

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, FÍSICO-QUÍMICA E
INORGÂNICA**

EMANUELA DA CONCEIÇÃO

**Efeito do óxido nítrico na atividade anticâncer da tiossemicarbazona
derivada do trimetil acetaldeído**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestra em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira

Araraquara
2024

C744e

Conceição, Emanuela da
Efeito do óxido nítrico na atividade anticâncer da
tiossemicarbazona derivada do trimetil
acetaldeído /Emanuela da Conceição. --
Araraquara, 2024
84 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química,

1. Câncer. 2. Agentes antineoplásicos. 3. Óxido Nítrico.
4. Tiossemicarbazonas. 5. Compostos cíclicos. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DA PESQUISA

Este trabalho tem como foco investigar o efeito do NO/O₂ sobre a atividade anticâncer de tiossemicarbazonas. Estes compostos são conhecidos por serem potenciais agentes anticâncer. Porém, esta atividade pode ser reduzida devido à possível ciclooxidação em meio biológico. A confirmação deste processo neste trabalho poderá contribuir para o entendimento do mecanismo de ação das tiossemicarbazonas como agentes anticâncer e para o planejamento de novos compostos resistentes aos efeitos supracitados.

POTENTIAL RESEARCH IMPACT

This work focuses on investigating the effect of NO/O₂ on the anticancer activity of thiosemicarbazones. These compounds are known to be potential anticancer agents. However, this activity can be reduced due to possible cyclooxidation in biological media. Confirmation of this process in this work may contribute to the understanding of the mechanism of action of thiosemicarbazones as anticancer agents and to the planning of new compounds resistant to the aforementioned effects.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Efeito do óxido nítrico na atividade anticâncer da tiosemicarbazona derivada do trimetilacetaldeído"

AUTORA: EMANUELA DA CONCEIÇÃO

ORIENTADOR: JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Dr. GUSTAVO METZKER (Participação Virtual)
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

Dr. RENAN LIRA DE FARIAS (Participação Virtual)
Departamento de Química / Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC - Rio de Janeiro

Araraquara, 01 de fevereiro de 2024

Documento assinado digitalmente
 JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA
Data: 26/02/2024 16:54:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DADOS CURRICULARES

Emanuela da Conceição

Email: e.conceicao@unesp.br

Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica, Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

Endereço: Rua Dr. Francisco Degni 55, CEP 14800-060, Araraquara- SP, Brasil.

Formação Acadêmica

2021 – 2024 Mestrado em Biotecnologia

Grande área: Ciências Exatas e da Terra.

Subárea: Química Inorgânica.

Especialidade: Química Bioinorgânica.

Título: Efeito do óxido nítrico na atividade anticâncer da tiossemicarbazona derivada do trimetil acetaldeído.

Orientador: Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira.

Agência Financiadora: Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2016 – 2022 Graduação em Licenciatura em Química

Iniciação Científica (2019-2020)

Grande área: Ciências Exatas e da Terra.

Subárea: Química Analítica.

Especialidade: Eletroanalítica.

Título: Determinação de espécies metálicas em bioquerosene de aviação utilizando eletrodo modificado com nanocompósito contendo pectina em óxido de grafeno reduzido.

Orientador: Nelson Ramos Stradiotto.

Agência Financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Iniciação Científica (2020-2021)

Grande área: Ciências Exatas e da Terra.

Subárea: Química Analítica.

Especialidade: Eletroanalítica.

Título: Desenvolvimento de sensor eletroquímico baseado em polímero molecularmente impresso para determinação de poli(3-hidroxibutirato) obtido a partir de resíduos de banana.

Orientador: Nelson Ramos Stradiotto.

Agência Financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Experiência Didática

2023-2023 Instituto de Química Araraquara - UNESP

- Atividades de Apoio na Graduação e na Pós-Graduação na disciplina: “Química Inorgânica Estrutura e Propriedades: Experimental”.

Supervisores: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto e Profa. Dra. Regina Celia Galvão.

2023-2023 Instituto de Química Araraquara - UNESP

- Estágio de docência na disciplina: “Química Geral”.

Supervisor: Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira.

Produções

CONCEIÇÃO, E.; BUFFON, E.; STRADIOTTO, N. R. . Lead signal enhancement in anodic stripping voltammetry using graphene oxide and pectin as electrode modifying agents for biofuel analysis. **FUEL**, v. 325, p. 124906, 2022.

Participação em Eventos e Cursos

- I Curso de Inverno em Biociências e Biotecnologia realizado entre os dias 03 e 07 de julho de 2023 na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara - UNESP. Duração: 40h.
- VI Workshop INCT DATREM. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer and reduced graphene oxide for monitoring poly(3-hydroxybutyrate) production in polyhydroxyalkanoate samples. 2023. Instituto de Química de Araraquara – UNESP.
- I Workshop de Fruto-Refinaria. Desenvolvimento de sensor eletroquímico baseado em polímero molecularmente impresso para determinação de 3-hidroxibutirato obtido a partir de resíduos de banana. 2021. Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Gilmara, que mesmo não podendo mais estar comigo fisicamente, foi fundamental para todas as minhas conquistas e creio que de onde ela estiver está olhando por mim. À minha avó materna, Vilma, minha segunda mãe, sem a qual não teria chegado até aqui, de modo que essa conquista também é dela. Ao meu pai, Rogério, por ter me dado a oportunidade de estudar na Unesp e seguir meu sonho.

Em especial, este trabalho é dedicado com muito carinho e amor a duas pessoas imensamente especiais para mim e que infelizmente não estão mais aqui, meu querido e amado primo Victor Gabriel da Conceição e meu amigo, mentor e amado Dr. Edervaldo Buffon. Vocês foram incrivelmente amados e únicos no breve período em que tive o privilégio de desfrutar de suas companhias, e para sempre guardarei vocês no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Gilmara e Rogério por sempre terem se esforçado e se dedicado para me proporcionar uma educação de qualidade que me permitiu alcançar meus objetivos. Em especial, agradeço imensamente à minha avó materna, Vilma, por sempre me apoiar, acreditar em mim, e me dar a força necessária para enfrentar os meus obstáculos, sem ela eu não estaria aqui hoje, agradeço por todo o carinho e amor que recebi durante toda a minha vida.

Agradeço também ao meu orientador, o professor José Clayston Melo Pereira por todo o apoio, paciência e ensinamentos durante a realização deste trabalho. Agradeço também ao meu grupo de pesquisa pelas horas e horas de discussão de dados, ajuda com trabalhos e experimentos, risadas, companheirismo e parceria, sem vocês nada disso teria sido possível. Em especial, agradeço à minha amiga e colega de trabalho, Maria Isabella, que ultrapassando as barreiras do profissional, se tornou uma amiga para todas as horas e seu incentivo e cumplicidade fizeram essa caminhada muito mais leve e divertida.

E, por fim, mas não menos importante, meus agradecimentos à minha psicóloga, Michelle, por toda a ajuda que me proporcionou ao longo deste ano em que fui sua paciente. Ela mais do que ninguém sabe tudo o que tive que superar para chegar até aqui, e eu não teria conseguido sem sua paciência e dedicação sem igual.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O câncer é uma das principais causadoras de morte no mundo. As tiossemicarbazonas (TATSC) são compostos de interesse em pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de medicamentos para tratamento do câncer. Dentre os TATSC mais promissores, destaca-se a triapina, apresentando excelentes resultados em experimentos de atividade anticancerígena *in vitro*. Seu mecanismo de ação consiste na sua interação com uma enzima presente no meio celular, a ribonucleotídeo redutase (RDR), formando um complexo metálico com o átomo de ferro presente na estrutura desta enzima. Pesquisadores sugeriram que a triapina pode ser inibida durante o tratamento *in vivo* devido a um processo de ciclooxidação, formando seu correspondente tiadiazol (TDZ); sendo assim, incapaz de atuar como agente quelante e tendo sua atividade neoplásica cessada. Nosso grupo de pesquisa vem demonstrando que o óxido nítrico (NO) reage, na presença de oxigênio, com o TATSC através de um processo de ciclização oxidativa, formando um composto cíclico, um TDZ. Esta poderia ser a razão da inibição da atividade anticancerígena do TATSC, uma vez que o NO é uma molécula que está presente em ambientes biológicos. As TATSCs foram sintetizadas a partir de treimetil acetaldeído e tiossemicarbazidas correspondentes em meio etanólico e caracterizados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), UV-Vis, ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , análise elementar e ensaios biológicos com linhagens tumorais, assim como seus produtos de ciclização testados.

Palavras-chave: Câncer. Tiossemicarbazona. Óxido Nítrico. Tiadiazol. Ciclooxidação.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death in the world. Thiosemicarbazones (TATSC) are compounds of interest in research related to the development of drugs for cancer treatment. Among the most promising TATSC, triapine stands out, showing excellent results in in vitro anticancer activity experiments. Its mechanism of action consists of its interaction with an enzyme present in the cellular environment, ribonucleotide reductase (RDR), forming a metallic complex with the iron atom present in the structure of this enzyme. Researchers have suggested that triapine may be inhibited during in vivo treatment due to a cyclooxidation process, forming its corresponding thiadiazole (TDZ); therefore, it is unable to act as a chelating agent and its neoplastic activity has ceased. Our research group has been demonstrating that nitric oxide (NO) reacts, in the presence of oxygen, with TATSC through an oxidative cyclization process, forming a cyclic compound, a TDZ. This could be the reason for the inhibition of TATSC's anticancer activity, since NO is a molecule that is present in biological environments. TATSCs were synthesized from trimethyl acetaldehyde and corresponding thiosemicarbazides in ethanolic medium and characterized by absorption spectroscopy in the infrared region (IR), UV-Vis, ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR), elemental analysis and biological assays with tumor lines, as well as their tested cyclization products. Thiosemicarbazones were synthesized from trimethyl acetaldehyde and corresponding thiosemicarbazides in ethanolic medium and characterized by absorption spectroscopy in the infrared region (IR), UV-Vis, nuclear magnetic resonance (NMR) of ^1H and ^{13}C , elemental analysis and biological assays with tumor lines, as well as their tested cyclization products.

Key words: Cancer. Thiosemicarbazone. Nitric Oxide. Thiadiazole. Cyclooxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porcentagem estimada de mortes relacionadas ao câncer divididas por continentes em 2020.	16
Figura 2: Esquema de formação de célula maligna a partir da mutação genética em células somáticas.	18
Figura 3: Representação da molécula de cis-platina e seus derivados.	19
Figura 4: Representação estrutural das moléculas de tiossemicarbazonas pela IUPAC.	21
Figura 5: Tiossemicarbazona (<i>anti</i>) não substituída com ligação de hidrogênio intramolecular e tiossemicarbazona (<i>syn</i>) substituída em N-4.	21
Figura 6: Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas.	22
Figura 7: Estrutura da acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona (TIACETAZONA).	23
Figura 8: Estruturas moleculares de compostos de tiossemicarbazonas com atividade anticâncer.	23
Figura 9: Estrutura da fenilacetaldéído tiossemicarbazona.	24
Figura 10: Representação estrutural do composto triapina.	24
Figura 11: Estrutura da proteína ribonucleotídeo-redutase (RDR).	25
Figura 12: Estruturas de diferentes moléculas de tiadiazol.	28
Figura 13: Síntese do megazol via reação de condensação entre tiossemicarbazida e 1-metil-5-nitro-1-H-2-imidazolcarbonitrila em $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$.	29
Figura 14: Formação de 1,3,4-tiadiazóis assimétricos utilizando reação de Mannich.	29
Figura 15: Oxidação eletroquímica da triapina formando seu correspondente 1,3,4-tiadiazol.	30
Figura 16: Ciclooxidação de uma tiossemicarbazona por óxido nítrico em presença de oxigênio.	30
Figura 17: Reação simplificada para a obtenção dos compostos de tiossemicarbazona ($\text{R}_1 = \text{H}$ e $\text{R}_2 = \text{Metil, Etil}$).	33
Figura 18: Esquema da reação de síntese do tiadiazol a partir da produção de NO proveniente do nitrito de sódio.	34
Figura 19: Mecanismo de formação da tiossemicarbazona a partir de uma	

cetona/aldeído e uma tiossemicarbazida.	39
Figura 20: Representação da adição nucleofílica e ângulo formado entre o plano do composto carbonilado e o caminho adotado pelo nucleófilo.	40
Figura 21: Estrutura molecular das tiossemicarbazonas sintetizadas.	41
Figura 22: Espectro vibracional dos compostos TATSC-HM e TATSC-HE.	42
Figura 23: (a) Espectros de absorção na região UV-Vis para a TATSC-HM realizado em DMSO. (b) Curva analítica obtida para a banda principal em 273 nm.	44
Figura 24: (a) Espectros de absorção na região UV-Vis para a TATSC-HE realizado em DMSO. (b) Curva analítica obtida para a banda principal em 274 nm.	45
Figura 25: Numeração proposta para os compostos sintetizados.	49
Figura 26: Espectro de RMN ^1H referente à TATSC-HM realizado em DMSO- d_6 .	50
Figura 27: Espectro de RMN ^1H referente ao à TATSC-HE realizado em DMSO- d_6 .	51
Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C referente à TATSC-HM realizado em DMSO.	53
Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C referente à TATSC-HE realizado em DMSO.	54
Figura 30: Estrutura do composto TATSC-HM obtido por difração de raio X monocristal.	55
Figura 31: Estrutura do composto TATSC-HE obtido por difração de raio X monocristal.	58
Figura 32: Fórmula estrutural do TDZ-HE a partir de sua respectiva tiossemicarbazona e NO em presença de O_2 .	59
Figura 33: Comparação entre os espectros de IV da TATSC-HE e do TDZ-HE.	61
Figura 34: (a) Espectro de absorção na região UV-Vis para o tiadiazol TDZ-HE realizado em DMSO. (b) Curva analítica obtida para a banda principal em 268 nm.	63
Figura 35: Espectro de RMN ^1H referente ao TDZ-HE realizado em DMSO- d_6 .	66
Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C referente ao TDZ-HE realizado em DMSO- d_6 .	67
Figura 37: Estrutura do composto TDZ-HE obtido por difração de raio X monocristal.	68
Figura 38: Estrutura molecular das tiossemicarbazona TATSC-HPh sintetizada.	71
Figura 39: Representação estrutural de uma molécula de (1,2,3-triazol) e (1,2,4-triazol), respectivamente.	71
Figura 40: Fórmula estrutural do 1,2,4-triazol obtido a partir de sua respectiva tiossemicarbazona.	72

Figura 41: Estrutura do composto de triazol obtido por difração de raio X monocristal. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tiossemicarbazidas utilizadas na síntese dos compostos de tiossemicarbazonas.	41
Tabela 2: Sinais de IV para as tiossemicarbazonas sintetizadas.	43
Tabela 3: Composição calculada e experimental para as tiossemicarbazonas sintetizadas.	48
Tabela 4: Deslocamento químico no espectro de RMN ^1H para os substituintes R_1 e R_2 .	52
Tabela 5: Comprimentos de ligação em Å do composto TATSC-HM.	56
Tabela 6: Ângulos de ligação do composto TATSC-HM.	57
Tabela 7: Comprimentos de ligação em Å do composto TDZ-HE.	69
Tabela 8: Ângulos de ligação do composto TDZ-HE.	70
Tabela 9: Comprimentos de ligação em Å do triazol derivado da TATSC-HPh.	74
Tabela 10: Ângulos de ligação do triazol derivado da TATSC-HPh.	75
Tabela 11: Concentração (μM) necessária para reduzir em 50% (IC_{50}) a atividade inibitória dos compostos frente a linhagens tumorais.	76

SUMÁRIO

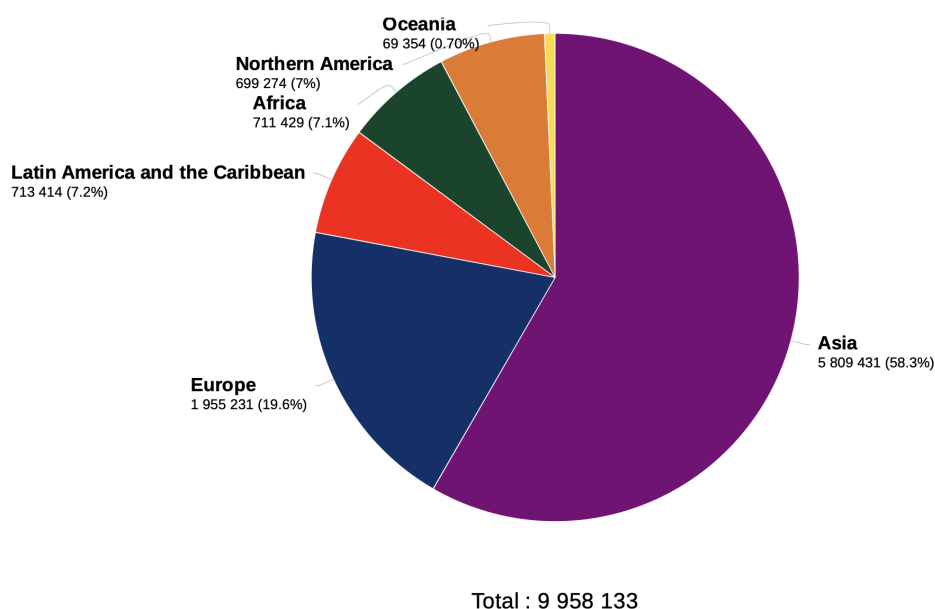
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Formas de tratamento	19
1.2 Tiossemicarbazonas	20
1.3 Ciclização das Tiossemicarbazonas	27
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos Específicos	31
3. PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1 Síntese das Tiossemicarbazonas	33
3.2 Reação de Ciclização de Tiossemicarbazonas	34
3.2.1 Síntese do tiadiazol	34
3.3 Métodos Instrumentais	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Síntese e Caracterização das Tiossemicarbazonas	39
4.1.2 Espectroscopia Vibracional na região do IV	42
4.1.3 Espectroscopia Eletrônica na região do UV-VIS	44
4.1.4 Análise Elementar	47
4.1.5 Espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C	48
4.1.6 Difração de Raio X	54
4.2 Reação de Ciclização das Tiossemicarbazonas	58
4.2.1 Tiadiazol	59
4.2.2 Triazol	69
4.3 Ensaios de Citotoxicidade	74
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	76
6. REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto formado por mais de 100 doenças cuja característica em comum é a capacidade de crescimento celular desordenado, e assim, se consolida como um problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morte no mundo. Alguns dos principais desafios no combate ao câncer são devido ao tempo de detecção desta doença, à assistência necessária aos pacientes, a um tratamento eficaz de longo prazo, dentre outros (JEMAL et al., 2014).

Em 2020, cerca de 19 milhões de pessoas no mundo foram acometidas por essa doença, de modo que praticamente metade desses indivíduos vieram a óbito. Entretanto, a distribuição mundial de pacientes com câncer não se dá de maneira homogênea, já que é observado que continentes mais desenvolvidos como, por exemplo, a Europa (19,6%) apresenta o segundo maior número de mortes, ficando atrás apenas da Ásia (58,3%), segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2020 (Figura 1) (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2024).

Figura 1: Porcentagem estimada de mortes relacionadas ao câncer divididas por continentes em 2020.



Fonte: GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2024.

Em um panorama mundial, projeções futuras feitas pela OMS apontam que até o ano de 2040, o número de casos de câncer deve atingir um valor de 30,2 milhões.

Em relação ao número de óbitos, estima-se um crescimento de 9,96 milhões em 2020 para 16,3 milhões em 2040. Esses valores são baseados em todos os tipos de câncer, abrangendo todos os sexos e idades entre 0-85+ (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2024).

