



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA**

RAFAEL MACEDO FEIJÓ

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS COM
POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

**CAMPINA GRANDE
2018**

RAFAEL MACEDO FEIJÓ

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS COM
POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de bacharelado em farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em farmácia.

Área de concentração: Química Medicinal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura.

**CAMPINA GRANDE
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

F297p Feijó, Rafael Macedo.
Planejamento e síntese de derivados tiossemicarbazônicos com potencial atividade antibacteriana [manuscrito] : / Rafael Macedo Feijó. - 2018.
53 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. Fármacos. 2. Tiossemicarbazonas. 3. Tiossemicarbazida. 4. Atividade Antimicrobiana.

21. ed. CDD 615.19

RAFAEL MACEDO FEIJÓ

PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS COM
POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de bacharelado em farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em farmácia.

Área de concentração: Química Medicinal

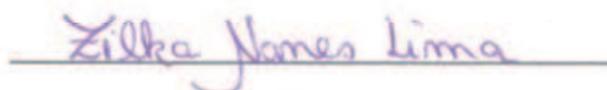
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura.

Aprovada em: 17/06/2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Me. Zilka Nanes Lima
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Me. Michelangela Suelleny de Caldas Nobre
Instituto Federal da Paraíba (UEPB)

RESUMO

A resistência bacteriana é um dos maiores problemas contemporâneos para a saúde mundial, e contribui para a incidência de mortalidade relacionada com as infecções por bactérias. Por conta disso, o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antibacteriana é de vital relevância para a saúde mundial. A abordagem moderna do desenvolvimento de novos fármacos é feita pelo desenho racional, e as estruturas privilegiadas descritas na literatura facilitam esse trabalho, contemplando as estruturas químicas relacionadas com diversas atividades farmacológicas. A tiossemicarbazona é uma dessas estruturas, e é frequentemente associada com atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral, sendo muito utilizada em pesquisas para encontrar novos *hits* promissores. Foram sintetizadas 4 derivados tiossemicarbazônicos e 1 derivado tiossemicarbazídico, ambos com potencial atividade antibacteriana. A síntese foi realizada através de uma via linear em duas etapas. O intermediário tiossemicarbazídico foi obtido pela reação em etanol da tiossemicarbazida com o fenilisotiocianato em proporções equimolares, fornecendo rendimento de mais de 80%. Os compostos finais foram obtidos pela condensação do intermediário tiossemicarbazídico com um benzaldeído substituído em meio etanólico ácido. Os rendimentos dos derivados finais foram todos abaixo de 50 % pela rota sintética utilizada. A espectroscopia de infravermelho foi feita para avaliar a estrutura química e a ocorrência da reação. Os testes antibacterianos foram conduzidos no LaRMiCC, pelo método da microdiluição em caldo. As bactérias testadas foram cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Nenhum dos compostos sintetizados apresentou concentração inibitória mínima menor do que 1024 µg/ml, provavelmente por conta da baixa solubilidade dos compostos no meio testado e na solução teste.

Palavras-chaves: Desenvolvimento de Fármacos, Tiossemicarbazonas e Tiossemicarbazidas, Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

The incidence of bacterial resistance is one of the biggest currently problems for the human health, and contributes to the elevated rates of mortality involved with bacterial infections. Because of that and of other factors, the development of new drugs with potential antibacterial activity is of vitally importance for the human health worldwide. The modern approach to the development of new drugs is made through the rational design, and the privileged structures makes this works easier, because they contemplate structures with a range of pharmacological activities. The thiosemicarbazone is one of that structures and is frequently associated with antibacterial, antitumoral and antifungal activities, being largely utilized in researches to find new promising *hits*. It were synthesized 4 thiosemicarbazone derivatives, and 1 thiosemicarbazide derivative, both with potential antibacterial activity. The synthesis was made by a linear method of two steps. The thiosemicarbazide intermediated was obtained from the reaction of thiosemicarbazide with phenylisothiocyanate, in ethanol with yields higher than 80%. The final compounds were obtained by the condensation of the intermediated thiosemicarbazide with diferents sustituted benzaldehydes in acidic ethanol. The yields of final compounds were all below of 50%, being necessary a new synthetic way of synthesis. The infrared spectroscopy was made for the evaluation of the chemical structure and the chemical reaction it self. The antibacterial assays were made in the LaRMiCC, through the method of microdilution. The bacterial tested were *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. None of the synthesized compounds displayed minimum inhibitory concentration lower than 1024 $\mu\text{g/ml}$, probably because of the low solubility of the compounds in the test solution.

Keywords: Drugs development, Thiosemicarbazones and Thiosemicarbazides, Antibacterial activity

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 09 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 12 |
| 2.1 | Objetivo Geral..... | 12 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 12 |
| 3 | REFERENCIAL TEÓRICO | 13 |
| 3.1 | Planejamento e modificação molecular..... | 13 |
| 3.1.1 | Desenho Racional..... | 15 |
| 3.2 | Estratégias de modificação molecular..... | 16 |
| 3.2.1 | Bioisosterismo..... | 16 |
| 3.2.2 | Simplificação molecular..... | 18 |
| 3.2.3 | Restrição conformacional..... | 20 |
| 3.2.4 | Hibridação molecular..... | 20 |
| 3.3 | Tiossemicarbazidas e tiossemicarbazonas..... | 21 |
| 3.3.1 | Atividade biológica de derivados tiossemicarbazídicos e tiossemicarbazônicos..... | 24 |
| 3.4 | Toxicidade de fármacos..... | 26 |
| 3.5 | Teste de citotoxicidade por hemólise – <i>Red Blood Cell (RBC) Assay</i> | 27 |
| 3.6 | Bactérias e suas classificações..... | 27 |
| 3.6.1 | Epidemiologia e resistência bacteriana..... | 28 |
| 3.7 | Teste de sensibilidade a antibacterianos..... | 30 |
| 4 | METODOLOGIA..... | 31 |
| 4.1 | Síntese das moléculas..... | 31 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.1.1 | Síntese do intermediário..... | 31 |
| 4.1.2 | Síntese dos compostos finais..... | 32 |
| 4.2 | Purificação dos compostos..... | 32 |
| 4.3 | Elucidação estrutural e características físico-químicas..... | 33 |
| 4.4 | Atividade hemolítica..... | 34 |
| 4.5 | Atividade antibacteriana..... | 34 |
| 4.5.1 | Microorganismos..... | 35 |
| 4.5.2 | Suspensão bacteriana..... | 35 |
| 4.5.3 | Preparo das soluções..... | 35 |
| 4.5.4 | Realização dos testes..... | 36 |
| 4.5.5 | Leitura das placas..... | 36 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 38 |
| 5.1 | Compostos sintetizados e caracterização físico-química..... | 38 |
| 5.1.1 | Mecanismo de reação da obtenção dos RF..... | 40 |
| 5.2 | Infravermelho..... | 40 |
| 5.2.1 | RF07..... | 40 |
| 5.2.2 | RF09..... | 42 |
| 5.3 | Atividade hemolítica..... | 43 |
| 5.4 | Atividade antibacteriana..... | 45 |
| 5.4.1 | Relação estrutura-atividade dos derivados RF..... | 46 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 48 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 49 |

1 INTRODUÇÃO

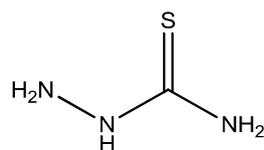
Desde tempos remotos da sociedade que os homens tentam combater as diversas patologias que os acometem. Os primeiros registros de tratamento fitoterápico datam de 3.000 a.C. pelos chineses e, até o advento da síntese orgânica, os produtos obtidos de origem natural foram os protagonistas no combate dessas patologias (BIANCOLLI, 2010).

No ano de 1828 o alemão Friedrich Wöhler sintetizou a ureia, que foi o primeiro composto orgânico sintetizado da história. Esse evento deu surgimento a um novo segmento para a química, a síntese orgânica. Foi com esse conhecimento em mãos que o químico alemão Felix Hoffman sintetizou o ácido acetil salicílico em 1897, considerado o primeiro fármaco sintético empregado na terapêutica. Desde então os fármacos de origem sintética dominam o mercado de medicamentos, e no ano de 1991, aproximadamente 75% dos fármacos comercializados eram derivados sintéticos (MENEGATTI et al., 2001).

Atualmente a síntese de fármacos é um segmento de extrema importância na química medicinal, uma área interdisciplinar que engloba diversos conhecimentos de ciências exatas, biológicas e da saúde. Segundo Montanari (1999), a química medicinal é definida como uma ciência trans-, multi- e interdisciplinar que se utiliza de áreas como biofísica, biologia molecular, bioquímica, química orgânica, e farmacologia, com o objetivo de produzir um novo fármaco que seja eficiente, seguro e de baixa toxicidade.

Muito da química medicinal se concentra no estudo das estruturas privilegiadas, definidas como a subunidade mínima de um composto que é capaz de interagir com um ou mais biorreceptores e modular suas atividades (DUARTE, 2006). A tiossemicarbazida (figura 1) é uma dessas estruturas, e é muito estudada em química medicinal devido às suas propriedades antibacterianas, antivirais, antitumorais entre outras (CIHAN-ÜSTÜNDAG et al., 2016)

Figura 1: Estrutura química da tiossemicarbazida



Fonte: dados da pesquisa, 2018

A escolha de uma doença a ser tratada é a primeira etapa para o desenvolvimento e introdução de um medicamento no mercado, e deve ser feita de maneira criteriosa, avaliando

a importância clínica, a necessidade, e as considerações socioeconômicas que estão envolvidas com essa patologia. A morbimortalidade de uma patologia deve ser um dos critérios mais importantes a ser considerado nessa etapa (GRAHAM, 2013).

No mundo moderno está sendo observado um aumento de mortalidade relacionada a infecções bacterianas por bactérias multirresistentes (MDR). Isso se deve principalmente pela ausência de fármacos eficazes para combater tais infecções (ROLAIN et al, 2016).

Segundo Rolain et al (2016), já existem cepas de bactérias em vários países da Europa que se tornaram multirresistentes à grande maioria dos antibióticos atualmente disponíveis. Uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* já demonstra resistência a todos os carbapenêmicos, e algumas cepas de *E.coli* demonstram resistência a mais três ou quatro classes de antibióticos, como cefalosporina, aminoglicosídeos e penicilinas.

Apesar do grande benefício à saúde populacional que os antibióticos proporcionaram, existem muitos problemas associados com o seu uso clínico. Os principais contratempos com a utilização desses fármacos são os efeitos colaterais e a ausência de eficácia devido à resistência bacteriana. Absolutamente todos os antibióticos atualmente disponíveis já foram identificados como ineficazes em pelo menos uma cepa resistente de bactéria, e além da *Klebsiella pneumoniae*, já foram identificadas cepas do gênero *Enterobacteriaceae* que são multirresistentes devido à produção de uma β -lactamase de amplo espectro de atividade (ROLAIN et al., 2016)

Com o objetivo de inserir um medicamento no mercado, as indústrias farmacêuticas, as universidades e os grandes centros de pesquisa investem anos de esforços e bilhões de dólares na pesquisa de fármacos. Segundo Katzung (2012), atualmente os pesquisadores levam entre 10 e 15 anos em média para conseguir colocar um medicamento no mercado. Esse tempo é justificado pela grande quantidade de estudos necessários para o desenvolvimento do medicamento.

Apesar de todos os estudos despendidos nesses medicamentos, ocorrem muitos casos de toxicidade que são observados somente após sua comercialização, sendo necessária a retirada do medicamento do mercado ou ter seu uso restrito em diversos países. Alguns dos exemplos mais conhecidos são o grepafloxacino e o temafloxacino. Tendo isso em vista, fica evidente a importância da realização efetiva dos testes de toxicidade (FERREIRA, 2009).

O teste de atividade hemolítica é uma avaliação prévia da toxicidade do fármaco, de modo que funciona como uma triagem entre moléculas (CARVALHO et al, 2012). Esse é um teste *in vitro* para avaliação de citotoxicidade membranar, e sua análise é essencial durante a avaliação toxicológica da molécula, sendo um dos testes mais empregados com essa finalidade (MOE et al., 2003)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar, caracterizar e avaliar o perfil antibacteriano e hemolítico de derivados sintéticos tiossemicarbazônicos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Sintetizar os derivados tiossemicarbazônicos;
- b) Verificar suas propriedades físico-químicas;
- c) Avaliar a estrutura química dos derivados tiossemicarbazônicos por espectroscopia de infravermelho;
- d) Quantificar a citotoxicidade hemolítica dos derivados tiossemicarbazônicos;
- e) Verificar a atividade antibacteriana em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Segundo Lima (2007), a química medicinal é a ciência que estuda em escala molecular a ação dos fármacos no organismo, enfatizando a importância de cada grupo funcional e o modo como eles interagem com o alvo farmacológico. Cabe também à química medicinal o planejamento, desenvolvimento, a caracterização e a obtenção novas moléculas com potencial atividade biológica. Com foco nesses objetivos os químicos medicinais dispõem de uma variedade de meios e estratégias que facilitam as suas pesquisas.

