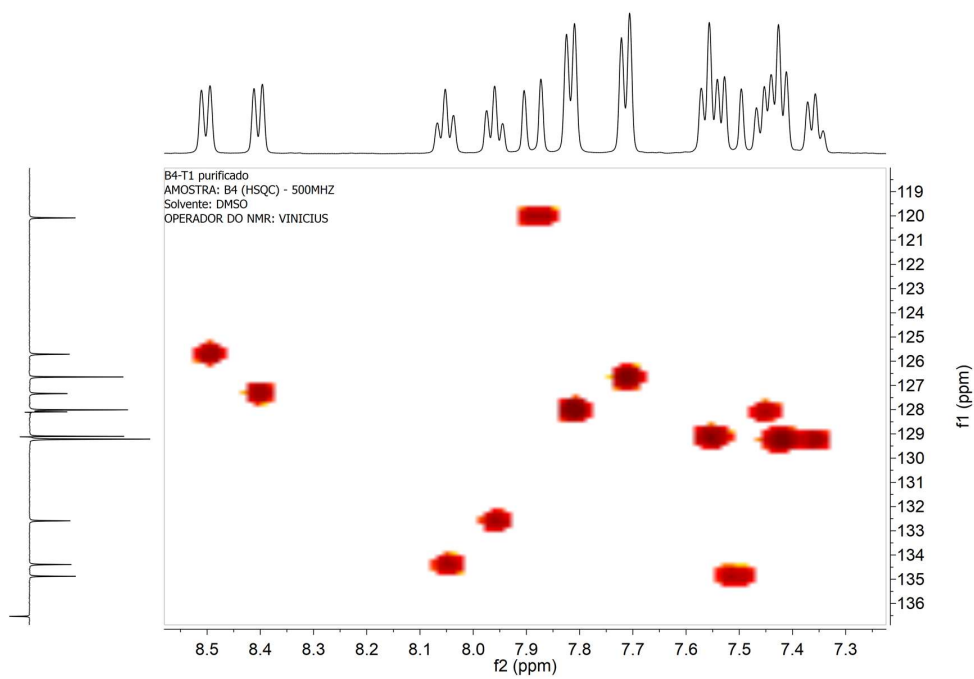


Figura A313. Espectro de HSQC (B4)

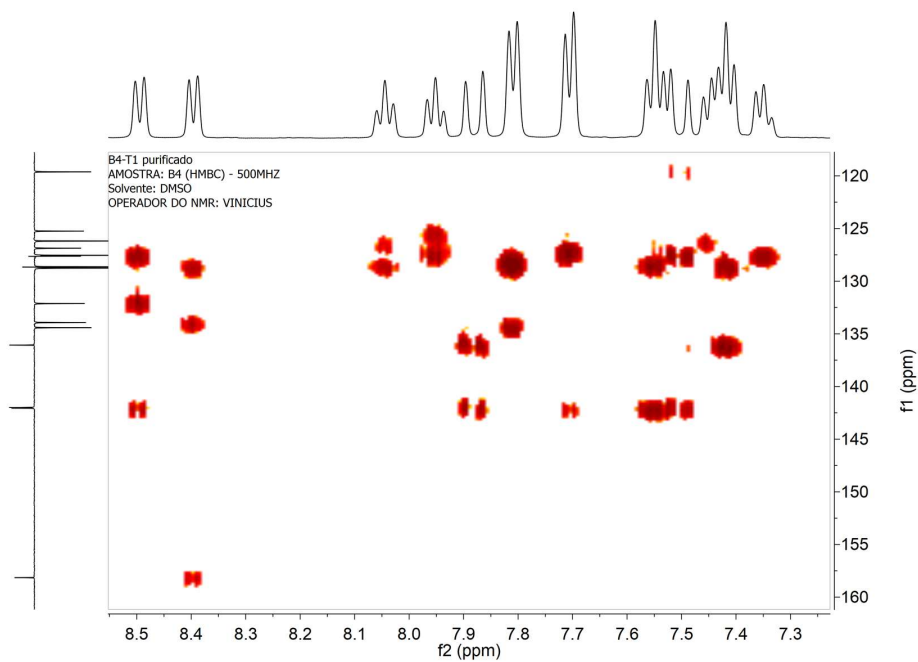


Figura A314. Espectro de HMBC (B4)