No Brasil, são registrados aproximadamente mais de 600 mil casos da doença por ano, sendo a segunda principal causa de morte no país, sendo superada apenas por doenças cardiovasculares. Segundo dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer), estima-se que esse valor deve aumentar para 704 mil casos por ano até 2025. Dentre esses casos, o tumor maligno mais incidente no Brasil é o de pele não melanoma (31,3% do total de casos), seguido pelos de mama feminino (10,5%), próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%) (INCA, 2024).

A todo instante, milhões de divisões celulares acontecem dentro de um organismo, e, por vezes, a célula replicada apresenta algum defeito genético que quase sempre não é visto, pois elas sofrem apoptose (LOPES, 2004). As mutações que ocorrem em células somáticas não são percebidas, já que os seus efeitos ocorrem somente naquela célula, contudo, algumas mutações podem modificar o controle normal da divisão e sobrevivência celular. Quando isso ocorre, a célula que sofreu mutação se prolifera para formar uma população de células mutantes, as quais eventualmente desorganizam a função do órgão e a fisiologia do organismo, causando assim as doenças chamadas de câncer (PARHAM, 2011). Apesar destas modificações na replicação do DNA ocorrerem eventualmente, é necessário que um número muito grande de replicação destas células mutantes ocorram para levar a formação de uma célula maligna, assim sua incidência aumenta gradativamente com o tempo (CANCER RESEARCH UK, 2016).

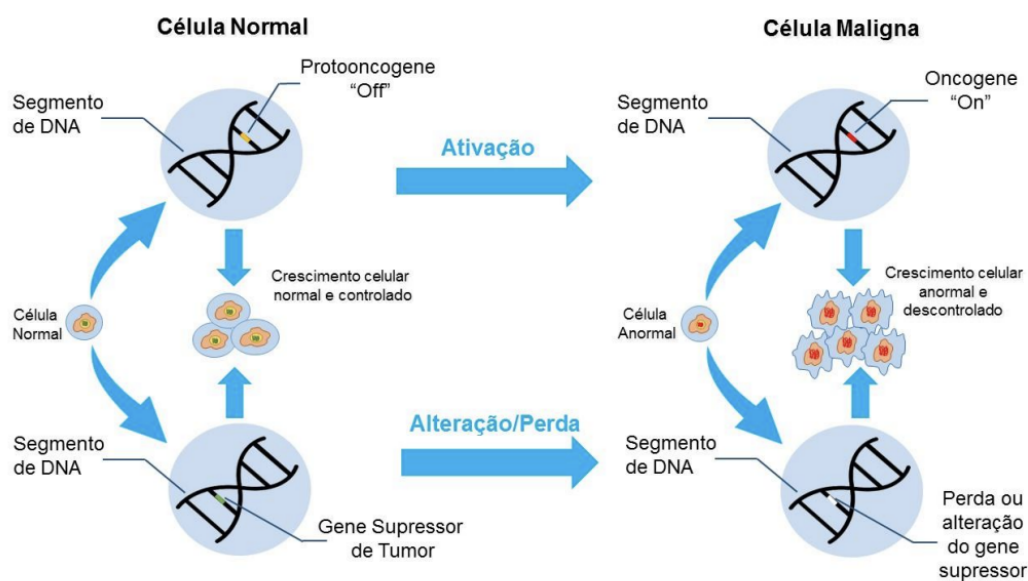
Do ponto de vista genético, duas das principais causas de câncer são por meio da ativação do gene que favorece a multiplicação celular, o oncogene, e pela inativação ou ausência do gene supressor de tumor, que bloqueia o crescimento celular (PIEROTTI et al., 2017).

Os oncogenes estão presentes no material genético de todas as células, porém não corroboram com a replicação celular, já que se encontram em sua forma inativa. No entanto, algumas mutações podem ocorrer de modo a ativá-los, o que faz com que esses oncogenes sintetizem oncoproteínas que são capazes de estimular as vias

sinalizadoras da divisão celular (HANAHAN; WEINBERG, 2017). Por outro lado, os genes supressores de tumor são responsáveis por codificar proteínas que inibem a replicação celular, ou seja, a falha ou inativação desses genes resultam em um desarranjo no ciclo celular e na sobrevivência de células mutantes (BELK; MAIER, 2015). O p53 é o principal gene supressor de tumor responsável pela correção e eliminação (apoptose) de células deformadas, e alterações presentes nele são encontradas em aproximadamente 50% dos casos de tumores em seres humanos (HARRIS; HOLLSTEIN, 1993).

Por meio de mutações que ocorrem nesses dois genes, a célula mutante garante a sua sobrevivência, sendo capaz de se replicar de maneira desenfreada, transmitindo assim essa mutação às suas descendentes, aumentando exponencialmente o número de células, até que eventualmente cria-se o tumor (LOPES, 2004).

Figura 2: Esquema de formação de célula maligna a partir da mutação genética em células somáticas.



Fonte: ZANETTI, 2018.

Há várias hipóteses do porquê esse fenômeno ocorre e já se conhece alguns fatores que, comprovadamente, aumentam as chances do desenvolvimento desses tumores, entre eles destacam-se o tabagismo, obesidade, doenças infecciosas, má alimentação, radiação ultravioleta, além da hereditariedade que é um fator

determinante. A esses fatores se dá o nome de agentes carcinogênicos (JEMAL et al., 2014).

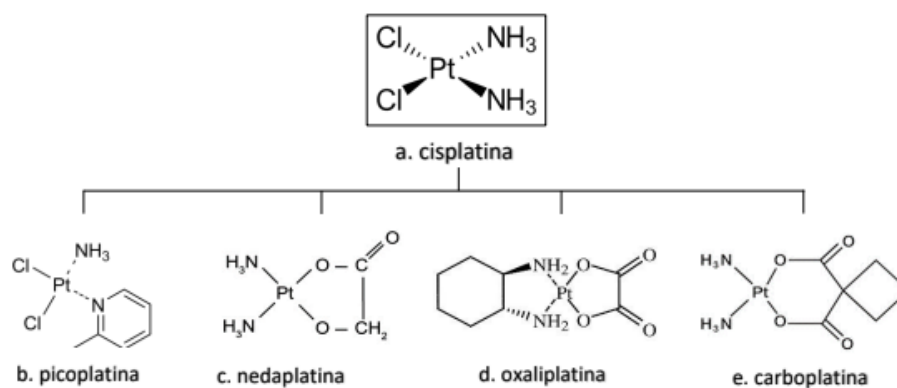
Dessa maneira, se torna evidente a necessidade de desenvolver tratamentos e a possível cura para essa doença.

1.1 Formas de tratamento

Os tratamentos mais utilizados contra o câncer são a quimioterapia, a radioterapia, a hormonioterapia e a intervenção cirúrgica. O procedimento mais adequado varia dependendo da gravidade e do local do tumor em questão, sendo necessário, na maioria das vezes, a combinação de mais de um tratamento (INCA, 2023).

Na dinâmica do organismo humano é necessário compreender e buscar métodos alternativos de tratamento. Diante deste cenário, os compostos de coordenação conquistaram destaque principalmente com a cisplatina ($\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$): um dos fármacos mais utilizados no tratamento de vários tipos de câncer, entre eles, cancro da cabeça e pescoço, pulmão, estômago, testicular, ovariano, esofágico, entre outros (Figura 3) (SHAHEEN et al., 2010). Sua atividade citotóxica foi descoberta por Rosenberg em 1960, e desde então, diversos compostos derivados dela foram sintetizados e vêm sendo utilizados como medicamentos no combate ao câncer (NDAGI et al., 2018). A cisplatina é o complexo inorgânico mais utilizado para o tratamento de câncer desde 1978, quando a agência americana Food and Drugs Administration (FDA) liberou seu uso clínico (DE ALMEIDA et al., 2005).

Figura 3: Representação da molécula de cis-platina e seus derivados.



Fonte: NDAGI et al., 2018.

O sucesso dessas moléculas foi notório nas últimas décadas, no entanto, alguns fatores como a resistência das células à essas moléculas, sua baixa solubilidade em água e também seus graves efeitos colaterais gerou a busca por novos agentes quimioterápicos (KARAVASILIS et al, 2008). Além disso, este tipo de tratamento apresentou-se limitado também devido à complicações tóxicas causadas pelo complexo, como neurotoxicidade (danos ao sistema nervoso), a nefrotoxicidade (danos aos rins), a ototoxicidade (perda de audição) e mielotoxicidade (supressão da medula óssea) (SHAHEEN et al., 2010). Finalmente, foi observado que o sistema enzimático da glutathione restringe o efeito anticâncer do fármaco, que consiste na catalização do processo de conjugação da glutathione pela enzima glutathione S-transferase e oferece resistência à radiação (ANG et al., 1992).

Uma das estratégias mais estudadas buscando uma alternativa à cisplatina é a síntese de compostos de coordenação que possuam ligantes orgânicos com atividades farmacológicas (CAIRES et al., 1999). Dentre as vantagens no uso de ligantes orgânicos, destaca-se que estes podem ser modificados, ativados ou possuírem um efeito direto ou indireto no metabolismo por meio da sua interação com íons metálicos (BERALDO, 2004).

O mecanismo de ação biológica desses ligantes, na maioria dos casos, envolve os complexos metálicos desses compostos (BERALDO, 2004). Em alguns casos, complexos metálicos possuindo ligantes orgânicos podem ser mais ativos do que o ligante isolado como agente citotóxico (BERALDO, 2004).

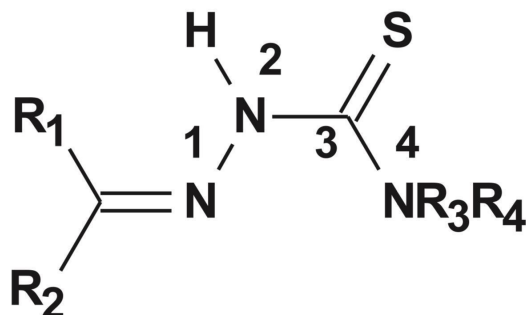
Para este fim, os ligantes de tiossemicarbazonas (TATSCs) se mostram promissores, pois constituem uma importante classe de compostos que apresentam propriedades químicas e medicinais (ABOU-MELHA, K.; FARUK, H., 2008).

1.2 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas são compostos de grande interesse científico, devido às suas importantes propriedades químicas e biológicas, como, por exemplo, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, dentre outras (BERALDO; GAMBINO, 2004). A estrutura geral (Figura 4) dessas TATSCs possui átomos de nitrogênio e enxofre, o que confere a essas moléculas a capacidade de formar ligações em complexos metálicos. Por esse motivo, são reconhecidas por possuírem a

capacidade de atuar como agentes quelantes, de modo que modificações na capacidade quelante dessas TATSCs provocam também alterações na sua atividade biológica (BERALDO; GAMBINO, 2004).

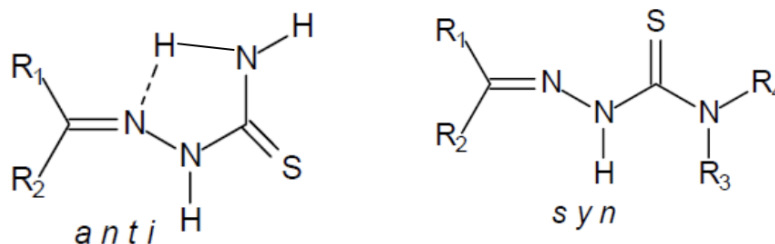
Figura 4: Representação estrutural das moléculas de tiossemicarbazonas pela IUPAC.



Fonte: Química Nova, 2005.

Segundo Casas e colaboradores, as TATSCs não substituídas na posição N-4 apresentam estrutura básica, $C=N-NH-CS-NH_2$, consideravelmente planar, com o átomo de enxofre em posição *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina (Figura 5). Alguns fatores eletrônicos e estéricos contribuem para este arranjo estrutural, entretanto, o fator que pode ser considerado mais importante é que o átomo de enxofre em posição *anti* possibilita que ocorra ligações de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio da imina e os hidrogênios presentes na tioamida (TENÓRIO et al., 2005). Por outro lado, este arranjo estrutural muda de maneira significativa se forem adicionados grupos substituintes na posição N-4, já que favorece a conformação *syn* entre o átomo de nitrogênio da imina e o átomo de enxofre (TENÓRIO et al., 2005).

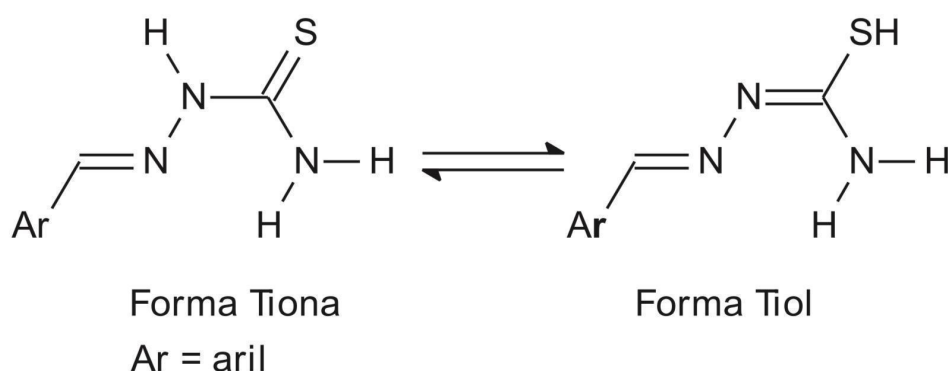
Figura 5: Tiossemicarbazona (*anti*) não substituída com ligação de hidrogênio intramolecular e tiossemicarbazona (*syn*) substituída em N-4.



Fonte: TENÓRIO et al., 2005.

As TATSCs são sistemas que apresentam extrema deslocalização eletrônica, principalmente quando há grupos aromáticos ligados ao carbono da imina de acordo com Palenik e colaboradores. Devido à esta deslocalização eletrônica presente nas TATSCs, estas podem coexistir na forma tiona ou tiol em equilíbrio tautomérico (TENÓRIO et al., 2005) (Figura 6).

Figura 6: Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas.

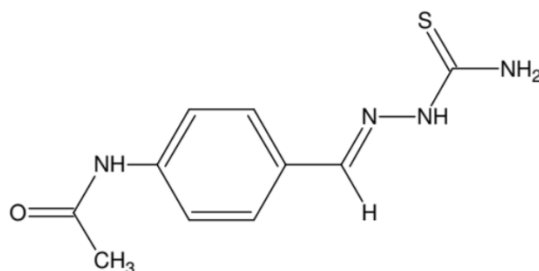


Fonte: TENÓRIO et al., 2005.

Modificações estruturais levam a atividades biológicas distintas (WEST, et al., 1991). Desse modo, as TATSCs derivadas da piridina, por exemplo, contém grupos alquila como substituintes no nitrogênio terminal, e portanto, apresentam maior atividade antiviral do que seus análogos não substituídos (WEST, et al., 1991). Já os compostos que apresentam grupos volumosos no nitrogênio terminam possuem maior atividade antitumoral (PADHYE et al., 1992). E, por fim, derivados de acetilpiridina com substituintes também volumosos são melhores agentes antimalária. Variações no grupo R1, que está ligado ao carbono imínico também alteram a atividade biológica desses ligantes (PADHYE et al., 1992).

Um exemplo importante dessas propriedades é a p-22 acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona, que é conhecida comercialmente como tiacetazona, e é empregada no tratamento clínico da tuberculose decorrente do HIV (NANDI et al., 1964) (Figura 7).

Figura 7: Estrutura da acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona (TIACETAZONA).

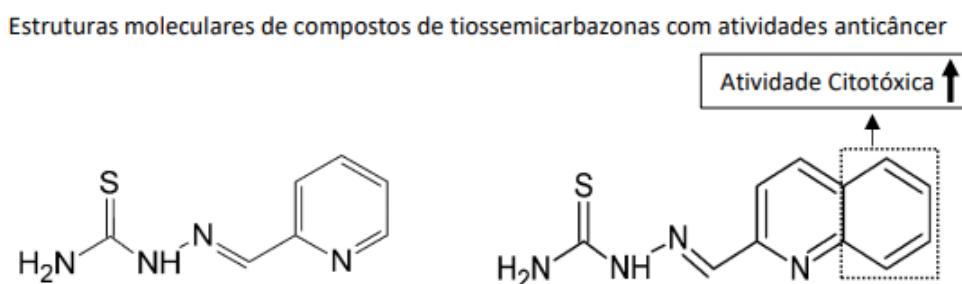


Fonte: NANDI et al., 1964.

Atualmente, a atividade mais explorada das TATSCs é a antitumoral. Em meados de 1956, foi demonstrado que a molécula 2-formilpiridina tiossemicarbazona tinha eficácia contra a leucemia (BROCKMAN et al, 1956). Apesar dessa constatação, não foram encontradas evidências o suficiente para considerar essa substância um medicamento na terapia contra o câncer.

Mais tarde, French (1958) propôs um mecanismo de ação para essas moléculas que é até hoje aceito. Ele previu que as TATSCs atuam como agentes quelantes podendo se complexar com metais que desenvolvem o papel de coenzimas. Assim, as enzimas passam para o estado inativo, não completando o ciclo de replicação celular. Desse modo, foi sintetizada a molécula 1-formilisoquinolina tiossemicarbazona, com um grupo benzeno a mais, o que confere uma maior densidade eletrônica à estrutura, fazendo com que esta tenha uma maior capacidade de complexação.

Figura 8: Estruturas moleculares de compostos de tiossemicarbazonas com atividade anticâncer.

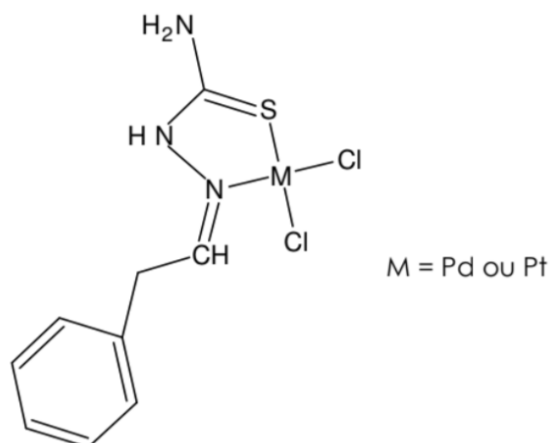


Fonte: French, 1958.

Existem também exemplos na literatura de complexos metálicos contendo ligantes de TATSCs de grande importância farmacológica, como aqueles contendo

paládio (Pd) ou Platina (Pt) de fenilacetaldéido tiossemicarbazona (Figura 9) e apresentam atividade citotóxica em células tumorais resistentes à cisplatina (QUIROGA et al., 1998).

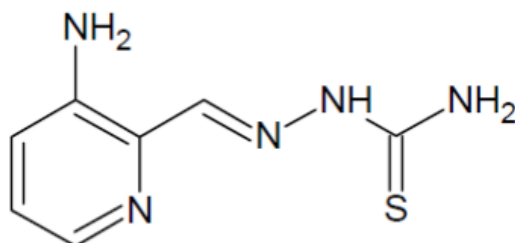
Figura 9: Estrutura da fenilacetaldéido tiossemicarbazona.



Fonte: QUIROGA et al., 1998.

Um composto da classe das TATSCs que vem apresentando potencial para atuar como fármaco antitumoral é a aminopiridina-2-carboxaldeído-tiossemicarbazona, ou como é comercialmente chamada, Triapina (Figura 10) (FINCH, R. A.; LIU, M. C. et al). Sua atividade antineoplásica está relacionada aos mecanismos de inibição da ribonucleotídeo difosfato redutase (RDR), enzima responsável pela manutenção da síntese do DNA.