Segundo a IUPAC, a química medicinal é uma disciplina baseada na química, e também envolve aspectos de ciências biológicas, médicas e farmacêuticas. A química medicinal lida com a invenção, a descoberta, o desenho, a identificação e a preparação de moléculas biologicamente ativas, a interpretação do seu modo de ação em nível molecular, a construção das relações estrutura-atividade e o estudo do seu metabolismo (BARREIRO, 2009)

3.1 Planejamento e modificação molecular

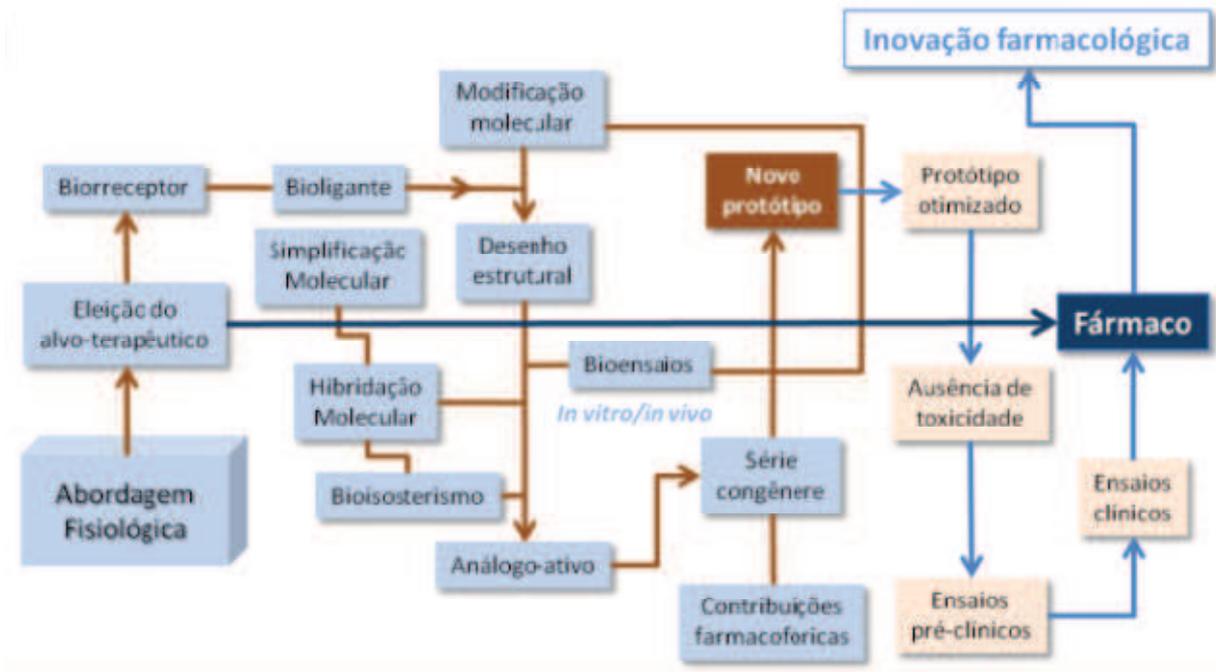
Em descrição simplificada, o processo de desenvolvimento de um novo medicamento divide-se em quatro etapas: estudos *in-vitro*; testes em animais; testes clínicos e comercialização (KATZUNG, 2012). O trabalho do químico medicinal se concentra especialmente na primeira etapa, que se destaca principalmente pelo desenvolvimento do princípio ativo. O desenvolvimento caracteriza-se, entre outros aspectos, pelo planejamento e a otimização da molécula candidata a fármaco. Essa etapa se inicia com a escolha de uma doença, seguido da seleção de um alvo biomolecular que esteja relacionado com essa doença, e o estudo de uma molécula promissora que seja capaz de interagir com esse alvo, causando efeitos direcionados à erradicação da patologia (PATRICK, 2013).

Estratégias modernas de planejamento molecular baseiam-se na identificação de uma biomolécula alvo, que pode ou não ter a sua estrutura tridimensional conhecida. As ferramentas tecnológicas como programas computacionais facilitam o planejamento num processo conhecido como *Computer-aided Drug Design (CADD)*. Nesse caso, a interação do fármaco com o alvo pode ser visualizada tridimensionalmente, além da possibilidade de serem desenvolvidos estudos mais complexos de interação fármaco-receptor, tal como estudo de *docking* (GUIDO et al, 2013).

A eleição do alvo farmacológico é uma etapa crucial, e Barreiro (2009) a definiu como uma das mais importantes para a descoberta de um fármaco através da abordagem fisiológica

(figura 2). Essa é a abordagem moderna de descoberta de novos fármacos, que baseia o desenvolvimento do fármaco a partir do alvo terapêutico.

Figura 2: Etapas para a descoberta de novos fármacos segundo a abordagem fisiológica



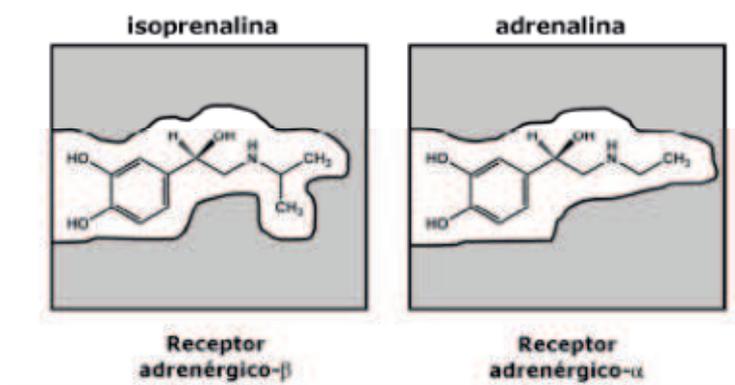
Fonte: (BARREIRO, 2009)

Algumas moléculas que estão presentes no mercado, ou descritas na literatura também podem ser utilizadas como um ponto de partida para a descoberta de um novo fármaco. Essa é uma estratégia comum de descoberta de um composto *lead* – uma molécula que possui atividade farmacológica desejada e que será utilizada para o desenho molecular –, conhecida como *farmacophore-based drug design (FBDD)*. Os fármacos desenvolvidos dessa maneira podem ter propriedades farmacológicas semelhantes aos do composto de referência, e serão chamados de *Me too*. Alternativamente, o fármaco novo também pode apresentar-se com melhor potência, seletividade e eficácia do que o composto de referência, e nesse caso serão chamados de *Me better* (PATRICK, 2013).

Outra estratégia de desenvolvimento comum, denominada *ligand-based drug design (LBDD)*, consiste no desenvolvimento do fármaco tendo uma molécula endógena como referência. Um exemplo clássico foi o desenvolvimento do isoproterenol, um medicamento simpatomimético seletivo para β -adrenoceptores, utilizado no tratamento de asma e bradicardia (figura 3). No caso do isoproterenol, a molécula endógena tomada como referência foi a adrenalina, modificando somente o grupamento N-metil, substituindo-o por

um grupamento isopropil que impede a interação do fármaco com receptores α -adrenérgicos (BIAGGIONI; ROBERTSON, 2014).

Figura 3. Planejamento do isoproterenol a partir de um composto endógeno



Fonte: (BIAGGIONI; ROBERTSON, 2014).

O planejamento do fármaco se baseia em ferramentas para a identificação de um composto *hit* ou ligante, que pode ser otimizado por estratégias de modificação molecular. Os *hits* são moléculas promissoras que demonstram afinidade por determinado alvo farmacológico. Existem uma variedade de estratégias de modificação molecular, que são feitas com o objetivo de otimizar a molécula em estudo para alcançar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas ideais que um fármaco necessita (BARREIRO; FRAGA, 2014).

Caso a estrutura tridimensional do alvo farmacológico seja conhecida, pode-se encontrar ou desenvolver o *hit* com base na estratégia de *Structure-Based Drug Design* (SBDD). Desenvolvimento através de LBDD, SBDD, triagem virtual dentre outros, são métodos comuns de seleção de um composto hit (GUIDO et al, 2013).

3.1.1 Desenho Racional

O desenho racional de fármacos implica em um planejamento extremamente minucioso de uma molécula bioativa a qual é conhecido a estrutura do alvo farmacológico onde o fármaco ligar-se-á (KATZUNG, 2012).

O desenho racional de fármacos requer uma série de estudos, e um banco de dados disponível com várias moléculas, proteínas e suas representações estruturais em três dimensões. O banco de dados é de extrema importância para facilitar os estudos requeridos, pois o desenvolvimento do fármaco é feito a partir da estrutura química conhecida do alvo farmacológico ao qual o fármaco deverá se ligar. Os bancos de dados contêm uma grande

quantidade de biomoléculas, com estrutura química tridimensional definida por métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) e difração de raios X, que podem servir de alvos biológicos para novos fármacos. Sabendo a doença destinada para o novo fármaco, esse banco de dados deve ser consultado, e um alvo farmacológico que esteja relacionado com a doença será escolhido. Com a estrutura do alvo em mãos, a estrutura química do fármaco começará a ser planejada de modo a se ligar no sítio ativo deste alvo (MANDAL et al., 2009).

Uma vez que o alvo farmacológico foi identificado, o desenho racional do fármaco deverá seguir diversos aspectos, como avaliação da afinidade pelo alvo, hidrofilia/lipofilia, absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), possíveis reações de ataque nucleofílico e eletrofílico, toxicidade da molécula e de todos os metabólitos possíveis e a relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR).

O desenho racional de fármacos é feito por muitos grupos de pesquisa. A grande quantidade de estudos complexos como Docking e QSAR, além de equipamentos de alto custo financeiro e programas computacionais necessários para esse tipo de pesquisa, constituem um grande impedimento para o desenho racional de fármacos. A compensação de tanto investimento vem de uma vasta compreensão a respeito todas as propriedades químicas e farmacológicas do novo fármaco em estudo (NASCIUTTI, 2012).

3.2 Estratégias de modificação molecular

Após o composto *hit* ter tido sua estrutura química elucidada, bem como a validação de sua atividade farmacológica, segue as etapas de modificação molecular e determinação da relação estrutura-atividade (SAR). Essas etapas são feitas com base em estratégias desenvolvidas pela química medicinal para o desenho racional de fármacos. Como exemplo, tem-se a hibridação molecular, o bioisosterismo, a simplificação molecular e a restrição conformacional (SILVA, 2012).

3.2.1 Bioisosterismo

O conceito de bioisosterismo foi dado em meados de 1950 para aquelas moléculas que se encaixavam na definição de isómeros e que possuíam propriedades físico-químicas de efeitos biológicos semelhantes. Em 1970 essa definição foi ampliada por Alfred Burger em bioisosterismo clássico e bioisosterismo não clássico, que diferem no aspecto de que os grupamentos bioisómeros não clássicos não necessitam ter a mesma quantidade de elétrons de

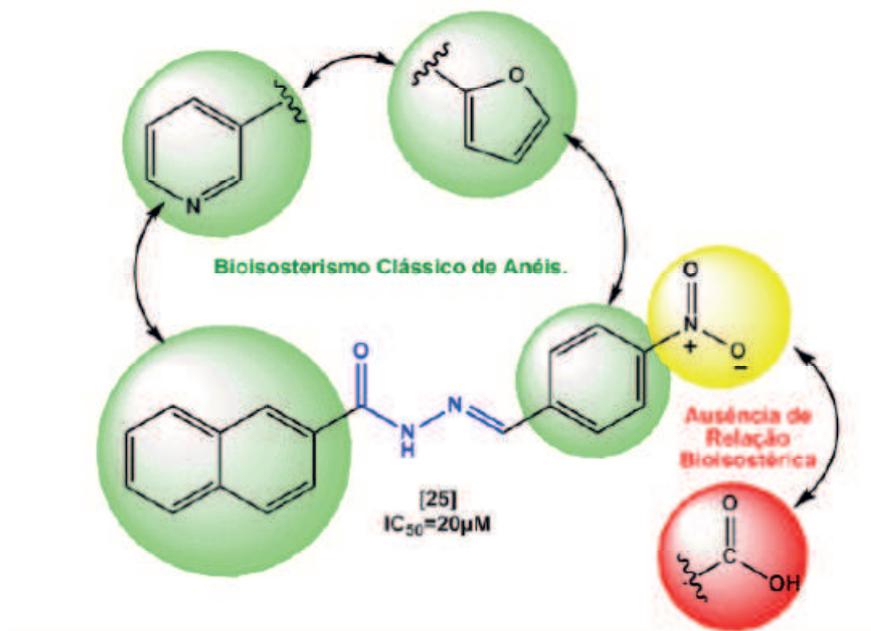
valência, mas necessitam de ter as mesmas propriedades de afinidade ao receptor e efeitos farmacológicos semelhantes (BHATIA et al., 2011).

Bioisosterismo é uma das principais estratégias de modificação molecular em desenho racional de fármacos. Utilizada com o objetivo de melhorar a atividade farmacológica, aspectos farmacocinéticos, interação com o alvo e também com viés de reduzir a toxicidade do composto *lead*. É importante que, para o bioisosterismo ser feito, deve-se ter em mente o conhecimento total da estrutura da molécula, de todos os seus grupamentos farmacofóricos, das propriedades físico-químicas e das possíveis vias de metabolismo do composto estudado (LIMA; BARREIRO, 2005).

Ambos os biososterismos clássicos e não clássicos são igualmente importantes em modificação molecular, sendo que qualquer substituição biosostérica deve ser realizada cuidadosamente tendo diversos parâmetros em mente, como: o tamanho, o volume e a distribuição eletrônica dos átomos; a solubilidade do composto *lead*; a reatividade dos grupos funcionais que estão sendo adicionados, de modo a prever novos caminhos metabólicos; e os fatores conformacionais do grupamento biosostero adicionado (LIMA; BARREIRO, 2005).

Um exemplo de bioisosterismo foi o desenvolvimento da molécula **LASSBio-1524** (figura 4), que é um inibidor da quinase de kappa B (IKK- β), uma quinase envolvida na transcrição de fatores relacionados a desenvolvimento de tumores e inflamações (SILVA, 2012).

Figura 4. Modificação molecular por bioisosterismo



Fonte: (Silva, 2012).

No exemplo do LASSBio-1524, existe uma relação bioisostérica clássica entre os anéis aromáticos benzeno, piridina e furano representados em verde. A ausência da relação bioisostérica clássica entre os substituintes nitro e ácido carboxílico é justificada pela natureza ácida do segundo, a qual está ausente no primeiro (SILVA, 2012).