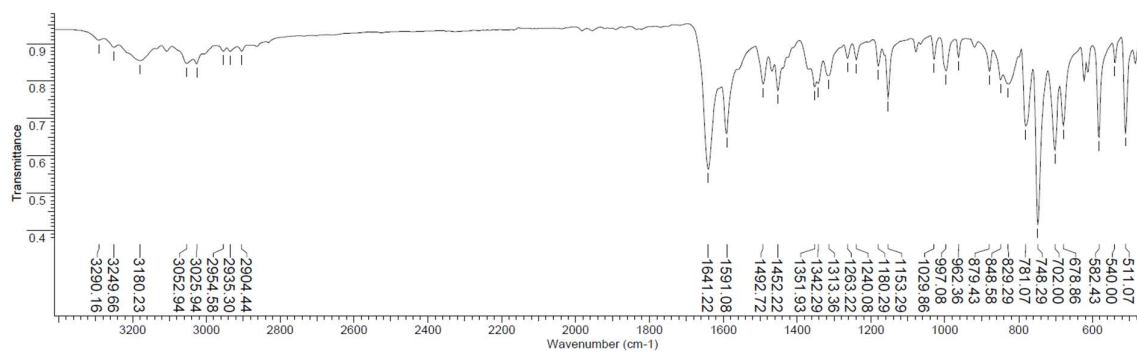


Figura A315. Espectro de IV do C2

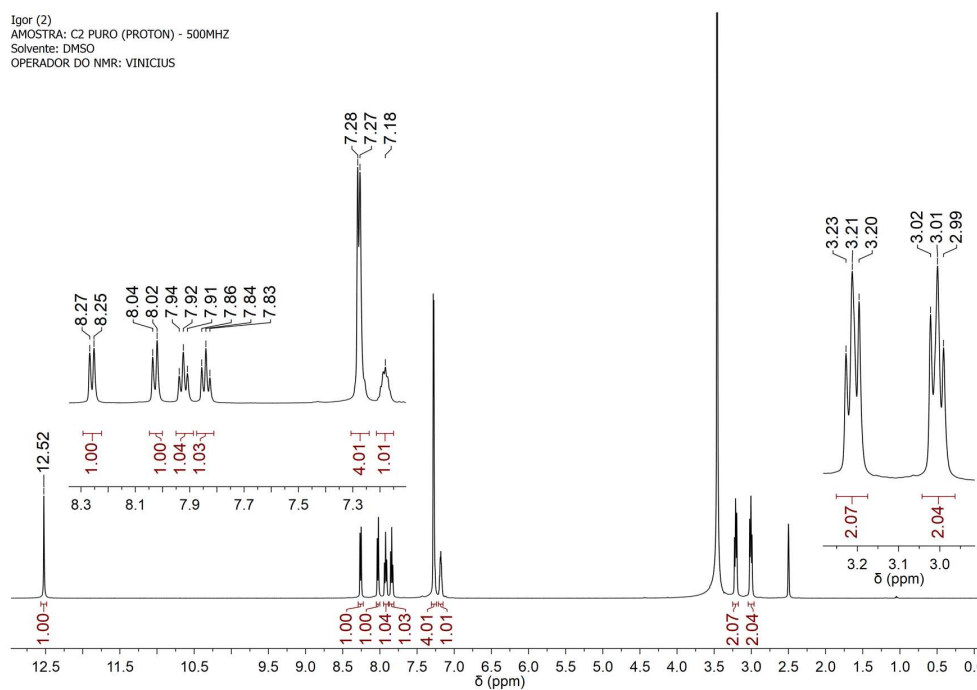


Figura A316. Espectro de RMN de ^1H (C2)

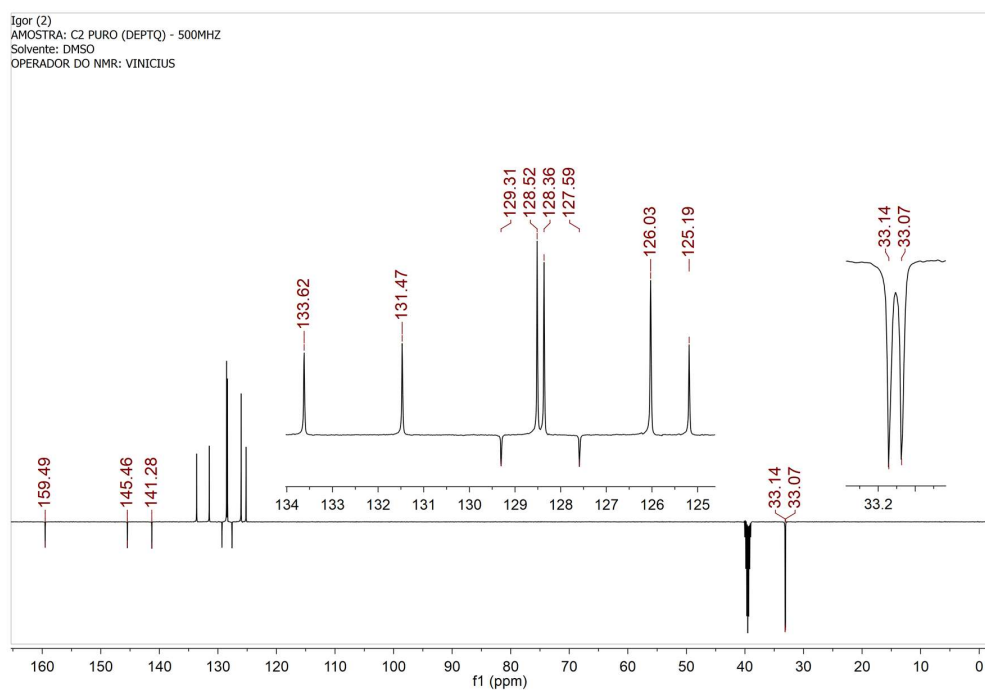


Figura A317. Espectro de RMN de ^{13}C (C2)

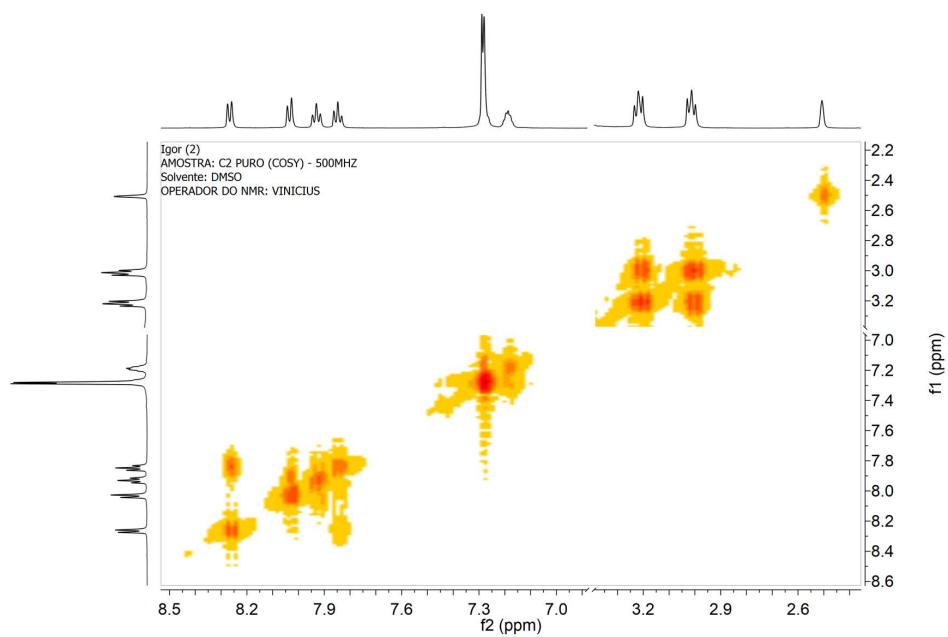


Figura A318. Espectro de COSY (C2)