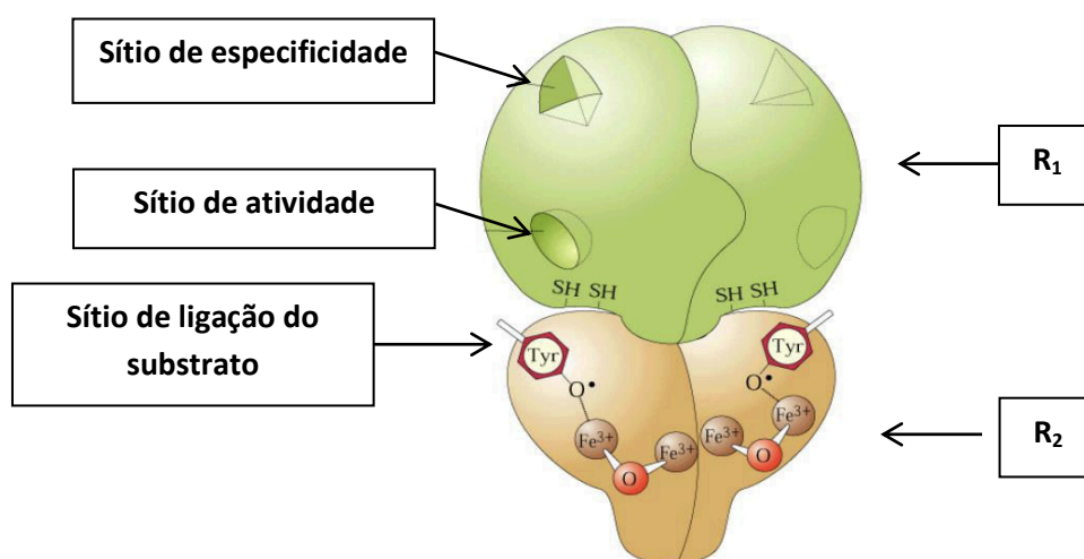
Figura 10: Representação estrutural do composto triapina.



Fonte: Química Nova, 2004.

Esta enzima ribonucleotídeo redutase (Figura 11) vem sendo relacionada como um alvo promissor na terapia do câncer. É uma enzima que existe em todas as células vivas e possui a função de catalisar o passo limitante na síntese dos desoxirribonucleotídeos fundamentais para a síntese do DNA (TENÓRIO; GÓES, 2005). A RDR é uma enzima constituída por duas subunidades, conhecidas como R_1 e R_2 . A subunidade R_2 contém um radical livre tirosila, o qual é estabilizado por um centro de ferro não-heme. Tanto o ferro quanto o grupo tirosila são essenciais para a atividade catalítica (CERQUEIRA, 2007).

Figura 11: Estrutura da proteína ribonucleotídeo-redutase (RDR).



Fonte: VILHENA, 2008.

A RDR catalisa o ciclo de reações redox que estão envolvidos na conversão de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos (VILHENA, 2008). Já os inibidores desta enzima, são altamente efetivos em bloquear a biossíntese de DNA, devido aos baixos níveis intracelulares dos desoxirribonucleotídeos (BERALDO, 2004). A gentamicina e a hidroxiuréia são os únicos inibidores desta enzima que receberam aprovação do (FDA), de modo que a hidroxiuréia atua diretamente na subunidade R_2 da enzima (BERALDO, 2004). No entanto, a hidroxiuréia é pouco efetiva, já que possui pouca afinidade pela RDR e possui um curto tempo de meia-vida dentro do plasma (BERALDO, 2004).

Dentre outras substâncias conhecidas que apresentarem atividade inibitória sobre esta enzima, estão a 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (triapina 3-AP) e a 3-aminopiridina-4-metil-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (3-AMP) (TENÓRIO; GÓES, 2005; CERQUEIRA, 2007). Segundo Liu et al., estas tiossemicarbazonas são 1000 vezes mais potentes que a hidroxauréia para inibir a RR em células da leucemia L-1210. Estudos apontam que a atividade inibitória destas substâncias sobre a enzima se deve ao complexo formado entre ela e o átomo de ferro presente no seu sítio catalítico (TENÓRIO; GÓES, 2005).

O mecanismo de ação dessas tiossemicarbazonas assim como o mecanismo de formação desses complexos foi investigado por Popović-Bijelić e colaboradores (2011) que sugeriram que ocorre a quelação de Fe (III), presente na estrutura da RR, formando um complexo tetraédrico de Fe (III). Este, por sua vez, é reduzido a Fe (II) em quantidades catalíticas pelo ligante, o qual produz espécies orgânicas reativas (*Reactive Organic Species* - ROS) derivadas da sua reação com o oxigênio molecular.

De acordo com a literatura, após a formação desse complexo de Fe (II), este se aloca em um sítio da RR que seria do metal livre e, dessa forma, transfere um elétron para o radical tirosila presente na subunidade R₂ inativando-o (RICHARDSON, 2022; BORGES et al., 1997). Além desse fator, as ROS formadas também são lábeis e têm a capacidade de promover a apoptose celular (SHAO et al., 2006).

Atualmente, a triapina está sendo avaliada em testes clínicos de fases I e II como possível fármaco antitumoral com resultados promissores no combate a tipos específicos de células tumorais, como, por exemplo, carcinoma de pulmão M109 de ratos, carcinoma de ovário humano A2789 e em ratos apresentando estágios avançados de leucemia L-1210 (BERALDO, H. 2004). Porém, pesquisas demonstram que a triapina falhou contra outros diversos tipos de tumor e as razões para este fenômeno ainda são muito vagas, uma vez que a quantidade de dados ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) da triapina disponíveis na literatura é muito limitada (PELIVAN et al., 2017).

De acordo com Pelivan e colaboradores (2017), esse fato pode ser devido à administração inadequada de medicamentos, resistência do organismo a esses medicamentos e/ou excreção rápida pelo metabolismo. Na literatura, dados *in vivo* de amostras de urina revelaram níveis muito elevados de metabólitos e da própria triapina

já 15 minutos após o tratamento com este medicamento, demonstrando que o metabolismo dessas substâncias no organismo pode ser bastante rápido (PELIVAN et al., 2017).

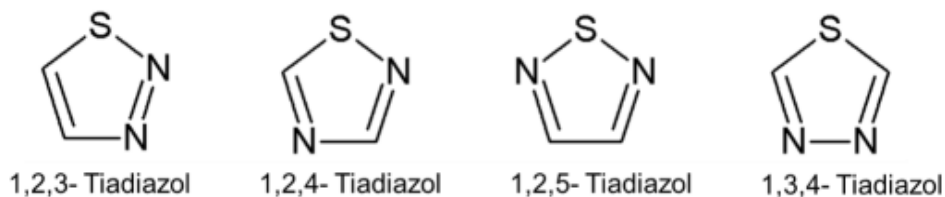
Ainda segundo Pelivan e colaboradores (2017), a triapina quando submetida a determinadas condições dentro do organismo, pode sofrer um processo de ciclização, se transformando em um tiadiazol, e em consequência disso, ter o seu mecanismo de ação comprometido.

1.3 Ciclização das Tiossemicarbazonas

De acordo com a literatura, de um modo geral, existem algumas estratégias que podem ser empregadas visando a ciclização de e tiossemicarbazonas. Realizando a análise retrossintética para estas moléculas ciclizadas, podem ser destacadas algumas vias de síntese para a formação de compostos pertencentes à classe dos chamados tiadiazóis (NASCIMENTO, 2007). Estes compostos possuem grande versatilidade sintética, e são objetos de estudo em diversos trabalhos publicados (TALATH, GADAD, 2006; FOROUMADI et al., 2005; KARABASANAGOUDA et al., 2006).

Tiadiazol é um exemplar da classe dos tiazóis, sendo um composto orgânico, heterocíclico, que possui um anel com cinco membros, contendo dois átomos carbonos, um de enxofre e dois de nitrogênio (Figura 12) (KASHYAP et al., 2012; SIDDIQUI et al., 2011).

Figura 12: Estruturas de diferentes moléculas de tiadiazol.



Fonte: 1,3,4-Thiadiazole: Synthesis, Reactions, and Applications in Medicinal, Agricultural, and Materials Chemistry (HU et al., 2014).

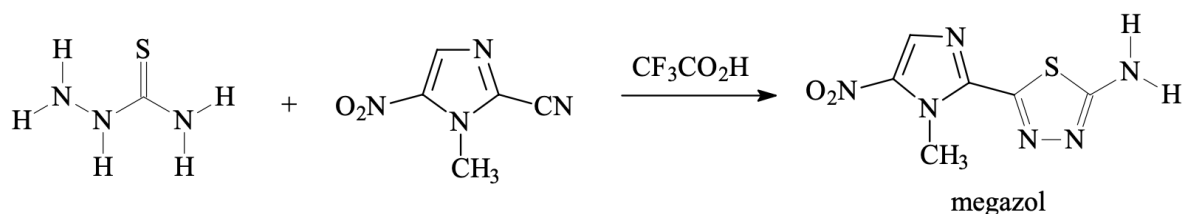
Dentre as principais vias de síntese, destacam-se: duas estratégias que abordam tiossemicarbazidas (previamente sintetizadas ou adquiridas comercialmente) em processos de endociclização e também uma envolvendo reações de ciclização oxidativa de tiossemicarbazonas (FOROUMADI et al., 2003).

Tratando-se dos métodos de obtenção de 2-amino-1,3,4-tiadiazóis substituídos, a reação que mais se destaca é a de ciclodeidrogenação de aciltiossemicarbazidas em meio ácido (KADI et al., 2006; DOGAN et al., 2002; HOVSEPIAN et al., 2004; KIDWAI et al., 1997). Esta síntese consiste na dissolução da aciltiossemicarbazida em H_2SO_4 concentrado a 0°C , temperatura ambiente ou sob leve aquecimento (aproximadamente 50°C) obtendo-se 1,3,4-tiadiazóis com rendimento satisfatório.

Uma outra metodologia empregada para a síntese de 2-amino-1,3,4-tiadiazóis substituídos foi utilizada por Carvalho et al. (2004) e Karabasanagouda et al. (2006). Esta envolve reações de condensação entre tiossemicarbazidas e ácidos carboxílicos aromáticos em oxicloreto de fósforo (POCl_3) (CARVALHO et al., 2004; KARABASAMAGOU DA et al., 2006).

Por fim, a mais relevante via de síntese para este trabalho é a ciclização oxidativa de tiossemicarbazonas. Em trabalhos desenvolvidos por Foroumadi et al. (2003 e 2006), é descrita a síntese de novos derivados 2-amino-1,3,4-tiadiazóis a partir da reação dessas tiossemicarbazonas com $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, em solução aquosa, ou com FeCl_3 , em solução etanólica, sob refluxo. Esta metodologia representa uma estratégia para a síntese do megazol a partir da 2-[(E)-1-(1-metil-5-nitro-2-H-2-imidazolil)metilideno]-1-hidrazinocarbotioamida (FOROUMADI et al., 2006).

Figura 13: Síntese do megazol via reação de condensação entre tiossemicarbazida e 1-metil-5-nitro-1-H-2-imidazolcarbonitrila em $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$.

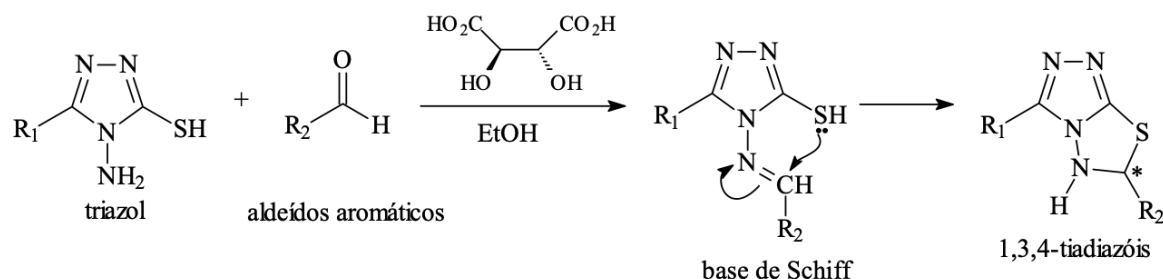


Fonte: FOROUMADI et al., 2006.

Wang et al. (1996) sintetizaram 5-(β -piridil)-2,3-di-hidro-1,3,4-triazolo[3,4,b]-1,3,4-tiadiazóis assimétricos, substituídos na posição 2, oriundos da reação de Mannich entre 3-piridil-4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol e aldeídos aromáticos utilizando ácido L-(+)-tartárico em quantidades catalíticas. Esta metodologia se baseia na formação de uma base de Schiff, como composto intermediário, que

representa um equivalente sintético de tiossemicarbazonas, o que é crucial para o fechamento do anel tiadiazólico, a partir do ataque nucleofílico do grupo sulfidril ao carbono presente no grupo imino (WANG et al., 1996).

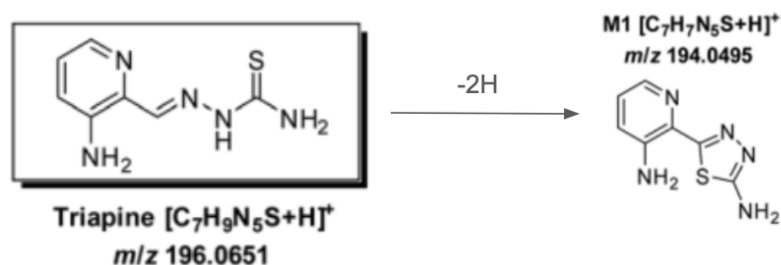
Figura 14: Formação de 1,3,4-tiadiazóis assimétricos utilizando reação de Mannich.



Fonte: WANG et al., 1996.

Por fim, no que diz respeito à 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (triapina 3-AP), Pelivan e colaboradores (2017) com o intuito de entender a quais reações químicas esse medicamento é submetido dentro do organismo, fizeram uso de uma técnica utilizada para a simulação de muitas reações hepáticas oxidativas do sistema metabólico, que envolvem a oxidação eletroquímica de um composto. Esta oxidação foi iniciada aplicando-se um potencial à célula eletroquímica com a entrada simultânea da triapina, a qual foi bombeada através da célula. Como produto dessa oxidação, foi identificado um metabólito desidrogenado M1 de anel fechado, que posteriormente, tratado por meio de um processo de cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC), pôde ser entendido como um 1,3,4-tiadiazol, ou seja, um produto ciclizado da tiossemicarbazona de origem (PELIVAN et al., 2017).

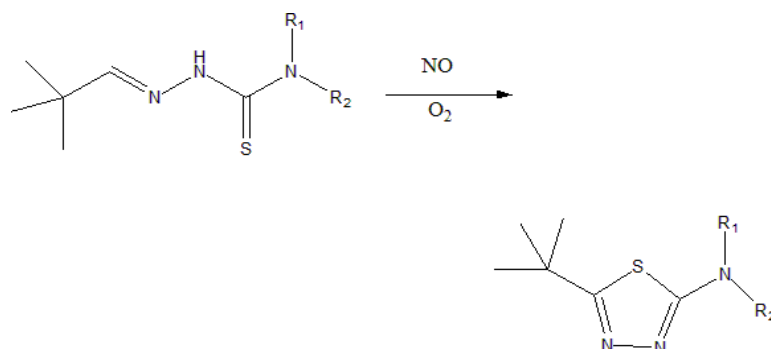
Figura 15: Oxidação eletroquímica da triapina formando seu correspondente 1,3,4-tiadiazol.



Fonte: Adaptado de PELIVAN et al., 2017.

Com base nesses dados, nosso grupo de pesquisa propõe a hipótese de que essa ciclooxidação que resulta na formação do tiadiazol, seja provocada pelo óxido nítrico (NO) existente no meio biológico, na presença de oxigênio (Figura 16).

Figura 16: Ciclooxidação de uma tiossemicarbazona por óxido nítrico em presença de oxigênio.



Fonte: Pereira, J.C.M. et al, 2019.

Foi demonstrado que o tiadiazol derivado da triapina não apresenta atividade anti-proliferativa de células cancerígenas, indicando assim que o processo de ciclização desse composto pode ter relação com a sua baixa atividade anticâncer em experimentos *in vivo* (PERIVAN et al., 2017). Assim, a hipótese estudada nessa dissertação é que esse processo de ciclooxidação por meio da ação do NO, em presença de O₂, ocorre nos ensaios *in vivo* envolvendo a triapina 3-AP, e assim, ela pode perder sua capacidade de atuar efetivamente como fármaco antitumoral.

2. OBJETIVOS

Sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade citotóxica das tiossemicarbazonas derivadas do trimetil acetaldeído e analisar a atividade do óxido nítrico na ciclooidação desses compostos e em sua atividade anticâncer.

2.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar novas tiossemicarbazonas a partir da reação de condensação entre o trimetil-acetaldeído e duas tiossemicarbazidas correspondentes.
- Sintetizar o tiadiazol corresponde à tiossemicarbazona, a partir da reação desta com o NO em presença de O₂ e estudar suas atividades antitumorais frente às linhagens MCF-7 (tumoral de mama) e A549 (tumoral de pulmão).

3. PARTE EXPERIMENTAL

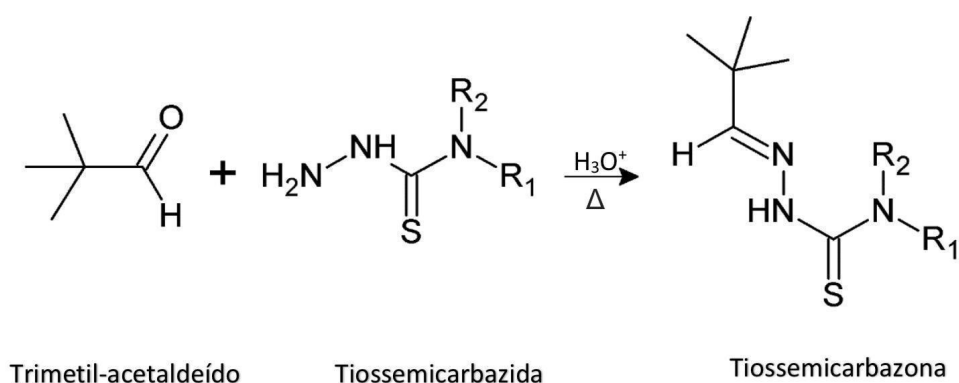
Nesta seção, serão apresentados os métodos experimentais empregados para a síntese, caracterização e análise das TATSCs e tiadiazóis propostos e desenvolvidos como parte deste estudo. Os procedimentos para a obtenção dos compostos, bem como as técnicas utilizadas para avaliar sua estrutura e propriedades, serão abordados de forma detalhada.

3.1 Síntese das Tiossemicarbazonas

As TATSCs podem ser obtidas comercialmente, no entanto, do ponto de vista sintético, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, quimiosseletividade, versatilidade, rapidez e alto rendimento, fazendo com que a sua síntese seja muito vantajosa (DU et al., 2002). Além disso, torna-se possível obter uma infinidade de novas moléculas combinando diferentes tiossemicarbazidas com aldeídos/cetonas.

Utilizou-se o procedimento já descrito na literatura para a síntese dessas TATSCs (TENÓRIO, 2005). Em um balão de fundo chato contendo 15ml de etanol solubilizou-se a tiossemicarbazida correspondente. Em seguida, adicionou-se à solução uma quantidade equimolar de trimetil acetaldeído e três gotas de ácido clorídrico diluído, que foi utilizado como catalisador. Manteve-se a mistura em agitação e com aquecimento (80°C) constante por 6h (Figura 17). Ao término do período, o aquecimento foi interrompido e o balão foi deixado em repouso até a evaporação lenta de parte do solvente, observando a formação de um precipitado. O produto foi lavado com etanol gelado, filtrado e seco no dessecador por algumas horas.

Figura 17: Reação simplificada para a obtenção das tiossemicarbazonas ($R_1 = H$ e $R_2 = \text{Metil, Etil}$).



Fonte: Obra da autora.