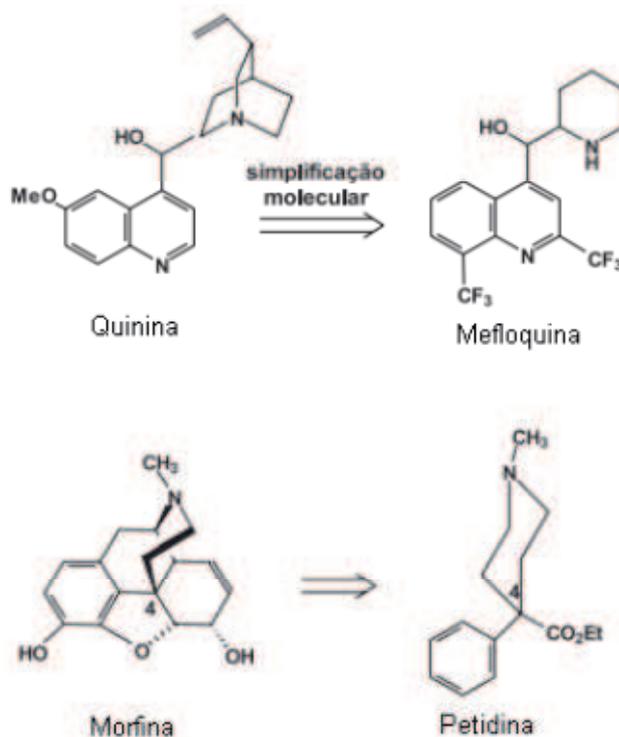
3.2.2 Simplificação molecular

A simplificação molecular é uma das principais estratégias de modificação molecular em química medicinal. Consiste na diminuição da estrutura molecular de moléculas estruturalmente complexas, com objetivo de facilitar a obtenção das mesmas por síntese orgânica, ao mesmo tempo em que se mantém ou aumenta-se a atividade farmacológica do composto (GARCÍA et al, 2010).

Um exemplo clássico da aplicação da simplificação molecular foi a obtenção das 4-fenilpiperidinas, representados pela petidina, e mefloquina, tendo os compostos naturais morfina e quinina – respectivamente – como protótipos (esquema 1). Durante o planejamento molecular da simplificação, é de extrema importância que sejam previstos os possíveis metabólitos da nova molécula, bem como todos os grupos toxicofóricos formados no processo. A descoberta de grupos funcionais eletrofílicos por exemplo devem ser avaliadas

cuidadosamente, pois são potencialmente tóxicos por conta da possível formação de metabólitos epoxidados e outros bionucleófilos (BARREIRO, 2002).

Esquema 1. Simplificação molecular



Fonte: adaptado de Barreiro, 2012.

Uma vez que os grupamentos farmacofóricos de uma molécula tenham sido identificados por estudos de *SAR*, os demais grupamentos podem frequentemente ser retirados sem perda significativa de atividade. A simplificação engloba a abertura ou a retirada de anéis complexos, bem como a retirada de centros quirais. A eliminação dos centros quirais é de extrema importância para a obtenção sintética do composto de interesse farmacológico, tendo em vista que geralmente apenas um dos enantiômeros é dotado da atividade biológica desejada (PATRICK, 2013).

A simplificação molecular fornece a vantagem da obtenção de uma molécula estruturalmente menos complexa e com retenção da atividade farmacológica do composto protótipo, o que facilita a sua síntese em laboratório. No entanto, a simplificação exagerada também pode trazer desvantagens. Geralmente as moléculas pequenas e lineares que podem ser obtidas pela simplificação possuem um grande número de *conformeros*, aumentando a possibilidade desses fármacos interagirem com outros receptores e possivelmente demonstrar efeitos colaterais (ABRAHAM, 2003).

3.2.3 Restrição conformacional

Moléculas que possuem ligações simples entre seus átomos são passíveis de apresentar rotações entre suas ligações. Essas rotações fornecem uma certa flexibilidade para o fármaco e possibilitam uma variedade de conformações moleculares na qual apenas algumas detêm a capacidade de se ligar ao receptor e exercer efeito biológico desejado, enquanto outras podem ser inativas, ou apresentar um efeito colateral indesejado. As diferentes conformações do fármaco o tornam capaz de interagir com outros receptores biológicos, que desencadeia esses efeitos colaterais (SOLOMONS, 2008).

A rigidificação da estrutura molecular baseia-se em adicionar grupamentos que impedem a mudança de conformação da molécula, restringindo-a na conformação ativa, que é a conformação na qual o fármaco se liga ao alvo farmacológico desejado (esquema 2). Essa restrição pode ser feita por diferentes modificações estruturais, como adição de um anel, de uma ligação dupla, ou de um grupo funcional rígido como amida. Além de diminuir a quantidade de conformeros possíveis, e conseqüentemente diminuir a possibilidade de efeitos colaterais, a rigidificação da molécula deixa-a mais prontamente passível de se ligar ao receptor desejado (PATRICK, 2013).

Esquema 2. Restrição conformacional

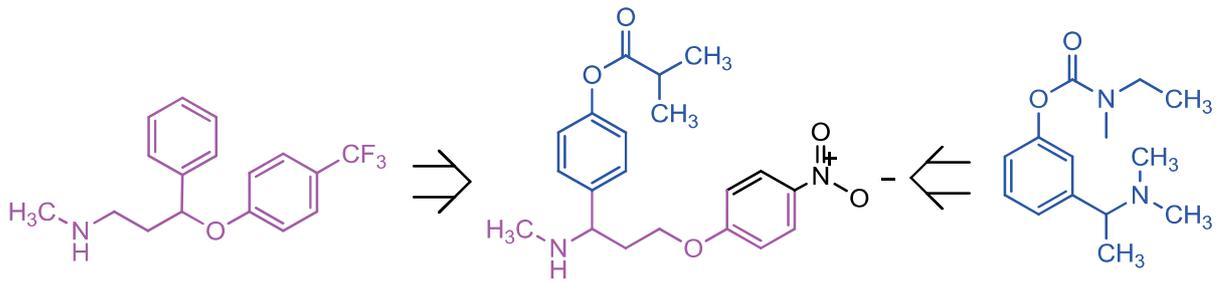


Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

3.2.4 Hibridação molecular

A hibridação molecular consiste em juntar dois ou mais grupamentos farmacofóricos de compostos ativos (esquema 3). Essa estratégia foi predominante por muito tempo no desenvolvimento de fármacos multialvo, que são aqueles que interagem com mais de um alvo biológico. Geralmente é desejável que um fármaco seja seletivo para um receptor. No entanto, a interação mútua com mais de um alvo tem suas vantagens em casos específicos (SILVA, 2012).

Esquema 3. Hibridação molecular



Fonte: adaptado de Silva, 2012

A grande maioria dos fármacos atualmente disponíveis no mercado foram produzidos com a utilização das estratégias de desenvolvimento e de modificação descritas acima, como o captopril, procaína, benzodiazepínicos e outros. Neste sentido, é imprescindível para o planejamento racional de novos fármacos que o químico farmacêutico medicinal tenha em mente as ferramentas que essa ciência fornece para essa atividade (DALE, 2007; WERMUTH, 2008).

3.3 Tiossemicarbazida e Tiossemicarbazonas

A importância da tiossemicarbazida e tiossemicarbazonas como estruturas privilegiadas para o desenvolvimento de novos fármacos fica evidente quando se tem em mente a variedade de atividades que essas estruturas detêm. Segundo He et al. (2012), a tiossemicarbazida (figura 5) de estrutura molecular $\text{CH}_5\text{N}_3\text{S}$ demonstra uma diversidade de atividades farmacológicas significantes, como antitumoral, fungicida, bactericida, anti-inflamatória e antiviral (CIHAN-ÜSTÜNDAG et al., 2016).

Figura 5. Estrutura química da tiossemicarbazida(1) e tiossemicarbazona (2)

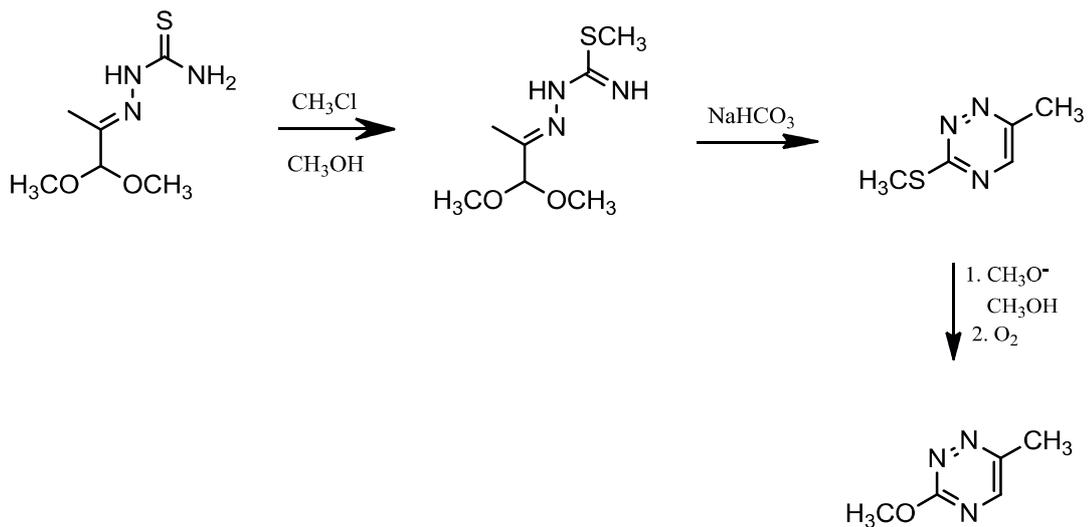
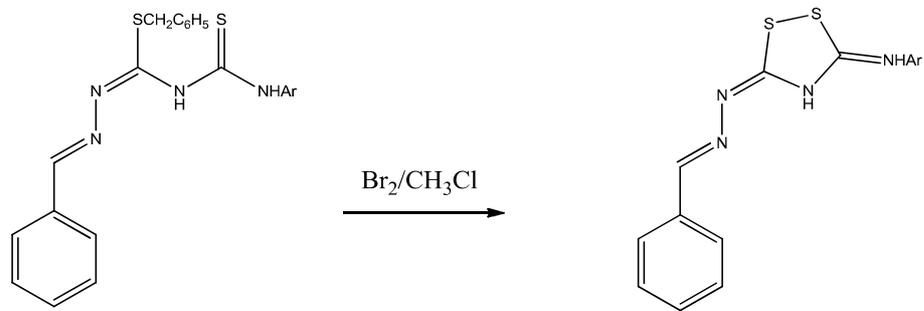
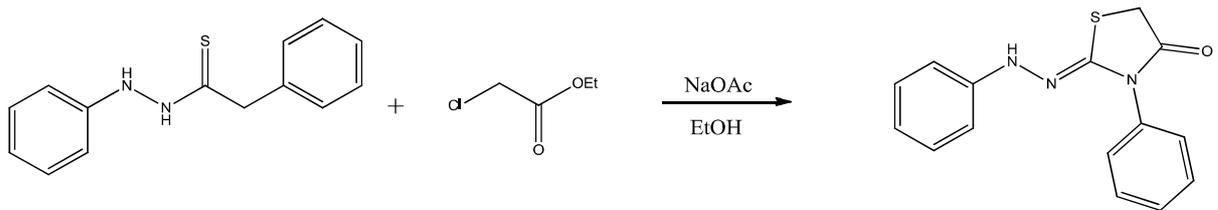


Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

As tiossemicarbazidas e tiossemicarbazonas também possuem uma variedade de aplicações não biológicas, como aplicações sintéticas, propriedades anticorrosivas e capacidade de formar complexos metálicos (SILVA, 2008).

Uma das principais aplicações sintéticas das tiossemicarbazidas e tiossemicarbazonas é a obtenção de ditiazolidinas, tiazolidinonas e triazina (esquema 4), que são outras importantes estruturas privilegiadas utilizadas em química medicinal (CAVALCANTE et al., 1999; TENÓRIO, 2005; CARLOS, 2011)

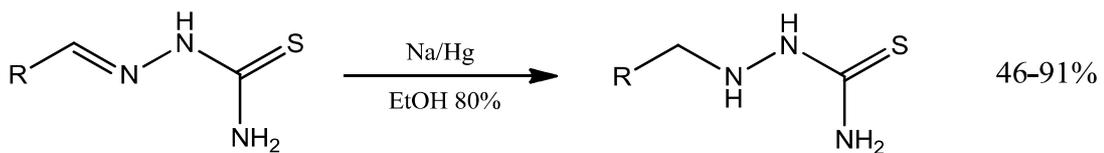
Esquema 4: aplicações sintéticas da tiossemicarbazida



Fonte: adaptado de (Cavalcante, 1999; Tenório, 2005)

Segundo o trabalho realizado por Machado (2010), a tiossemicarbazida é uma estrutura linear do anel heterocíclico tiodiazol, e pode ser sintetizada facilmente e com rendimentos satisfatórios pela redução do grupamento imina da molécula tiossemicarbazona. De forma alternativa, a tiossemicarbazona também pode ser obtida pela oxidação da tiossemicarbazona (esquema 5).

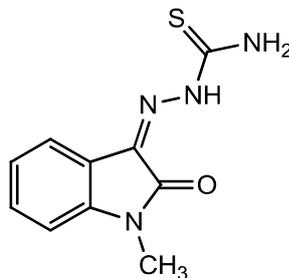
Esquema 5. Síntese de derivados tiossemicarbazídicos através da tiossemicarbazona



Fonte: adaptado de Machado, 2010.

Durante a incidência da Varíola o fármaco metisazona (figura 6) que contém o esqueleto tiossemicarbazona, foi muito utilizado para prevenção de uma das principais doenças infectocontagiosas causada por vírus que a humanidade já enfrentou, sendo efetivo contra muitos vírus de DNA e RNA (CIHAN-ÜSTÜNDAG et al., 2016).

Figura 6: estrutura química da metisazona

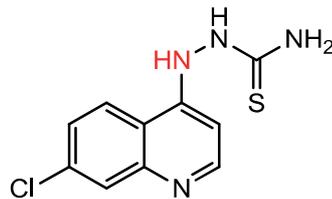


Fonte: adaptado de www.chemspider.com

Outro método de obtenção de tiossemicarbazida é através da reação de isotiocianatos com hidrato de hidrazina (esquema 6) em tetrahydrofurano (THF). Essa reação é extremamente eficiente, fornecendo rendimentos entre 70 e 90% (TENÓRIO, 2005).

Segundo o trabalho de Machado (2010) que realizou testes antimicrobianos de derivados tiossemicarbazídicos em *Mycobacterium tuberculosis*, foi constatado que a substituição do hidrogênio no átomo de nitrogênio destacado em vermelho na figura 7 causa perda considerável de atividade, com um decréscimo para mais de 250 µg/mL de concentração inibitória mínima (CIM₅₀). Esse estudo de relação estrutura atividade implica que o grupamento N-H da tiossemicarbazida é de essencial importância para a manutenção da atividade antibacteriana desses compostos.