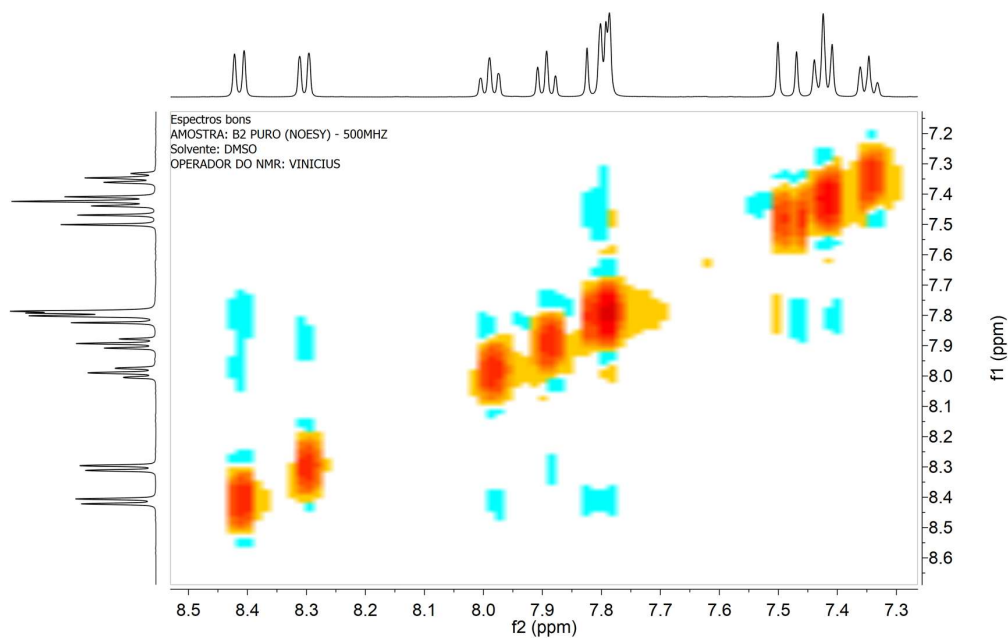


Figura A319. Espectro de NOESY (C2)

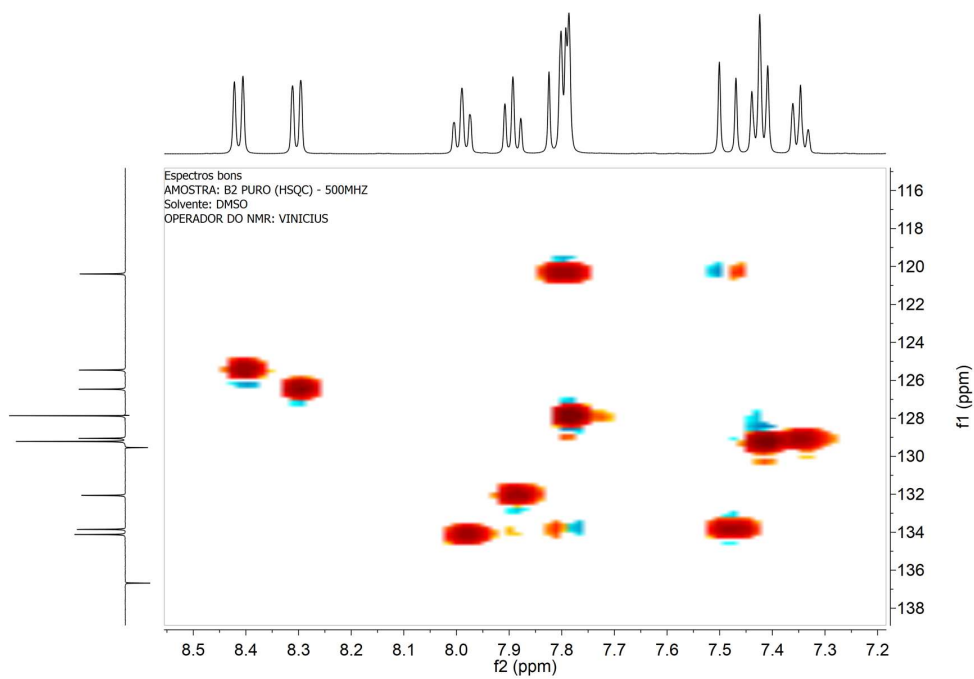


Figura A320. Espectro de HSQC (C2)

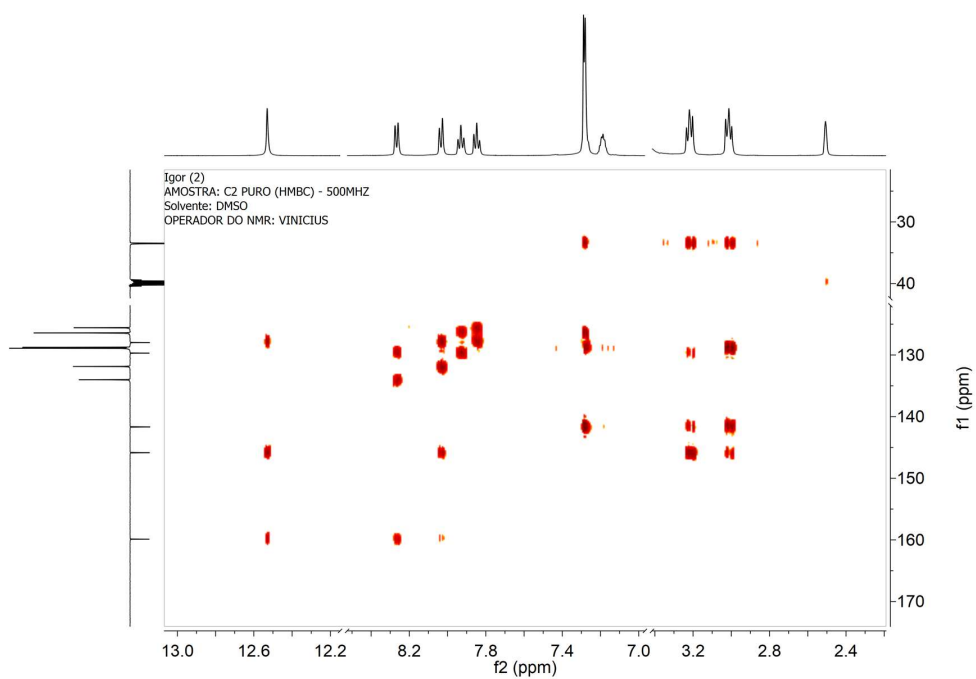


Figura A321. Espectro de HMBC (C2)

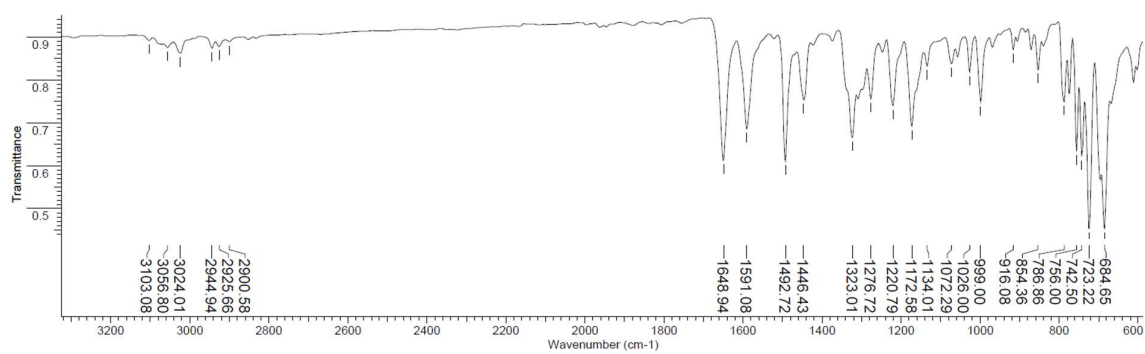


Figura A322. Espectro de IV do C3

RMN em clorofórmio
 AMOSTRA: C3 (PROTON) - 500MHZ
 Solvente: CDCL₃
 OPERADOR DO NMR: VINICIUS