3.2 Reação de Ciclização de Tiossemicarbazonas

3.2.1 Síntese do tiadiazol

Em um balão tribulado foi adicionado aproximadamente 0,5g da tiossemicarbazona correspondente em 20mL de uma solução de etanol 96%, mantendo-se o sistema sob agitação constante por meio de um agitador magnético. O óxido nítrico (NO) utilizado para a ciclooxidação foi sintetizado a partir da reação de nitrito de sódio e ácido sulfúrico (Equação 1) e com auxílio de um tygon foi direcionado à mistura contida no balão. A solução foi borbulhada durante uma hora com agitação e o excesso de gás foi eliminado através de uma das saídas do balão (Pereira, J.C.M. et al, 2019). Após esse período interrompeu-se o direcionamento de NO e a agitação foi mantida por mais 30 minutos, obtendo-se ao fim uma solução. Esta solução foi mantida em repouso até a evaporação do solvente e precipitação do tiadiazol de interesse.

Equação 1: Reação de síntese de NO.

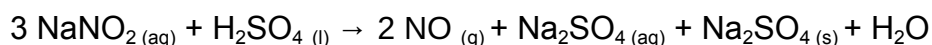
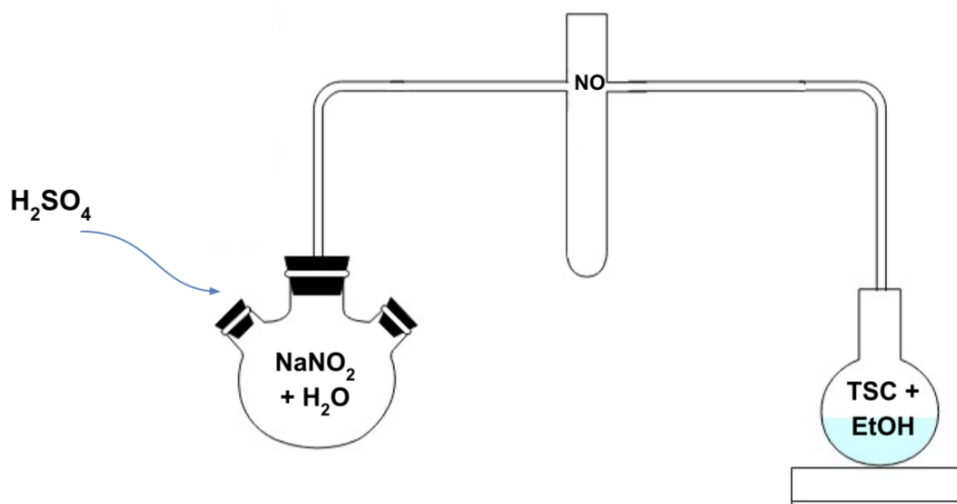


Figura 18: Esquema da reação de síntese do tiadiazol a partir da produção de NO proveniente do nitrito de sódio.



Fonte: Obra da autora.

3.3 Métodos Instrumentais

Nesta seção, serão apresentados os métodos experimentais empregados para a síntese, caracterização e análise das TATSCs e tiadiazóis propostos e desenvolvidos como parte deste estudo. Os procedimentos para a obtenção dos compostos, bem como as técnicas utilizadas para avaliar sua estrutura e propriedades, serão abordados de forma detalhada. As técnicas empregadas incluíram espectroscopia vibracional na região do infravermelho, espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível, análise elementar, ressonância magnética nuclear (RMN) e difração de raio x. As configurações específicas dos equipamentos utilizados, bem como as condições experimentais adotadas, serão descritas.

Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

Utilizou-se o equipamento de espectrofotômetro Lambda 1050 da Perkin Elmer localizado no Instituto de Química – UNESP Araraquara, no qual obteve-se os espectros vibracionais na região do infravermelho.

Espectroscopia eletrônica na Região do Ultravioleta-visível (UV-VIS)

Utilizou-se o equipamento de UV-Visible Spectrophotometer Evolution Array da Thermo scientific localizado no Instituto de Química – UNESP Araraquara, no qual obteve-se os espectros eletrônicos na região do Ultravioleta visível.

Análise Elementar

Utilizou-se o equipamento PerkinElmer CHNS/O 2400 Series II 120 V que está localizado no Laboratório Multiusuário I de Análises Químicas, situado ao lado do CEMPEQC, no prédio do Apoio Técnico Químico, Instituto de Química – UNESP Araraquara, no qual obteve-se os valores de análise elementar CHN.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Utilizou-se o equipamento Bruker-Avance III 600 HD localizado no Instituto de Química – UNESP Araraquara, no qual obteve-se o espectro de RMN ^1H e ^{13}C , o que teve como solvente o DMSO deuterado (DMSO-d₆) que foi utilizado como referência para os deslocamentos químicos.

Difração de Raio-X

Utilizou-se o equipamento Difratorômetro BRUKER APEX II Duo, equipado com duas micro fontes, de cobre e molibdênio, e sistema OXFORD de baixa temperatura. Marca: Bruker - Modelo: APEX II Duo que está localizado no Instituto de Física – USP São Carlos.

3.4 Ensaios de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando as seguintes linhagens celulares humanas: MCF-7 (tumoral de mama), MCF-10A (não tumoral de mama), A549 (tumoral de pulmão) e MRC5 (não tumoral de pulmão de origem fetal). A linhagem celular MCF-10A foi cultivada em meio DEMEM/F-12 suplementado com 10% (v/v) de FHS (soro fetal de cavalo), para a linhagem MCF-7 foi utilizado o meio RPMI-1640 e as demais linhagem em meio DMEM, ambos meios de cultura foram suplementados com 10% (v/v) de FBS (soro fetal bovino). O cultivo foi realizado dentro de garrafas de plástico armazenadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

A contagem das células foi realizada utilizando a câmara de contagem Neubauer com auxílio do corante Azul de Tripiano. Após a contagem da suspensão, foram adicionadas às placas de 96 poços alíquotas com 100 µL contendo $1,0 \times 10^4$ células. As placas foram mantidas por 24h na estufa e em seguida foi adicionado a cada poço 50 µL de uma solução do composto, diluído com DMSO e meio de cultura, contendo os compostos de interesse. As concentrações finais dos compostos nos poços foram de 1,58; 3,16; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00; 200 µmol·L⁻¹; ajustadas de acordo com a toxicidade do composto. Em seguida, as placas foram incubadas novamente na estufa por mais 48h com atmosfera de 5% de CO₂.

Após a incubação das microplacas foi adicionado a cada poço 50 µL de uma solução de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolio) (1 mg·mL⁻¹) e incubada novamente na estufa por 4h. Por fim, retirou-se a solução de cada poço e adicionou-se 100 µL de uma solução de álcool Isopropílico e dmsO, em seguida foram realizadas as medidas de absorbância em cada poço com o leitor de microplacas da BioTek Synergy HTX Multimode Reader – Agilent. Os dados obtidos foram tratados utilizando Excel 360 e GraphPadPrism 8.0.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

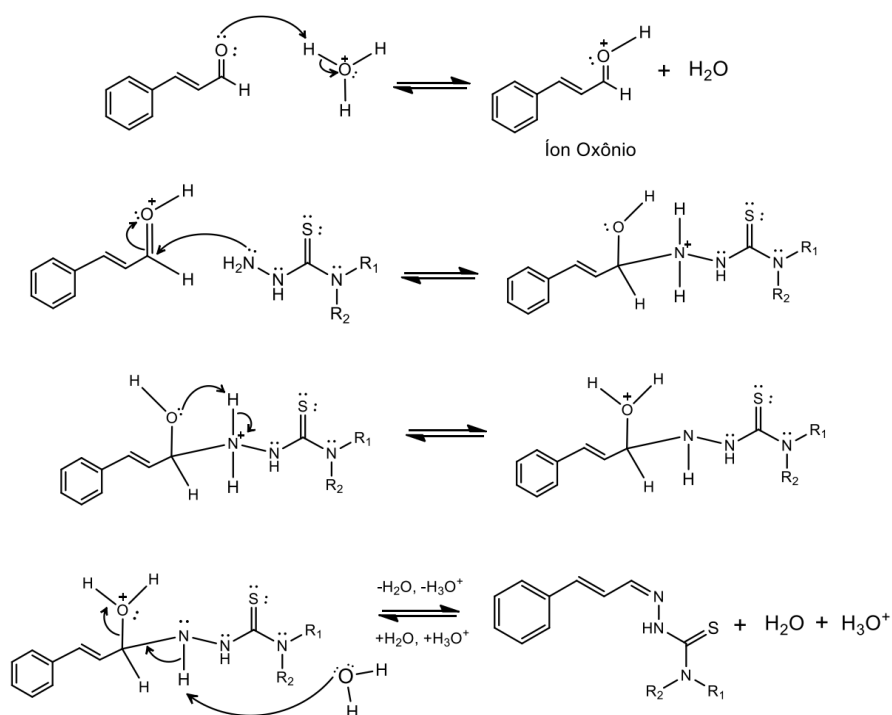
As TATSCs e seus respectivos tiadiazóis sintetizados foram submetidos a uma caracterização abrangente, envolvendo análise elementar de Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio, técnicas espectroscópicas diversificadas que incluíram espectroscopia na região do infravermelho e ultravioleta-visível, ressonância magnética nuclear (RMN) e difração de raio x. Essas análises desempenharam um papel fundamental na identificação e caracterização dos compostos sintetizados. Os resultados obtidos foram posteriormente examinados mediante comparação com dados já presentes na literatura, acompanhados pela interpretação de cada composto.

4.1 Síntese e Caracterização das Tiossemicarbazonas

Tiossemicarbazonas são moléculas orgânicas que podem ser adquiridas comercialmente, contudo sua síntese é relativamente simples, sendo caracterizada por uma condensação equimolar de um aldeído ou cetona com uma tiossemicarbazida em meio alcoólico com quantidades catalíticas de ácido (TENÓRIO et al., 2005).

A reação se inicia pela protonação do oxigênio da carbonila (ativação) para formar o intermediário íon oxônio seguido da adição nucleofílica do nitrogênio da tiossemicarbazida, que posteriormente perde uma molécula de água, formando, por fim, a tiossemicarbazona (Figura 19) (TENÓRIO et al., 2005).

Figura 19: Mecanismo de formação da tiossemicarbazona a partir de uma cetona/aldeído e uma tiossemicarbazida.

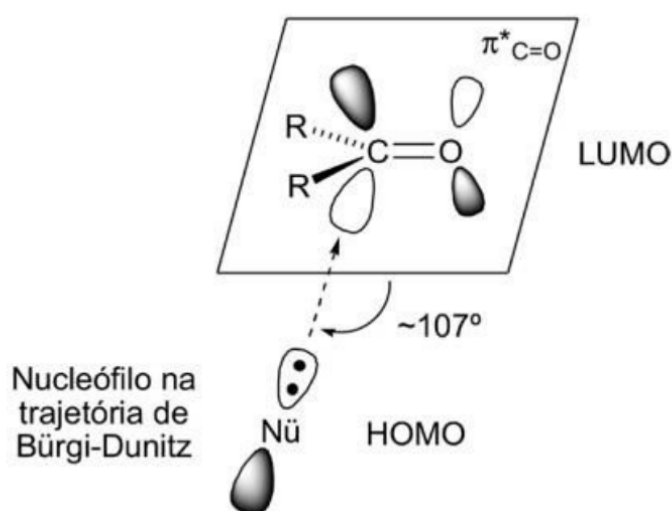


Fonte: ZANETTI, 2018.

Esta reação é chamada de adição nucleofílica, na qual os elétrons do nucleófilo estão no orbital ocupado de mais alta energia (HOMO) e a interação deste par eletrônico se dá com o orbital desocupado de mais baixa energia (LUMO) do composto carbonilado (ALVES, 2010).

O orbital LUMO do composto carbonilado é descrito como o orbital antiligante do tipo π^* , obtido a partir da combinação fora de fase entre os orbitais atômicos p do carbono e do oxigênio. Este orbital possui maior coeficiente sobre o átomo de carbono, que representa o sítio eletrofílico (Figura 20). Desta forma o nucleófilo, rico em elétrons, evitará a repulsão eletrônica desestabilizadora com a região de maior densidade eletrônica, representada pelo orbital π ao redor do átomo de oxigênio (ALVES, 2010).

Figura 20: Representação da adição nucleofílica e ângulo formado entre o plano do composto carbonilado e o caminho adotado pelo nucleófilo.



Fonte: ALVES, 2010.

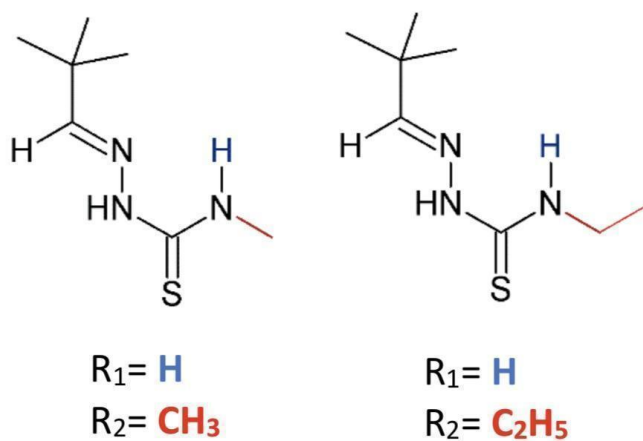
Em meio ácido, a energia do LUMO do composto carbonilado diminui, e o HOMO do nucleófilo é fracamente afetado, acarretando em uma menor variação de energia e consequentemente a sobreposição dos orbitais será facilitada (ALVES, 2010).

Dessa forma, duas TATSCs (Figura 21) com diferentes substituintes no nitrogênio terminal foram sintetizadas e caracterizadas reagindo o trimetilacetaldeído com as tiossemicarbazidas 4-metil-3-tiossemicarbazida e 4-etil-3-tiossemicarbazida em meio ácido.

Tabela 1: Tiossemicarbazidas utilizadas na síntese dos compostos de tiossemicarbazonas.

Molécula	R ₁	R ₂
4-Metil-3-tiossemicarbazida	H	CH ₃
4-Etil-3-tiossemicarbazida	H	CH ₂ -CH ₃

Fonte: Obra da autora.

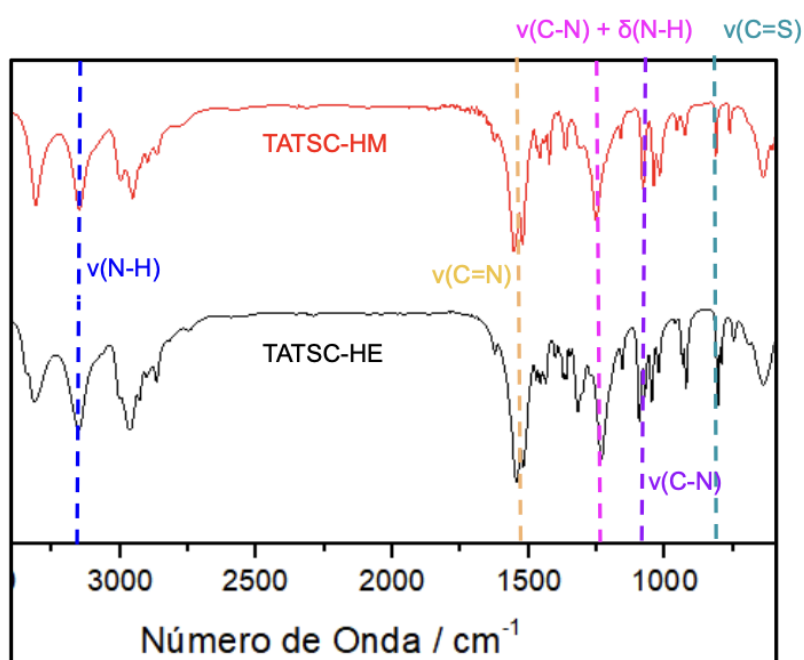
Figura 21: Estrutura molecular das tiossemicarbazonas sintetizadas.

Fonte: Obra da autora.

4.1.2 Espectroscopia Vibracional na região do IV

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho gera um espectro de absorção característico e diferente para toda a molécula submetida ao método. Dessa forma, com auxílio da literatura é possível identificar as bandas características de certos grupos de átomos presentes na estrutura com as bandas já conhecidas, permitindo a identificação da estrutura como um todo (SILVERSTEIN, 1916). Foram obtidos dois espectros de IV para as TATSCs, sendo eles para a TATSC-HM e TATSC-HE (Figura 22).

Figura 22: Espectro vibracional dos compostos TATSC-HM e TATSC-HE.



Fonte: Obra da autora.

No espectro de IV dos compostos, apresentados na Figura 22, nota-se a presença de bandas entre 3395–2941 cm^{-1} referentes ao estiramento $\nu(\text{N-H})$ da amina (PAVIA et al., 2015). De acordo com Wiles (p. 2258, 1967), as regiões compreendidas entre 1600 – 800 cm^{-1} contém as bandas de absorção das tioamidas I, II, III e IV respectivamente: em 1550 cm^{-1} com a contribuição de $\nu(\text{C=N}) + \delta(\text{N-H})$, em 1250 cm^{-1} com $\nu(\text{C-N}) + \delta(\text{N-H}) + \delta(\text{C-H})$, em 1000 cm^{-1} com $\nu(\text{C-N}) + \nu(\text{C=S})$ e, por fim, em 800 cm^{-1} referente a $\nu(\text{C=S})$.

Tabela 2: Sinais de IV para as tiossemicarbazonas sintetizadas.

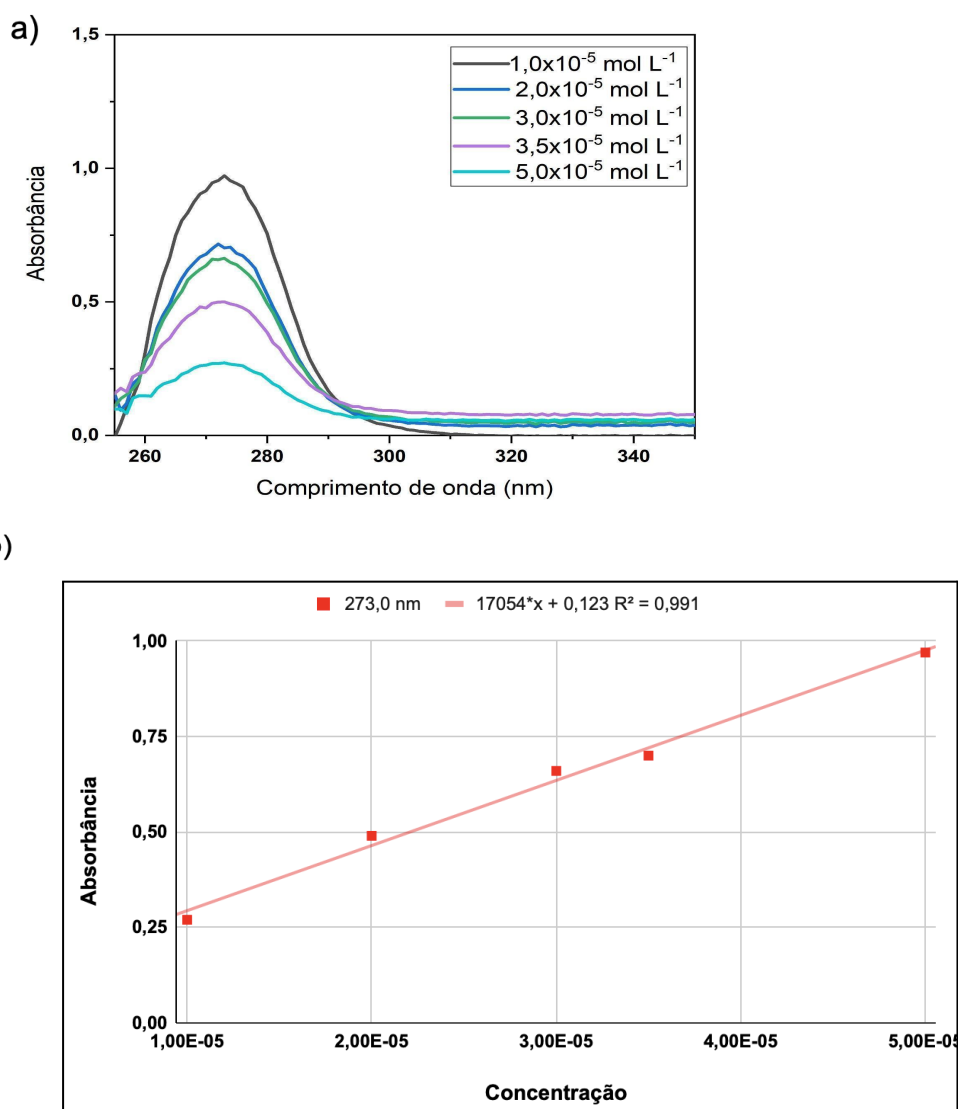
Compostos	Número de Onda / cm^{-1}				
	$\nu(\text{N-H})$ amina	Tioamidas I, II, III e IV			
		$\nu(\text{C=N}) + \delta(\text{N-H})$	$\nu(\text{C-N}) + \delta(\text{N-H}) + \delta(\text{C-H})$	$\nu(\text{C-N})$	$\nu(\text{C=S})$
TATSC-HM	3150	1523	1253	1080	809
TATSC-HE	3149	1544	1235	1093	809

Fonte: Obra da autora.