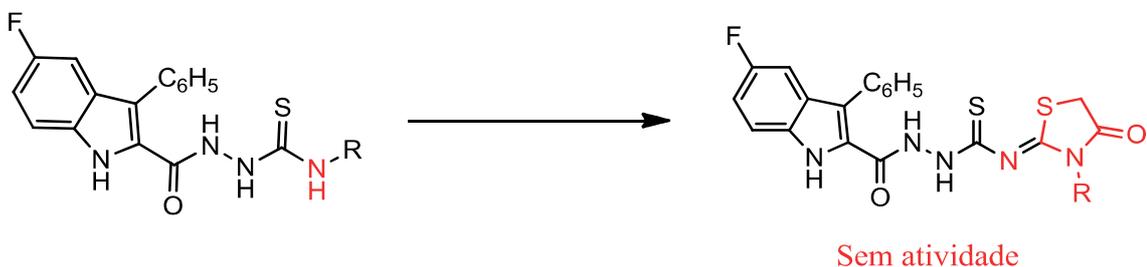
Figura 7. Função amina que evidencia a atividade antimicrobiana da tiossemicarbazida



Fonte: Adaptado de Machado, 2010.

Já no estudo realizado por Cihan-Üstündag et al (2016) foi avaliada a atividade antiviral de derivados tiossemicarbazídicos para sete tipos de vírus, bem como os estudos de relação estrutura-atividade dos compostos sintetizados. De forma semelhante ao exemplo anterior, os pesquisadores demonstraram a importância da manutenção da função N-H do esqueleto tiossemicarbazídico, visto que a ciclização ou a adição de grupamentos volumosos no nitrogênio retira completamente a atividade antiviral dos derivados para todos os vírus testados (esquema 8).

Esquema 8. Substituição da função tioamida com perda da atividade



Fonte: Adaptado de Cihan-Üstündag et al, 2016

A pesquisa de Mavrova et al (2016) foi responsável por sintetizar uma série de compostos derivados tiossemicarbazídicos e demonstrou a importância da função tioamida da tiossemicarbazida para atividade antitumoral através do estudo de Docking (figura 8). A ligação N-H livre fornece um hidrogênio que é capaz fazer ligação de hidrogênio com um

A possibilidade de um fármaco causar mais prejuízo do que efeitos benéficos para o organismo depende de diversos fatores, como idade e predisposição genética a efeitos adversos. A toxicidade pode ser desencadeada por diversos mecanismos, que são divididos com base em paradigmas gerais em: efeitos adversos sobre o alvo; efeitos colaterais indesejados; produção de metabólitos tóxicos; resposta idiossincrásicas; produção de resposta imune prejudicial (TANIGUCHI et al., 2009).

A produção de resposta imune é um problema grave, pois a toxicidade do fármaco é *independente da dose* – um fenômeno conhecido por *hipersensibilidade* – e qualquer concentração do fármaco na corrente sanguínea desencadeará a toxicidade. Essa resposta torna-se de particular importância quando o fármaco interage com um receptor alvo no eritrócito. Nesse caso, se os anticorpos do paciente forem capazes de se ligar ao complexo fármaco-receptor no eritrócito, o anticorpo pode ativar mediadores para destruir a célula, ou o sistema imune do paciente pode recrutar os fagócitos com o objetivo de destruir a célula sanguínea causando hemólise (TANIGUCHI et al., 2009).

3.5 Teste de citotoxicidade por hemólise – *Red Blood Cell (RBC) Assay*

Sabendo que a grande maioria dos fármacos são distribuídos pela corrente sanguínea, é de extrema importância que o fármaco em estudo seja completamente desprovido de atividade hemolítica.

O ensaio de citotoxicidade por hemólise permite quantificar por meio de espectrofotometria a toxicidade de fármacos e de outras substâncias mediante a membrana celular das células vermelhas, baseando-se na lise e liberação de hemoglobinas e na desnaturação proteica das proteínas dos eritrócitos. A relação entre hemólise e a danificação das proteínas celulares são detectadas com base na mudança de absorção das oxiemoglobinas, indicador de ambos os processos (ABREU, 2008).

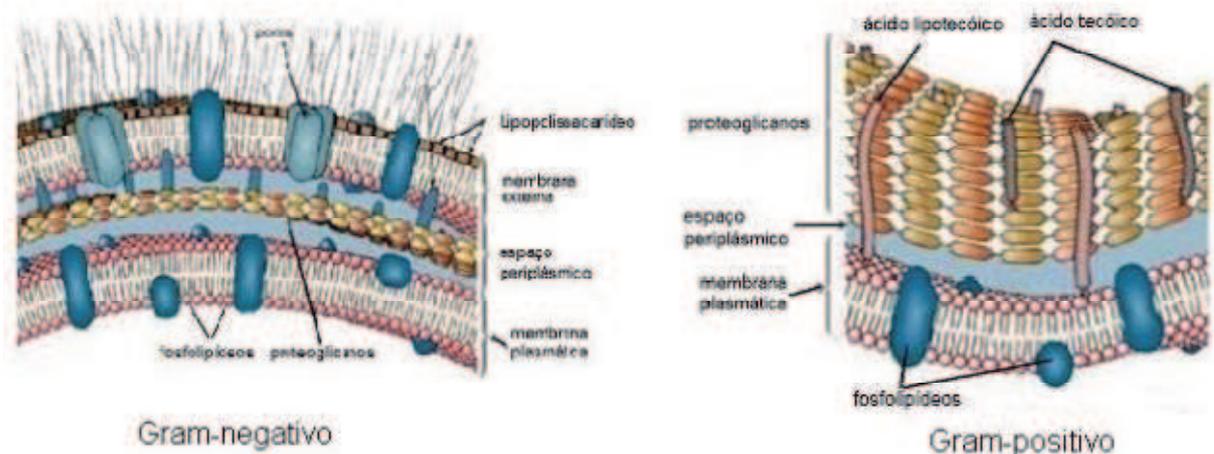
3.6 Bactérias e suas classificações

As bactérias podem ser classificadas de acordo com diversas características, duas das mais importantes classificações são dadas de acordo com suas capacidades de causar doença, e de acordo com a estrutura da parede celular. No primeiro aspecto, as bactérias são classificadas em patogênicas ou saprófitas. No segundo, são classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas (SANTOS, 2017).

A principal diferença entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas está nas suas paredes celulares. A parede celular é uma camada que se localiza fora da membrana celular bacteriana, e é uma estrutura de muita importância para a viabilidade bacteriana, responsável por manter o formato da célula, impedir o rompimento celular por lise osmótica dentre outros. As designações Gram-positivas e Gram-negativas são dadas de acordo com a capacidade da bactéria de reter a coloração de gram, que por sua vez depende da estrutura da parede celular (BROWN, 2016).

As paredes celulares de bactérias Gram-positivas possuem uma única e espessa camada de peptidoglicano. O peptidoglicano é formado por várias subunidades, em que cada subunidade contém dois tipos de açúcares: N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), e diferentes tipos de aminoácidos (figura 9). Já nas bactérias Gram-negativas a camada de peptidoglicano é mais delgada, e se localiza no meio do espaço periplasmático, que corresponde ao espaço entre a membrana celular interna e a membrana celular externa. A parede celular das Gram-negativas são muito mais complexas, e geralmente são mais resistentes às ações dos antibióticos do que as Gram-positivas (ALBERTS, 2010).

Figura 9: Estrutura das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas



Fonte: <http://www.klimanaturali.org/>

3.6.1 Epidemiologia e resistência bacteriana

Há muito tempo que as infecções bacterianas correspondem a um dos maiores problemas de saúde em todo mundo. Dentre essas, aquelas que afetam diretamente a corrente sanguínea (ICS) destacam-se entre as demais, por causa do seu alto índice de morbimortalidade. Os microorganismos habitualmente adentram a corrente sanguínea através

de feridas cirúrgicas, queimaduras, infecção respiratória e por abscesso. As infecções por bactérias Gram positivas são as mais frequentes, e dentre essas, aquelas que ocorrem por *Staphylococcus aureus* correspondem à maioria dos casos. Os casos de infecção por Gram negativas são mais raros. No entanto, os índices de mortalidade são maiores do que para as gram positivas. Dentre as principais bactérias gram negativas estão *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (LIMA et al., 2013).

O ministério da saúde avaliou a magnitude de infecções hospitalares em 99 hospitais do Brasil, e foi identificado que 13% dos pacientes hospitalizados adquiriram infecções hospitalares, dos quais 34% evoluíram a óbito. De forma semelhante, um estudo na Europa identificou que 10% dos pacientes hospitalizados adquiriram infecções hospitalares, sendo essas responsáveis por 5000 óbitos anuais no continente (SOUZA, 2015).

A resistência bacteriana aos antibióticos é um dos maiores problemas enfrentados por pesquisadores da área de desenvolvimento de novos fármacos e é a principal justificativa para as incansáveis pesquisas investidas no desenvolvimento de novos antibióticos (ALBERTS, 2010).

As bactérias desenvolvem resistência através de quatro principais mecanismos de aspecto genético e bioquímico. São eles: (1) A *inativação enzimática* dos antibióticos, que se caracteriza pela síntese de enzimas que degradam o fármaco através de reações como hidrólise, transferência de um grupo químico ou processo de oxidação. O exemplo típico desse tipo de mecanismo é a produção da enzima β -lactamase, que hidrolisa o anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas. A β -lactamase é produzida tanto por bactérias gram negativas quanto gram positivas, estando esse mecanismo de resistência presente em ambos os tipos; (2) *modificação do alvo do antibiótico*. Nesse caso, o fármaco induz uma mutação no gene correspondente do receptor alvo, que impede a interação do fármaco com o receptor bacteriano, sem prejudicar a função normal do receptor para a célula; (3) as *Bombas de efluxo* estão presente tanto em bactérias gram positivas quanto gram negativas, e são responsáveis por expulsar o fármaco do interior celular através de proteínas transportadoras. Esse mecanismo de resistência funciona contra várias classes de antibióticos e envolve a produção de uma diversidade de transportadores, através de vários genes; (4) a *alteração na permeabilidade da membrana* é um mecanismo exclusivo das bactérias gram negativas, e funciona através da modificação do conteúdo de lipopolissacarídeos e da estrutura

membranar, conseqüentemente alterando a permeabilidade do fármaco através da membrana (COSTA, 2017).

3.7 Teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA)

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer espécie de microrganismo capaz de causar infecção. Essa pesquisa é essencial no desenvolvimento de fármacos antibióticos para avaliar a atividade antibacteriana do novo composto. Esses testes são mais frequentemente aplicados na clínica para avaliar a sensibilidade de microrganismos resistentes (ANVISA, 2008).

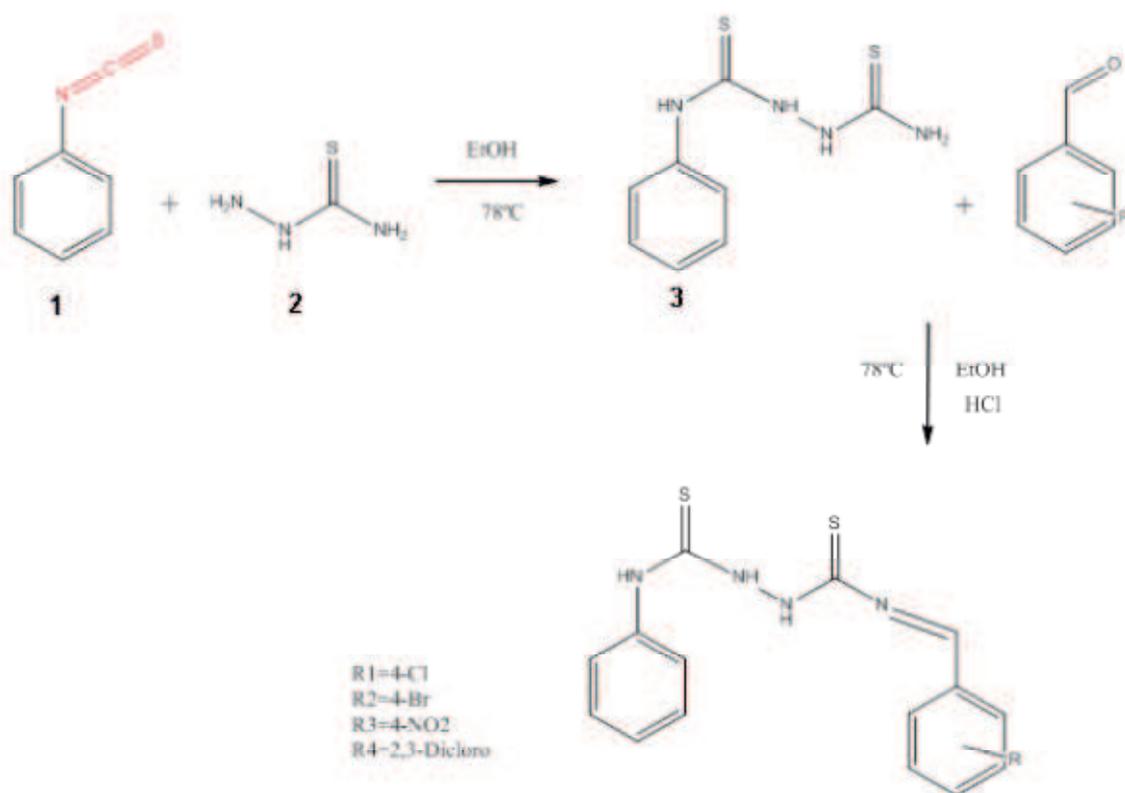
A metodologia da microdiluição em caldo é a mais adequada para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM), que corresponde à concentração mínima do fármaco numa solução que é necessária para exercer o efeito antibacteriano. As CIMs têm sido determinadas usando concentrações derivadas, tradicionalmente, de diluições 2X em série indexadas, por exemplo: 1, 2, 4, 8, 16 µg/mL e assim por diante. Uma das desvantagens do método de microdiluição em caldo é que ele geralmente não fornece a CIM exata do fármaco. Isto é, a CIM encontrada na leitura da placa de microdiluição, provavelmente não é a CIM verdadeira, uma vez que esse valor exato da CIM está, frequentemente, entre a concentração da diluição do poço no qual foi verificada a inibição do crescimento bacteriano, e do próximo poço correspondente (NCCLS, 2015).