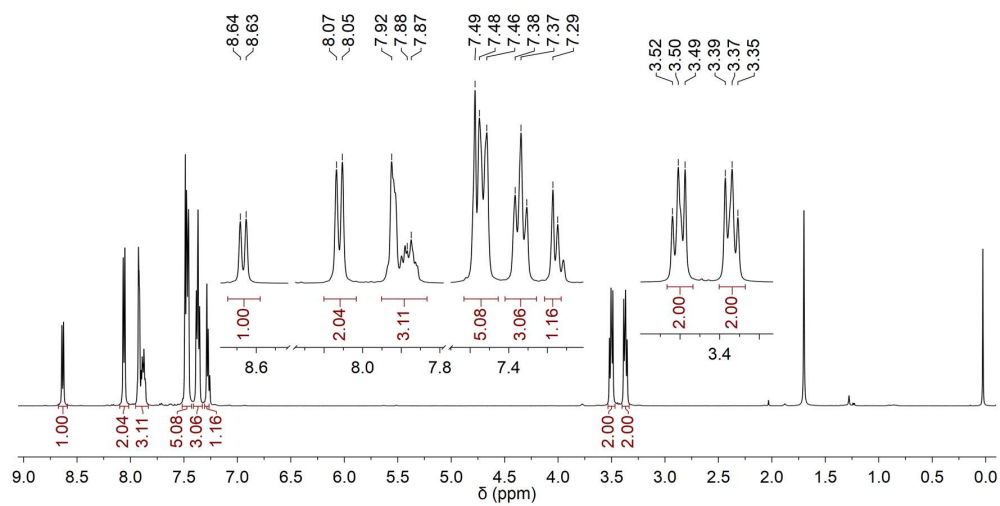


Figura A323. Espectro de RMN de ¹H (C3)

RMN em clorofórmio
 AMOSTRA: C3 (DEPTQ) - 500MHZ
 Solvente: CDCL₃
 OPERADOR DO NMR: VINICIUS

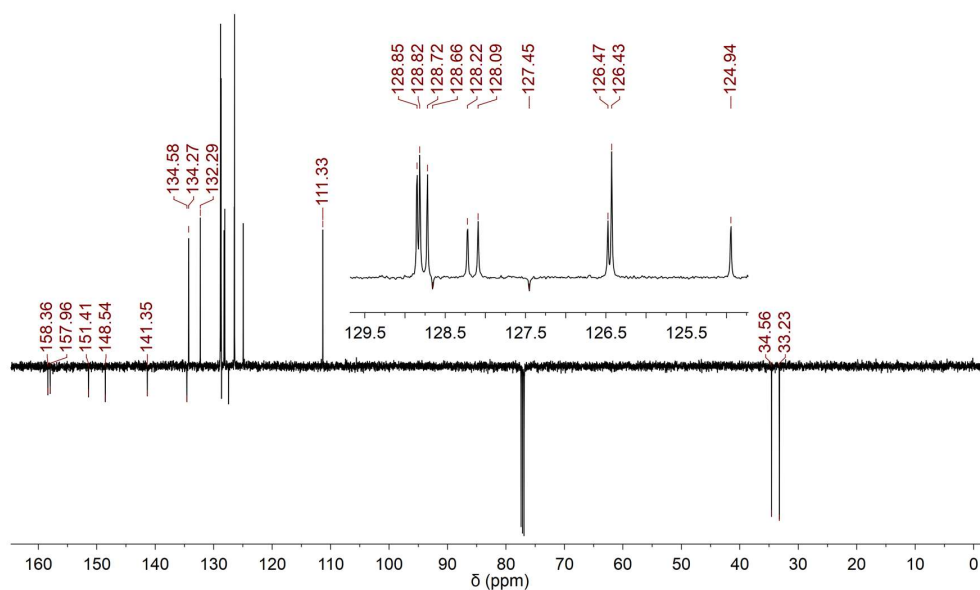


Figura A324. Espectro de RMN de ¹³C (C3)