4.1.3 Espectroscopia Eletrônica na região do UV-VIS

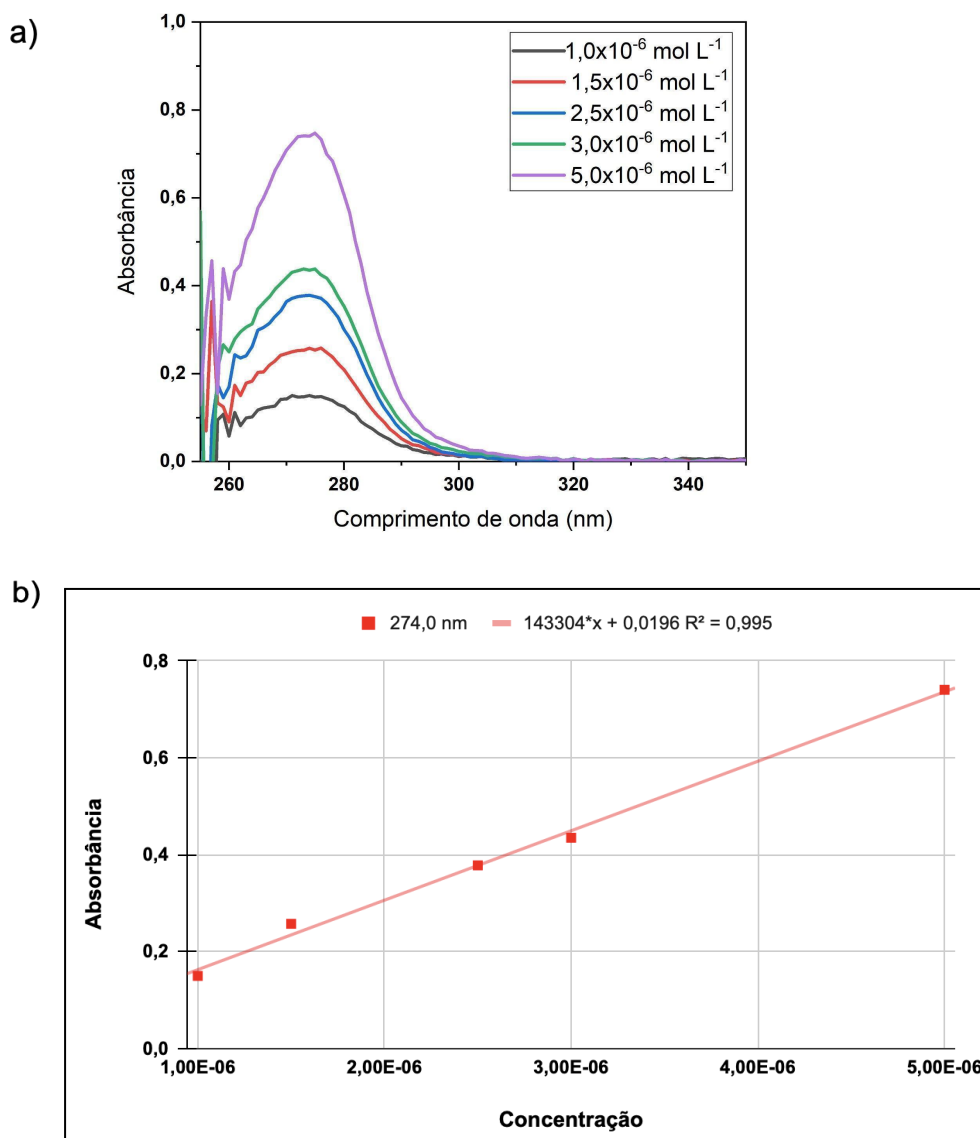
Os espectros de absorção foram realizados com o intuito de determinar os coeficientes de absorvidade molar das tiossemicarbazonas. Nas Figuras 23 e 24 estão ilustrados os espectros obtidos, em diversas concentrações, assim como a curva analítica obtida com base na lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot C$, em que A é a absorvância, ϵ é absorvidade molar e b o caminho óptico) (PAVIA, et al., 2010).

Figura 23: (a) Espectros de absorção na região UV-Vis para a TATSC-HM realizado em DMSO. (b) Curva analítica obtida para a banda principal em 273 nm.



Fonte: Obra da autora.

Figura 24: (a) Espectros de absorção na região UV-Vis para a TATSC-HE realizado em DMSO. (b) Curva analítica obtida para a banda principal em 274 nm.



Fonte: Obra da autora.

Como o R^2 é muito próximo de 1, os valores estatísticos encontrados na equação da reta são próximos dos reais. Desse modo, pode-se utilizar a equação de Lambert-Beer para encontrar o coeficiente de absorvidade molar (ϵ). Para isso, utilizou-se o coeficiente de inclinação das retas de regressão linear, os quais são obtidos a partir das curvas analíticas e correspondem à absorvidade (A) (PAVIA, et al., 2010). Dessa forma, com os dados obtidos nos experimentos, nos quais as retas de regressão são dadas por ($y = 17054x + 0,123$) e ($y = 143304x + 0,0196$) e assumindo o caminho óptico como 1 cm (volume da cubeta utilizada), obtém-se que

os coeficientes de absorvidade molar dos compostos TATSC-HM e TATSC-HE produzidos, são, respectivamente, $\epsilon=17054 \text{ (L(cm.Mol)}^{-1})$ e $\epsilon=143304 \text{ (L(cm.Mol)}^{-1})$.

Os grupos funcionais amina (N-H) e tiol (S-H) apresentam transições eletrônicas do tipo $n \rightarrow \sigma^*$ que possuem por característica apresentarem apenas um banda de intensidade de baixa a média e constante de absorvidade molar (ϵ) entre 100 a 10.000, a qual caracteriza um grupo funcional que pode apresentar de baixa a alta intensidade de absorção. No caso das aminas, estas transições ocorrem entre 190-290 nm (PAVIA, et al., 2010) e são observadas no espectro de UV-VIS do composto TATSC-HM em 273 nm e em TATSC-HE em 274 nm. A transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$ correspondente ao grupo tiol ocorre entre 200-220 nm (PAVIA, et al., 2010) e não é observada nos dois compostos, o que indica que ambos estão em sua forma tiona (C=S).

4.1.4 Análise Elementar

As análises elementares que foram feitas para confirmar a estrutura das TATSCs propostas na Figura 21 estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Composição calculada e experimental para as tiossemicarbazonas sintetizadas.

Composto	%Carbono		%Hidrogênio		%Nitrogênio	
	Exp	Cal	Exp	Cal	Exp	Cal
TATSC-HM	49,1	48,52	12,26	8,72	31,38	24,25
TATSC-HE	52,0	51,30	11,97	9,15	28,37	22,43

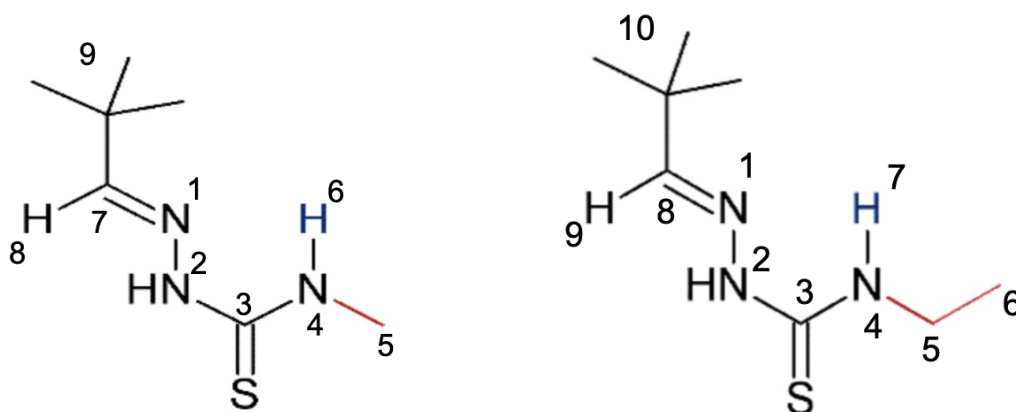
Fonte: Obra da autora.

Os valores de nitrogênio foram discrepantes com relação aos valores esperados e isto pode ser em razão dos reagentes utilizados na síntese das TATSCs. Porém os valores de carbono e hidrogênio foram próximos aos teóricos o que também indica que os compostos provavelmente são os previamente propostos.

4.1.5 Espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C permitiram uma análise mais profunda sobre a estrutura das moléculas. Assim, com o intuito de facilitar a compreensão da atribuição dos espectros, o mesmo padrão de designação numérica utilizada para as tiossemicarbazonas (TENÓRIO et al., 2005) foi mantido. Toda a numeração posterior foi proposta conforme pode ser visto na Figura 25.

Figura 25: Numeração proposta para os compostos sintetizados.



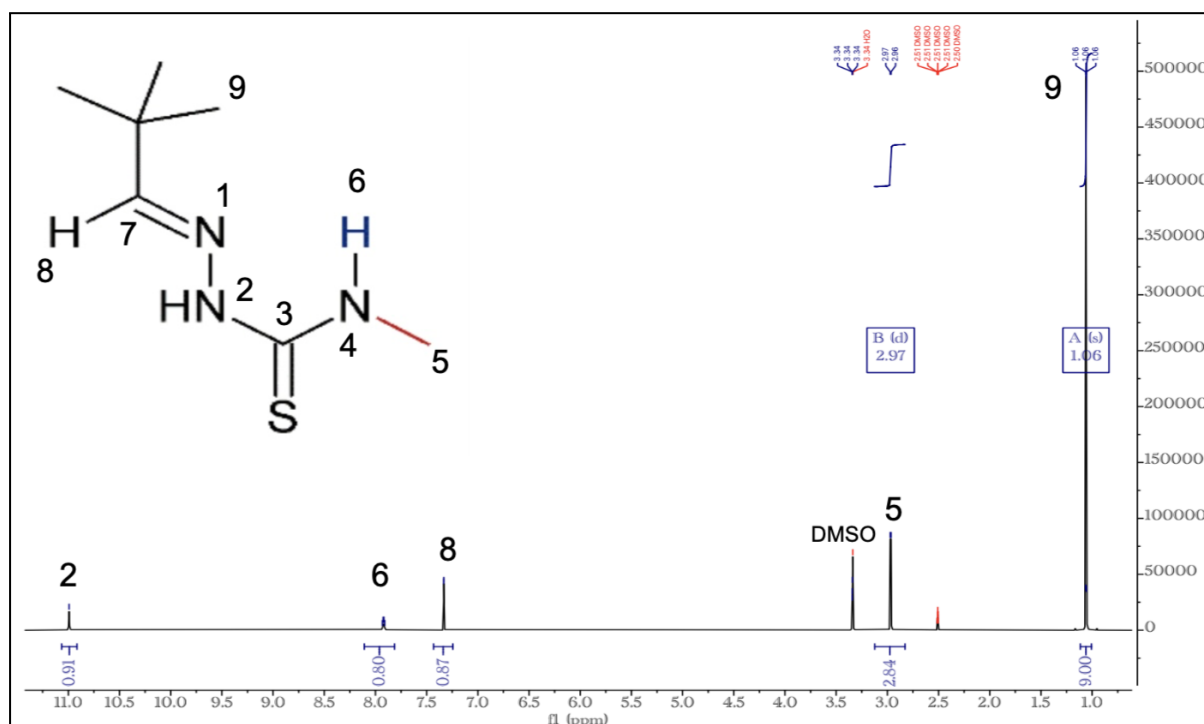
Fonte: Obra da autora.

Espectros de ^1H

As integrais estão representadas logo abaixo de cada pico e apresentam valores aproximados do número de hidrogênio. Observou-se nos espectros do TATSC-HM e TATSC-HE um sinal intenso por volta de 2-4 ppm, que de acordo com Gottlieb e colaboradores, é referente ao contaminante de água (em DMSO- D_6), provavelmente originado do solvente ou da própria reação, que pode liberar água em uma das etapas.

No que diz respeito à molécula de TATSC-HM (Figura 26) foi observado um singlete em δ 10,99 referente ao hidrogênio ligado ao N (2), um singlete em δ 1,08 referente aos hidrogênios grupo trimetil-acetaldeído. Outro singlete foi observado em 7,92 referente ao H (6) da amina (4). O grupo metil ligado à amina (4) apresentou um dubleto em δ 2,97. E por último, o sinal em δ 7,3 foi atribuído ao hidrogênio da ligação $\text{CH}=\text{N}$ (PAVIA, et al., 2010).

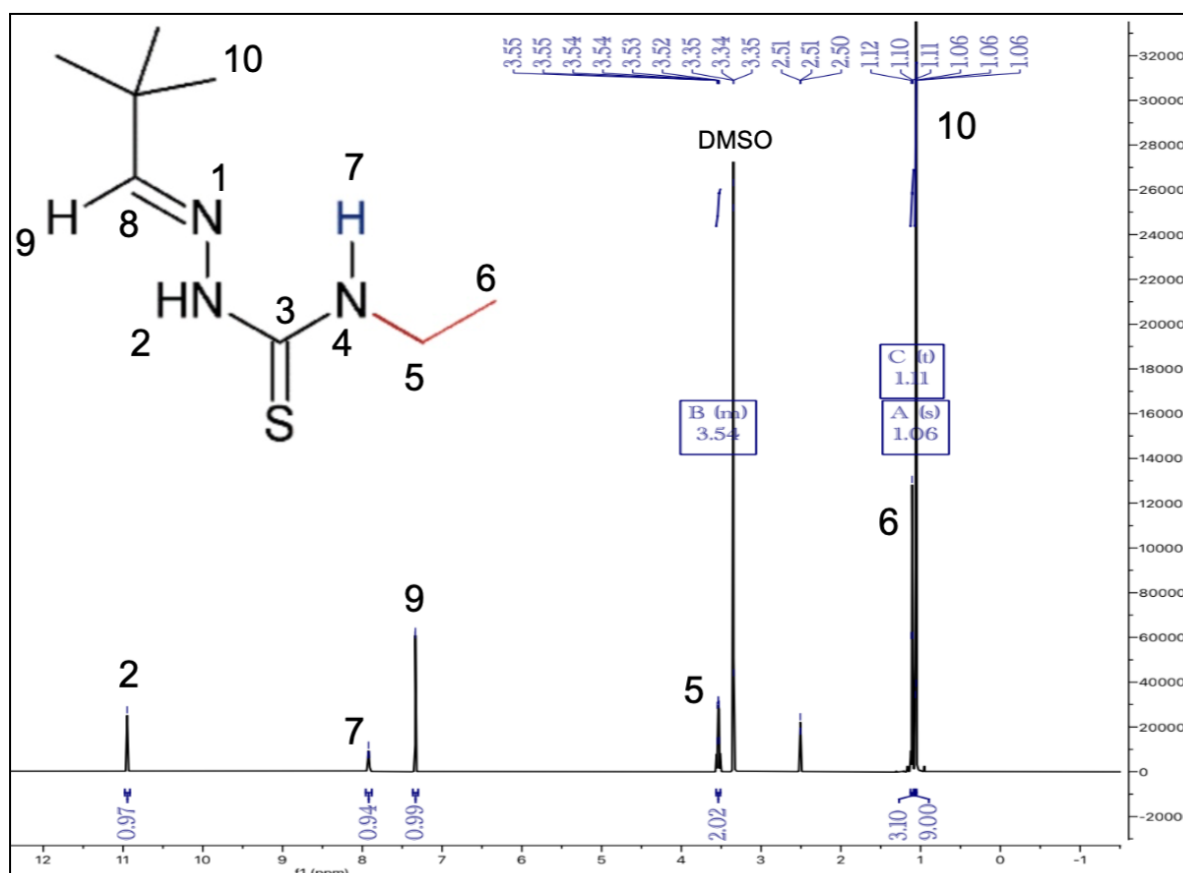
Figura 26: Espectro de RMN ^1H referente à TATSC-HM realizado em DMSO- d_6 .



Fonte: Obra da autora.

No espectro do TATSC-HE (Figura 27) foi observado um sinal em 3.5 ppm, do acoplamento dos hidrogênios do $-\text{CH}_2$ da etila C (6) com o hidrogênio H (7) e os hidrogênios de C (6). O sinal em 1,11 ppm é possível supor que seja referente aos grupos $-\text{CH}_3$ do reagente trimetil-acetaldeído. Outro singlete foi observado em 7,92 referente ao H (7) da amina (4) e um sinal em δ 7,3 foi atribuído ao hidrogênio da ligação $\text{CH}=\text{N}$. Além disto, foi observado um singlete em δ 10,95 referente ao hidrogênio ligado ao N (2) (PAVIA, et al., 2010).

Figura 27: Espectro de RMN ^1H referente à TATSC-HE realizado em DMSO- d_6 .



Fonte: Obra da autora.

Na Tabela 4 encontram-se as integrais (em parênteses) e os deslocamentos químicos para R_1 e R_2 , de todos compostos estudados.

Tabela 4: Deslocamento químico no espectro de RMN ^1H para os substituintes R_1 e R_2 .

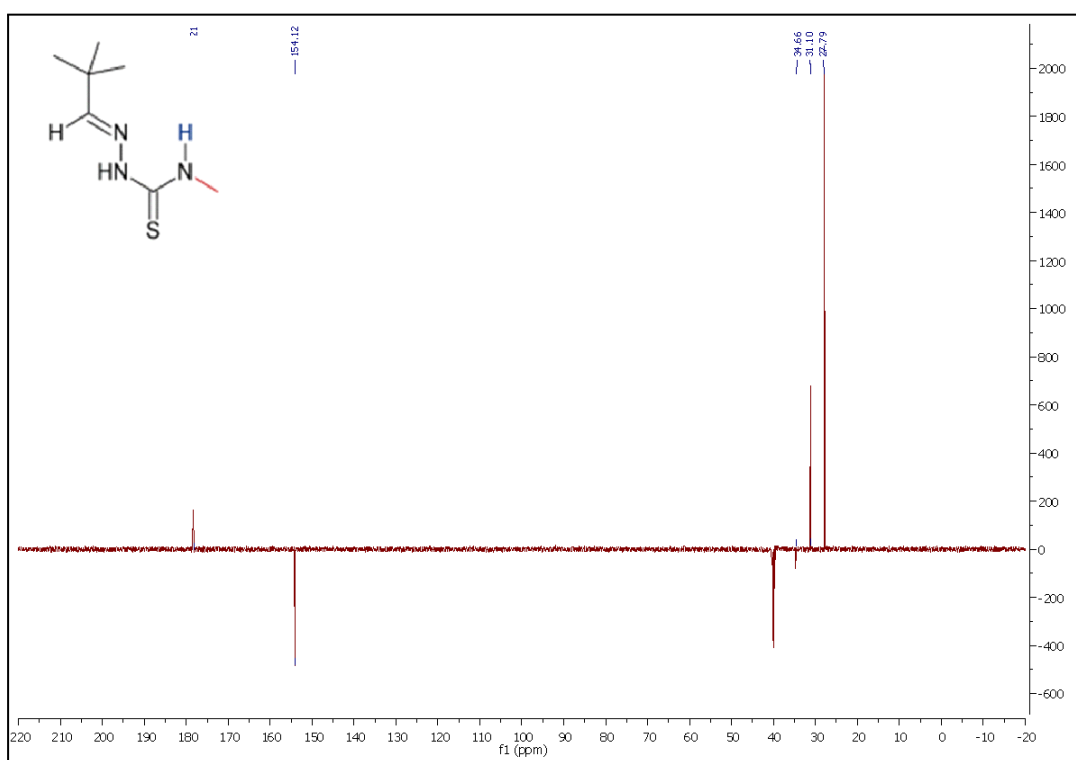
Substituinte	Composto (δ - ppm)	
	TATSC-HM	TATSC-HE
R_1 (H)	7,92 s (1H)	7,92 s (1H)
R_2 (CH_3 e CH_2CH_3)	2,97 s (3H)	3,54 m (2H) 1,11 t (3H)

Fonte: Obra da autora.