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese das moléculas

Os derivados tiossemicarbazônicos foram sintetizados por uma via linear em duas etapas, em que primeiramente foi preparada uma quantidade suficiente do intermediário **3**, e esse foi posteriormente condensado com um composto aldeído aromático substituído (esquema 9), fornecendo a molécula final.

Esquema 9. Rota sintética dos derivados da série RF sintetizados



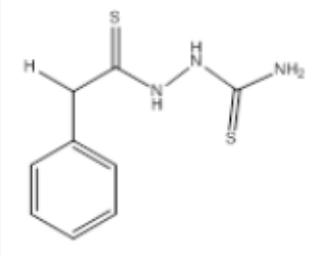
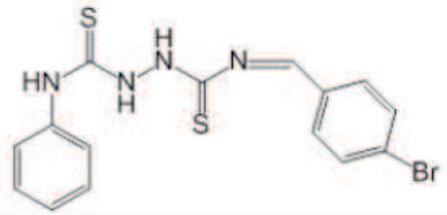
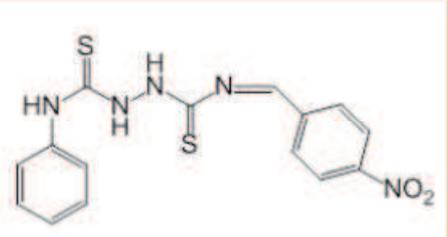
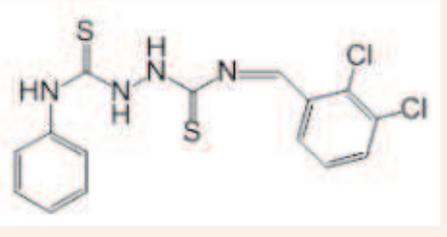
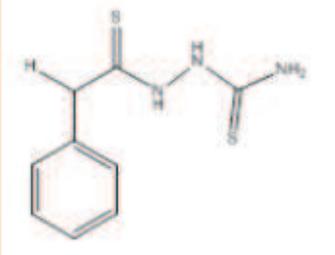
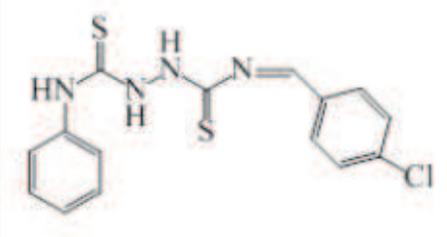
Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Todas as reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCD), e ao final das duas etapas foram obtidos um intermediário tiossemicarbazídico (3) e quatro compostos derivados tiossemicarbazônicos da série RF, com variações na substituição do anel aromático ligado ao grupo imina.

Foram sintetizadas cinco moléculas, das quais quatro são compostos finais derivados tiossemicarbazônicos da série RF, e uma delas é um intermediário tiossemicarbazídico

utilizado como reagente na síntese das moléculas finais. Todos os derivados e suas características encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Derivados sintetizados e suas estruturas

| Composto | Nomenclatura IUPAC | Estrutura Molecular |
|----------|--|---|
| RF07 | <i>N</i>-fenilhidrazina-1,2-di(carbotiamida) |  |
| RF10 | (<i>Z</i>)-<i>N</i>¹-(4-bromobenzilideno)-<i>N</i>²-fenilhidrazina-1,2-di(carbotiamida) |  |
| RF11 | (<i>Z</i>)-<i>N</i>¹-(4-nitrobenzilideno)-<i>N</i>²-fenilhidrazina-1,2-di(carbotiamida) |  |
| RF13 | (<i>Z</i>)-<i>N</i>¹-(2,3-diclorobenzilideno)-<i>N</i>²-fenilhidrazina-1,2-di(carbotiamida) |  |
| RF07 | <i>N</i>-fenilhidrazina-1,2-di(carbotiamida) |  |
| RF09 | (<i>Z</i>)-<i>N</i>¹-(4-clorobenzilideno)-<i>N</i>²-fenilhidrazina-1,2-di(carbotiamida) |  |

Fonte: Dados da pesquisa, 2018

4.1.1 Síntese do intermediário

A tiossemicarbazida e os aldeídos aromáticos com as diferentes substituições são produtos comerciais que já estavam disponíveis no laboratório, sendo necessária a síntese prévia apenas do intermediário tiossemicarbazídico RF7 (composto **3** no esquema 1). Para tal, a tiossemicarbazida disponível foi recristalizada em água com viés de obter seus cristais purificados.

Na síntese do intermediário **3**, primeiramente foram pesados 0,302 g de tiossemicarbazida recristalizada, e adicionados à um balão de fundo redondo juntamente com 15 mL de etanol. Em seguida foram adicionados 0,4 mL de fenilisotiocianato ao sistema, resultando numa mistura equimolar dos dois reagentes. Por fim, a mistura foi colocada sem catalizador sob agitação magnética, acoplada com um condensador e aquecida até a temperatura de refluxo do etanol.

Finalizada a reação, formou-se um precipitado branco que foi filtrado, secado em temperatura ambiente e pesado em balança analítica e armazenado em vidro de penicilina.

Uma avaliação prévia da pureza do intermediário **3** obtido foi verificada por meio de placa de CCD. Averiguado o funcionamento da reação, a mesma foi repetida com 2 gramas de tiossemicarbazida e com um equivalente molar de fenilisotiocianato, fornecendo uma quantidade suficiente para as reações dos compostos finais.

4.1.2 Síntese dos compostos finais

Finalizada a obtenção do intermediário tiossemicarbazídico **3**, os compostos finais foram sintetizados por uma reação de condensação em meio etanólico ácido sob agitação magnética e refluxo.

Nessa etapa de obtenção dos compostos finais, as reações foram feitas partindo de 200 mg de cada um dos aldeídos aromáticos, que foram colocados em balões de fundo redondo juntamente com uma gota de ácido clorídrico P.A como catalisador. O intermediário tiossemicarbazídico **3** foi adicionado a mistura em uma quantidade suficiente para obter uma razão equimolar dos reagentes. A reação foi feita em 15 mL de etanol e aquecida à temperatura refluxo em um sistema acoplado a um condensador

A precipitação de todos os produtos finais foi forçada com a adição de água destilada na mistura, e os cristais obtidos foram filtrados e pesados e armazenados em diferentes vidros de penicilina.

4.2 Purificação dos compostos

A purificação da molécula RF09 (R= 4-Cl) foi feita com sucessivas precipitações forçadas com adição de água destilada gelada nas soluções filtradas que foram deixadas em repouso dentro da geladeira por uma semana (esquema 10). Já para o composto RF10, a purificação foi feita com a precipitação forçada com água destilada adicionada diretamente na reação, obtendo primeiros cristais purificados que foram filtrados, enquanto o subproduto permaneceu solubilizado na solução filtrada.

Esquema 10. Purificação do derivado RF09



Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

A purificação do composto intermediário RF07 foi feita através da recristalização dos primeiros cristais em etanol. Não foi necessário purificar os derivados RF11 e RF13, pois aparentavam estar puros nas placas de CCD.

4.3 Elucidação estrutural e características físico-químicas

A estrutura química dos compostos foi inicialmente avaliada por espectroscopia de infravermelho (IV) utilizando as amostras sólidas em pastilhas de KBr.

Foram avaliados somente os espectros de duas das moléculas sintetizadas, o RF07 e o RF09. Os espectros dessas moléculas podem sugerir de forma adequada o sucesso da reação. A formação do RF07 pode ser sugerida pelo desaparecimento das bandas da função isotiocianato destacada em vermelho no esquema 9, e pelo aparecimento de apenas uma banda de amina primária. Já a formação dos derivados finais pode ser sugerida pelo

desaparecimento de uma banda sugestiva de amina primária, e pelo aparecimento da função imina.

Após a síntese de todos os compostos, os mesmos tiveram suas características físico-químicas avaliadas. Foram determinados os valores dos fatores de retenção (FR) feito por CCDA, as suas faixas de fusão (F.F), – através do aparelho Quimis, modelo Q-340M –, o cálculo de rendimento de cada uma das reações, e os valores de *Log P* das moléculas, que foram determinados no *Chemdraw Ultra 12.0*.

4.4 Atividade hemolítica

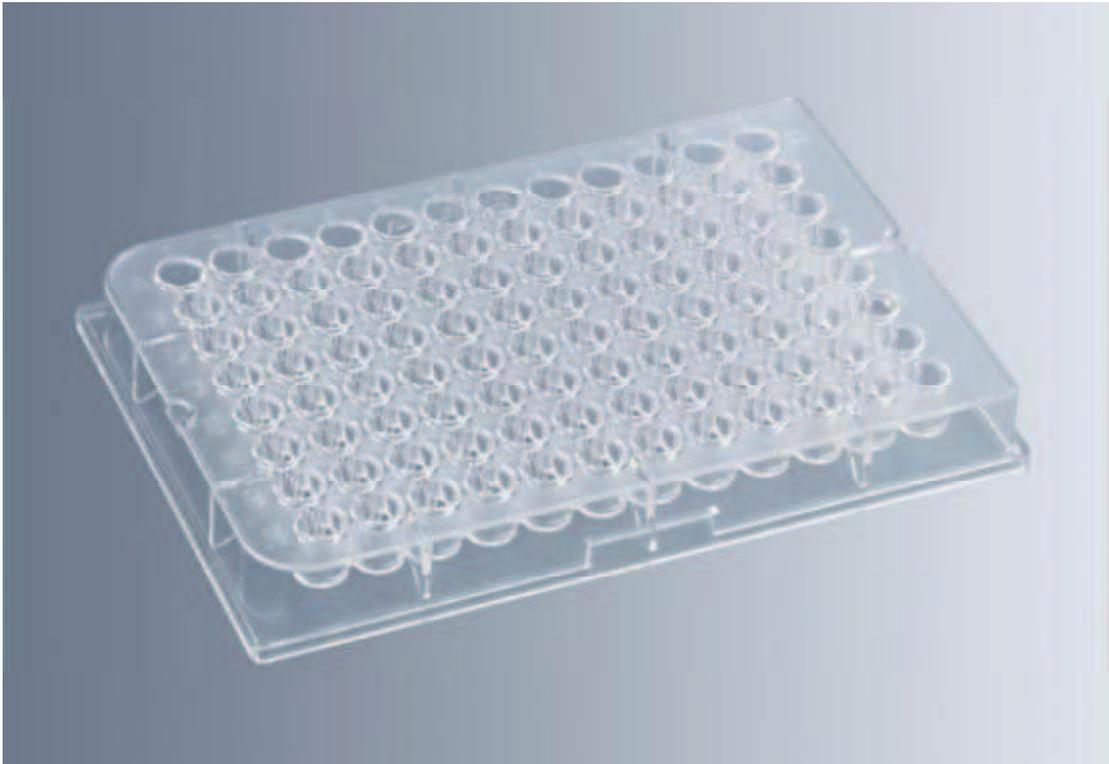
O teste para atividade hemolítica foi feito em eritrócitos humanos do tipo O+. Primeiramente foram pesados 5 mg de cada molécula a ser testada e dissolvidas em 10 mL de solução de DMSO a 1% em solução salina. Paralelamente, 2 mL de sangue foram por três vezes lavados em solução salina e centrifugados. Esse processo foi feito em quatro tubos de ensaio, totalizando 8 mL de sangue. O sobrenadante foi desprezado após cada centrifugação, e na terceira centrifugação o sangue sedimentado foi pipetado e adicionados 4 mL em um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com solução salina, e dessa mistura foram pipetados 1 mL para 5 tubos de ensaios separados. A cada um desses tubos foram adicionados 1 mL de cada solução das moléculas dissolvidas em DMSO a 1%, resultando numa concentração de 500 µg/mL de cada composto.

A mistura final foi deixada em repouso por uma hora, e depois foi centrifugada. Do sobrenadante foram pipetados 2 mL que foram analisados em espectrofotômetro para determinação da concentração de hemoglobina. A leitura da absorbância foi medida no comprimento de onda de 540 nm, e o resultado foi comparado com a absorbância no *líquido de turk* que causa hemólise total.

4.5 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos novos derivados RF foram testadas no Laboratório de Microbiologia de Resistência Microbiana Clínica e Contemporânea (LaRMiCC) através do método de diluição em caldo. Essa metodologia é feita com viés de determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) aproximada de cada molécula testada, através da diluição sequencial das moléculas em cada poço de uma placa de 96 poços (figura 9).

Figura 9. Placa de microdiluição em caldo



Fonte: www.zatlab.com.br, 2018.

4.5.1 Microorganismos

Os testes foram feitos em cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e de *Escherichia coli* ATCC 25922

4.5.2 Suspensão bacteriana

As suspensões das cepas de bactérias *E. coli* e *S. aureus* a serem usadas no teste foram feitas como descrito no CLSI M7-A6, em solução salina 0,9 % estéril com bactérias de cultura de 24 horas. A concentração resultante da suspensão foi de 10^8 UFC/mL, e foi determinada através da leitura em espectrofotômetro feita no comprimento de onda de 625 nm.

4.5.3 Preparo das soluções

As soluções mães para o teste foram preparadas pela dissolução de 20 mg dos derivados RF 07, 09, 11 e 13 em 2 mL de dimetilsulfoxido 20% diluído em água destilada, para obter uma solução com concentração de 10 μ g/L. A mistura foi submetida a um leve aquecimento em aparelho de ultrassom com viés de solubilizar os compostos que se apresentaram insolúveis no DMSO.

Posteriormente as soluções estoques foram preparadas com a diluição das soluções mães em água destilada estéril, utilizando 0,41 mL da solução mãe e 0,59 mL água destilada, obtendo 1 mL de cada solução estoque. Nesse ponto o DMSO encontra-se numa concentração de 10% v/v.