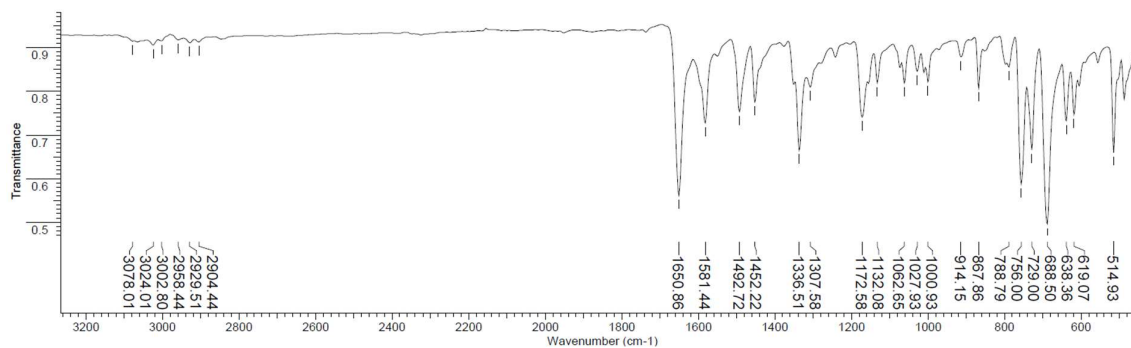


Figura A325. Espectro de IV do C4

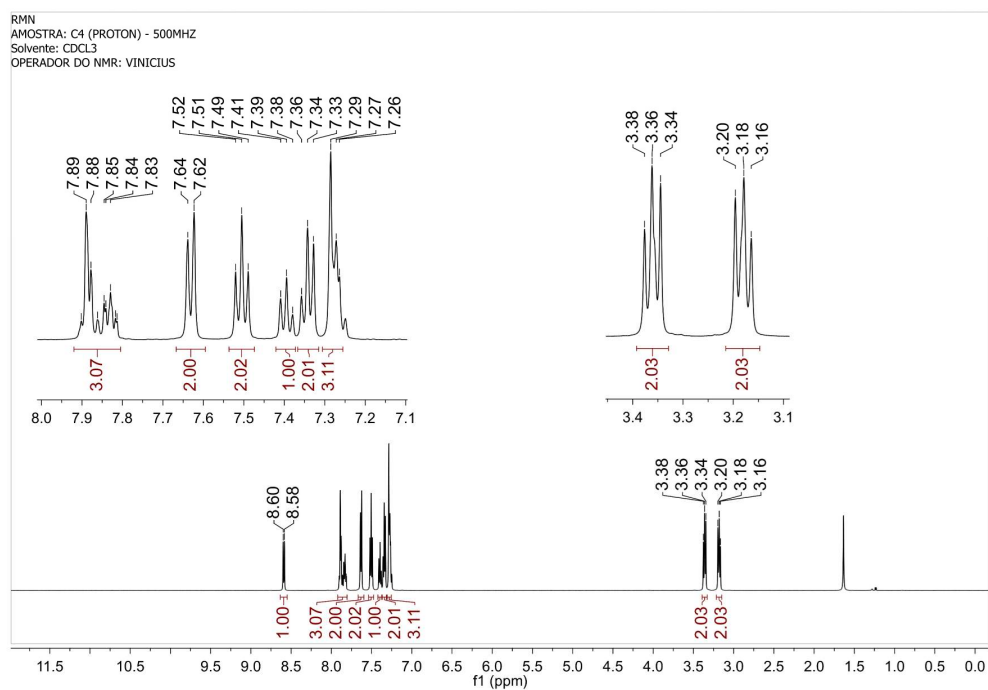


Figura A326. Espectro de RMN de ¹H (C4)

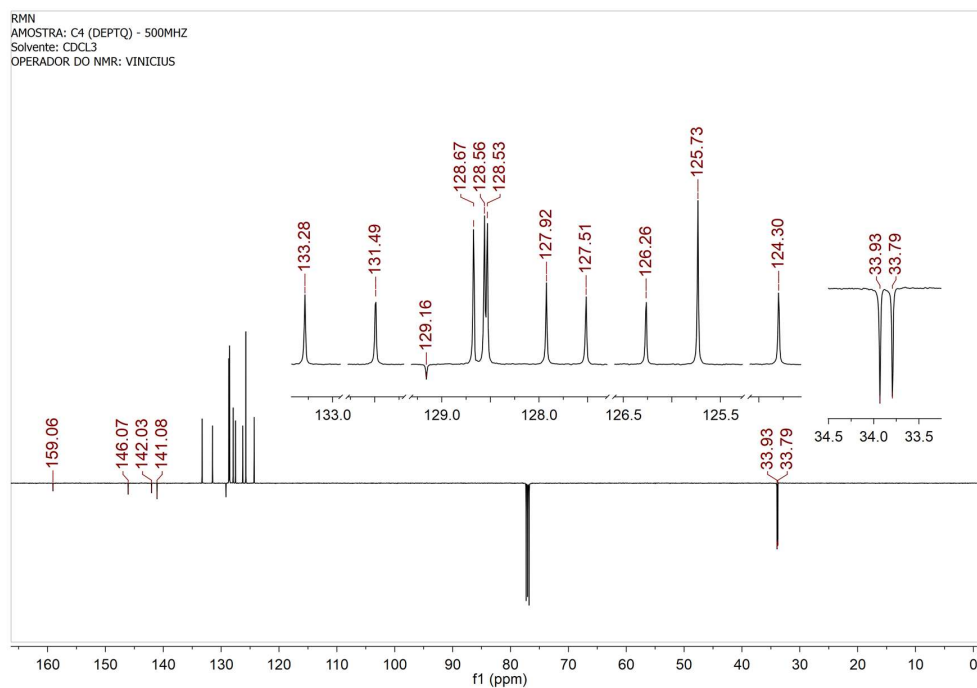


Figura A327. Espectro de RMN de ^{13}C (C4)

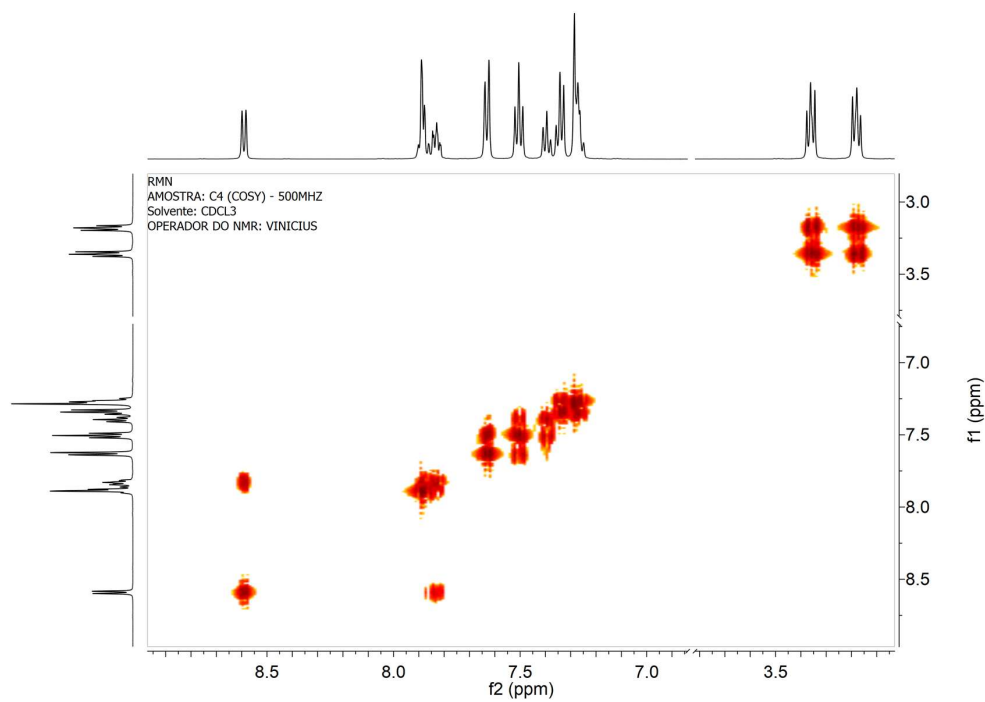


Figura A328. Espectro de COSY (C4)