Espectros de ^{13}C

O resultado proveniente do espectro de RMN ^{13}C pode ser mais um indício da formação da tiossemicarbazonas. O espectro RMN ^{13}C do composto TATSC-HM apresenta um sinal intenso em 27,70 ppm referente aos grupos CH_3 do trimetil-acetaldeído e do metil ligado à amina em 30,95 ppm. Além disso, foi observado um pico em 178,1 ppm referente ao grupo $\text{CH}=\text{N}$. O sinal referente ao carbono do grupo $\text{C}=\text{S}$ foi observado em 154,2 ppm. Finalmente, um pico em 35,34 ppm foi atribuído ao carbono quaternário do fragmento derivado do trimetil-acetaldeído (Figura 28) (PAVIA, et al., 2010).

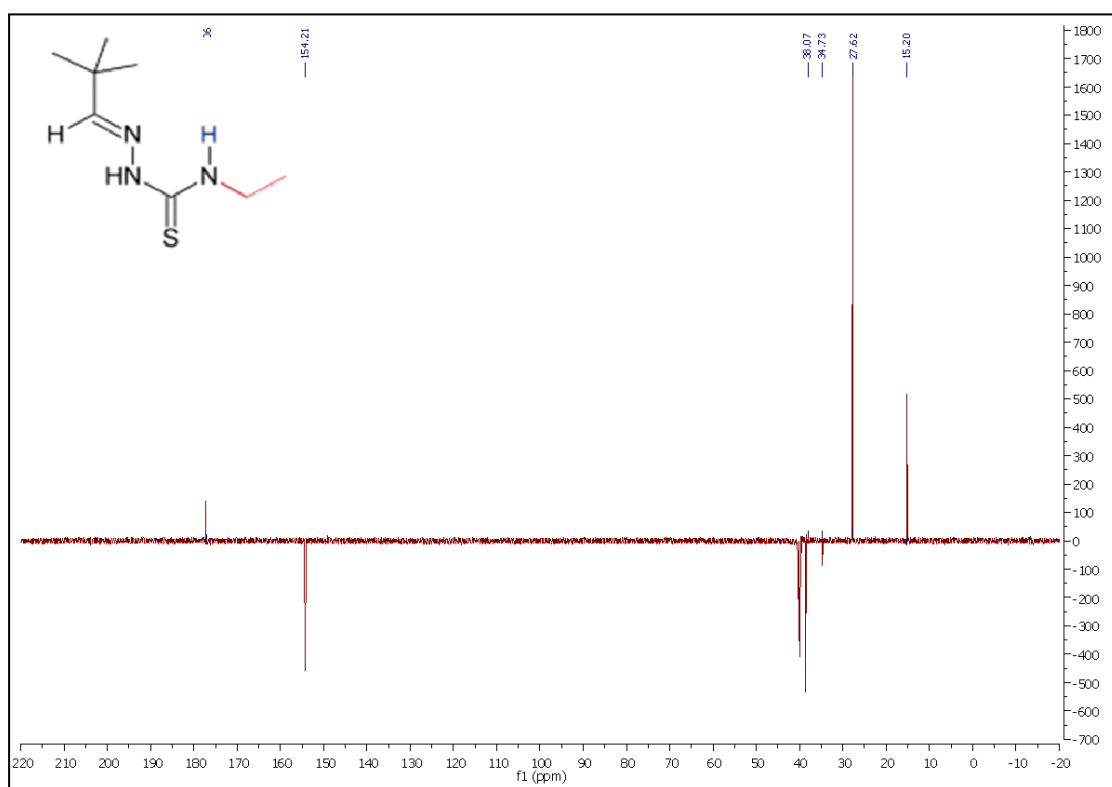
Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C referente à TATSC-HM realizado em DMSO.



Fonte: Obra da autora.

O espectro RMN ^{13}C do composto TATSC-HE apresenta um sinal intenso em 27,99 ppm referente aos grupos CH_3 do trimetil-acetaldeído e do CH_3 do grupo etil ligado à amina em 15,2 ppm. Além disso, foi observado um pico em 177,1 ppm referente ao grupo $\text{CH}=\text{N}$. O sinal referente ao carbono do grupo $\text{C}=\text{S}$ foi observado em 154,2 ppm. Um pico em 38,06 foi atribuído ao CH_2 do grupo etil ligado à amina. Finalmente, um pico em 35,10 ppm foi atribuído ao carbono quaternário do fragmento derivado do trimetil-acetaldeído (Figura 29) (PAVIA, et al., 2010).

Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C referente à TATSC-HE realizado em DMSO.

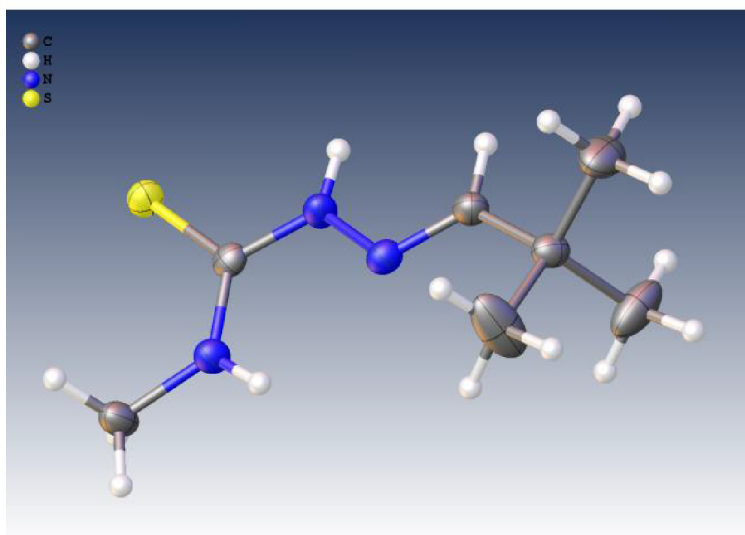


Fonte: Obra da autora.

4.1.6 Difração de Raio X

Além de todas as atribuições estruturais supracitadas, a formação das tiossemicarbazonas foi confirmada por meio de um estudo de raios X de monocristal (Figura 30).

Figura 30: Estrutura do composto TATSC-HM obtido por difração de raio X monocristal.



Fonte: Obra da autora.

Por meio da análise dos dados coletados de difração, foi observada a estrutura cristalina da tiossemicarbazona TATSC-HM. Os comprimentos e ângulos de ligação da estrutura da TATSC-HM estão de acordo com o esperado. Foi observado que a TATSC-HM estudada apresenta uma conformação anti para os seguintes átomos: N1-N2 e C6-N3 (DE OLIVEIRA, et al., 2012). Os comprimentos de ligação S1-C6 bem como o ângulo de ligação N2-C6-S1 ($119,52^\circ$) e N3-C6-S1 ($123,30^\circ$) indicam um caráter de formação de tiona, enquanto os comprimentos de ligação N1-N2, N3-C6 e N3-C7 (1,3852, 1,3270 e 1,4514 Å, respectivamente) são consistentes com um caráter de ligação simples (DE OLIVEIRA, et al., 2012). O grupo CH=N também é confirmado pelo caráter de ligação dupla da ligação N1-C5 (1,2696 Å). As ligações intermoleculares da estrutura cristalina da TATSC-HM são do tipo ligação de hidrogênio N-H---O e do tipo N-H----S (DE OLIVEIRA, et al., 2012).

Tabela 5: Comprimentos de ligação em Å do composto TATSC-HM.

Átomo 1	Átomo 2	Comprimento de ligação
S1	C6	1,6973
N1	C5	1,2696
N1	N2	1,3852
N3	C6	1,3270
N3	C7	1,4514

Fonte: Obra da autora.

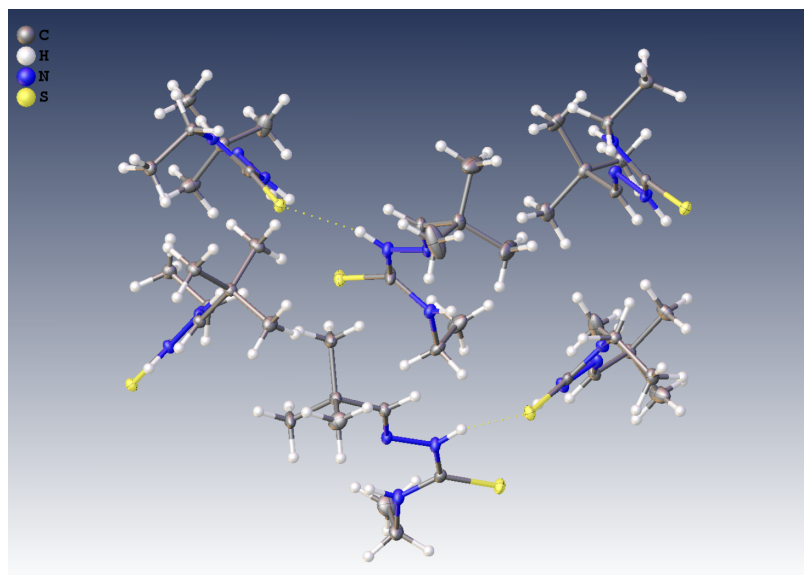
Tabela 6: Ângulos de ligação do composto TATSC-HM.

Átomo 1	Átomo 2	Átomo 3	Ângulo de ligação
C5	N1	N2	115,91
C6	N3	C7	123,52
C6	N2	N1	119,41
N1	C5	C4	122,24
C5	C4	C1	111,26
C5	C4	C2	108,96
C1	C4	C2	110,70
C5	C4	C3	107,09
C1	C4	C3	110,24
C2	C4	C3	108,47
N3	C6	N2	117,18
N3	C6	S1	123,30
N2	C6	S1	119,52

Fonte: Obra da autora.

Os comprimentos e ângulos de ligação da estrutura do TATSC-HE também estão de acordo com o esperado (Figura 31). Foi observado que a molécula TATSC-HE apresenta uma conformação anti para os seguintes átomos: N1-N2 e C6-N3 (DE OLIVEIRA, et al., 2012).

Figura 31: Estrutura do composto TATSC-HE obtido por difração de raio X monocristal.



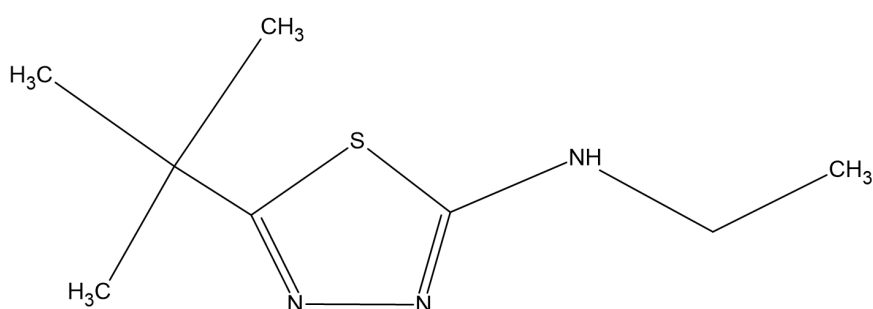
Fonte: Obra da autora.

Os comprimentos de ligação S1–C6 bem como o ângulo de ligação N2-C6-S1 ($119,52^\circ$) e N3-C6-S1 ($123,30^\circ$) indicam um caráter de formação de tiona, enquanto os comprimentos de ligação N1–N2, N3–C6 e N3-C7 (1,3852, 1,3270 e 1,4514 Å, respectivamente) são consistentes com um caráter de ligação simples (DE OLIVEIRA, et al., 2012).. O grupo CH=N também é confirmado pelo caráter de ligação dupla da ligação N1–C5 (1,2696 Å). As ligações intermoleculares da estrutura cristalina do TATSC-HE são do tipo ligação de hidrogênio N-H---O e do tipo N-H----S (DE OLIVEIRA, et al., 2012).

4.2 Reação de Ciclização das Tiossemicarbazonas

Apesar de duas TATSCs terem sido previamente sintetizadas visando a formação do seu tiadiazol, apenas a TATSC-HE apresentou um rendimento satisfatório o suficiente para que fossem realizadas as devidas caracterizações visando comprovar a estrutura do tiadiazol (TDZ-HE) correspondente. O TDZ-HE esperado e sua fórmula estrutural está presente na Figura 32.

Figura 32: Fórmula estrutural do TDZ-HE a partir de sua respectiva tiossemicarbazona e NO em presença de O₂.



Fonte: Obra da autora.

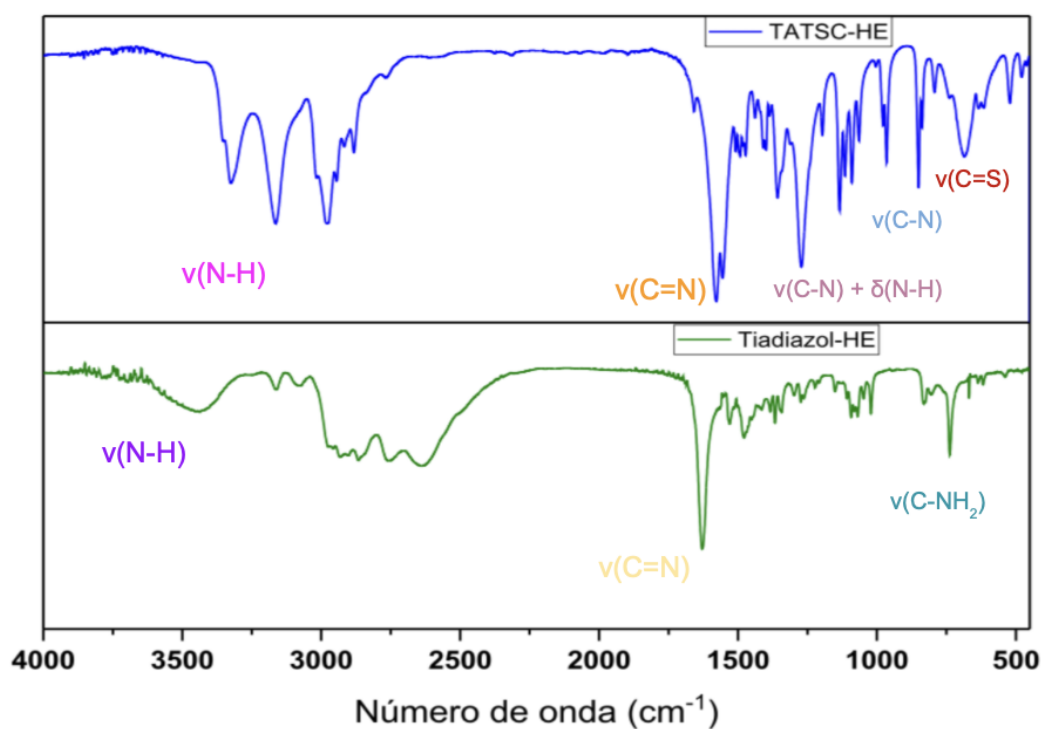
4.2.1 Tiadiazol

O tiadiazol sintetizado foi submetido a uma caracterização abrangente, envolvendo técnicas espectroscópicas diversificadas que incluíram espectroscopia na região do infravermelho e ultravioleta-visível, ressonância magnética nuclear (RMN) e difração de raio x. Essas análises desempenharam um papel fundamental na identificação e caracterização do composto e também auxiliaram na comprovação do TDZ-HE esperado. Os resultados obtidos foram posteriormente examinados mediante comparação com dados já presentes na literatura, acompanhados pela interpretação específica de cada composto.

Espectroscopia Vibracional na região do IV

De acordo com os resultados obtidos por meio do espectro de infravermelho (Figura 33), é possível observar que o tiadiazol (TDZ-HE) formado é condizente com o esperado.

Figura 33: Comparação entre os espectros de IV da TATSC-HE e do TDZ-HE.



Fonte: Obra da autora.

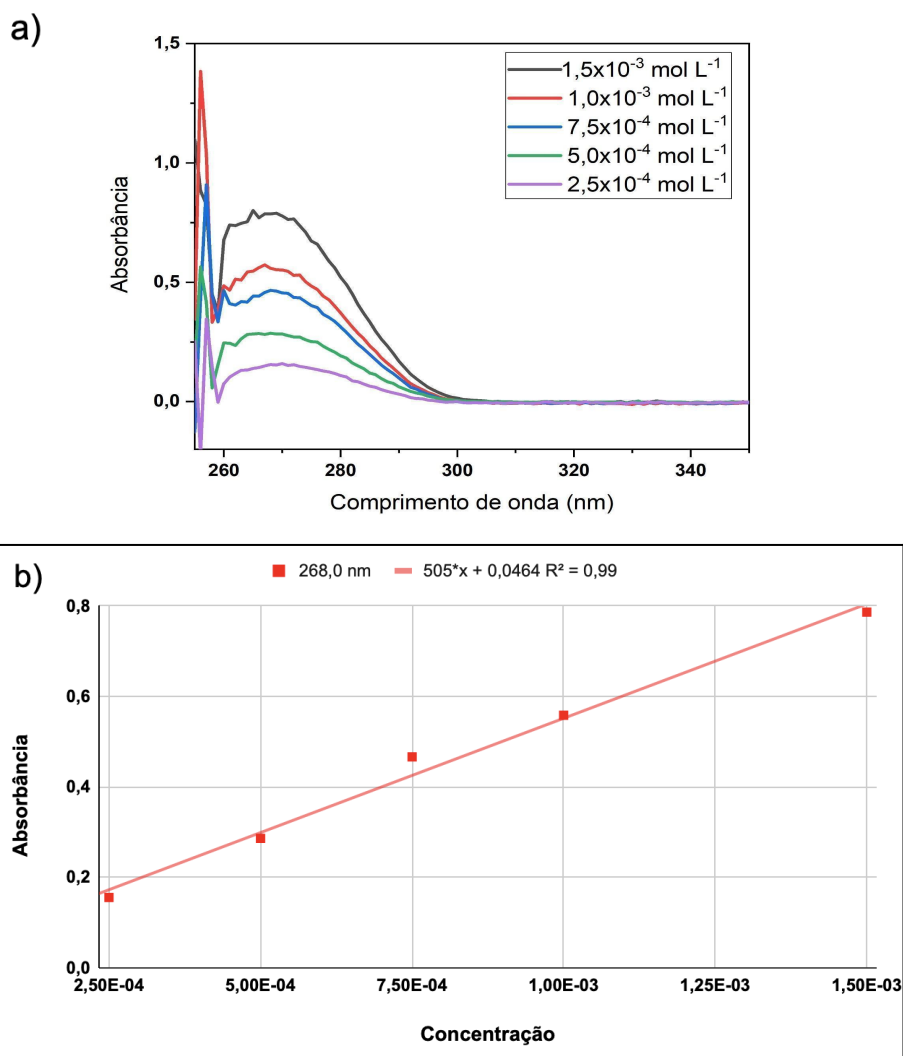
Uma das bandas de baixa intensidade é causada pela vibração axial da ligação C-S, que ocorre na frequência (700 cm^{-1} - 600 cm^{-1}). No entanto, apesar da deformação da ligação C-S não seja determinante para identificar a estrutura, com a sua ausência no espectro vibracional do TDZ-HE, é possível supor que a tioamida presente na estrutura da tiossemicarbazona foi transformada em uma amina secundária na estrutura do tiadiazol produzido (Galavotti, 2019).