Por fim, as soluções teste foram preparadas pela diluição de 0,5 ml da solução estoque com 0,5 mL de meio de cultura Caldo Mueller Hinton (CMH), resultando finalmente numa concentração de 5 % de DMSO que não é tóxica para as bactérias. Foram ainda adicionados 20 μ L de Tween 20 na solução mãe, com objetivo de melhorar a solubilidade dos derivados que estavam pouco solúveis. Os derivados encontram-se numa concentração de 2048 μ g/mL nas soluções teste, que foi diluída até 1 μ g/mL nos poços contendo Caldo Mueller Hinton (CMH)

4.5.4 Realização dos testes

Os testes foram feitos em triplicata para cada derivado RF, com as concentrações dos derivados variando de 1024 μ g/mL até 1 μ g/mL em cada poço da placa. O meio de cultura utilizado nos poços foi o CMH, e a droga de referência foi a Amicacina. Alguns poços foram reservados para controle de viabilidade de microorganismos e controle de esterilidade, bem como controle negativo de DMSO.

Primeiramente foram adicionados 100 μ L de CMH em todos os poços da placa. Em seguida foi feita a diluição seriada de cada composto presente nas soluções estoques preparadas previamente, distribuídas nas fileiras A a F da placa com uma pipeta de 100 μ L.

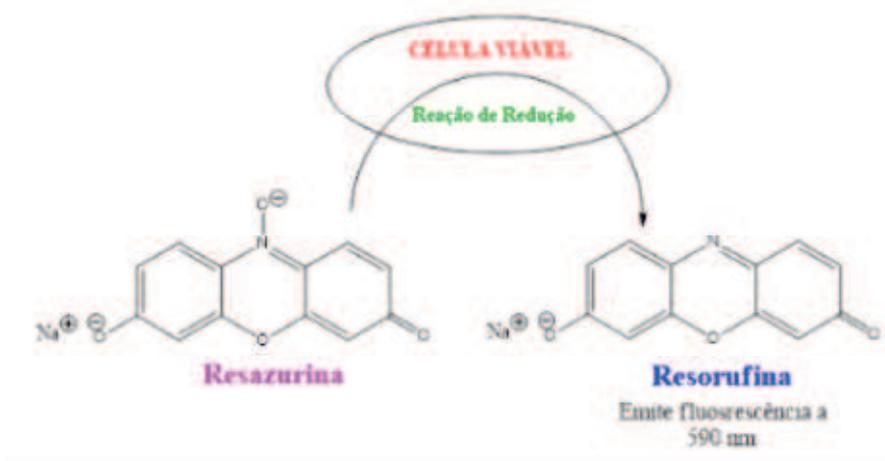
Por fim, foram adicionados 10 μ L da suspensão bacteriana em todos os poços da placa, com exceção dos poços da coluna 1 das fileiras G e H, que foram reservadas para controle de esterilidade. A placa foi então colocada em estufa a 36 °C durante 24 horas

4.5.5 Leitura das placas

Passado o tempo de incubação das placas, foram adicionados 20 μ L do corante resazurina em todos os poços da placa. Feito isso, a placa foi novamente incubada nas mesmas condições durante 2 horas. Passado esse tempo os resultados foram lidos e interpretados, de forma que os poços com coloração rosa representa crescimento bacteriano e a cor azul representa ausência de crescimento.

Os microorganismos possuem enzimas capazes de reduzir a resazurina (azul) a resafurina (rósea), segundo a reação na esquema 12.

Esquema 12. Reação de redução da resazurina



Fonte: www.sscdt.org, 2018

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Compostos sintetizados e caracterização físico-química

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos derivados RF

| Composto | Rend (%) | FR | Faixa de fusão (°C) | Massa Molecular (g/mol) | Fórmula molecular | Log P |
|-------------|----------|-------------------|---------------------|-------------------------|---|-------|
| RF07 | 82,86 | 0,56 ^c | 181-182 | 226,03 | C ₈ H ₁₀ N ₄ S ₂ | 1,63 |
| RF09 | 48,66 | 0,80 ^a | 278-281 | 342,02 | C ₁₅ H ₁₃ ClN ₄ S ₂ | 5,08 |
| RF10 | 42,37 | 0,45 ^b | 234-239 | 391,98 | C ₁₅ H ₁₃ BrN ₄ S ₂ | 5,35 |
| RF11 | 47,52 | 0,66 ^a | 271-275 | 359,05 | C ₁₅ H ₁₃ N ₅ O ₂ S ₂ | 2,46 |
| RF13 | 43,62 | 0,58 ^b | 205-211 | 383,99 | C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ S ₂ | 5,64 |

Rend (%): Rendimento; RF: Fator de Retenção; Log P: Coeficiente de partição; ^ahexano/acetato de etila (1:1); ^bhexano/acetato de etila (7:3); ^chexano/acetato de etila (6:4)

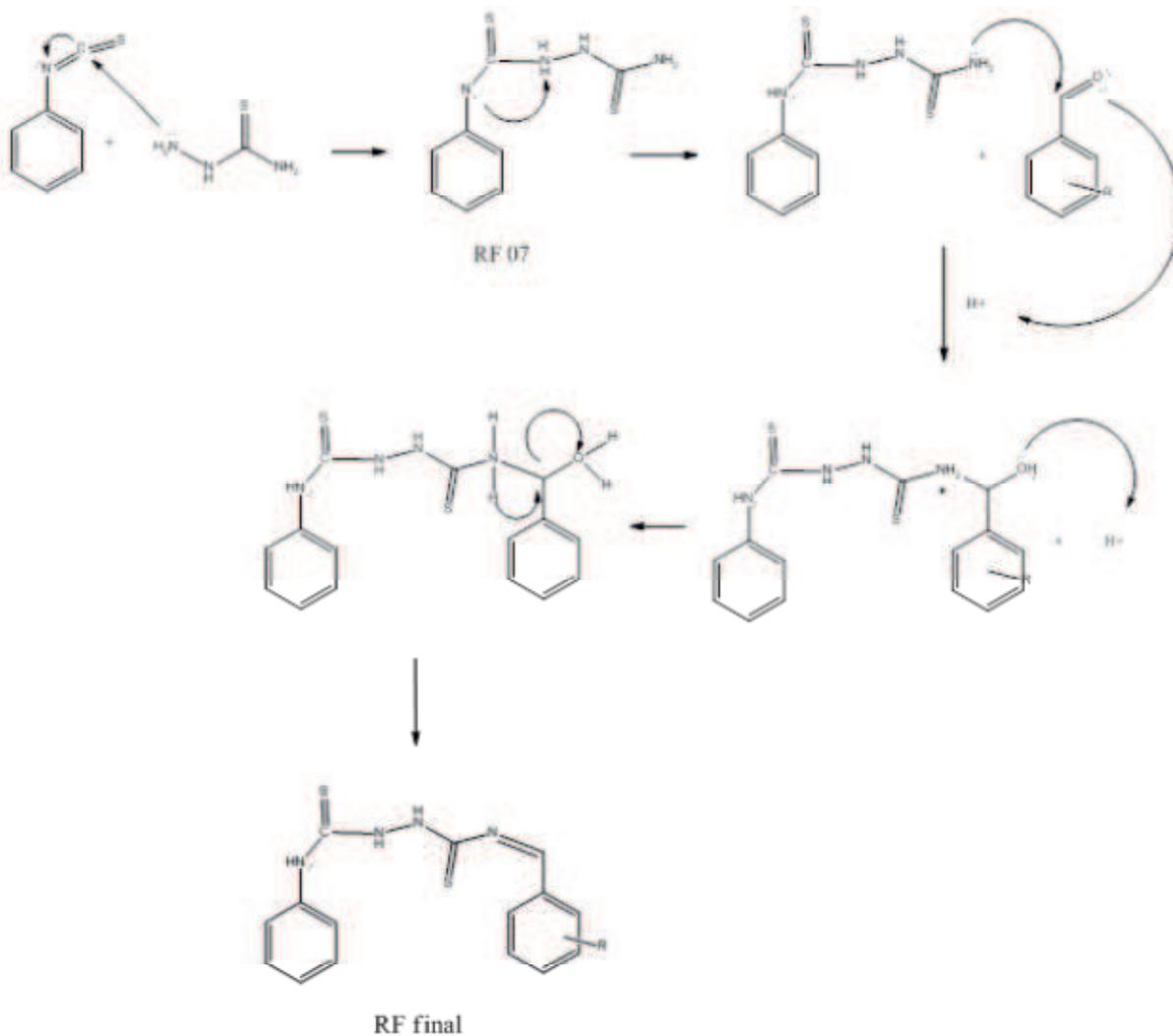
De acordo com os dados experimentais obtidos e registrados na tabela, com exceção do intermediário RF07, todos os compostos finais foram obtidos com rendimento abaixo de 50%, que é considerado insatisfatório. Esse baixo rendimento deve-se à baixa reatividade da função tioamida do intermediário RF07. Além disso, os compostos RF07, RF09 e RF10 precisaram ser purificados, pois apresentaram subprodutos que foram observados nas placas de CCD feitas durante as reações.

Com relação aos Log P das moléculas obtidas, os compostos RF09, RF10 e RF13 têm valores de coeficiente de partição acima de 5, enquanto o intermediário RF07 possui Log P abaixo de 2. De acordo com esses valores, somente o intermediário RF07 possui o Log P dentro da faixa ideal proposta para compostos *Lead* de acordo com Lipinski, que determina, dentre outros fatores, que o Log de P ideal de compostos *Lead* tenha um Log P menor do que cinco.

Por fim, com exceção do derivado RF13, que apresentou variação da faixa de fusão acima de 5 unidades – variações abaixo de 5 unidades são consideradas ideais (MOURA, 2016) –, todos os outros compostos demonstram variação aceitável de faixa de fusão.

5.1.1 Mecanismo de reação da obtenção dos RF

Esquema 13: Mecanismo de reação dos derivados RF



Fonte: dados da pesquisa, 2018

5.2 Infravermelho

A interpretação de ambos os espectros de infravermelho foram feitos utilizando como referência o capítulo 3 da sétima edição do livro Identificação Espectroscópica de Compostos Orgânicos de Silverstein et al (2006).

5.2.1 RF07

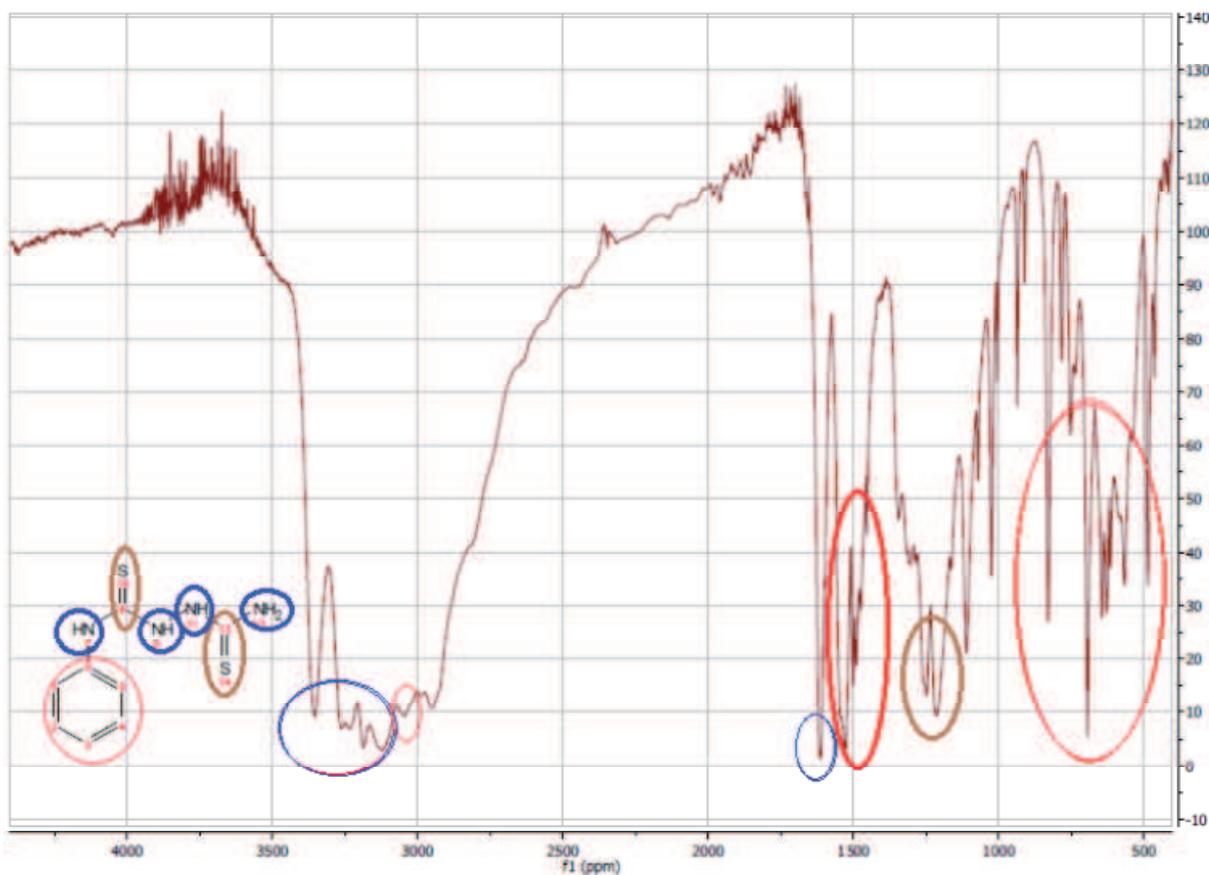
Na região entre 3346 e 3182 cm^{-1} observa-se quatro bandas circuladas em azul, sendo aquela em 3258 cm^{-1} um dublete as quais são característica de deformação axial simétrica e assimétrica de amina primária. Em 3054 cm^{-1} observa-se uma banda circulada em vermelho que é sugestiva de deformação axial C-H de carbono sp^2 , presente nos anéis aromáticos.

Em 1608 cm^{-1} encontra-se uma única banda de alta intensidade, que é sugestivo de deformação angular de ligação N-H. Já na região 1537 cm^{-1} aparece outra banda próxima a vários picos entre 1500 e 1510 cm^{-1} que é sugestivo de deformação axial de ligação carbono-carbono do anel aromático. Nesse espectro a banda de deformação angular N-H parece ter encobrido os picos que deveriam aparecer na mesma região, referentes às ligações carbono-carbono do aromático.

Em 1260 e 1210 cm^{-1} apareceram dois picos simétricos que provavelmente são correspondentes a aqueles presentes na região de 1239 e 1207 cm^{-1} no espectro do RF09 e que são sugestivos das duas ligações C=S. Entre 1125 e 1040 cm^{-1} apareceram picos também semelhantes aos encontrados no espectro do RF09, que são sugestivos de interação de deformação axial de ligação C-N com uma função tiocarbonila.

Na região entre 625 e 820 cm^{-1} aparecem vários picos que são sugestivos de deformação angular fora do plano de ligações C-H de anéis aromáticos.

Figura 10: Espectro de IV do RF07.



Fonte: dados da pesquisa, 2018.

5.2.2 RF09

Nesse espectro é possível observar a presença de três bandas circuladas em vermelho, de fraca intensidade e muito simétricas em 3235, 3180 e 3100 cm^{-1} , que são sugestivos de deformação axial de ligações N-H, sendo cada pico derivado de cada uma das ligações N-H no RF09.

Entre 3060 e 3018 cm^{-1} aparecem duas bandas sugestivas de deformação axial de C-H de carbono sp^2 . Assim como no espectro do RF07, apareceram vários picos de fraca intensidade na região entre 1270 e 1020 cm^{-1} , que são característicos da interação entre a deformação axial C-N e a deformação axial de C=S. A ausência das bandas de absorção na região entre 2600 e 2500 cm^{-1} em ambos os espectros indica que os derivados RF encontram-se predominantemente na forma de tiona.

Neste espectro não apareceram os dupletes presentes no espectro do RF07 que são derivados de deformação axial simétrica e assimétrica de N-H, sugestivos de amins ou amidas primárias, indicando que a função tioamida primária do RF07 não está mais presente na molécula.

Na região entre 1614 e 1424 cm^{-1} aparecem bandas de média a alta intensidade que são bastante característica de anel aromático devido à deformação axial das ligações duplas carbono-carbono do anel. Assim como sugerido na literatura, a banda do número de onda em 1502 cm^{-1} é a mais intensa das quatro, seguido das bandas de média intensidade em 1424, 1580 e em 1614 cm^{-1} . Essas bandas também apareceram no espectro do RF07.

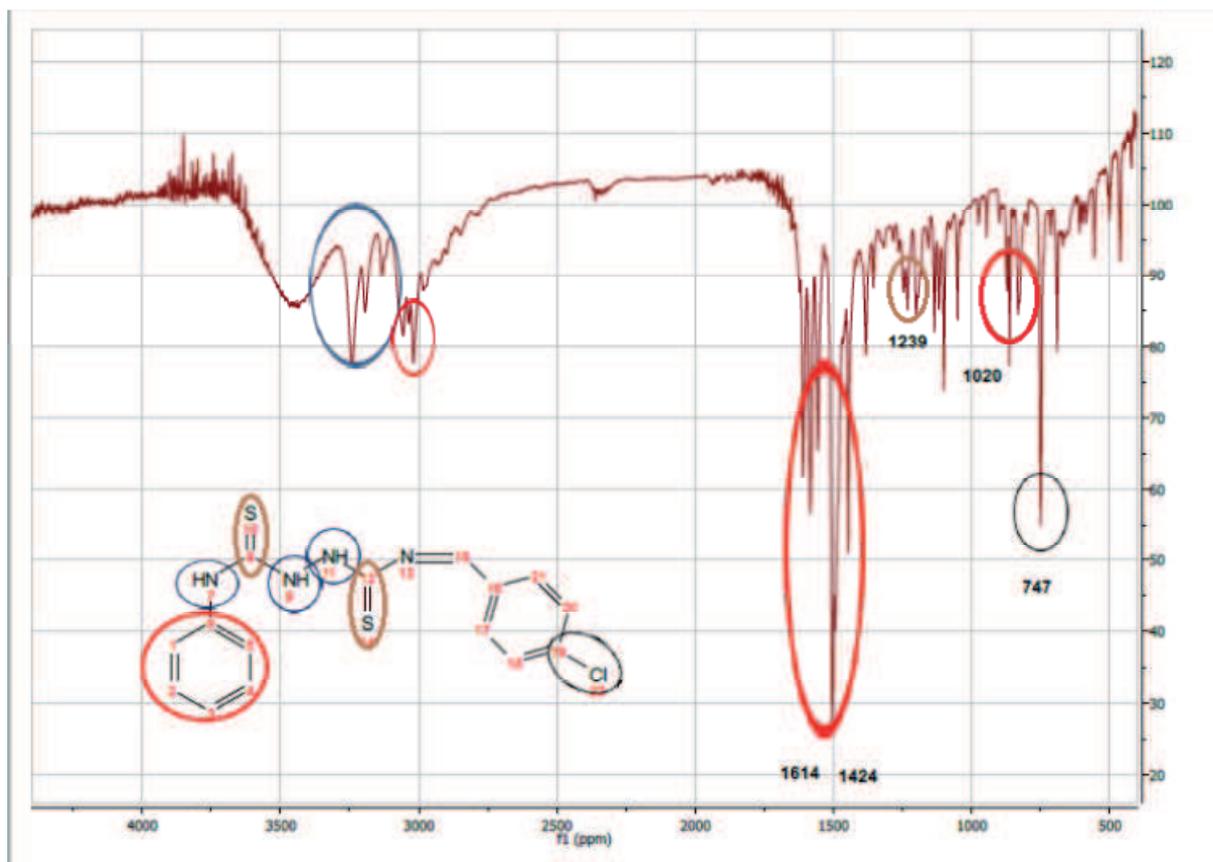
É provável que a banda de deformação angular de N-H que deveria aparecer em 1500 cm^{-1} tenha sido obscurecida pelo pico intenso de anel aromático que aparece na mesma região. O mesmo deve ter ocorrido com a banda de absorção da função imina, que tem intensidade variável e ocorre na mesma região de deformação axial de C=C.

Na região entre 689 e 864 cm^{-1} é possível observar uma variedade de picos de média a alta intensidade, que são picos sugestivos de anel aromático, devido à deformação angular fora do plano das ligações C-H do anel. Mais precisamente no número de onda de 747 cm^{-1} aparece um pico intenso que é característico de deformação axial de ligação C-Cl presente na estrutura química.

A presença dessas bandas características de anel aromático com ligação C-Cl, somado à ausência de uma banda sugestiva de deformação axial de grupo carbonila, e ainda à ausência de uma banda sugestiva de deformação axial de N-H de uma amina primária, já é indício de que ocorreu a condensação do benzaldeído clorado com o composto RF07.

A espectroscopia no IV é uma das principais ferramentas de elucidação estrutural de compostos orgânicos. Entretanto, a elucidação é feita através de várias técnicas, e a espectroscopia de IV é apenas uma delas. Dessa forma, para a elucidação completa da estrutura dos derivados RF é necessário prosseguir com análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e de carbono, bem como análises por espectrometria de massa.

Figura 11. Espectro de absorção de IV do RF09



Fonte: Dados da pesquisa, 2018

5.3 Atividade hemolítica

Os resultados das hemólises causadas pelos derivados RF em concentração de 500 µg/mL encontram-se na tabela 3.

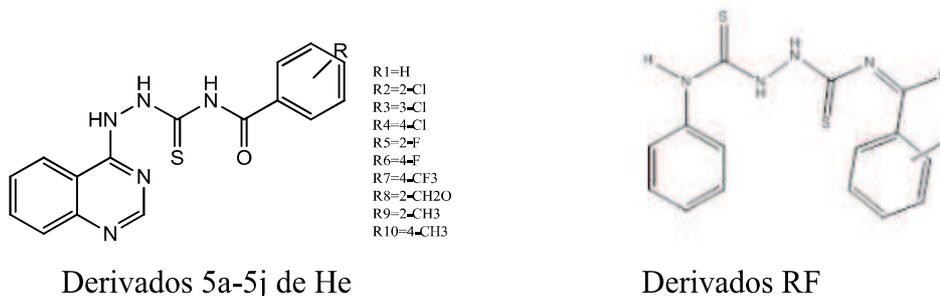
Tabela 3. Resultados da hemólise dos derivados RF

| Composto | Hemólise (%) |
|----------|--------------|
| RF07 | 0,00 |
| RF09 | 0,92 |
| RF10 | 4,03 |
| RF11 | 22,41 |
| RF13 | 0,00 |

Fonte: Dados da pesquisa, 2018

Como apresentado na tabela, apenas o composto RF11 apresentou citotoxicidade considerável. A elevada citotoxicidade desse composto se justifica pela presença da substituição nitro (-NO₂), que é conhecida por ser dotada de atividade citotóxica. O grupamento nitro é um potente agente oxidante, capaz de oxidar componentes biomoleculares como lipídeos e proteínas, podendo lisar facilmente as membranas celulares (OGA et al., 2009).

O grupo de pesquisa de He et al (2012), sintetizou vários compostos contendo grupamento tiossemicarbazídicos e testou a atividade desses derivados em células tumorais. Os resultados evidenciaram a importância de um grupamento fenilamida com substituições halogênicas em R para a atividade. Tendo em vista a baixa atividade hemolítica dos derivados RF07, RF09, RF10 e RF13, e a semelhança estrutural desses derivados com a série 5a-5j de He et al, pode-se considerar a possibilidade de estudo de atividade antitumoral dos derivados RF (figura 11).

Figura 11. Algumas semelhanças estruturais entre os derivados de He et al e os derivados RF

Fonte: Dados da pesquisa, 2018

5.4 Atividade antibacteriana

Foram testadas as atividades antibacterianas dos compostos RF07, RF09, RF11 e RF13 em cepa de bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922, que é uma bactéria gram negativa, e em cepa de bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, que é uma bactéria gram positiva. O RF10 não foi testado por conta de dificuldades sintéticas desse produto.

O RF07 e RF13 foram os únicos que apresentaram solubilidade razoável no meio de cultura. No entanto, todos os compostos testados precipitaram no meio de cultura, o que provavelmente comprometeu os resultados obtidos (figura 12).

Figura 12. Soluções teste



Fonte: dados da pesquisa, 2018.

As concentrações dos derivados RF sintetizados variaram na placa de microdiluição em caldo entre os valores de 1024 µg/mL e 1 µg/mL. Os resultados das concentrações inibitórias mínimas encontram-se na tabela 4.

Tabela 4. CIMs dos derivados RF

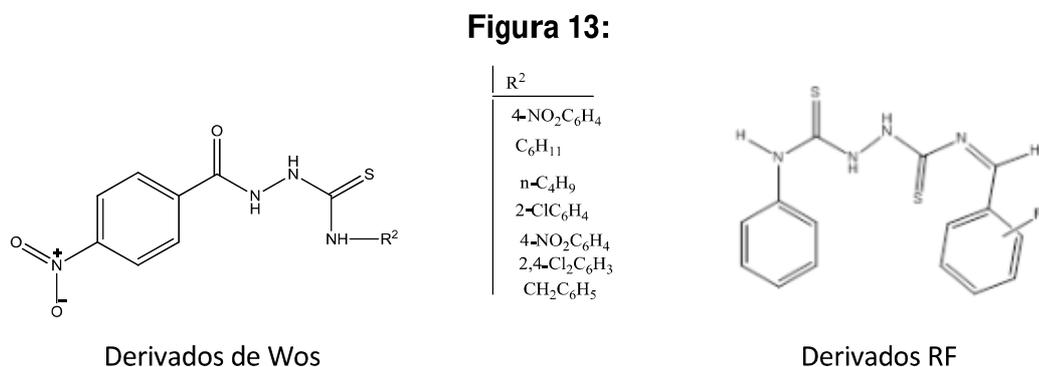
| Composto | Concentração Inibitória mínima (µg/mL) | |
|----------|--|------------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| RF07 | >1024 | >1024 |
| RF09 | 1024 | 1024 |
| RF11 | 1024 | 1024 |
| RF13 | >1024 | >1024 |

Fonte: Dados da pesquisa, 2018

Pelos resultados de CIM encontrados nos testes, e comparando com a amicacina que foi usada como referência, verificou-se que nenhum dos derivados da série RF não apresentaram atividade antibacteriana abaixo de 1024 $\mu\text{g/mL}$.

5.4.1 Relação estrutura-atividade dos derivados RF

O grupo de pesquisa de Wos (2017) sintetizou uma série de derivados tiossemicarbazídicos fenil-substituídos que foram testados para atividade antibacteriana em cepa *S.aureus* ATCC 25923. Esse estudo demonstrou a importância dos grupamentos 4-nitrofenil e 2,4-clorofenil (figura 13), os quais se apresentaram muitas vezes mais potentes do que os análogos sem essas substituições.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

Comparando os resultados dos compostos **1-9** de Wos (2017) com os derivados RF, observa-se uma discrepância de valores entre o derivado 8 (-2,4-diclorofenil) – o mais potente da série – e o derivado RF13 (-2,3-diclorofenil), que não apresentou atividade para nenhuma das bactérias testadas.

Esses resultados indicam que o cloro na posição 4 é uma substituição importante para a atividade antibacteriana. Essa hipótese é ainda corroborada pela discreta atividade bacteriostática do derivado RF09 (-4-clorofenil) na concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$ em *S.aureus*.

Apesar de ser o mais solúvel da série, derivado RF07 não apresentou nenhuma atividade em nenhuma das cepas, indicando que a função imina e o grupamento fenil substituído são importantes para a atividade dos derivados RF09 e RF11.

O derivado **4** de Wos (2017) apresenta um grupo carboxila e outro grupamento nitro ligado ao anel aromático A, que não estão presentes nos derivados RF. Apesar disso, a atividade do derivado **4** foi muito semelhante ao do RF11 em *S.aureus* – CIM = 1000 e 1024 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente –, sustentando ainda mais a hipótese de que a atividade dos derivados RF se deu devido à função imina ou fenila substituídas na posição 4.

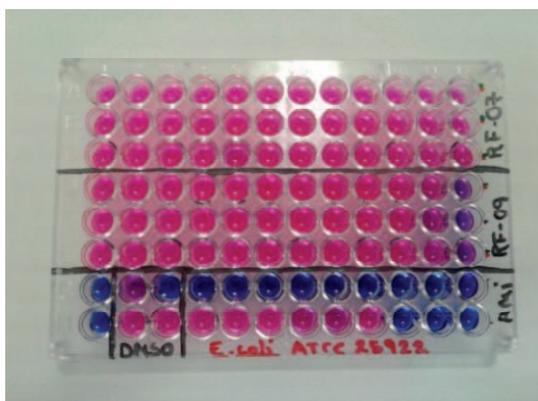
O composto RF11, que apresentou inibição do crescimento em ambas as bactérias, demonstrou-se citotóxico pelo ensaio de hemólise (22% de hemólise), o que sugere que a ação antibacteriana do RF11 pode ter ocorrido através lise membranar. Como já citado anteriormente, a atividade citotóxica desse composto pode ser justificada pela presença do grupamento aromático com substituição 4-NO₂.

Na placa de microdiluição foi possível observar que o RF11 apresentou atividade bacteriostática em 1024 µg/mL para a cepa gram negativa, e atividade bactericida na mesma concentração para a cepa gram positiva. Já para o RF09, a inibição em 1024 µg/mL foi somente bacteriostática para ambas as bactérias.

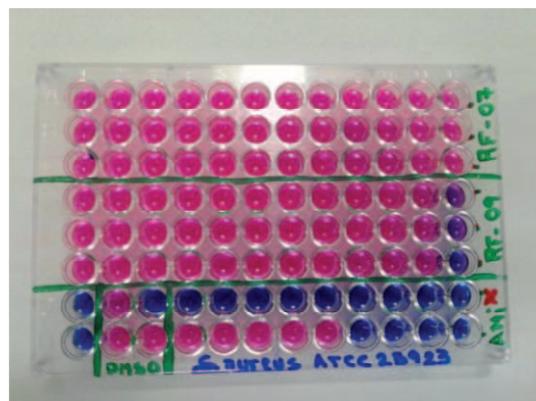
A melhor atividade foi da molécula RF09 frente a *Staphylococcus aureus* pois na concentração de 1024 µg/mL após adicionar resazurina não notou-se mudança para rosa. Mesmo assim quando inoculou-se 1 µL do poço em agar BAB quantificou-se 200 000 colônias por mL, comprovando que a CIM não é igual a concentração bactericida mínima.

Abaixo encontram-se as fotos da placas de microdiluição coradas com resazurina.

Figura 24. Placas de microdiluição coradas com resazurina



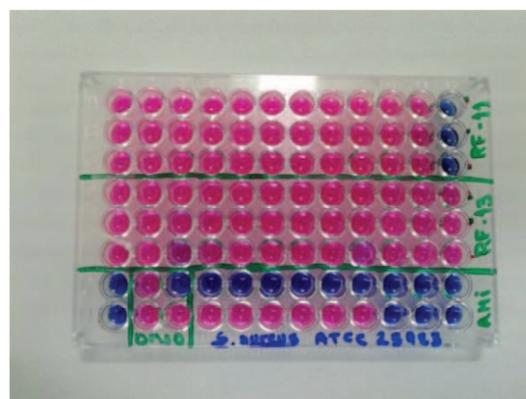
Teste de RF07 e RF09 em *E.coli*



Teste de RF09 e RF07 em *S.aureus*



Teste de RF13 e RF11 em *E.coli*



Teste de RF13 e RF11 em *S.aureus*

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

6 CONCLUSÃO

Foram sintetizados quatro derivados tiossemicarbazônicos e um tiossemicarbazídico conforme reações descritas em artigos acadêmicos, e determinados a suas características físico-químicas. A rota sintética para os derivados finais RF 09, RF10, RF11 e RF13 demonstraram-se insatisfatórias, pois o rendimento de todas apresentou-se menor do que 50%, com exceção da síntese do RF07 cujo rendimento foi de 83%.

A elucidação estrutural é muito difícil de ser feita somente por espectroscopia de infravermelho. Porém, os espectros apresentados fornecem indícios de que a reação ocorreu formando os produtos esperados. Outras técnicas de elucidação como a espectrometria de massas, espectroscopia de RMN de hidrogênio e de carbono devem ser feitas para a elucidação completa dos derivados RF.

Os resultados dos testes de atividade hemolítica para os derivados RF – com exceção do RF11 – foram todos menores do que 15%, sendo considerado de baixa citotoxicidade. O RF11 apresentou hemólise de 22%, provavelmente devido à substituição nitro no anel aromático, que é conhecida pelo seu potencial oxidante de biomoléculas.

A baixa solubilidade dos derivados sintetizados podem ter culminado nos resultados de baixa atividade antibacteriana dos derivados RF. É possível que os derivados RF possuam atividade antibacteriana mais potente do que se pode verificar no teste de microdiluição em caldo, visto que para tal, as moléculas precisam estar solubilizadas no meio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. *Avaliação Da Citotoxicidade Induzida Por Produtos Cosméticos Pelo Método De Quantificação De Proteínas Totais Em Células 3t3*, 2008. 106f. Dissertação de Mestrado – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

AHMAD, M. et al. Preparation And Characterization Of Antibacterial Thiosemicarbazide Chitosan As Efficient Cu(II) Adsorbent, *Carbohydrate Polymers*, v. 132, n. 5, p. 164-172, 2015.

ANVISA, 2008. Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos, disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/introducao.htm. Acesso, 2018.

ALBERTS, J. et al. *Biologia Molecular da Célula*. ed. 5. California. Editora: Artmed, 2010.

BARREIRO, E. A Química Medicinal E O Paradigma Do Composto Protótipo. *Revista Virtual de Química*, <http://www.uff.br/rvq>, n. 1, p. 26-34. 2009.

BARREIRO, E. et al. *A Química Medicinal de N-Acildrazonas: Novos Compostos Protótipos de Fármacos Analgésicos, Antiinflamatórios e Anti-trombóticos*. *Quim. Nova* Rio de Janeiro, v. 25. n. 1, p. 129-148, 2002.

BARREIRO, E. et al. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*, Rio de Janeiro, n. 12, p. 23-49. 2005.

BARREIRO, E. Estratégia De Simplificação Molecular No Planejamento Racional De Fármacos: A Descoberta De Novo Agente Cardioativo. *Quim. Nova*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 6b, p. 1172-1180. 2002.

BIANCOLLI, A. et al. *A Química Medicinal: Uma Visão Geral*. 2015. 15f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

BOJANŠARKANJ et al. 4-Methyl-7-Hydroxycoumarin Antifungal And Antioxidant Activity Enhancement By Substitution With Thiosemicarbazide And Thiazolidinone Moieties, *Food Chemistry*, v. 139, p. 488-495. 2013.

BROWN, M. Building The Bacterial Cell Wall at Pole, *Current Opinion in Microbiology*, v. 34, n. 3, p. 53-59, 2016.

CAVALCANTE, M. et al. Síntese De 1,3,5-Triazinas Substituídas E Avaliação Da Toxicidade Frente A Artemia Salina Leach. Artigo, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 20-22. 2000.

CARLOS, M; ESCHEVARRIA, A. Síntese De Tiazolidinonas Derivadas De Tiossemicarbazidas E Tiossemicarbazonas. 2011.

COSTA, A; JUNIOR, A. Resistência Bacteriana Aos Antibióticos E Saúde Pública: Uma Breve Revisão De Literatura. <https://periodicos.unifap.br/index.php/estacao>. Macapá, v.7, n. 2, p. 45-57. 2017.

DUARTE, C. *Novos derivados N-Acildrazônicos Planejados Como Candidatos a Fármacos Analgésicos e Antiinflamatórios*. 2006. 119f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FERREIRA, F. et al. Fármacos: Do Desenvolvimento à Retirada do Mercado, Revista Eletrônica de Farmácia, v. 6, p. 14-24, 2009.

GAUTAM, P. et al. Vibrational And Quantum Chemical Investigation Of Cyclization Of Thiosemicarbazide Group In 1-Benzoyl-4-Phenyl-3-Thiosemicarbazide, Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy, v. 132, n. 11, p. 278-287, 2014.

GERA, T.; PANCOTE, C. Planejamento de Fármacos. Unilago. p. 137-147, 2008.

GOLAN, D. et al. Princípios de Farmacologia: A base Fisiopatológica da Farmacoterapia. ed. 2. Editora: Guanabara Koogan, 2009.

GRAHAM, P. An Introduction to Medicinal Chemistry. 4. ed. United Kingdom Oxford. 2009.

GÖKÇE CIHAN-ÜSTÜNDAG, G. et al. Synthesis And Antiviral Properties Of Novel Indole-Based Thiosemicarbazides And 4-Thiazolidinones. Bioorganic & Medicinal Chemistry, Turquia, n. 24, p. 240-246, 2016.

GUIDO, R. et al. Planejamento De Fármacos, Biotecnologia E Química Medicinal: Aplicações Em Doenças Infecciosas. Estudos Avançados, São Paulo, v. 14, n. 70, p. 81-98. 2010.

HE, J. et al. Synthesis And Antitumor Activity Of Novel Quinazoline Derivatives Containing Thiosemicarbazide Moiety, European Journal of Medicinal Chemistry, China, v. 54, p. 925-930, 2012.

KATZUNG, B. et al. *Farmacologia Básica e Clínica*. ed. 12. California. Editora: Artmed, 2012.

LIMA, M. *Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira*. Quim. Nova Rio de Janeiro, Vol. 30, n. 06, p. 1456-1468, 2007.

LIMA, E. et al. Incidência Bacteriana E Perfil De Susceptibilidade De Microorganismos Isolados Em Hemoculturas De Pacientes Da Unidade De Terapia Intensiva (Uti) Da Santa Casa De Misericórdia De Anápolis, Goiás, No

MACHADO, R. *Síntese de Novos Derivados de 1-(7-cloro-4-quinolinil) Tiosemicarbazidas e Semicarbazidas Como Potenciais Agentes Antibacterianos e Antiparasitários*. 2011. 223f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

MANDAL, E. et al. Rational Drug Design, European Journal of Pharmacology, Canada, v. 625, p. 90-100. 2009.

MAVROVA, A. et al. Synthesis, Anticancer Activity And Photostability Of Novel 3-Ethyl-2-Mercapto-Thieno[2,3-D]Pyrimidin-4(3H)-Ones, v. 123, n. 10, p. 69-79, 2016.

MENEGATTI, R. et al. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*. 1. ed. n.3. Rio de Janeiro, 2001.

MONTANARI, C. A Química Medicinal Nas Próximas Décadas. *Assuntos Gerais*, Belo Horizonte, v. 23, n. 1, p. 134-137. 1999.

MOURA, 2016. *Planejamento, Síntese e Avaliação Preliminar da atividade antibacteriana de Derivados N-Acildrazônicos Substituídos* – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

NASCIUTTI, P. *Desenvolvimento de Novos Fármacos*. 2012. 89f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

NCCLS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. v. 23. n. 2. 2005.

OGA, S. et al. *Fundamentos de Toxicologia*. ed. 3. São Paulo. Editora: Gruoi Zanini, 2008.

PEREIRA, D. et al. Síntese E Avaliação Da Atividade Anticorrosiva De Tiossemicarbazida E Tiossemicarbazona 4-N-(P-Metóxfenil) Substituídas, Revista Virtual de Química, <http://www.uff.br/rvq>, v. 5, n. 4, p. 770-785, 2013.

PISHAWIKAR, S; MORE, H. Synthesis, Docking And In-Vitro Screening Of Mannich Bases Of Thiosemicarbazide For Anti-Fungal Activity, Arabian Journal of Chemistry, Arábia Saudita, v. 10, n. 2, p. S2714-S2722, 2017.

RANG, H.; DALE, M.: Farmacologia. Ed. 7. United Kingdom. Editora: Elsevier, 2007.

ROLAIN, J. et al. Do we Need New Antibiotics?, Clinical Microbiology and Infections, v. 22, n. 5, p. 408-415, 2016.

WERMUTH, C. et al. The Practice of Medicinal Chemistry. ed. 3. Reino Unido Editora: Wermuth Editor, 2008.

SANTOS, E. *Síntese e Avaliação da Atividade Antibacteriana de Derivados de 2-cianoacetamida*. 2017. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

SILVA, P. *Caracterização Da Atividade Antitumoral Das Tiossemicarbazonas Derivadas De N(4)-Metil-Toluil-2-Acetilpiridina E De 2-Piridinoformamida E Seus Complexos Metálicos: Avaliação Do Potencial Radiofarmacêutico*. 2008. 173f. Dissertação de Mestrado – Belo Horizonte, 2008.

SILVA, T. *Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Uma Nova Série de Derivados Cicloalquil-N-Acildrazonas: Análogos de Lassbio-294*. 2012. 246f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SOLOMONS, G. et al. Química Orgânica. ed. 9, Florida. Editora: Gen LTC, 2008.

SOUZA, A. et al. Mortalidade e Riscos Associados a Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, Texto Contexto, v. 24, n. 1, Florianópolis, p. 220-228, 2015.

STONE, M. et al. Fluorescent Antibiotics: New Research Tools to Fight Antibiotic Resistance, Trend in Biotechnology, v. 36, n. 5, p. 523-536, 2018.

TENÓRIO, R; GÓES, A. Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas E Importância Biológica. Quim. Nova, Pernambuco, v. 28, n. 6, p. 1030-1037. 2005.

UNVER, Y. et al. New Thiophene-1,2,4-Triazole-5(3)-Ones: Highly Bioactive Thiosemicarbazides, Structures Of Schiff Bases And Triazole–Thiols, European Journal of Medicinal Chemistry, v. 84, n. 12, p. 639-560, 2014.

WOS, M. et al. Novel Thiosemicarbazide Derivatives with 4-nitrophenyl group as multi-target drugs: α -glucosidase inhibitors with antibacterial and antiproliferative activity. Biomedicine & Pharmacotherapy. Filandia, n. 93. p. 1269-1276, 2017.

WENCEWICZ, T. New Antibiotics From Nature's Chemical Inventory, Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 24, n. 24, p. 6227-6252, 2016.