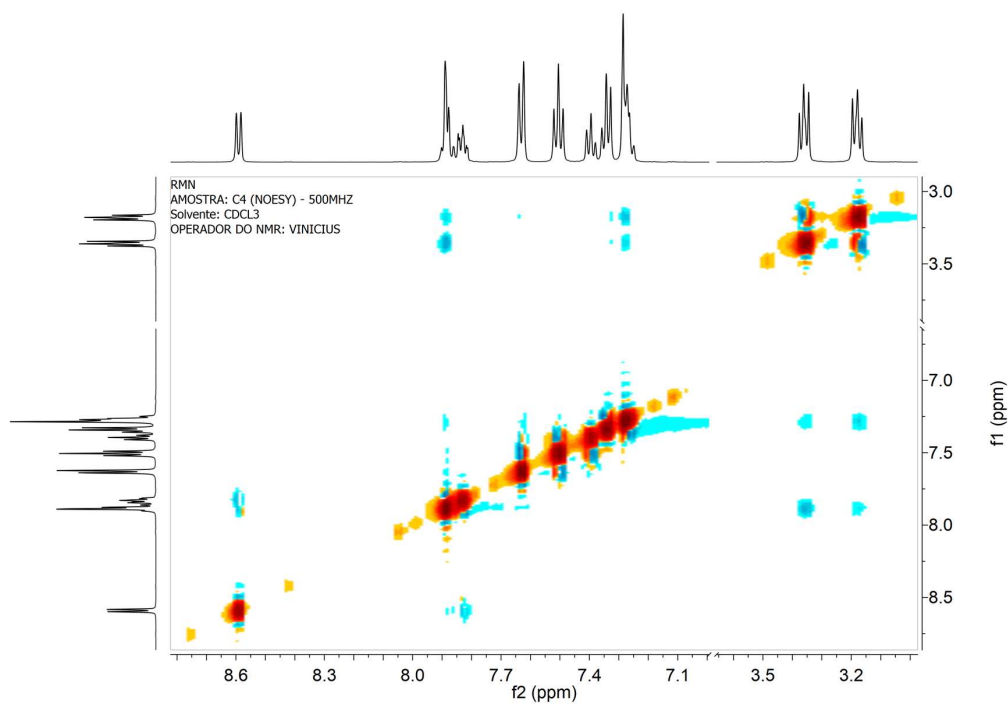


Figura A329. Espectro de NOESY (C4)

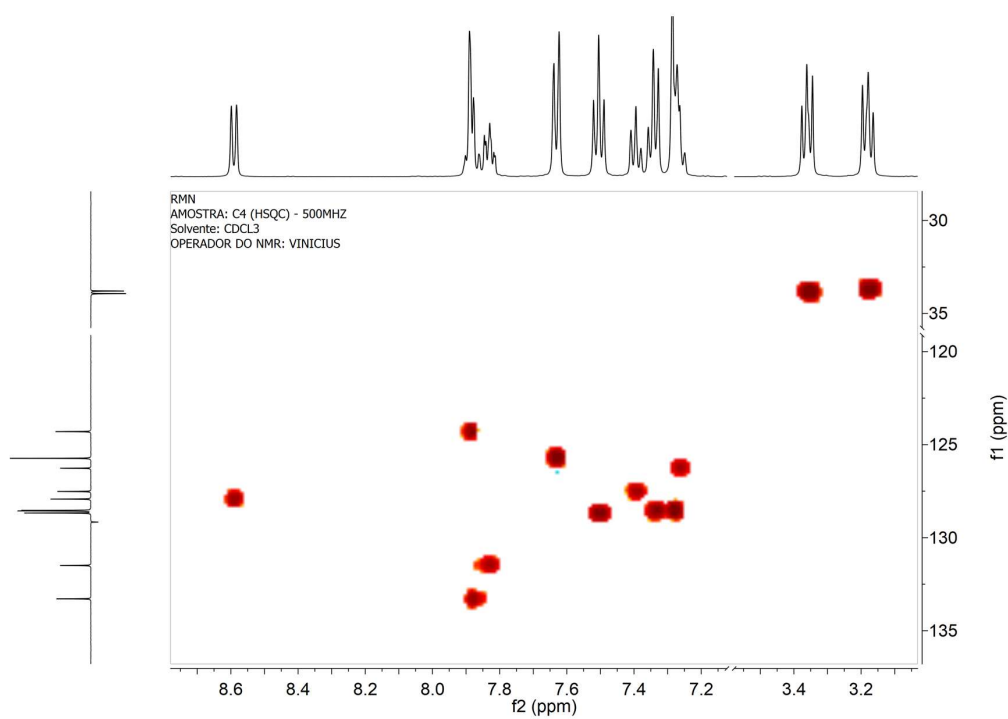


Figura A330. Espectro de HSQC (C4)

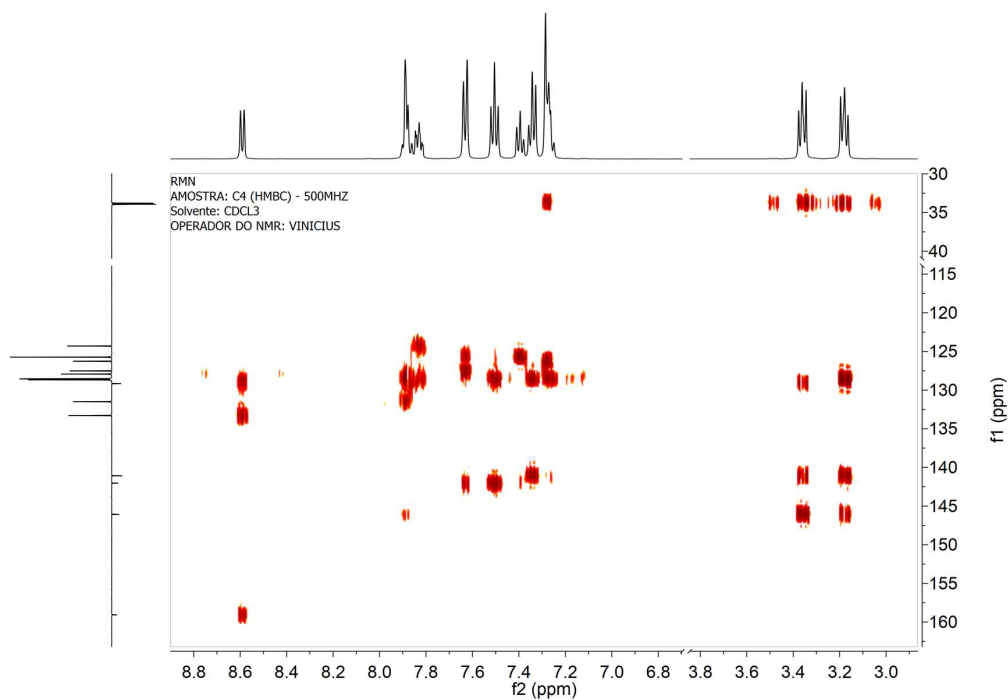


Figura A331. Espectro de HMBC (C4)