Além disso, as frequências da tioamida em (1556 cm^{-1} - 152 cm^{-1}), (1282 cm^{-1} - 1033 cm^{-1}) e (829 cm^{-1} - 807 cm^{-1}) características da tiossemicarbazona de partida sumiram ou diminuíram drasticamente (Galavotti, 2019). Portanto, considerando as principais vibrações presentes no espectro que foram analisadas e confirmadas pelos presentes na literatura, tem-se que o produto formado na síntese condiz com o tiadiazol proposto.

Espectroscopia Eletrônica na região do UV-VIS

Assim como na sua TATSC-HE correspondente, o TDZ-HE também possui um R^2 muito próximo de 1, e assim, os valores estatísticos encontrados na equação da reta são próximos dos reais. Desse modo, pode-se utilizar a equação de Lambert-Beer para encontrar o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) (PAVIA et al., 2010). Dessa forma, com os dados obtidos nos experimentos, a reta de regressão é dada por ($y = 505x + 0,0464$) e ao assumir o caminho óptico como 1 cm (volume da cubeta utilizada), obtém-se que o coeficiente de absorvidade molar do tiadiazol TDZ-HE é $\epsilon=505$ ($L(cm.Mol)^{-1}$).

Figura 34: (a) Espectro de absorção na região UV-Vis para o tiadiazol TDZ-HE realizado em DMSO. (b) Curva analítica obtida para a banda principal em 268 nm.



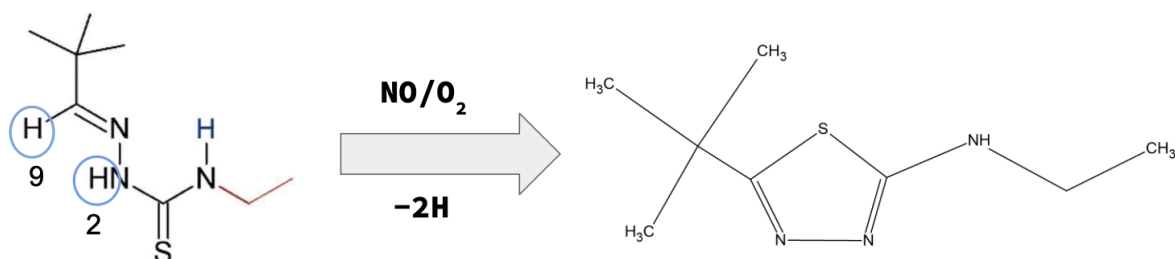
Fonte: Obra da autora.

As bandas encontradas, semelhante às tiossemicarbazonas, aparecem no mesmo intervalo já descrito para excitação de elétrons π , como transições π - π^* entre o grupo C=N (270-350 nm), (ISSA; KHEDR; RIZK, 2008) (KHEDR; MARWANI, 2012). Diferentemente de sua TATSC-HE de origem, no TDZ-HE formado, valores de absorção para tioamidas, que apresentam sistemas de absorção em torno de 190 e 230 nm, aproximadamente, não aparecem no espectro (JUDGE; D. C. MOULE; GODDARD, 1987), o que confirma que de fato houve a ciclização da TATSC-HE.

Espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN permitiram uma análise mais profunda sobre a estrutura das moléculas. Dessa forma, com o intuito de comprovar que o TDZ-HE de fato foi formado, foram realizadas análises de RMN de ^1H e ^{13}C , que segue a numeração apresentada anteriormente na Figura 25 e a estrutura final esperada está representada na reação abaixo.

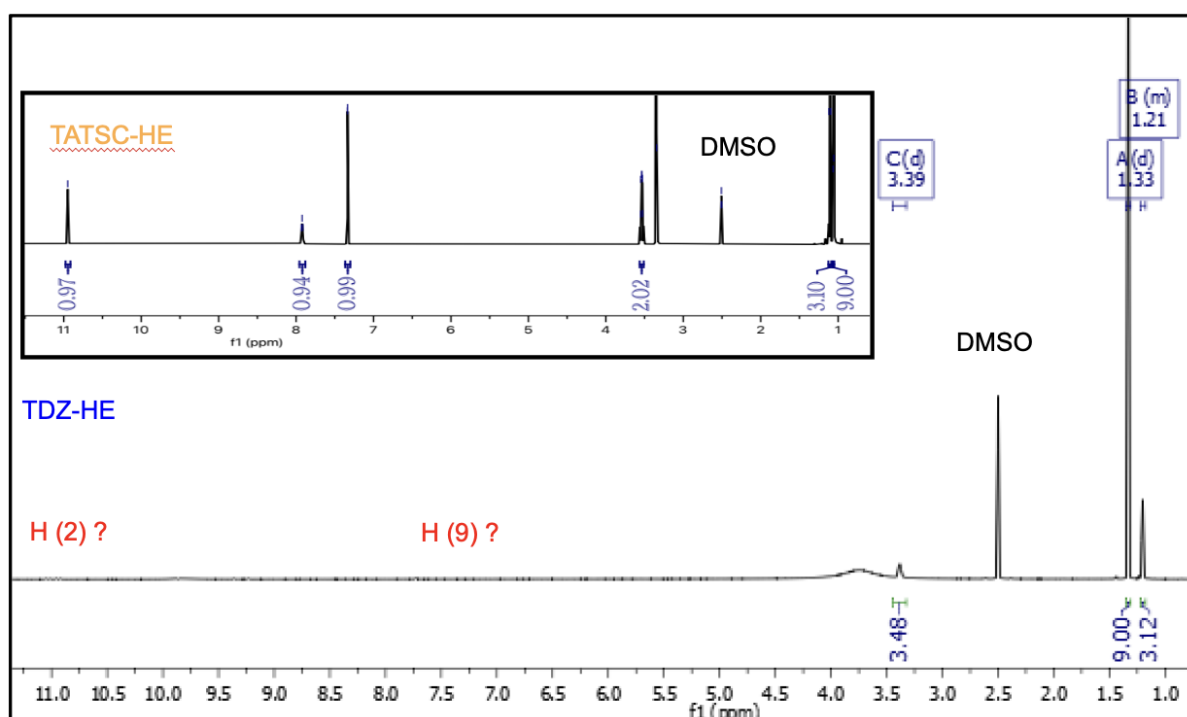
Reação proposta para obtenção do TDZ-HE esperado.



Espectro de ^1H

As integrais estão representadas logo abaixo de cada pico e apresentam valores aproximados do número de hidrogênios. Após a reação de ciclooxidação da tiossemicarbazona, é esperada a perda de dois hidrogênios da estrutura original e a formação do anel tiadiazólico. Assim, espera-se algumas mudanças na estrutura final e a perda dos sinais H (2) e H (9) foi observada no espectro da Figura 35. As mudanças estruturais e os sinais que devem deixar de aparecer estão apresentados.

Figura 35: Espectro de RMN ^1H referente ao TDZ-HE realizado em DMSO- d_6 .



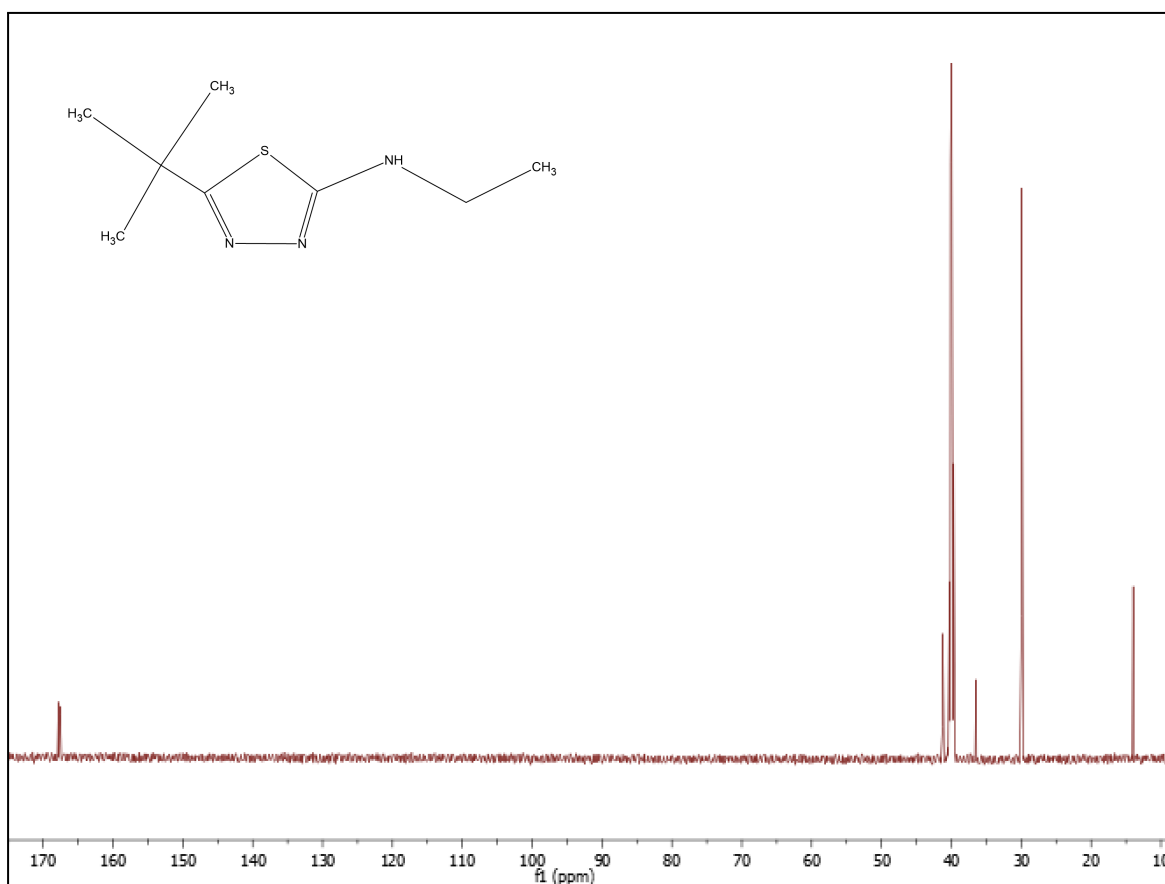
Fonte: Obra da autora.

Após a obtenção do espectro de ^1H do TDZ-HE, foi feita a comparação com os valores observados na sua TATSC-HE de origem, e dessa maneira, foi possível concluir que os sinais que deveriam desaparecer devido à ciclooxidação da tiossemicarbazona de fato não estão mais presentes, o que indica que o ciclo foi formado tiadiazol esperado de fato foi sintetizado.

Espectro de ^{13}C

O resultado proveniente do espectro de RMN ^{13}C pode ser mais um indício da formação do TDZ-HE. Os sinais esperados estão de acordo com a estrutura proposta em que destacamos dois sinais em 167,80 e 167,54 ppm referente aos carbonos ligados aos nitrogênios do anel tiadiazólico. Além disso, foram observados sinais em 41,24; 36,49; 29,95 e 13,98 ppm, que são compatíveis com a estrutura proposta (Figura 36).

Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C referente ao TDZ-HE realizado em DMSO-d₆.

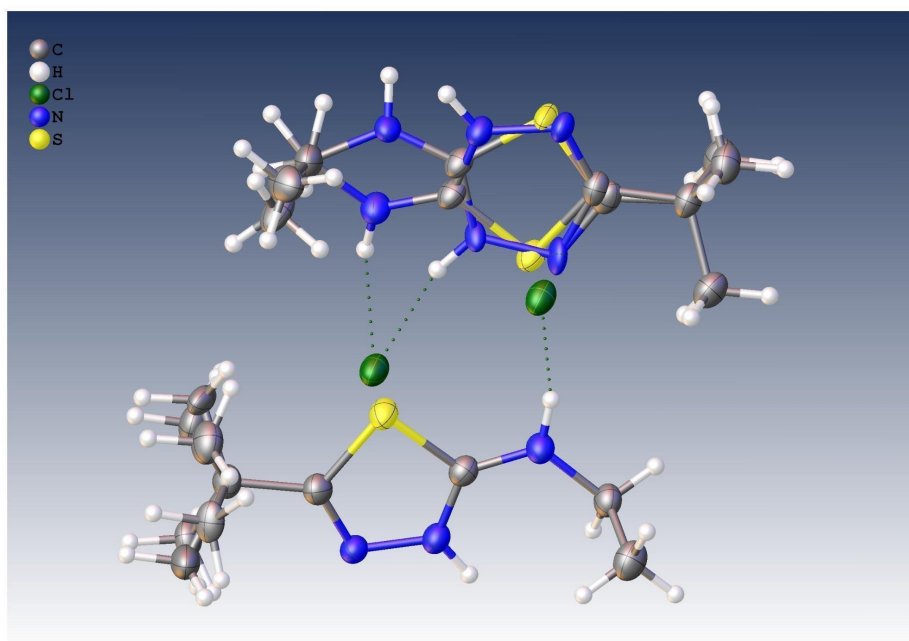


Fonte: Obra da autora.

Difração de Raio X

Por fim, além das atribuições estruturais discutidas acima, a formação do tiadiazol (TDZ-HE), proveniente da TATSC-HE, foi confirmada por meio de um estudo de raios x de monocristal (Figura 37).

Figura 37: Estrutura do composto TDZ-HE obtido por difração de raio x monocristal.



Fonte: Obra da autora.

Por meio da análise dos dados coletados de difração, foi observada a estrutura cristalina do tiadiazol TDZ-HE. Os comprimentos e ângulos de ligação da estrutura do TDZ-HE estão de acordo com o esperado. Os comprimentos de ligação S1-C5, S1-C6, N1-C5 e N2-C6 bem como o ângulo de ligação C5-N1-N2 ($109,30^\circ$), C6-N2-N1 ($116,76^\circ$) e C6-S1-C5 ($88,02^\circ$) indicam um a formação do anel tiadiazol. Os grupos C=N também são confirmados pelo caráter de ligação N1-C5 (1,288 Å) e N2-C6 (1,323 Å) (DE OLIVEIRA, et al., 2012). Os comprimentos das outras ligações também são condizentes com a estrutura proposta neste trabalho.

Tabela 7: Comprimentos de ligação em Å do composto TDZ-HE.

Átomo 1	Átomo 2	Comprimento de ligação
S1	C6	1,735
S1	C5	1,759
S1	C6	1,732
S1	C5	1,735
N1	C5	1,288
N1	N2	1,383
N1	C5	1,292
N1	N2	1,367
N3	C6	1,320
N3	C7	1,462
N2	C6	1,323

Fonte: Obra da autora.

Tabela 8: Ângulos de ligação do composto TDZ-HE.

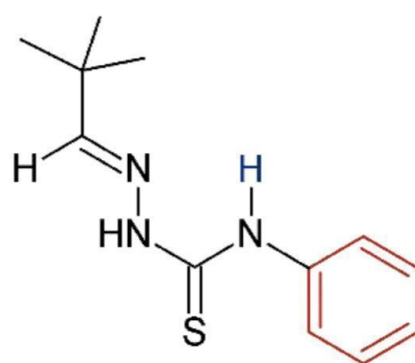
Átomo 1	Átomo 2	Átomo 3	Ângulo de ligação
C6	S1	C5	88,02
C5	N1	N2	109,30
C5	N1	N2	111,08
C6	N3	C7	122,77
C6	N2	N1	116,76
C6	N3	C7	123,81
N3	C6	N2	123,18
N2	C6	S1	110,22
C9	C4	C5	111,8
C3	C4	C1	109,51
C5	C4	C1	108,75
C3	C4	C2	109,40
C5	C4	C2	110,19

Fonte: Obra da autora.

4.2.2 Triazol

Ao realizar as sínteses das TATSCs, uma outra tiossemicarbazida também foi utilizada, com o substituinte R_2 sendo o grupo fenil. Porém, ao prosseguir com os métodos de caracterização, foi observado que no produto resultante da síntese havia uma mistura da TATSC-HPH (Figura 38) com o seu correspondente triazol. Ou seja, na síntese inicial de formação de tiossemicarbazonas, foi produzido também o triazol.

Figura 38: Estrutura molecular das tiossemicarbazona TATSC-HPH sintetizada.



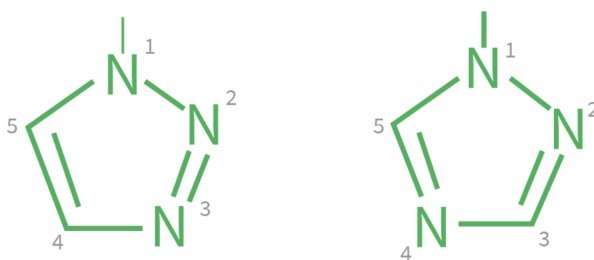
$R_1 = \text{H}$

$R_2 = \text{C}_6\text{H}_5$

Fonte: Obra da autora.

Os triazóis são de origem exclusivamente sintética e possuem um anel heteroaromático de 5 membros dentre os quais três são nitrogênios, podendo ser classificados como vicinais (1,2,3-triazóis) ou como simétricos (1,2,4-triazóis) (Figura 39) (COOLS, H. J. et al., 2012).

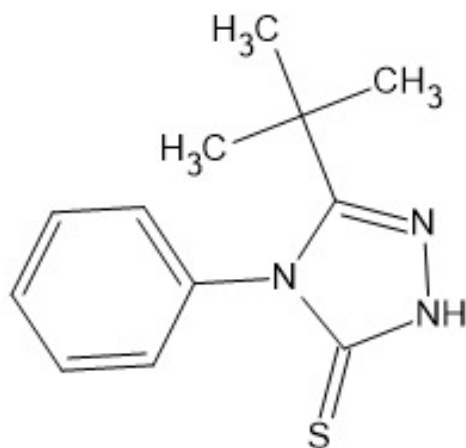
Figura 39: Representação estrutural de uma molécula de (1,2,3-triazol) e (1,2,4-triazol), respectivamente.



Fonte: COOLS, H. J. et al., 2012.

O triazol formado a partir da TATSC-HPh apresenta a conformação 1,2,4-triazol e sua fórmula estrutural está presente na Figura 40.

Figura 40: Fórmula estrutural do 1,2,4-triazol obtido a partir de sua respectiva tiossemicarbazona.