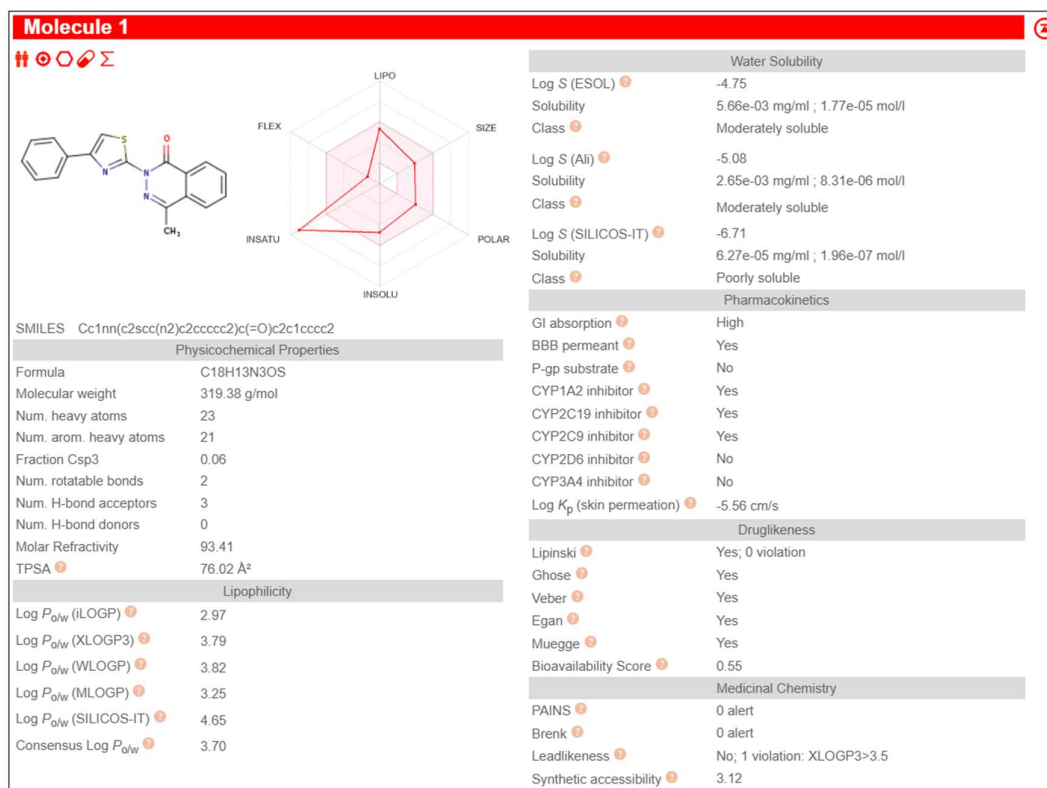


Figura A332. Resultados das previsões pelo SwissADME para A3.

Artigos publicados

Sidnonas e sulfonamidas-sidnonas:

1 – RVq, 2022.



* Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, CEP 23890-000, Seropédica-RJ, Brasil

*E-mail: echevarr@ufrj.br

Recebido em: 5 de Dezembro de 2021

Aceito em: 23 de Fevereiro de 2022

Publicado online: 7 de Abril de 2022

Review

<http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20220058>

Uma Breve Revisão sobre a Síntese do Anel Heterocíclico da Sidnona e Atividade Anticâncer de seus Derivados

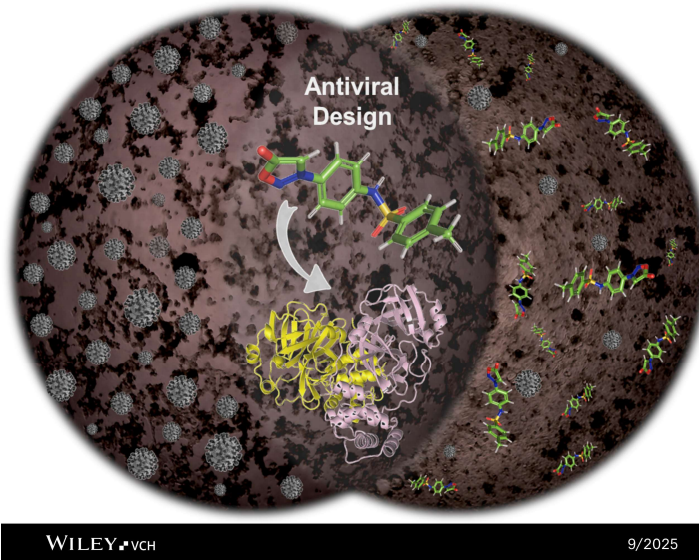
A Brief Review of Sydnone Heterocyclic Ring Synthesis and Anti-Cancer Activity of its Derivatives

Igor Resendes Barbosa,*^{ORCID} Aurea Echevarria*^{ORCID}

Sydones are among the most studied mesoionic compounds to date, especially for their unusual structure and utility to act as precursors in the synthesis of other important heterocycles through sydnone-alkyne and sydnone-alkene cycloaddition reactions. Also, many studies have been focused on the medicinal chemistry aspects of these compounds, revealing their wide range of biological activities. This article presents a brief discussion regarding the structure, reactivity, aromaticity, and synthesis of the heterocyclic sydnone ring (1,2,3-oxadiazolium ring). Also, different derivatives are presented, describing their anticancer activities and, in some cases, their possible mechanisms of action.

Keywords: 1,2,3-oxadiazolium-5-olate; mesoionic compounds; cytotoxic activity.

2- ChemMedChem, 2025 (Front Cover).