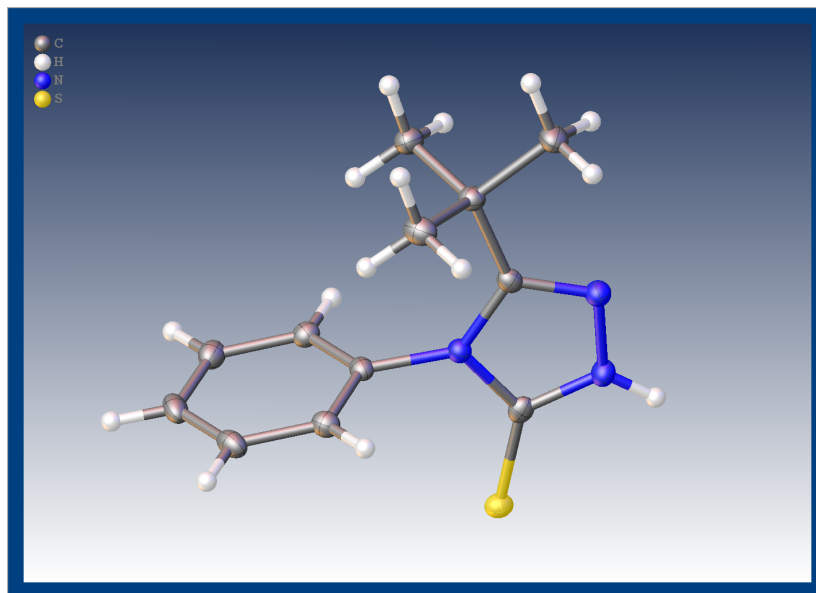


Fonte: Obra da autora.

Difração de Raio X

A partir da difração de raio x do monocristal do composto, é possível observar que o triazol correspondente da TATSC-HPh de partida de fato foi obtido (Figura 41).

Figura 41: Estrutura do composto de triazol obtido por difração de raio X monocristal.



Fonte: Obra da autora.

Por meio da análise dos dados coletados de difração, foi observada a estrutura cristalina do triazol derivado da TATSC-HPh. Os comprimentos e ângulos de ligação da estrutura do triazol estão de acordo com o esperado. Os comprimentos de ligação N3-C5, N3-C6, N1-C6 e N2-C5 bem como o ângulo de ligação C6-N3-C5 ($107,49^\circ$), C5-N1-N2 ($104,57^\circ$) e C6-N2-N1 ($113,49^\circ$) indicam a formação do anel triazol (DE OLIVEIRA, et al., 2012). O grupo C=N é confirmado pelo caráter de ligação N1-C5 ($1,305 \text{ \AA}$). O grupo C=S também é confirmado pelo comprimento da ligação S1-C6 ($1,688 \text{ \AA}$) compatível com as tionas. Os comprimentos das outras ligações também são condizentes com a estrutura proposta neste trabalho (DE OLIVEIRA, et al., 2012).

Tabela 19: Comprimentos de ligação em Å do triazol derivado da TATSC-HPh.

Átomo 1	Átomo 2	Comprimento de ligação
S1	C6	1,688
N3	C6	1,376
N3	N5	1,391
N3	C7	1,444
N2	C6	1,333
N2	N1	1,372
N1	C5	1,305

Fonte: Obra da autora.

Tabela 10: Ângulos de ligação do triazol derivado da TATSC-HPh.

Átomo 1	Átomo 2	Átomo 3	Ângulo de ligação
C6	N3	C5	107,49
C6	N3	C7	122,44
C5	N3	C7	129,98
C6	N2	N1	113,49
C5	N1	N2	104,57
C8	C7	N3	119,82
N2	C6	N3	118,84
N2	C6	S1	127,64
N3	C6	S1	128,35
C7	C12	C11	118,87
C8	C9	C10	119,87

Fonte: Obra da autora.

4.3 Ensaios de Citotoxicidade

As tiossemicarbazonas foram submetidas a ensaios biológicos frente às linhagens tumorais MCF-10A (não tumoral de mama), MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano), MRC-5 (não tumoral de pulmão) e A549 (tumoral fibroblasto pulmonar). Os valores são dados pela medida de IC_{50} , que é a concentração necessária daquela substância para induzir a morte de 50% da população estudada, no caso, células do câncer de mama e pulmão (FUCHS, 2010).

Tabela 11: Concentração (μM) necessária para reduzir em 50% (IC_{50}) a atividade inibitória dos compostos frente a linhagens tumorais.

Linhagens	IC_{50} (μM)			
	MCF-10A	MCF-7	MRC-5	A549
TATSC-HE	106,48 $\pm$ 8,83	>200	68,55 $\pm$ 0,89	>200
TDZ-HE	52,13 $\pm$ 1,36	111,48 $\pm$ 8,57	>200	115,14 $\pm$ 5,62

Fonte: Obra da autora.

De acordo com a Tabela 11, é possível observar que a TATSC-HE não pôde ter seus resultados calculados com precisão frente às células tumorais, pois em nenhum dos casos esse composto atingiu 50% de atividade inibitória, já que seria necessária uma concentração superior a 200 μM . O que não acontece com o tiadiazol TDZ-HE, que em ambos os casos, atingiu 50% de atividade em 111,48 μM e 115,14 μM , sendo consideravelmente menor do que o seu composto de origem. Desse modo, conclui-se que o TDZ-HE apresentou uma atividade citotóxica mais satisfatória em comparação com a TATSC-HE.

Segundo nossa hipótese, o processo ciclooxygenação poderia inibir a ação de tiossemicarbazonas tais como a triapina. Isto acontece pois a ação da triapina tem relação com uma mecanismo de inibição da ribonucleotídeo difosfato redutase (RDR), enzima responsável pela manutenção da síntese do DNA. Esta ação ocorre devido ao efeito quelante da triapina no centro de ferro da enzima supracitada. Portanto, por óbvio, a ciclização de uma tiossemicarbazona diminui seu poder quelante em centros metálicos e por consequência, sua atividade anticâncer.

Neste trabalho, era esperado que o tiadiazol tivesse efeito anticâncer menor que a sua TATSC-HE ou nenhum efeito. Porém, foi observado que após a ciclização o efeito anticâncer aumentou. É possível supor que isso ocorre, pois provavelmente o mecanismo de ação desta TATSC-HE específica não ocorreria por meio da inibição da enzima RDR. Assim, é plausível concluir que o mecanismo principal de ação dessa TATSC-HE seja diferente da clássica triapina. Portanto, acredita-se que seria necessário um estudo mais aprofundado para a determinação do mecanismo de ação da TATSC e do TDZ estudados.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

As tiossemicarbazonas, por apresentarem sínteses relativamente simples, com metodologias bem estabelecidas, não apresentaram grandes desafios na sua obtenção, de modo que as técnicas de caracterização empregadas para tais compostos corroboraram para as estruturas planejadas. Desse modo, foi possível a obtenção de duas novas tiossemicarbazonas devidamente caracterizadas.

A proposta empregada na ciclização de tiossemicarbazonas apresentou sucesso, uma vez que, a formação do ciclo foi evidenciada. A formação do tiadiazol foi provada a partir das técnicas de caracterização empregadas, em especial a difração de raio X, com a qual foi possível confirmar que o tiadiazol obtido foi de fato o esperado e proposto neste trabalho. O mecanismo de reação da síntese desse tiadiazol ainda precisa ser estudado, assim como o papel desenvolvido pelo NO. No entanto, esse processo parece depender, de fato, da natureza do composto de partida em relação aos substituintes ligados ao nitrogênio da tioamida, como já descrito na literatura e comprovado nas caracterizações apresentadas.

Da mesma forma que o tiadiazol, o triazol formado também pôde ter sua estrutura confirmada a partir da difração de raio X, e abre margem para um estudo mais aprofundado de suas propriedades. Apesar de não ter sido o foco principal do trabalho, também se mostra válido o estudo da sua estrutura e propriedades para que futuramente sejam obtidas mais informações acerca desse composto e da sua síntese, que foi feita a partir de uma tiossemicarbazona.

Por fim, a partir dos ensaios biológicos, pôde-se concluir que possivelmente o mecanismo das tiossemicarbazonas utilizadas não é o mesmo do descrito na literatura, visto que seu tiadiazol apresentou uma resposta citotóxica mais eficiente. Dessa forma, para pesquisas futuras, é pertinente um aprofundamento maior a respeito do mecanismo de ação desses compostos e no que eles se diferem dos já estudados, tendo em vista que a síntese utilizada foi a mesma que em outros trabalhos já relatados.

Assim, como pareceres finais, pode-se dizer que o trabalho teve êxito no que diz respeito à síntese e caracterização dos compostos esperados, assim como do seu tiadiazol. Todas as estruturas obtidas foram devidamente caracterizadas e confirmadas a partir dos resultados obtidos. No entanto, faz-se necessário a

realização de outros testes biológicos visando um entendimento mais aprofundado a respeito de como esses compostos se ligam às células tumorais e possivelmente propor uma hipótese do seu mecanismo e propriedade citotóxica.

6. REFERÊNCIAS

ABOU-MELHA, K. S.; FARUK, H. Bimetallic complexes of schiff base bis-[4-hydroxycoumarin-3-yl]-1N,5N-thiocarbohydrazone as a potentially dibasic pentadentate ligand. Synthesis, spectral, and antimicrobial properties. **Journal of the Iranian Chemical Society**, Vol. 5, No1, p. 122–134, 2008.

Alves, P.B.V., M. M., Reação da Cânfora com Boroidreto de Sódio: Uma Estratégia para o Estudo da Estereoquímica da Reação de Redução. **Química Nova**, 2010. 33(10): p. 2274-2278.

A.K.Nandi, S. Chudhuri, S.K. Mazumda, S. Ghosh, J. **Chem. Soc.**, Perkin Trans. |/ 1729 (1964).

André Augusto Pimentel Liesen Nascimento substituted-1,3,4-thiadiazoles. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 1983-1985, 2005.

ANG, W. H.; et al. Rational design of platinum (IV) compounds to overcome glutathione-S-transferase mediated drug resistance. **Journal American Chemical Society**, v. 127, p. 1382-1383, 2005.

BERALDO, H. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Quim. Nova**, Vol. 27, N°. 3, p. 461-471, 2004.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbozones and their metal complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Vol. 4, No 1, p. 31-39, 2004.

BELK, C., MAIER, V. B. **Biology Science for Life with Physiology**. 5th ed. Illinois: Pearson, 2015.

Borges, R.H., Paniago, U. E., Beraldo, H. Equilibrium and kinetic studies of iron(II) and iron(III) complexes of some alphaN)-heterocyclic thiosemicarbazones. Reduction of the iron(III) complexes of 2-formylpyridinethiosemicarbazone and 2-acetylpyridine

thiosemicarbazone by cellular thiol-like reducing agents. **J Inorg Biochem**, 1997. 65(4): p. 267-275.

BROCKMAN, W. R. et al. Observations on the Antileukemic Activity of pyridine-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone and Thiocarnohydrazone. **Cancer Res.** N° 16 p.167-170, 1956.

CAIRES, A. C. F. et al. Síntese e atividade citotóxica de alguns azido-ciclopaladados estabilizados com ligantes bifosfínicos. **Química Nova**, v. 22, No 3, p. 329–334, 1999.

CARVALHO, S. A.; SILVA, E. F.; SANTA-RITA, R. M.; CASTRO, S. L.; FRAGA, C. A. M. Synthesis and antitrypanosomal profile of new functionalized 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazones derivatives, designed as non-mutagenic megazol analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 5967–5970, 2004.

CERQUEIRA, N. M. F. S. A.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Ribonucleotide Reductase: a Critical Enzyme for Cancer Chemotherapy and Antiviral Agents. **Recent Patents on Anti- Cancer Drug Discovery**, v. 2, p.11-29, 2007.

Cools HJ, Bayon C, Atkins S, Lucas JA, Fraaije BA, Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. **Pest Manag Sci** 68:1034–1040 (2012).

D. C. Reis, M. C. X. Pinto, E. M. Souza-Fagundes, S. M. S. V. Wardell, J. L. Wardell, H. Beraldo, **Europ. J. Med. Chem.** 45 (2010) 3904-3910.

De Oliveira, A.B., et al. 2-(1,2,3,4-Tetra-hydro-naphthalen-1-yl-idene)hydrazinecarbothio-amide. **Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online**, 2012. 68(Pt 8): p. 02581.

DOMAGK, G. Investigations on the antituberculous activity of the thiosemicarbazones in vitro and in vivo. **Am Rev Tuberc.** No 61(1), p. 8–19, 1950.

D. X. West, S. Padhye, P. B. Sonawane, **Structure and Bonding** 76 (1991) 127.

Finch, R. A., Liu, M. C., Cory, A. H., Cory, J. G., & Sartorelli, A. C. (1999). Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone; 3-AP): An inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. **Advances in Enzyme Regulation**, 39(1), 3-12.

FOROUMADI, A.; EMAMI, S.; HASSANZADEH, A.; RAJAEI, M.; SOKHANVAR, K.; MOSHAFI, M. H.; SHAFIEI, A. Synthesis and antimycobacterial activity of some alkyl[5-(nitroaryl)-1,3,4-thiadiazol-2-ylthio]propionates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 1164- 1167, 2006.

FRENCH, F. A. Carcinostatic Action of Polycarbonyl Compounds and Their Derivatives IV. Glyoxal Bis (thiosemicarbazone) and Derivatives. **American Journal of Cancer**. Vol. 18, No 1, p. 1290-1300, 1958. FUCHS, F. D. Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional - 4a Ed. 2010.

GADAD, A. K.; MAHAJANSHETTI, C. S.; NIMBALKAR, S.; RAICHURKAR, A. Synthesis and antibacterial activity of some 5-guanylhydrazono/thiocyanato-6-arylimidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 53-857, 2000.

GADAD, A. K.; NOOLVI, M. N.; KARPOORMATH, R. V. Synthesis and anti-tubercular activity of a series of 2-sulfonamido/trifluoromethyl-6-substituted imidazol-[2,1-b]-1,3,4-thiadiazole derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 5651-5659, 2004.

GALAVOTTI, J. S. O. **Síntese, caracterização e avaliação de atividades biológicas de tiossemicarbazonas e semicarbazonas vanílicas e seus derivados de dinitrosilos de ferro**. Araraquara: [s.n.], 2019 108 f.: il.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY - GCO. **Cancer Today**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso: 03 janeiro 2024.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY - GCO. **Cancer Tomorrow**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>. Acesso: 03 janeiro 2024.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of Cancer: The next generation**. *Cell*, n. 144, 2011.

FINCH, R. A.; LIU, M. C. et al. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehydethiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. **Adv. Biochem Pharmacol.**, v.59, p. 983-91, 2000.

HANAHAN, D., WEINBERG R. A. **Biologic Hallmarks of Cancer**. p. 3-7, 2017.

HARRIS, C. C., HOLLSTEIN, M. Clinical Implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene. **The New England Journal of Medicine**, 1993.

HOVSEPIAN, T. R.; DILANIAN, E. R.; ENGOYAN, A. P.; MELIK-OHANJANIAN, R. G. Synthesis of substituted 1,2,4-triazoles and 1,3,4-thiadiazoles. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 40, p. 1194-1198, 2004.

J. S. Casas, A. Castiñeiras, M. C. Rodríguez-Argüelles, A. Sánchez, J. Sordo, A. Vázquez-López, E. Vázquez-López, **J. Chem. Soc., Dalton Trans.** (2000) 2267–2272.

JEMAL, A., et al. The Cancer Atlas. 2nd ed. **American Cancer Society**, p.14, 2014.

KADI, A. A.; EL-BROLLOS, N. R.; AL-DEEB, O. A.; HABIB, E. E., IBRAHIM, T. M.; EL-EMAM, A. A. Synthesis, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of novel 2-(1-adamantyl)-5-substituted-1,3,4-oxadiazoles and 2-(1-adamantylamino)-5-substituted-1,3,4-thiadiazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 235-242, 2007.

KARABASANAGOUDA, T.; ADHIKARI, A.V., SHETTY, N. S. Synthesis and antimicrobial activities of some novel 1,2,4-triazolo [3,4-b]-1,3,4 thiadiazoles and

1,2,4-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazines carrying thioalkyl and sulphonyl phenoxy moieties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2006, no prelo.

KARAVASILIS, V. et al. Cancer drug resistance. **Teicher**, Beverly A, p. 405-423, 2008.

KASHYAP, S. J.; GARG, V. K.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N.; DUDHE, R.; GUPTA, J. K. **Thiazoles: having diverse biological activities. Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 8, p. 2123–2132, 2012.

KIDWAI, M.; BHUSHAN, K. R.; KUMAR, P.; KUMAR, R. Synthesis of novel fungicidal organomercurials using microwaves. **Monatshefte für Chemie**, v. 128, p. 1291-1295, 1997.

LOPES, S. **BIO: Introdução a Biologia e Origem da Vida**. 1o ed. - São Paulo: Saraiva, p. 606, 2004.

NDAGI, U., et al. Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 599-616, 2018.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer Treatment**. Disponível em <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatments>. Acesso em 04 janeiro 2024.

PELIVAN, Karla et al., Understanding the metabolism of the anticancer drug Triapine: electrochemical oxidation, microsomal incubation and in vivo analysis using LC-HRMS. *Analyst*, 2017, 142, 3165, **Royal Society Of Chemistry**, 2017.

R. Alonso, E. Bermejo, R. Carballo, A. Castineiras, T. Pérez, J. **Mol. Struc.** 606 (2002) 155-173.

ROSEMBERG, B. et al. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, p. 385-386, 1969.

SHAHEEN, F.; et al. In vitro assessment of cytotoxicity, anti-inflammatory, antifungal properties and crystal structures of metallacyclic palladium(II) complexes.

Journal of Organometallic Chemistry, v. 695, p. 315-322, 2010.

Shao, J. et al. A Ferrous-triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. **Molecular Cancer Therapeutics**, 2006. 5(3): p. 586 - 592.

PARHAM, P. **O Sistema Imune**. 3a ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. v. 1

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy**. 5. ed. Stamford: Cengage Learning, 2015.

PEREIRA, J. C. M.; GODOY, A. V.; ZANETTI, R. D.; COSTA, M.A.M.; SARTI, A. **Processo de síntese de tiadiazóis**. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro:BR1020190066075, título: "Processo de síntese de tiadiazóis", Instituição de registro: INPI -Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 01/04/2019.

PIEROTTI et al., Oncogenes in: BAST, R. C. et al. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 9nd ed.Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2017. chap. 4, p. 2.

Popovic-Bijelic, A., et al. Ribonucleotide reductase inhibition by metal complexes of Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone): A combined experimental and theoretical study. **J Inorg Biochem**, 2011. 105(11): p. 1422-1431.

Richardson, D.R. Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, 2002. 42(3): p. 267-281.

SHAHEEN, F.; et al. In vitro assessment of cytotoxicity, anti-inflammatory, antifungal properties and crystal structures of metallacyclic palladium(II) complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 695, p. 315-322, 2010.

SIDDIQUI, N.; ARYA, S. K.; AHSAN, W.; AZAD, B. Diverse biological activities of thiazoles: a retrospect. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 3, n. 4, p. 156–164, 2011.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. In: **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 2007. p. 490-490.

S. Padhye, R. Chikate, A. Kumbhar, **Biometals** 5 (1992) 67.

TALATH, S.; GADAD, A. K. Synthesis, antibacterial and antitubercular activities of some 7-[4-(5-amino-[1,3,4]thiadiazole-2-sulfonyl)-piperazin-1-yl] fluoroquinolonic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 918-924, 2006.

TENÓRIO, R. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, Vol. 28, Nº 6, p.1-17, 2005.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, J. S. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicação sintética e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

Vilhena, F.S.D.S., **Complexos metálicos de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas: estudos em solução, no estado sólido e atividade citotóxica**, in Departamento de Química, 2008, Pontifícia Faculdade Católica do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro. p. 82.

WANG, Z.; YOU, T.; XU, Y. Synthesis and Biological Activities of 2-Substituted-5-(b-Pyridyl)-2,3-dihydro-1,2,4-triazolo[3.4-b]-1,3,4-thiadiazoles. **Molecules**, v. 1, p. 68-71, 1996.

WILES, D. M. et al. C=S Stretching Vibration in Infrared Spectra of some Thiosemicarbazones. **Canadian Journal of Chemistry**, v.45, p. 2258-2261, 1967.

ZANETTI, R. D. **Dinitrosilos de ferro contendo tiadiazol ou tiossemicarbazona derivada do cinamaldeído: síntese, caracterização e avaliação da atividade contra câncer**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, UNESP, Araraquara.