ChemMedChem

Research Article
doi.org/10.1002/cmdc.202400697



www.chemmedchem.org

Novel Sulfonamide-Sydnone Hybrids: Complementary Insight into Anti-Inflammatory Action, Anti-SARS-CoV-2 Activity, Human Serum Albumin Interaction, and *in silico* Analysis

Igor Resendes Barbosa,^[a] Mayara Alves Amorim,^[b] Vitor H lio de Souza Oliveira,^[b] Eunice André,^[b] Guilherme Pereira Guedes,^[c] Otávio Augusto Chaves,^[d, e] Carlos Serpa,^[d] Natalia Fintelman-Rodrigues,^[e, f] Carolina Q. Sacramento,^[e, f] Thiago Moreno L. Souza,^[e, f] Carlos Mauricio R. Sant'Anna,^[a] and Aurea Echevarria^{*,[a]}

Acute lung injury (ALI) is a severe condition often seen in intensive care unit patients. Due to limited treatment options, ALI is linked to high rates of mortality and morbidity. Bacterial and viral infections are significant contributors to ALI. For instance, severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) infection can lead to a strong inflammatory response that may progress to ALI, a leading cause of death in COVID-19 cases. Prior research has demonstrated that sulfonamides and sydnones exhibit anti-inflammatory and antiviral properties, which has led us to develop compounds containing both scaffolds. Most of the new sulfonamide-sydnone hybrids are expected to be orally bioavailable based on *in silico* ADME

predictions. They effectively suppressed the development of ALI in lipopolysaccharide (LPS)-challenged mice and inhibited viral replication in Calu-3 cells, with minimal cytotoxicity in non-infected Calu-3 and Vero E6 cells. Molecular docking investigations indicated some possible viral targets for the action of the sydnones, highlighting the possible interaction with non-structural proteins of SARS-CoV-2. Additionally, combined experimental and theoretical studies indicated that the new compounds can strongly interact with human serum albumin, suggesting a possible extended residence time in the human bloodstream.

Tiosemicarbazona e complexo de zinco:

Journal of Inorganic Biochemistry 245 (2023) 112239



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinorgbio



Novel Zn(II)-complex with hybrid chalcone-thiosemicarbazone ligand: Synthesis, characterization, and inhibitory effect on HTLV-1-infected MT-2 leukemia cells

Maria Clara Campos^{a,1}, Igor Resendes Barbosa^{b,1}, Guilherme Pereira Guedes^c, Aurea Echevarria^{b,*}, Juliana Echevarria-Lima^{a,*}, Otávio Augusto Chaves^{d,e,*}

^a Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^c Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

^d Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e CQC-IMS, Departamento de Química, Universidade de Coimbra, Rua Larga s/n, Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Keywords:

Molecular hybridization
Zn(II)-complex
Toxicity
Leukemia cells
Metalloids
HTLV-1

ABSTRACT

Chalcone and thiosemicarbazone have attracted attention due to their easy synthetic procedure and high success in the development of antiviral and antitumor, however, there are few biological data on the evaluation of chalcone-thiosemicarbazone hybrids and their complexation with metal ions. In this sense, the present work reports the synthesis and characterization of the hybrid (Z)-2-((E)-3-(4-chlorophenyl)-1-phenylallylidene)hydrazine-1-carbothioamide (CTCI) and its Zn(II)-complex (CTCI-Zn). The compounds were cell-based evaluated in terms of cytotoxicity against human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected leukemia cells (MT-2) and the experimental data were correlated with molecular docking calculations. The ligand and Zn(II)-complex were easily synthesized with a good yield - 57% and 79%, respectively. The dynamic of E/Z isomers with respect to the imine bond configuration of CTCI was evidenced by ¹H NMR experiments in DMSO-*d*₆, while the X-ray diffraction of CTCI-Zn showed that Zn(II) ion is tetracoordinated to two ligands in a bidentate mode and the metal ion lies on an intermediate geometry between the see-saw and trigonal pyramid. The ligand and complex exhibited low toxicity and the Zn(II)-complex is more cytotoxic than the ligand, with the corresponding IC₅₀ value of 30.01 and 47.06 μM. Both compounds had a pro-apoptotic effect without the release of reactive oxygen species (ROS) and they can interact with DNA via minor grooves driven by van der Waals forces.

Cloridrato mesoioônico MI-D

1 – Molecular and cellular Biochemistry, 2022.

Molecular and Cellular Biochemistry
<https://doi.org/10.1007/s11010-022-04423-2>



The mesoionic compound MI-D changes energy metabolism and induces apoptosis in T98G glioma cells

Marília Locatelli Corrêa-Ferreira¹ · Amanda do Rocio Andrade Pires¹ · Igor Resendes Barbosa² · Aurea Echevarria² · Guilherme Henrique Pedrassoli¹ · Sheila Maria Brochado Winnischofer¹ · Guilhermina Rodrigues Noletto¹ · Sílvia Maria Suter Correia Cadena^{1,3}

Received: 31 October 2021 / Accepted: 25 March 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Abstract

The mesoionic compound 4-phenyl-5-(4-nitro-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride (MI-D) impairs mitochondrial oxidative phosphorylation and has a significant antitumour effect against hepatocarcinoma and melanoma. This study evaluated the cytotoxic effect of MI-D on T98G glioblastoma cells and investigated whether the impairment of oxidative phosphorylation promoted by MI-D is relevant to its cytotoxic effect. The effects of MI-D on T98G cells cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) HG (glycolysis-dependent) and galactose plus glutamine-supplemented Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) GAL (oxidative phosphorylation-dependent) were compared. T98G cells grown in DMEM GAL medium exhibited higher respiration rates and citrate synthase activity and lower lactate levels, confirming the metabolic shift to oxidative phosphorylation in these cells. MI-D significantly decreased the cell viability in a dose-dependent manner in both media; however, T98G cells cultured in DMEM GAL medium were more susceptible. The mesoionic significantly inhibited mitochondrial oxidative phosphorylation of glioma cells in both media. At the same time, lactate levels were not altered, indicating an absence of compensatory glycolysis activation. Additionally, MI-D increased the citrate synthase activity of cells in both media, which in DMEM HG-cultivated cells was followed by citrate accumulation. Apoptosis dependent on caspase-3 mediated the toxicity of MI-D on T98G cells. The higher susceptibility of glioma cells cultured in DMEM GAL medium to MI-D indicates that the impairment of mitochondrial functions is involved in mesoionic cytotoxicity. The results of this study indicate the potential use of MI-D for glioblastoma treatment.

Keywords Glioblastoma · T98G cells · Oxidative phosphorylation · Mesoionic compound · Tumour cell metabolism · Metabolic shift

2 – Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2025.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

411

Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2025, 25, 411–419

RESEARCH ARTICLE



The Mesoionic 1,3,4-thiadiazolium Derivative, MI-D, is a Potential Drug for Treating Glioblastoma by Impairing Mitochondrial Functions Linked to Energy Provision in Glioma Cells



Marília Locatelli Corrêa-Ferreira¹, Amanda do Rocio Andrade Pires¹, Juan Vitor Miranda¹, Eduardo de Freitas Montin¹, Igor Resendes Barbosa², Aurea Echevarria Aznar Neves Lima², Maria Eliane Merlin Rocha¹, Gláucia Regina Martinez¹ and Sílvia Maria Suter Correia Cadena^{1,*}



¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; ²Department of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil