
 <p>UFAL</p>	<p>Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia</p> <p><i>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia</i></p>	 <p>IQB</p>
---	---	--

**Síntese e Avaliação Citotóxica de Derivados
Aminoguanidínicos Planejados como Protótipos de Fármacos
Antineoplásicos**

Willians Antonio do Nascimento Epifânio

Maceió-AL
Abril de 2011

WILLIANS ANTONIO DO NASCIMENTO EPIFÂNIO

**Síntese e Avaliação Citotóxica de Derivados
Aminoguanidínicos Planejados como Protótipos de Fármacos
Antineoplásicos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de Mestre em Química e Biotecnologia.

Orientador:
Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior.

Maceió - Alagoas

Abril de 2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- E64s Epifânio, Willians Antonio do Nascimento.
Síntese e avaliação citotóxica de derivados aminoguanidínicos planejados como protótipos de fármacos antineoplásticos / Willians Antonio do Nascimento Epifânio. – 2016.
118 f. : il., grafs., tabs.
- Orientadora: João Xavier de Araújo Júnior.
Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.
- Bibliografia: f. 77-82.
Apêndice: f. 83-118.
1. Câncer. 2. Antineoplásticos. 2. Guanilhidrazonas. 3. Guanidina. 4. Tiossemicarbazonas. 5. Citotoxicidade. 6. Bioisosterismo. I. Título.

CDU: 542.913



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384
email: cpgqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Willians Antonio do Nascimento Epifânio**, intitulada: **“Síntese e Avaliação Citotóxica de Derivados Aminoguanidínicos Planejados como protótipos de Fármacos Antineoplásicos”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 29 de abril de 2011, às 8h, na Sala de aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Orientador - PPGQB/ESENFAR/UFAL

Prof. Dr. Johannatan Duarte de Freitas
IFAL

Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti
PPGQB/IQB/UFAL

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Antônio Josenildo Epifânio e Maria José
do Nascimento Epifânio, pelo amor e
incentivo nos estudos.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. João Xavier da Araújo Júnior** pela orientação e pelos valiosos ensinamentos;

Ao **Prof. Dr. Antônio Euzébio G. Sant'ana** pelo apoio no laboratório;

À **Prof^a. Dr^a. Lídia Moreira Lima**, do Laboratório de avaliação e síntese de substâncias bioativas (LassBio - UFRJ), por colaborar no desenrolar deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro**, do Laboratório de avaliação e síntese de substâncias bioativas (LassBio - UFRJ), pelas valiosas sugestões;

À **Martine Schmitt e Hassan Hammoud**, da Faculdade de Farmácia da Université Louis-Pasteur de Strasbourg, pelo apoio ao projeto.

Ao **Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais** pelo acolhimento;

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa Mestrado.

Ao **Instituto do Milênio - Inovação de Fármacos e Medicamentos (IM-INOVAR)**;

À **Prof^a. Dr^a. Dra Cláudia Pessoa**, ao **Prof. Dr. Manoel Odorico**, à **Prof^a. Dr^a. Letícia Veras**, aos pós-graduandos **Assuero Silva Meira** e **Danilo Damasceno**, e a todos os membros do Laboratório de Oncologia Experimental, da Universidade Federal do Ceará, pelos ensaios farmacológicos;

Ao **Prof. Dr. Edson de Souza Bento** e a todos os membros do laboratório de RMN do IQB/UFAL pelos espectros de RMN a 400 e 100 MHz;

À **Silvany Barros** - meu amor - pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos;

Às minhas irmãs **Jackeline** e **Jaciane** pelo companheirismo;

À **Camila Calado** e **Theolyta Araújo** pela amizade e bom humor nos momentos de estudo;

Aos amigos de pós-graduação: **Mariane, Pedro e Daniel** pelo apoio;

Ao técnico **Aldy dos Santos** por sempre ajudar a solucionar problemas difíceis;

À **Dona Margarida** (Margô) pelo carinho e ajuda no dia-a-dia do laboratório;

Aos **funcionários** do departamento de Química;

A todos os **professores** do IQB/UFAL, pela valiosa contribuição na minha formação acadêmica;

Enfim, a todos que contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

O câncer é considerado um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Estima-se que em 2020 o número de novos casos será em torno de 15 milhões. Nas últimas décadas, a necessidade do desenvolvimento de novos antineoplásicos tem se tornado cada vez mais evidente. Nesta direção, este trabalho objetivou a síntese e avaliação da atividade antineoplásica de derivados guanilhidrazonas e tiossemicarbazonas. A literatura reporta várias atividades biológicas para estas substâncias, inclusive antineoplásica. Partindo-se da aminoguanidina e de aldeídos aromáticos foram sintetizados, através de aquecimento sob refluxo em etanol, vinte guanilhidrazonas, com rendimentos entre 71% e 95%, que foram testadas quanto a sua atividade citotóxica frente a linhagens celulares tumorais (HCT-8, MDA-MB435, SF-295 e HL-60). Destas, quatro substâncias: 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzaldeídoguanilhidrazona, 4-Bifenilcarboxialdeídoguanilhidrazona, 3,4-Diclorobenzaldeídoguanilhidrazona e 2-Bifenilcarboxialdeídoguanilhidrazona (**10**, **14**, **17** e **19**; respectivamente) apresentaram elevada atividade citotóxica com percentuais de inibição do crescimento celular entre 92% e 100%; além de CI_{50} abaixo de 4 μ g/mL. Entretanto, a avaliação frente a linfócitos humanos demonstrou que estas substâncias (**10**, **14**, **17** e **19**) não são seletivas, apresentando frente a estas células um perfil de citotoxicidade semelhante ao apresentado nas células cancerígenas. Desta forma, com o intuito de elevar a seletividade foram realizadas modificações estruturais que levaram a obtenção das tiossemicarbazonas: 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzaldeídotiossemicarbazona, 4-Bifenilcarboxialdeídotiossemicarbazona, 3,4-Diclorobenzaldeídotiossemicarbazona e 2-Bifenilcarboxialdeídotiossemicarbazona (**10a**, **14a**, **17a** e **19a**; respectivamente), com rendimentos compreendidos entre 92% e 100%, que foram obtidas a partir da condensação dos mesmos aldeídos utilizados para os protótipos mais ativos (**10**, **14**, **17** e **19**) com a tiossemicarbazida. Estas últimas substâncias apresentaram pouca atividade citotóxica frente a células cancerígenas, o que evidencia a importância da região da guanidina como um farmacóforo importante para a atividade antineoplásica.

Palavras-chave: guanilhidrazonas, guanidina, tiossemicarbazonas, citotoxicidade, bioisosterismo.

ABSTRACT

Cancer is considered a serious public health problem worldwide. It is estimated that by 2020 the number of new cases will be around 15 million. In recent decades, the need for development of new anticancer drugs has become increasingly evident. In this direction, this paper aims at the synthesis and evaluation of anticancer activity of thiosemicarbazones and derivatives guanylhydrazones. The literature reports many biological activities for these substances, including anticancer. Based on the aminoguanidine and aromatic aldehydes were synthesized by heating under reflux in ethanol, twenty guanylhydrazones, with yields between 71 - 95%, which were tested for their cytotoxic activity against tumor cell lines (HCT-8, MDA-MB435, SF-295 and HL-60). Of these, four: 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehydeguanlylhydrazone, 4-Biphenylcarbaldehydeguanlylhydrazone, 3,4-Dichlorobenzaldehydeguanlylhydrazone e 2- Biphenylcarbaldehydeguanlylhydrazone (**10**, **14**, **17** e **19**; respectively) showed high cytotoxic activity with percentage inhibition of cell growth between 92% to 100%, well below the IC₅₀ 4µg/mL. However, the evaluation against the human lymphocytes showed that these substances (**10**, **14**, **17** and **19**) are not selective, presenting the face of these cells a profile similar to that displayed cytotoxicity against cancer cells. Thus, in order to increase the selectivity were carried out structural changes that led to the formation of thiosemicarbazones: 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehydethiosemicarbazone, 4-Biphenylcarbaldehydethiosemicarbazone, 3,4-Dichlorobenzaldehydethiosemicarbazone e 2-Biphenylcarbaldehydethiosemicarbazone (**10a**, **14a**, **17a** e **19a**; respectively), with yields ranging from 92% to 100%, which were obtained from the condensation of these aldehydes prototypes for the most active (**10**, **14**, **17** and **19**) with thiosemicarbazide. The latter substances exhibited little cytotoxic activity against cancer cells, highlighting the importance of the guanidine region as a important pharmacophore for anticancer activity.

Keywords: guanylhydrazones, guanidine, thiosemicarbazones, cytotoxicity, bioisosterism.

Lista de Esquemas

Esquema 1. Análise retrossintética de tiossemicarbazonas.	25
Esquema 2. Arranjo estrutural, comprimentos de ligação e formas tautoméricas das tiossemicarbazonas.	26
Esquema 3. Retrossíntese do esqueleto base das guanilhidrazonas e das tiossemicarbazonas.	33
Esquema 4. Planejamento da síntese das guanilhidrazonas e tiossemicarbazonas.	34
Esquema 5. Esquema geral da síntese das vinte guanilhidrazonas.	35
Esquema 6. Mecanismo proposto para a síntese das guanilhidrazonas.	36
Esquema 7. Esquema geral da síntese das quatro tiossemicarbazonas.	49
Esquema 8. Síntese do derivado SCH ₃ e perspectiva de obtenção dos derivados amínicos.	54

Lista de Figuras

Figura 1. Representação espacial das taxas brutas de mortalidade por todas as neoplasias, por 100.000 homens, nas unidades da federação, de 2000 a 2007.	21
Figura 2. Representação espacial das taxas brutas de mortalidade por todas as neoplasias, por 100.000 mulheres, nas unidades da federação, de 2000 a 2007.	21
Figura 3. Estruturas de algumas guanilhidrazonas de importância biológica.	23
Figura 4. Estruturas de algumas tiossemicarbazonas de importância biológica.	24
Figura 5. Regra de Grimm para o hidreto.	27
Figura 6. As quatro guanilhidrazonas que apresentaram maior citotoxicidade <i>in vitro</i> em células tumorais.	46
Figura 7. As quatro tiossemicarbazonas sintetizadas e avaliadas quanto à citotoxicidade <i>in vitro</i> em células tumorais.	52

Lista de Quadros

Quadro 1. Características das neoplasias benignas e malignas.	19
Quadro 2. Grupos e átomos bioisósteros clássicos.	28
Quadro 3. Exemplos de modificações bioisotéricas não-clássicas.	29

Lista de Tabelas

Tabela 1. Rendimentos e tempos reacionais da síntese das guanilhidrazonas.	37
Tabela 2. Dados de RMN ¹ H das guanilhidrazonas.	40
Tabela 3. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das guanilhidrazonas em três linhagens tumorais testadas na dose de 5 µg/mL.	43
Tabela 4. Valores de CI ₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) em quatro linhagens tumorais. Os valores são apresentados em µg/mL.	46
Tabela 5. Valores de CI ₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) em linfócitos humanos. Os valores são apresentados em µg/mL.	46
Tabela 6. Rendimentos e tempos reacionais da síntese das tiossemicarbazonas.	50
Tabela 7. Dados de RMN ¹ H das tiossemicarbazonas.	51
Tabela 8. Percentual de inibição do crescimento celular (CI%) das tiossemicarbazonas em três linhagens tumorais testadas na dose de 5 µg/mL.	52

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

AcOEt	Acetato de Etila
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Log P	Coefficiente de partição
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
NCI	National Cancer Institute
ONU	Organização das Nações Unidas
WHO	World Health Organization
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
s	Singleto
d	Dupleto
dl	Dupleto largo
dd	Duplo dupleto
t	Tripleto
m	Multipleto
δ	Deslocamento químico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
HCT-8	Linhagem celular tumoral de cólon
MDA-MB435	Linhagem celular tumoral de melanoma
SF-295	Linhagem celular tumoral de glioblastoma
HL-60	Linhagem celular tumoral de leucemia promielocítica
SA	Substância sem atividade;
PA	Substância com pouca atividade (inibição de crescimento celular entre 1 e 50%
pKa	Constante de dissociação

Mo	Substância com atividade moderada (inibição de crescimento celular entre 50 e 75%)
MA	Substância com muita atividade (inibição de crescimento entre 75 e 100%)
DOX	Doxorrubicina

Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Esquemas	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Quadros	xi
Lista de Tabela	xii
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas	xiii
1. Introdução	15
2. Revisão da Literatura	17
2.1 Câncer	17
2.2 As Guanilhidrazonas e as Tiossemicarbazonas	22
2.3 Estratégias de modificação molecular	26
3. Objetivos	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos	31
4. Resultados e Discussão	33
4.1 Obtenção das Guanilhidrazonas	34
4.2 Avaliação farmacológica das guanilhidrazona	42
4.3 Obtenção das tiossemicarbazonas	48
4.4 Avaliação farmacológica das tiossemicarbazonas	51
5. Conclusões e Perspectivas	56
6. Experimental	58
6.1 Especificações dos materiais e equipamentos	58
6.1.1 Obtenção do Indol-3-carboxialdeídoguanilhidrazona	59
6.1.2 Obtenção da 4-Clorobenzaldeídoguanilhidrazona	59
6.1.3 Obtenção da 4-Formilbenzonitrilaguanilhidrazona	60
6.1.4 Obtenção da 3-Hidroxi-4-metoxibenzaldeídoguanilhidrazona	61
6.1.5 Obtenção da 3,4-Dimetoxibenzaldeídoguanilhidrazona	61

6.1.6 Obtenção da 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeídoguanilhidrazona	62
6.1.7 Obtenção da 4-Hidroxibenzaldeídoguanilhidrazona	62
6.1.8 Obtenção da 4-Bromobenzaldeídoguanilhidrazona	63
6.1.9 Obtenção da Piperonalguanilhidrazona	63
6.1.10 Obtenção da 3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxibenzaldeídoguanilhidrazona	64
6.1.11 Obtenção da 4-Carboxibenzaldeídoguanilhidrazona	64
6.1.12 Obtenção da 2,6-Diclorobenzaldeídoguanilhidrazona	65
6.1.13 Obtenção da 4-Quinolinacarboxibenzaldeídoguanilhidrazona	65
6.1.14 Obtenção da 4-Bifenilcarboxialdeídoguanilhidrazona	66
6.1.15 Obtenção da Benzaldeídoguanilhidrazona	66
6.1.16 Obtenção da Metil-4-formilbenzoatoguanilhidrazona	67
6.1.17 Obtenção da 3,4-Diclorobenzaldeídoguanilhidrazona	67
6.1.18 Obtenção da 3-Clorobenzaldeídoguanilhidrazona	68
6.1.19 Obtenção da 2-Bifenilcarboxialdeídoguanilhidrazona	68
6.1.20 Obtenção da 2-(trifluorometil)benzalaldeídoguanilhidrazona	69
6.2 Obtenção das tiossemicarbazonas	70
6.2.1 Obtenção da 3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxibenzaldeídotiossemicarbazona	70
6.2.2 Obtenção da 4-Bifenilcarboxialdeídotiossemicarbazona	70
6.2.3 Obtenção da 3,4-Diclorobenzaldeídotiossemicarbazona	71
6.2.4 Obtenção da 2-Bifenilcarboxialdeídotiossemicarbazona	72
6.3 Obtenção do derivado SCH ₃	72
6.4 Ensaios Biológicos	74
6.4.1 Citotoxicidade <i>in vitro</i> em células tumorais	74
6.4.2 Determinação da Cl ₅₀	75
6.4.3 Citotoxicidade <i>in vitro</i> em linfócitos humanos	75
Referências Bibliográficas	77
Anexos	83

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

O Direito à Saúde, aí compreendido acesso aos medicamentos, é parte de um conjunto de direitos chamados de direitos sociais, que têm como inspiração o valor da igualdade entre as pessoas. O Direito à Saúde foi reconhecido internacionalmente em 1948, quando da aprovação da Declaração Universal dos Direitos Humanos pela Organização das Nações Unidas (ONU). No Brasil, foi reconhecido somente quarenta anos depois, na Constituição Federal de 1988, e desde então promover a saúde de todos passou a ser dever do Estado (Brasil, 2007).

Tendo em vista que os medicamentos são instrumentos essenciais à preservação, manutenção e promoção da Saúde. O acesso ao medicamento representa um importante fator de inclusão social. Acesso este que depende da disponibilidade do fármaco – princípio ativo contido no medicamento e que em 85% dos casos é de origem sintética (Barreiro, 2009).

Neste contexto, a capacidade de planejar, desenvolver e produzir fármacos que atendam as necessidades de saúde da população brasileira consiste numa das ferramentas mais eficazes para universalização do acesso aos medicamentos e, conseqüentemente, do acesso à saúde no Brasil.

Este processo, atribuição da Química Medicinal, caracteriza-se por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentarem os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico, seguro e confortável (Wermuth, 1996; Barreiro, 2001).

Diversas estratégias da Química Medicinal podem ser empregadas no desenho molecular de novos candidatos a agentes terapêuticos, *i.e.* novos protótipos de fármacos. Sendo também, estas estratégias, cruciais na etapa de modificação molecular necessária à sua otimização, diminuindo efeitos colaterais e aumentando sua potência, por exemplo. Dentre muitas se destacam o bioisosterismo, a simplificação molecular e a hibridação molecular (Barreiro, 2009).

A modificação ou variação molecular, utilizando principalmente o conceito de bioisosterismo, é o método mais frequentemente utilizado como estratégia para descoberta de novos protótipos de fármacos. Com a aplicação

do bioisosterismo pode-se analisar a influência da modificação de um átomo ou de um grupo de átomos por seu bioisótero sobre a atividade biológica que o fármaco original apresenta, podendo ser mais ativo, ter ação idêntica ou mesmo antagônica (Korolkovas, 1977; Barreiro, 2001).

Neste ambiente interdisciplinar, uma das ferramentas mais importantes para obtenção de novos compostos com potencial terapêutico é a Síntese de Fármacos, uma vez que permite a construção de moléculas, em seus diversos níveis de complexidade (Menegatti, 2001).

A Síntese de Fármacos, numa definição mais geral, e certamente incompleta, compreende o estudo de uma sequência planejada de reações orgânicas de alto grau de seletividade, aplicadas consecutivamente sobre uma substância de partida, de fácil obtenção, definida como matéria-prima. A metodologia usada na Síntese de Fármacos precisa ser capaz de viabilizar o acesso, com maior rendimento químico possível, na escala adequada de menor custo, a composto farmacoterapeuticamente ativo, de elevado grau de pureza, passível de ser empregado, com segurança, na posologia prescrita, como medicamento (Barreiro, 1991).

Focalizando-se na busca por novos agentes terapêuticos com atividade antineoplásica, este trabalho utilizou o bioisosterismo como estratégia para o planejamento racional de novos protótipos de fármacos contra o câncer.

2. Revisão de Literatura

2.1 Câncer

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações. Importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2009).

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (World Cancer Report, 2008), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos (INCA, 2009).

Neoplasia significa o processo de um novo crescimento celular e um novo crescimento é chamado de neoplasma. Consiste, então, na proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma (fora do controle dos mecanismos que regulam a multiplicação celular), na qual as células reduzem ou perdem a capacidade de diferenciar; em consequência de alterações nos genes que regulam o crescimento e a diferenciação celulares. Quando ocorre em órgãos sólidos, o maior número de células forma o tumor (Brasileiro-Filho, 2006).

Na prática, neoplasias são chamadas de tumores. O termo tumor é mais abrangente, pois significa qualquer lesão expansiva ou intumescimento localizado, podendo ser causado por vários outros processos. Originalmente o termo foi aplicado ao edema causado por uma inflamação. Impende salientar que o termo científico adotado para o câncer é neoplasia maligna. Entretanto é comum a utilização do termo tumor como sinônimo de neoplasia. Segundo Kumar (2005) o emprego não-neoplástico de tumor saiu de uso; portanto, o termo agora equivaleria a neoplasma (Almeida, 2005; Kumar, 2005; Brasileiro-Filho, 2006).

A natureza do câncer sugere que ele seja a doença do caos, o colapso da ordem biológica no corpo humano, pois as neoplasias são formadas por células que perderam sua habilidade para manter e criar tecidos de forma e funções normais (Weinberg, 2008). Este processo - denominado carcinogênese - ocorre, geralmente, de maneira lenta e pode levar vários anos para que uma

célula neoplásica se prolifera e dá origem a um tumor visível. São vários os estágios que estas células passam antes de serem consideradas um tumor propriamente dito, entre eles: o estágio de iniciação ou primeiro estágio, onde as células sofrem a ação de agentes cancerígenos passando para a fase seguinte; o estágio de promoção, onde as células iniciadas são transformadas em malignas; e o estágio de progressão, no qual as células apresentam uma multiplicação descontrolada e irreversível, este é o último estágio (INCA, 2009).

Os tumores podem ser classificados de acordo com vários critérios:

- Pelo comportamento clínico (benignos ou malignos);
- Pelo aspecto microscópico (critério histomorfológico);
- Pela origem da neoplasia (critério histogenético).

De modo geral, o critério de classificação mais recorrente é o do comportamento clínico. Pois as implicações de uma neoplasia maligna são substancialmente mais graves que de uma neoplasia benigna.

As neoplasias benignas apesar de muitas vezes não representarem grandes problemas para seus portadores, têm grande interesse prático por sua alta frequência e pelas consequências que podem gerar. Seja por seu volume, seja por sua localização ou outras propriedades, tumores benignos podem causar vários transtornos para o paciente (obstrução de órgãos ou estruturas ocas, compressão de órgãos e tecidos, produção de substâncias em maior quantidade etc.) inclusive sua morte. Neste sentido, o termo benigno deve ser entendido com reservas (Brasileiro-Filho, 2006; Kumar, 2005).

As células benignas em geral não são bem diferenciadas e podem até ser indistinguíveis das células normais correspondentes, ou seja, o tumor reproduz bem o tecido que lhe deu origem. Como a taxa de divisão celular é pequena (baixo índice mitótico), em geral o tumor tem crescimento lento. Este último fato permite o desenvolvimento adequado de vasos sanguíneos, assegurando boa nutrição das células. Desse modo, degenerações, necroses e hemorragias são pouco comuns. Por essa razão e pelo fato de não infiltrar ou destruir os tecidos vizinhos, o tumor benigno não leva à ulceração. Além disso, não compromete a nutrição do hospedeiro (a ação espoliativa é discreta ou ausente) e geralmente tem um crescimento como uma massa expansiva esférica. O crescimento do tipo infiltrativo é praticamente exclusivo dos tumores malignos (Brasileiro-Filho, 2006; Kumar, 2005).

Já as células das neoplasias malignas têm propriedades funcionais e morfológicas diferentes das células benignas. A taxa de reprodução celular é elevada (alto índice mitótico); seu crescimento é usualmente rápido; o mesmo não acontece com o estroma e os vasos sanguíneos, que se desenvolvem mais lentamente, resultando muitas vezes em degenerações, necroses, hemorragias e ulcerações. Por essa razão as neoplasias malignas frequentemente sangram e apresentam áreas de necrose. Também devido ao crescimento infiltrativo, não apresentam cápsula (Quadro 1) (Brasileiro-Filho, 2006; Weinberg, 2008).

Quadro 1. Características das neoplasias benignas e malignas.

	Neoplasia Benigna	Neoplasia Maligna
Taxa de crescimento	Baixa	Alta
Grau de diferenciação	Bem diferenciadas	Desde bem diferenciadas até anaplásticas
Degeneração, necrose	Ausentes	Presentes
Tipo de crescimento	Expansivo	Infiltrativo
Cápsula	Presente	Geralmente ausente
Limites da lesão	Bem definidos	Imprecisos
Efeitos locais e sistêmicos	Geralmente inexpressivos	Geralmente importantes e as vezes letais
Recidiva	Em geral ausente	Presentes
Metástases	Ausentes	Presentes

Fonte: Brasileiro-Filho, 2006. Adaptado.

A maior gravidade das neoplasias malignas consiste no fato destas células serem capazes de gerar metástases. A metástase (do grego *metástatis* = mudança de lugar, transferência) é a formação de uma nova lesão tumoral a partir da primeira, mas sem continuidade entre as duas. A formação de metástases é um processo complexo e depende de inúmeras interações entre células malignas e componentes dos tecidos normais do hospedeiro. A formação de uma metástase envolve: o destacamento das células da massa tumoral original, deslocamento dessas células através da matriz extracelular, invasão dos vasos linfáticos ou sanguíneos, sobrevivência das células na circulação, adesão ao endotélio vascular no órgão onde irão se instalar, saída

dos vasos nesse órgão, proliferação do órgão invadido e indução de vasos para o suprimento da nova colônia (Brasileiro-Filho, 2006; Weinberg, 2008).

De acordo com as estatísticas disponíveis, o câncer afeta parcela expressiva da população mundial e tem sido uma das principais causas de morte. Apesar do declínio do número de óbitos para alguns tipos da doença (linfomas, certas neoplasias da infância etc.), a taxa de mortalidade global por câncer tem aumentado nas últimas décadas (Brasileiro-Filho, 2006).

No ano de 2005, das 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por aproximadamente 7,6 milhões e destas, mais de 70% ocorreram em países com média ou baixa renda (Brasil, 2007; WHO, 2006). As taxas de mortalidade bruta, no Brasil, tanto entre homens quanto entre mulheres são especialmente elevadas nas regiões sul e sudeste do país. No estado de Alagoas, particularmente, a taxa bruta de mortalidade alcança uma média de 36,16 casos de morte por câncer para cada 100.000 homens; e 37,24 casos de morte por câncer para cada 100.000 mulheres (Figuras 1 e 2, pág. 21) (INCA, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2002) uma estimativa feita para o ano de 2020 mostra que, neste ano, o número de novos casos será em torno de 15 milhões, e que 60% destes surgirão em países em desenvolvimento. No ano de 2011, no Brasil, aproximadamente 500 mil pessoas terão algum tipo de câncer. Ainda em estimativa, acredita-se que o número de mortes devidas ao câncer continue crescendo e já em 2015 este número chegará a 9 milhões e em 2030 a 11,4 milhões de mortes (WHO, 2002; WHO, 2006; INCA 2011).

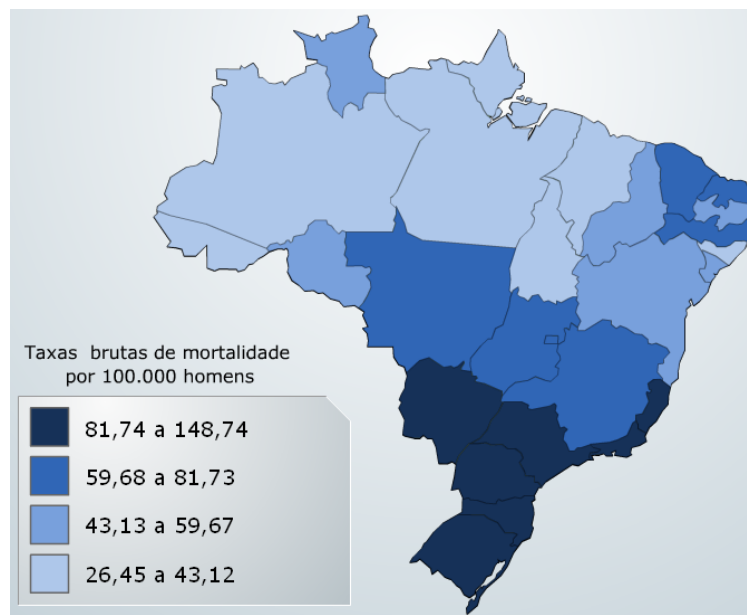


Figura 1. Representação espacial das taxas brutas de mortalidade por todas as neoplasias, por 100.000 homens, nas unidades da federação, de 2000 a 2007. Fonte: Atlas de mortalidade por câncer, INCA, 2011.

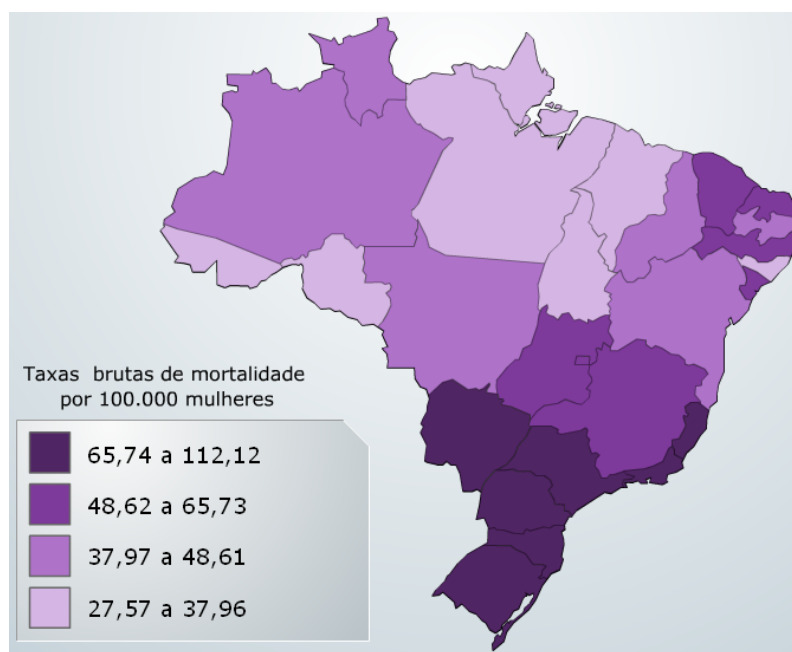


Figura 2. Representação espacial das taxas brutas de mortalidade por todas as neoplasias, por 100.000 mulheres, nas unidades da federação, de 2000 a 2007. Fonte: Atlas de mortalidade por câncer, INCA, 2011.

O tratamento das neoplasias malignas tem como objetivos a cura, o prolongamento da vida e/ou um melhoramento na qualidade de vida. Dentre os tipos de tratamento disponíveis podem ser citados a quimioterapia, a radioterapia, cirurgia, tratamento hormonal, etc. (WHO, 2006).

A aniquilação das células neoplásicas malignas é o principal objetivo da quimioterapia, sem que haja dano algum para as células normais. Contudo, os agentes quimioterápicos, em sua grande parte, não agem especificamente, o que gera danos tanto às células normais, principalmente células com alta velocidade de crescimento, como as gastrointestinais, as capilares e as do sistema imunológico, quanto às neoplásicas malignas (Almeida, 2005).

Isto decorre, principalmente, do fato dos tumores surgirem a partir de tecidos normais, sendo difícil a construção de moléculas capazes de diferenciar as células normais das neoplásicas (Weinberg, 2008).

Nesse cenário, torna-se fundamental que recursos e esforços sejam direcionados no sentido de orientar as estratégias de síntese e desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos. Comumente, a pesquisa por novas entidades químicas bioativas é realizada a partir de análogos relatados como capazes de oferecer a atividade esperada. Duas das classes de substâncias que apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas - inclusive atividade antineoplásica – são as guanilhidrazonas e as tiossemicarbazonas, que detêm diversos análogos reportados com esta atividade (Andreani, 2000; Karah, 2002; Foye, 1990; Brzozowski, 2007; Feun, 2002).

2.2 As Guanilhidrazonas e as Tiossemicarbazonas

As guanilhidrazonas e as tiossemicarbazonas representam duas classes de substâncias amplamente estudadas. São compostos de considerável interesse científico, devido as suas importantes propriedades químicas e biológicas.

Há relatos de diversas guanilhidrazonas estudadas como anti-hipertensivos (Foye, 1990; Hoffman, 2003), antidiabéticos (Larsen, 2001; Edmont, 2000), antineoplásicos (Andreani, 2000; Foye, 1990; Brzozowski, 2007), antibacterianos (Walzer, 1994; Gadad, 2000; Borges, 2001), antimaláricos (Ruiz, 1970) e tripanocida (Sundberg, 1990; Messeder, 1995; Santos-Filho, 1997).

Andreani e colaboradores (2000) relataram a síntese de novas guanilhidrazonas que foram testadas como potenciais agentes antitumorais em

linhagens celulares cancerígenas do pulmão, mama e glioma. Além disso, concluíram que os grupos 3-nitrofenil e 4-nitrofenil são importantes grupamentos farmacofóricos para esta atividade.

Messeder e colaboradores (1995) demonstraram que guanilhidrazonas aromáticas simples também são ativas contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, possivelmente por meio da interação com a membrana do parasita ou DNA (Messeder, 1995; Andreani, 2000).

Há diversos fármacos - que são guanilhidrazonas ou guardam similaridade estrutural com esta - de uso consagrado na terapêutica antihipertensiva (Hoffman, 2003, Lemke, 2008a) (Figura 3).

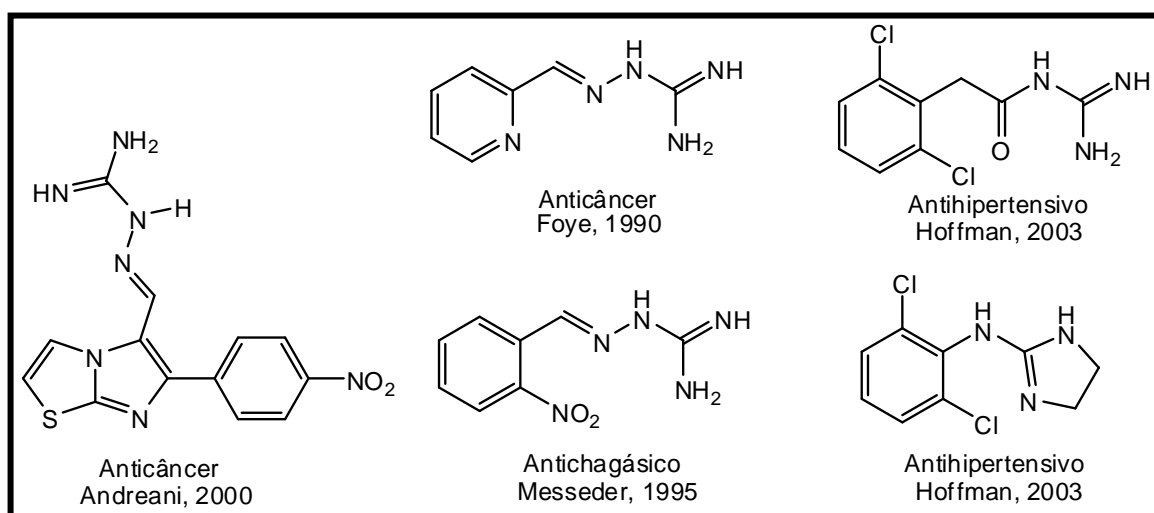


Figura 3. Estruturas de algumas guanilhidrazonas de importância biológica.

As tiossemicarbazonas, por sua vez, são relatadas como agentes com atividade antitumoral (Feun, 2002), antimalárica (Klayman, 1984), antibacteriana (Kasuga, 2003), antiviral (Teitz, 1994; Casas, 1998), antiprotozoária (Bharti, 2002), citotóxica (Liu, 1992; Li, 1998), dentre outras.

Casas e colaboradores (1998) reportaram a atividade inibitória sobre a enzima transcriptase reversa - presente em vírus do tipo HIV - para tiossemicarbazonas, derivadas de piridoxal, complexadas com estanho (IV). A atividade anti-HIV também foi relatada para tiossemicarbazonas por Teitz e colaboradores (1994), que relataram tiossemicarbazonas atuantes sobre a síntese de proteínas estruturais do HIV. Bharti e colaboradores (2002)

efetuaram testes antiprotozoários de alguns derivados tiossemicarbazonas e obtiveram bons resultados biológicos frente à *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis*.

Li e colaboradores (1998) - partindo de estudos prévios de Liu e colaboradores (1992) - desenvolveram um pró-fármaco tiossemicarbazona, com elevada atividade frente a células tumorais. Esta substância chegou a ser avaliada em ensaios clínicos de fase II (Beraldo, 2004) (Figura 4).

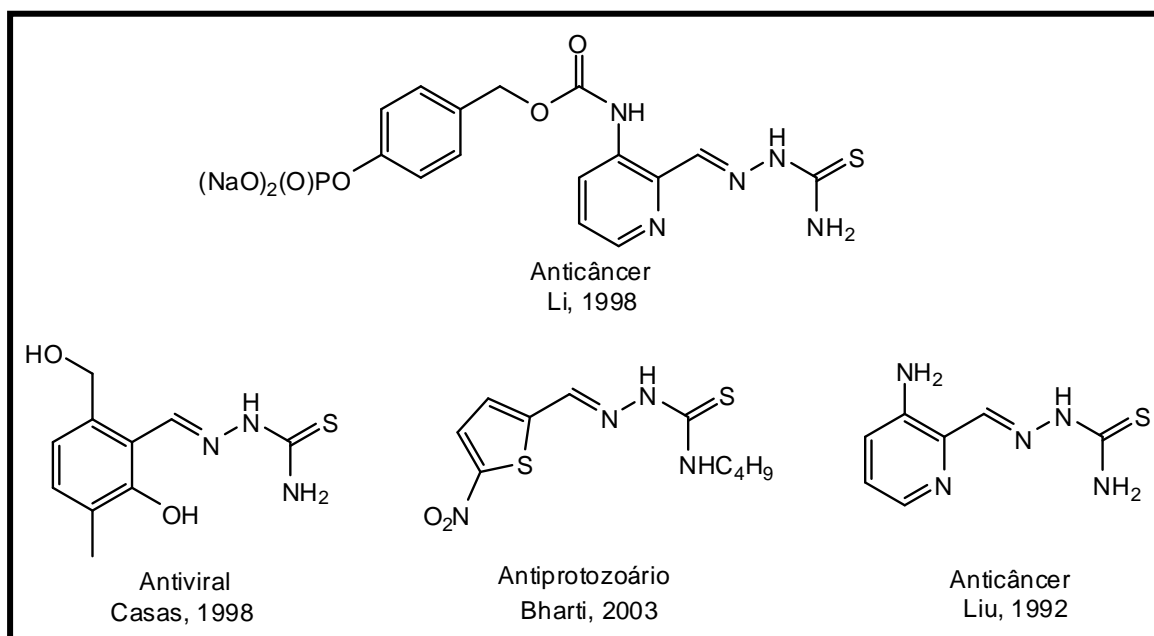


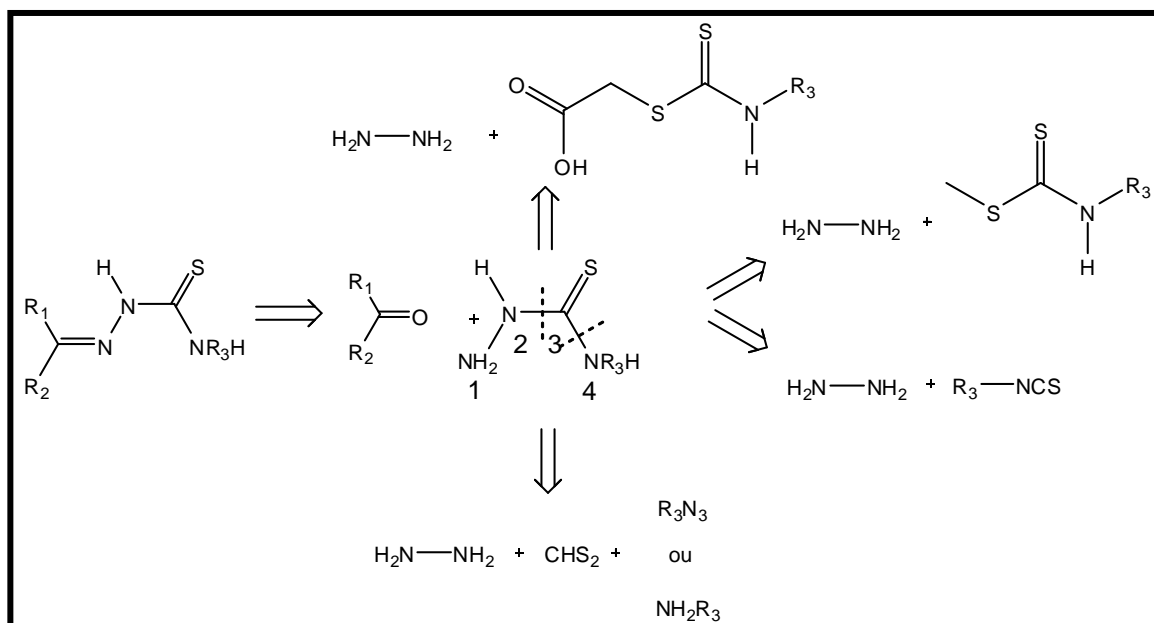
Figura 4. Estruturas de algumas tiossemicarbazonas de importância biológica.

As guanilhidrazonas são geralmente obtidas pela reação de condensação quimiosseletiva da aminoguanidina com aldeídos e/ou cetonas em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido, e recebem a denominação da classe guanilhidrazona após o nome do respectivo aldeído ou cetona condensado (Ulrich, 1984).

As tiossemicarbazonas aromáticas são também obtidas pela reação direta entre aldeídos e/ou cetonas com a tiossemicarbazida sob refluxo, usualmente em etanol, sob catálise ácida (Hang, 2001, Antonini, 1981).

A preparação de tiossemicarbazonas é extensamente explorada e descrita na literatura (Tenório, 2005). Na análise retrossintética, em geral, duas estratégias podem ser empregadas: obtenção direta, pela reação quimiosseletiva de aldeídos e/ou cetonas com as tiossemicarbazidas, e

obtenção indireta, através da preparação prévia das tiossemicarbazidas, utilizando hidrazina ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$) e diferentes reagentes, seguida de condensação com o derivado carbonilado específico (Esquema 1).

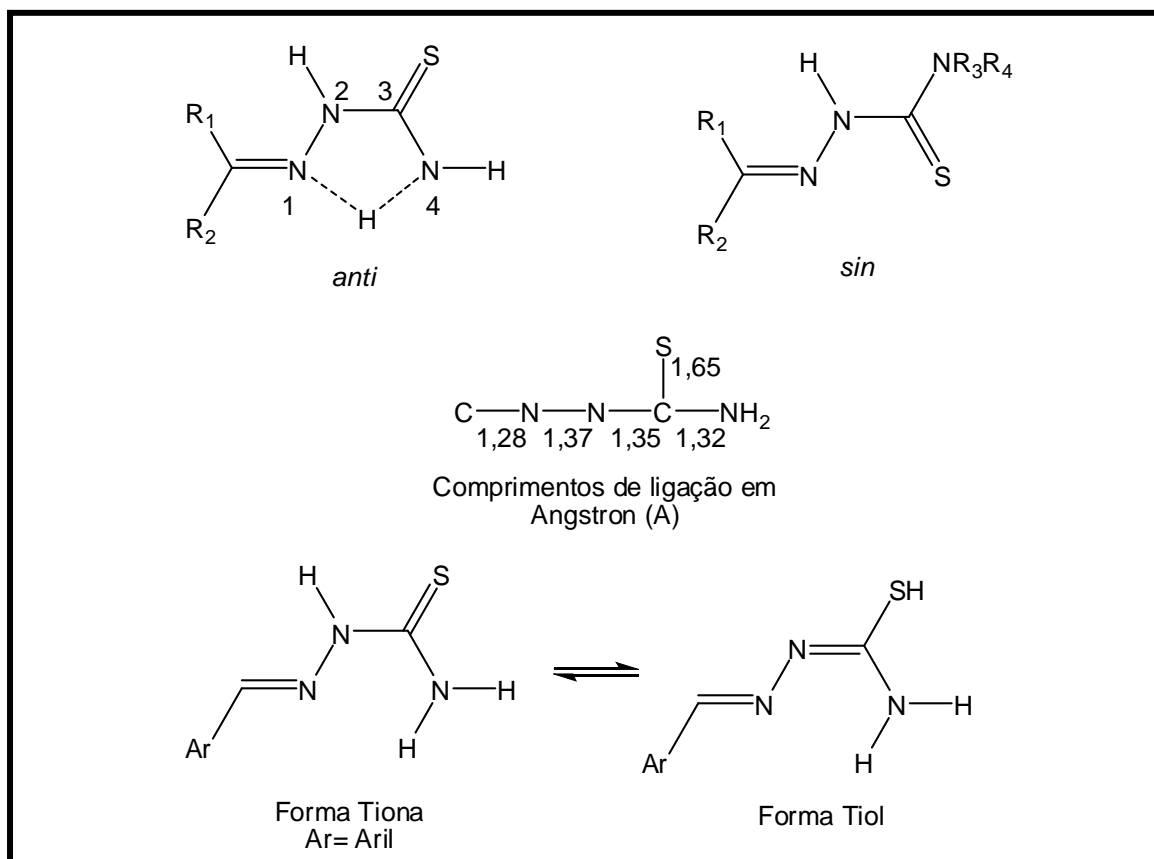


Esquema 1. Análise retrossintética de tiossemicarbazonas (Fonte: Tenório, 2005; modificada).

Tanto as guanilhidrazonas quanto as tiossemicarbazonas apresentam-se como sistemas com extrema deslocalização eletrônica, principalmente quando há grupos aromáticos ligados ao carbono da imina. Palenik e colaboradores demonstraram, em 1974, a influência nos comprimentos de ligação devido a deslocalização dos elétrons π nas tiossemicarbazonas (Palenik, 1974). Em decorrência da deslocalização eletrônica, as tiossemicarbazonas podem coexistir na forma tiona ou tiol em equilíbrio tautomérico (Tenório, 2005) (Esquema 2, pág. 26).

Segundo Casas e colaboradores (2000), as tiossemicarbazonas não substituídas na posição N-4 apresentam estrutura básica, $\text{C}=\text{N-NHCS-NH}_2$, aproximadamente planar, com o átomo de enxofre em posição *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina (Esquema 2, pág. 26). Fatores eletrônicos e estéricos contribuem para este arranjo estrutural, porém, possivelmente o fator mais importante é que o átomo de enxofre em posição *anti* possibilita a ocorrência de ligação de hidrogênio intramolecular entre o

nitrogênio da imina e os hidrogênios da tioamida (Chattopadhyay, 1989) (Esquema 2).



Esquema 2. Arranjo estrutural, comprimentos de ligação e formas tautoméricas das tiossemicarbazonas (Fonte: Tenório, 2005; modificada).

2.3 Estratégias de modificação molecular

O bioisosterismo é uma estratégia da Química Medicinal para o desenho racional de novos fármacos. Consiste, assim, num processo especial de modificação molecular de uma substância protótipo. A substância protótipo deve apresentar uma estrutura química bem definida, inclusive quanto aos aspectos estereoquímicos, em níveis configuracionais e conformacionais (Barreiro, 2001; Lima, 2005; Lima, 2007).

O sucesso do emprego desta estratégia no desenvolvimento de novas substâncias farmacoterapeuticamente atraentes tem observado significativo crescimento em distintas classes terapêuticas. No campo dos agentes antineoplásicos, a busca por moléculas capazes de atuar com maior seletividade é fundamentalmente importante. O desafio, naturalmente, é traçar

modificações moleculares que resultem em um fármaco com múltiplas propriedades aceitáveis, sobretudo com eficácia terapêutica, segurança e facilidade de formulação, adequado para uso clínico (Viegas-Jr, 2006, Pereira, 2007).

O Bioisosterismo resultou da aplicação do princípio de isosterismo, desenvolvido por Langmuir, em moléculas de substâncias bioativas. Em 1919, esse pesquisador estudava o comportamento químico e a reatividade de determinadas substâncias que possuíam átomos com o mesmo número de elétrons de valência – portanto isoeletrônicos (p. ex., N_2 e CO) (Barreiro, 2001).

Existem inúmeras razões para o uso do bioisosterismo no processo de descoberta de novos medicamentos, incluindo a necessidade de melhorar a atividade farmacológica, a seletividade de um determinado fármaco frente ao seu receptor – com redução simultânea de certos efeitos adversos -, ou mesmo aperfeiçoar a farmacocinética da substância (Lima, 2005).

O bioisosterismo, em suas primeiras aplicações como estratégia de modificação molecular de um protótipo, beneficiou-se enormemente da regra do hidreto, uma regra empírica, formulada por Grimm em 1925. A regra empírica que diz que a adição de um átomo de hidrogênio com um par de elétrons para um átomo, produz um pseudo-átomo apresentando as mesmas características físicas daqueles presentes na coluna imediatamente posterior da Tabela Periódica dos Elementos do primeiro átomo. Impende salientar que a regra de Grimm refere-se ao período inicial do desenvolvimento do bioisosterismo (Figura 5, pág. 27) (Barreiro, 2001; Lima, 2005).

n° de e ⁻	6	7	8	9	10	11
	C	N	O	F	Ne	Na ⁺
	H	CH	NH	OH	FH	
		H	CH ₂	NH ₂	OH ₂	FH ₂ ⁺
			H	CH ₃	NH ₃	OH ₃ ⁺
				H	CH ₄	NH ₄ ⁺

Figura 5. Regra de Grimm para o hidreto.

Trabalhos posteriores de Erlenmeyer e Hinsberg ampliaram consideravelmente o princípio do isosterismo, permitindo que, atualmente, o bioisosterismo represente uma estratégia útil para a descoberta de novos

compostos ativos ou novas séries congêneres de novos compostos protótipos, incluindo-se o emprego de técnicas computacionais (Barreiro, 2001; 2008).

O bioisosterismo pode ser classificado em duas categorias: clássico e não-clássico, que são subclassificados como a seguir (Barreiro, 2001; Lemke, 2008):

- Clássico:
 - Átomos ou grupos monovalentes;
 - Átomos ou grupos divalentes;
 - Átomos ou grupos trivalentes;
 - Átomos tetravalentes;
 - Bioisosterismo de anéis equivalentes.
- Não-clássico:
 - Grupos funcionais;
 - Abertura de anéis;
 - Fechamento de anéis;
 - Retroisosterismo.

Quadro 2. Grupos e átomos bioisósteros clássicos.

Monovalentes

F, OH, NH₂, CH₃, OR, Cl, SH, PH₂, SR, SR₃, Br, I

Divalentes

-CH₂-, -O-, -S-, -Se-, -Te-

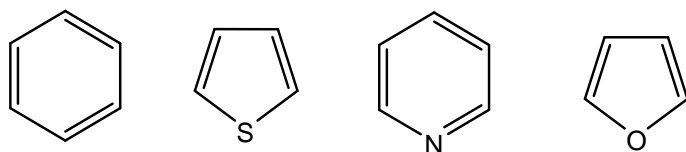
Trivalentes

=CH-, =N-, =P-, =As-, =Sb-

Tetravalentes

=C=, =Si=, =N⁺=, =P⁺=, =As⁺=, =Sb⁺=

Anéis equivalentes

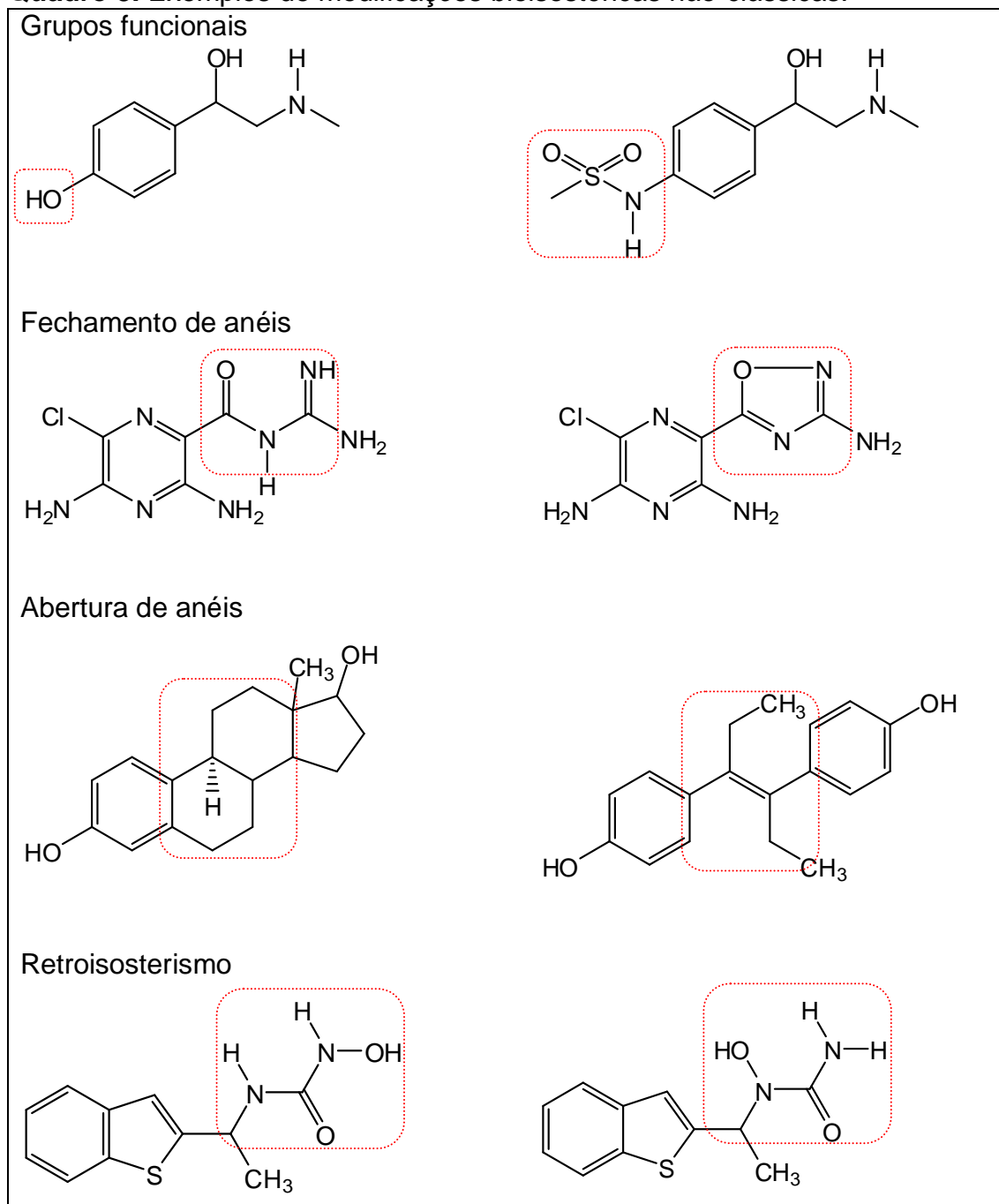


Fontes: Barreiro 2008 e Lemke, 2008. Adaptado.

O bioisosterismo clássico subdivide-se em função da valência dos átomos, grupos ou radicais, incluindo nesta categoria os anéis aromáticos

equivalentes ou não (Quadro 2). As demais possibilidades foram classificadas, genericamente, como bioisosterismo não-clássico. Com a evolução deste conceito, incorporaram-se a esta segunda classe o bioisosterismo envolvendo grupos funcionais com propriedade estruturais equivalentes, incluindo retroisosterismo, abertura e fechamento de anéis (Quadro 3) (Barreiro, 2001; Barreiro, 2008; Lemke, 2008; Lima, 2005; Wermuth, 1996).

Quadro 3. Exemplos de modificações bioisostéricas não-clássicas.



Fontes: Barreiro, 2008; Lemke, 2008 e Wermuth, 1996. Adaptado.

Este trabalho utilizou, especialmente, o bioisosterismo clássico para propor e realizar as modificações moleculares, racionalmente planejadas, para as guanilhidrazonas e tiossemicarbazonas em estudo; com dois objetivos principais: melhorar a atividade antineoplásica e/ou reduzir os efeitos tóxicos das substâncias. Para tanto, o uso correto do bioisosterismo requer atenção aos parâmetros físicos, eletrônicos e conformacionais envolvidos na substituição prevista. A análise cuidadosa destes parâmetros permite prever, mesmo que apenas em teoria, as alterações farmacocinéticas e farmacodinâmicas que ocorrerão com o novo bioisótero. Assim sendo, a substituição deve ser rigorosamente precedida por uma análise cuidadosa dos seguintes parâmetros (Lima, 2005, Barreiro, 2008):

- a) volume, tamanho, distribuição eletrônica, hibridação, polarizabilidade e ângulos de ligação;
- b) grau de solubilidade lipídica e aquosa, de modo a permitir a previsão de alteração propriedades físico-químicas, tais como logP e pKa;
- c) reatividade química dos grupos funcionais ou subunidades bioisostéricas estruturais, principalmente para prever alterações significativas nos processos de biotransformação, inclusive para a eventual alteração do perfil de toxicidade em relação aos principais metabólitos;
- d) fatores conformacionais.

3. Objetivos

3.1. Geral

Sintetizar derivados guanilhidrazonas e tiossemicarbazonas, racionalmente planejados, visando atividade citotóxica em linhagens de células tumorais.

3.2. Específicos

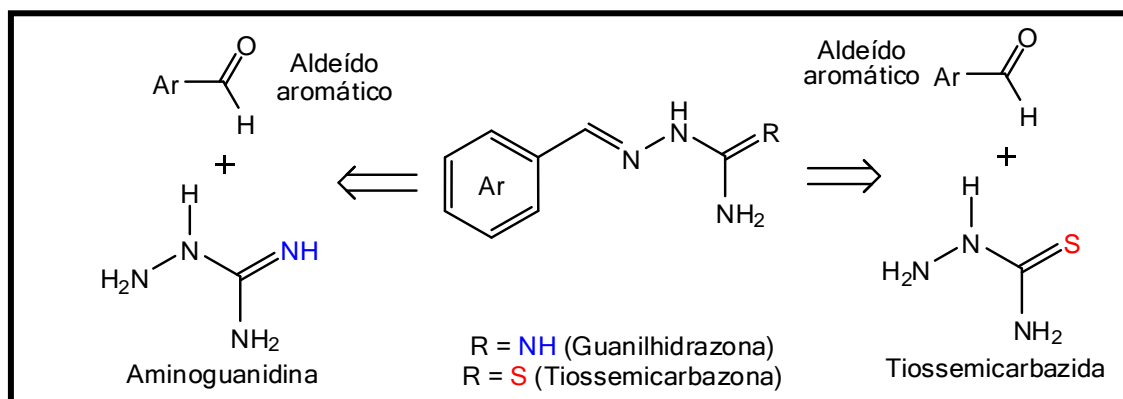
- ✓ Sintetizar guanilhidrazonas a partir da aminoguanidina para avaliação citotóxica;
- ✓ Selecionar os protótipos mais ativos e realizar a síntese das tiossemicarbazonas;
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica das guanilhidrazonas e das tiossemicarbazonas, através de uma abordagem *in vitro* frente a células tumorais e linfócitos humanos saudáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

As guanilhidrazonas e as tiossemicarbazonas representam duas classe de substâncias que apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas, incluindo as neoplasias malignas (Andreani, 2000; Foye, 1990; Brzozowski, 2007). De acordo com trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisas, incluindo a síntese e avaliação farmacológica de derivados amidínicos (Araújo-Júnior, 2006; Schmitt, 2006; Araújo-Júnior, 2007; Benderitter, 2007), planejou-se a síntese de guanilhidrazonas e tiossemicarbazonas.

A obtenção dos protótipos foi planejada variando-se duas regiões, a partir do esqueleto base das guanilhidrazonas e das tiossemicarbazonas aromáticas. A síntese foi realizada utilizando-se quantidades equimolares de aldeídos aromáticos e cloridrato de aminoguanidina, para obtenção das guanilhidrazonas, e com a tiossemicarbazida, para a obtenção das tiossemicarbazonas (Esquema 3, pág. 33).

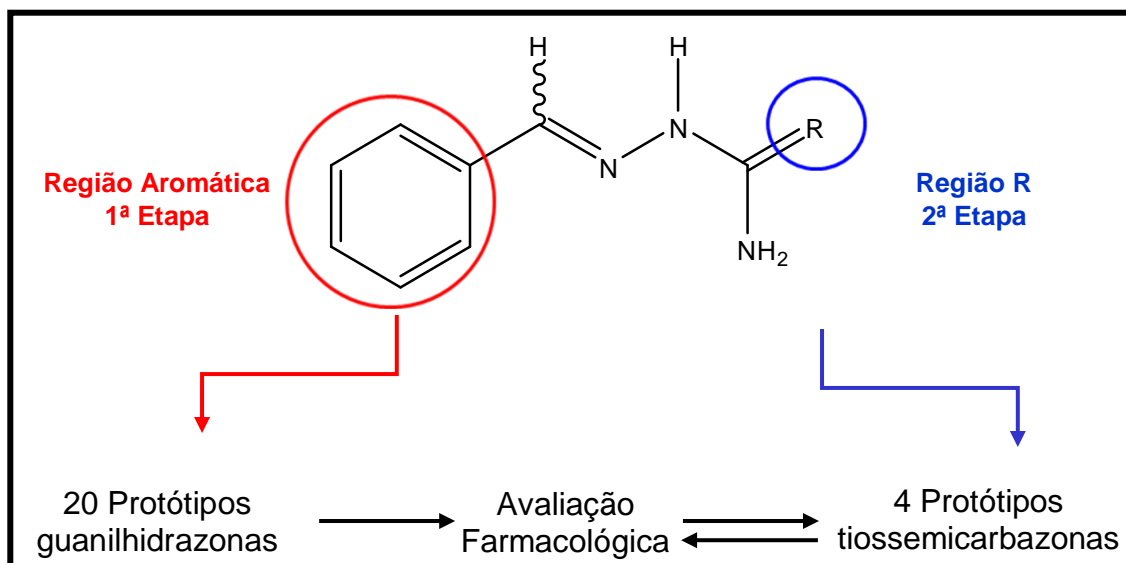


Esquema 3. Retrossíntese do esqueleto base das guanilhidrazonas e das tiossemicarbazonas.

A primeira família consistiu em vinte guanilhidrazonas com diferentes regiões aromáticas obtidas a partir de diferentes aldeídos aromáticos. Os aldeídos foram estrategicamente escolhidos para avaliar a importância de cada substituinte na relação estrutura-atividade frente à atividade farmacológica para a qual foram planejados (Esquema 5, pág. 35).

Posteriormente, partindo-se dos quatro protótipos mais promissores obtidos na primeira parte do trabalho, realizou-se a segunda etapa sintética, conservando-se a região aromática – possíveis farmacóforos - e realizando

modificações estruturais na região R. Utilizou-se, para tal, a síntese a partir da tiossemicarbazida. Estes últimos protótipos foram também submetidos à avaliação farmacológica para verificar as implicações biológicas das modificações estruturais realizadas (Esquema 4).



Esquema 4. Planejamento da síntese das guanilhidrazonas e tiossemicarbazidas.

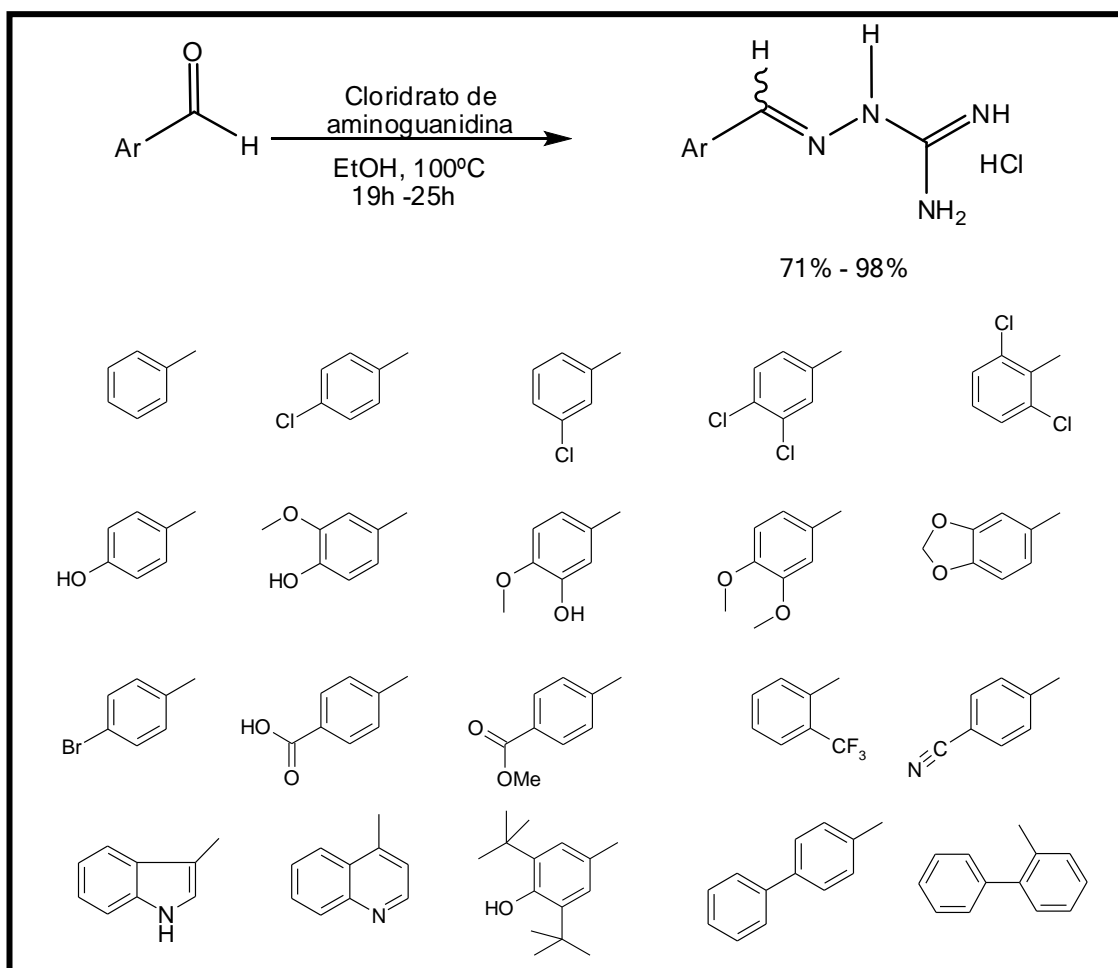
4.1. Obtenção das Guanilhidrazonas

As guanilhidrazonas aromáticas foram preparadas pela reação direta dos respectivos aldeídos com cloridrato de aminoguanidina sob refluxo de etanol 95% utilizando-se uma adaptação da metodologia descrita por Ulrich e Cerami (1984). Estes autores descrevem a condensação equimolar de um derivado carbonilado, do tipo aldeído ou cetona, com aminoguanidinas em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido (Ulrich, 1984).

Entretanto, realizamos a síntese destas substâncias sem a adição de quantidades catalíticas de ácido, pois a aminoguanidina está na forma de cloridrato. Obtivemos com esta metodologia ótimos rendimentos, compreendidos entre 71% e 98% (Esquema 5, pág. 35; Tabela 1, pág. 37).

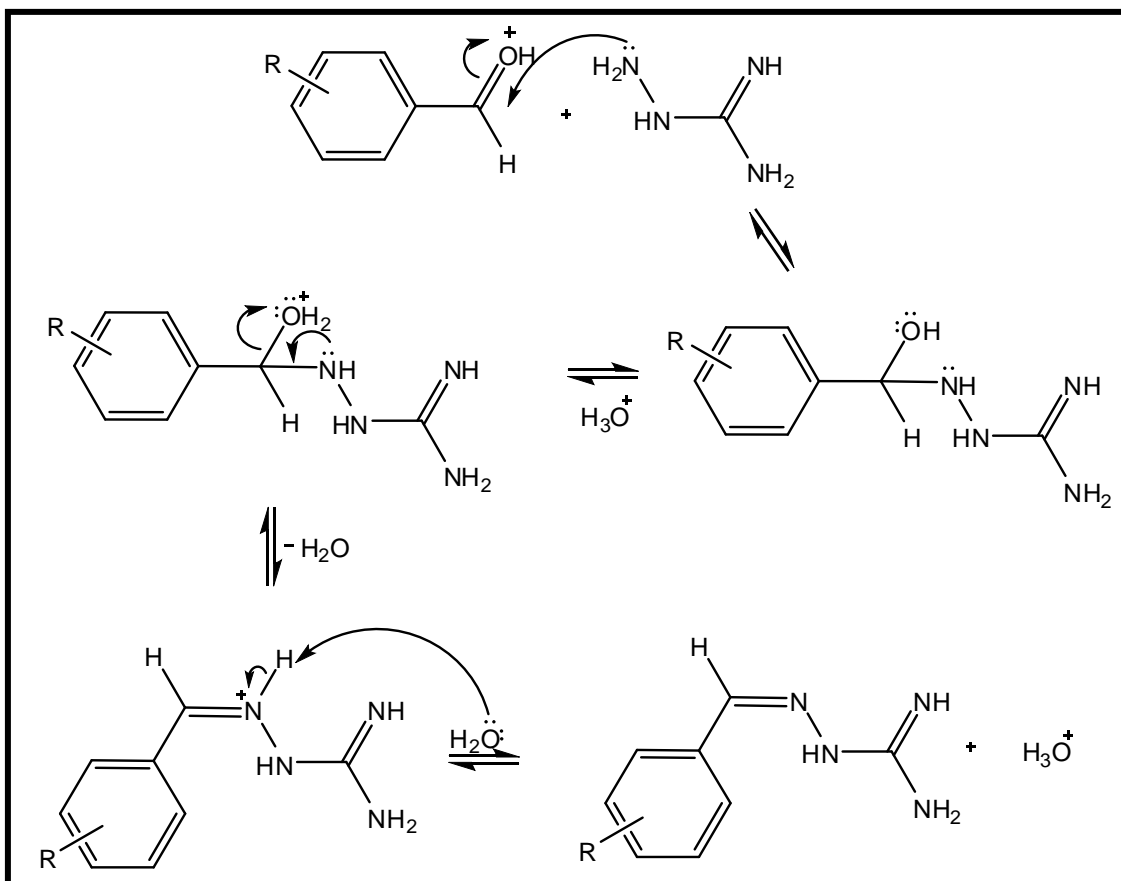
Há relatos na literatura que demonstraram que as tiossemicarbazonas – substâncias cuja síntese ocorre através do mesmo mecanismo que as guanilhidrazonas - poderiam ser sintetizadas em solução neutra indicando que, possivelmente, o emprego do ácido não seria uma condição indispensável para

formação dessas moléculas (Shailendra, 2003; Chiyanzu, 2003; Afrasiabi, 2003).



Esquema 5. Esquema geral da síntese das vinte guanilhidrazonas.

O mecanismo reacional é semelhante ao de formação de iminas (Solomons, 2000; Carey, 2007). Inicia-se com a protonação do grupo carbonila seguida da adição da aminoguanidina a este grupo para formar um intermediário dipolar tetraédrico, posteriormente ocorre a transferência do próton, intermolecular, do nitrogênio para o oxigênio, produzindo um aminoálcool. A reação avança com a protonação do oxigênio, o que produz um bom grupo abandonador. A perda de uma molécula de água leva ao íon imínio, ocorrendo, por fim, a perda de um próton para a água formando-se a guanilhidrazona (Esquema 6, pág. 36).



Esquema 6. Mecanismo proposto para a síntese das guanilhidrazonas.

O progresso das reações foi acompanhado através de placas de cromatografia em camada delgada onde observava-se o desaparecimento total ou parcial do produto de partida. As guanilhidrazonas foram obtidas como produtos cristalinos após resfriamento à temperatura ambiente e adição de um solvente apropriado: acetato de etila ou hexano.

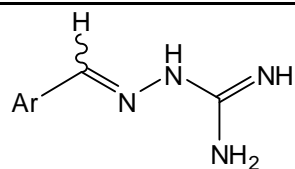
A metodologia utilizada demonstrou-se eficaz e forneceu os produtos com elevados rendimentos, compreendidos entre 71 e 98% (Tabela 1, pág. 37). Além disso, todas substâncias foram obtidas como cloridratos e são solúveis em DMSO.

Tendo em vista que a região guanidínica foi mantida, com a indicação de ser o grupamento farmacofórico mais importante das moléculas, a síntese foi realizada modificando-se inicialmente apenas a região aromática. Sendo cada modificação estrutural verificada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN 1H e ^{13}C).

Tabela 1. Rendimentos e tempos reacionais da síntese das guanilhidrazonas.

	Ar	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)
1		25	71
2		23	71
3		22	89
4		24	92
5		22	93
6		24	98
7		25	95
8		25	83
9		25	81
10		25	85

Tabela 1. Continuação.



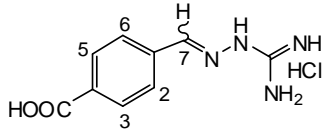
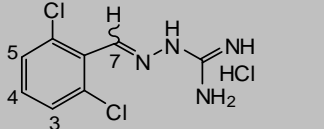
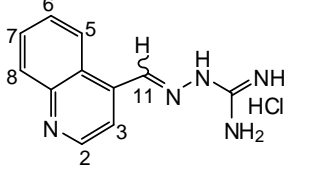
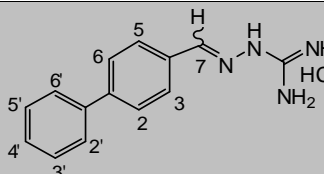
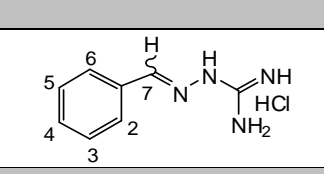
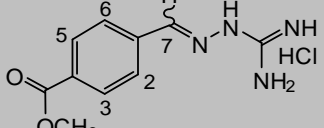
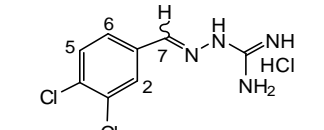
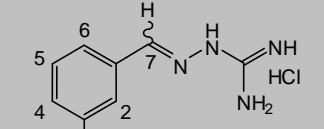
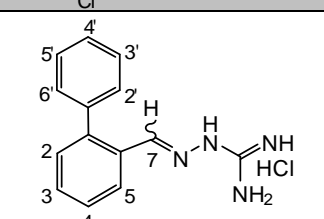
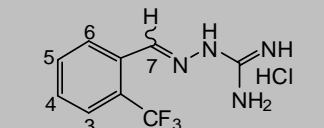
	Ar	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)
11		25	71
12		25	89
13		25	91
14		25	90
15		25	89
16		21	92
17		25	92
18		25	91
19		19	92
20		25	88

De uma maneira geral, na análise do RMN ^1H , podemos verificar um singlete de hidrogênio desblindado, em torno de δ 8,0, referente ao hidrogênio imínico presente em todas as substâncias. Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos e não aromáticos de cada molécula encontram-se na Tabela 2, pág. 40. Na análise do RMN ^{13}C observa-se sempre a presença do carbono imínico em torno de δ 145,0 e do carbono da guanidina em torno de δ 155,0, além dos carbonos aromáticos e não aromáticos, conforme espectros em anexo.

Tabela 2. Dados de RMN ^1H das guanilhidrazonas.

	Substância	RMN ^1H		
		^1H imínico	^1H aromáticos (J em Hz)	Demais ^1H
1		8,36 (s, 1H)	2: 7,8 (s, 1H) 5: 7,45 (d, 1H, $J=7,2$) 6: 7,12 (t, 1H, $J=7,2$) 7: 7,19 (t, 1H, $J=7,7$) 8: 8,28 (d, 1H, $J=7,2$)	
2		8,15 (s, 1H)	2 e 6: 7,85 (d, 2H, $J=8,5$) 3 e 5: 7,45 (d, 2H, $J=8,5$)	
3		8,24 (s, 1H)	2 e 6: 8,04 (d, 2H, $J=8,5$) 3 e 5: 7,87 (d, 2H, $J=8,5$)	
4		8,04 (s, 1H)	2: 7,33 (d, 1H, $J=2,0$) 5: 5,95 (d, 1H, $J=8,3$) 6: 7,18 (dd, 1H, $J=8,3$ e 2,0)	H_3CO : 3,79 (s, 3H)
5		8,09 (s, 1H)	2: 7,54 (s, 1H) 5: 6,97 (d, 1H, $J=7,9$) 6: 7,23 (d, 1H, $J=7,9$)	2 H_3CO : 3,80 (s, 3H) 3,77 (s, 3H)
6		8,04 (s, 1H)	2: 7,50 (d, 1,8, 1H) 5: 6,83 (d, 1H, $J=8,0$) 6: 7,13 (dd, 1H, $J=8,0$ e 1,8)	H_3CO : 3,81 (s, 3H)
7		8,06 (s, 1H)	3 e 5: 6,83 (d, 2H, $J=8,5$) 2 e 6: 7,66 (d, 2H, $J=8,5$)	
8		8,17 (s, 1H)	3 e 5: 7,63 (d, 2H, $J=8,5$) 2 e 6: 7,81 (d, 2H, $J=8,5$)	
9		8,07 (s, 1H)	2: 7,64 (d, 1H, $J=1,6$) 5: 6,94 (d, 1H, $J=8,0$) 6: 7,17 (dd, 1H, $J=8,0$ e 1,6)	CH_2 : 6,05 (s, 2H);
10		8,09 (s, 1H).	2 e 6: 7,50 (s, 2H)	6 CH_3 : 1,38 (s, 18H)

Tabela 2. Continuação.

	Substância	RMN ¹ H		
		¹ H imínico	¹ H aromáticos (J em Hz)	Demais ¹ H
11		8,20 (s, 1H)	2, 3, 5 e 6: 7,90 (s, 4H)	
12		8,42 (s, 1H)	4: 7,45 (m, 1H); 3 e 5: 7,57 (d, 2H, J=7,9);	
13		9,05 (s, 1H)	6: 7,72 (t, 1H, J=7,5); 7: 7,84 (t, 1H, J=7,5); 8: 8,09 (d, 1H, J=8,2); 5: 8,40 (d, 1H, J=8,2); 3: 8,18 (d, 1H, J=4,3); 2: 8,98 (d, 1H, J=4,3);	
14		8,24 (s, 1H)	2'-6': 7,47 (m, 5H) 2 e 6: 7,74 (d, 2H, J=8,4) 3 e 5: 7,94 (d, 2H, J=8,4)	
15		8,19 (s, 1H)	3-6: 7,43 (m, 3H); 2 e 6: 7,84 (m, 2H)	
16		8,25 (s, 1H)	2, 3, 5 e 6: 7,98 (s, 4H)	CH ₃ O: 3,84 (s, 3H)
17		8,16 (s, 1H)	5: 7,68 (d, 1H, J=8,4) 6: 7,79 (dd, 1H, J=8,4 e 2,0) 2: 8,24 (d, 1H, J=2,0)	
18		8,17 (s, 1H)	4 e 5: 7,47 (m, 2H) 6: 7,74 (dl, 1H, J=8,0) 2: 8,06 (s)	
19		8,06 (s, 1H)	2'-6': 7,36 (m, 5H) 2-5: 7,49 (m, 4H)	
20		8,21 (s, 1H).	5: 7,60 (t, 2H, J=7,8) 4: 7,70 (d, 1H, J=7,8) 6: 8,12 (d, 1H, J=7,8) 3: 8,31 (s, 1H)	

4.2. Avaliação farmacológica das guanilhidrazonas

Após a síntese das substâncias planejadas, estas foram encaminhadas para a avaliação quanto as suas atividades citotóxicas no Laboratório de Oncologia Experimental, da Universidade Federal do Ceará, sob responsabilidade da professora Dr^a. Cláudia Pessoa. Primeiramente, as vinte guanilhidrazonas obtidas foram submetidas a avaliação da atividade citotóxica através do método MTT.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (Skehan, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrito primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (Berridge, 1996).

Uma das vantagens da utilização do método de MTT em *screening* é que não se faz necessário nenhuma etapa de lavagem das placas no ensaio, nem emprego de nenhum radioisótopo, além de ser rápido e preciso.

A avaliação foi realizada com 3 linhagens de células tumorais humanas: cólon (HCT-8); melanoma (MDA-MB435); e glioblastoma (SF-295). Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança a partir de regressão não-linear. Cada amostra foi testada em duplicata em dois experimentos independentes.

O Laboratório de Oncologia Experimental adota, por convenção, uma escala de intensidade que compreende as seguintes abreviaturas:

- **SA**: substância sem atividade;
- **PA**: pouca atividade (inibição de crescimento celular variou entre 1 e 50%);
- **Mo**: atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%);

- **MA:** muita atividade (inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

Das vinte guanilhidrazonas seis (**2**, **8**, **10**, **14**, **17** e **19**) apresentaram muita atividade (MA) em pelo menos uma das linhagens testadas todas a uma concentração de 5 µg/mL. Sendo que quatro (**10**, **14**, **17** e **19**) delas apresentaram muita atividade (MA) nas três linhagens testadas (Tabela 3, pág. 43; Figura 6, pág. 46).

Tabela 3. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das guanilhidrazonas em três linhagens tumorais testadas na dose de 5 µg/mL.

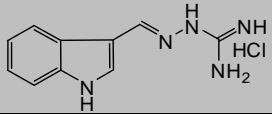
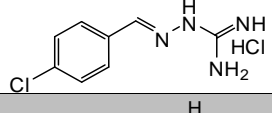
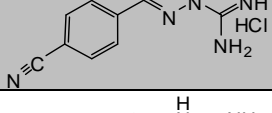
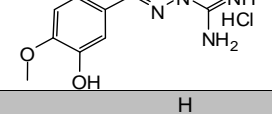
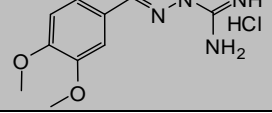
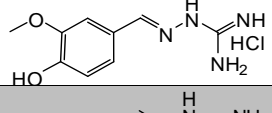
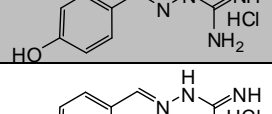
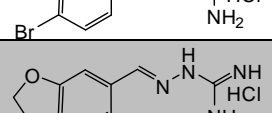
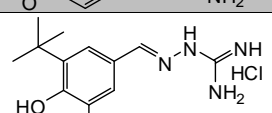
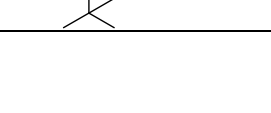
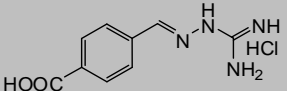
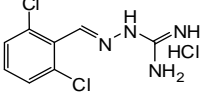
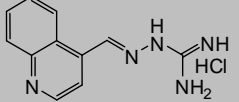
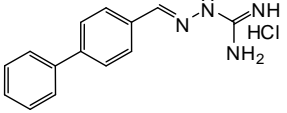
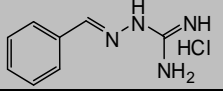
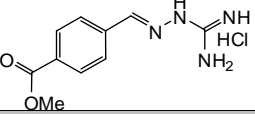
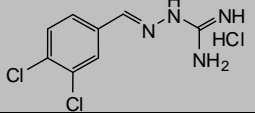
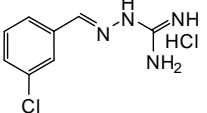
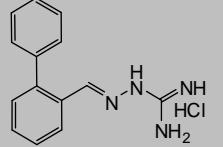
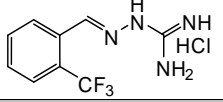
	Substância	HCT-8	MDAMB-435	SF-295
		IC% (média)	IC% (média)	IC% (média)
1		SA	SA	PA (24,08%)
2		Mo (72,97%)	MA (80,22%)	Mo (72,15%)
3		PA (25,46%)	PA (38,85%)	PA (28,63%)
4		SA	PA (32,48%)	PA (2,50%)
5		SA	PA (17,31%)	PA (19,56%)
6		PA (3,55%)	PA (0,22%)	PA (25,39%)
7		SA	SA	PA (11,57%)
8		Mo (67,30%)	MA (81,64%)	Mo (58,00%)
9		SA	Mo (53,24%)	PA (19,68%)
10		MA (97,23%)	MA (92,61%)	MA (97,88%)

Tabela 3. Continuação.

	Substância	HCT-8	MDAMB-435	SF-295
		IC% (média)	IC% (média)	IC% (média)
11		PA (10,38%)	PA (16,38%)	PA (26,27%)
12		PA (45,21%)	PA (15,39%)	Mo (51,92%)
13		PA (42,12%)	PA (29,80%)	PA (52,02%)
14		MA (100,00%)	MA (100,00%)	MA (100,00%)
15		PA (28,32%)	PA (26,50%)	PA (24,75%)
16		PA (43,14%)	PA (48,66%)	PA (37,87%)
17		MA (100,00%)	MA (100,00%)	MA (100,00%)
18		Mo (52,17%)	PA (46,06%)	Mo (52,05%)
19		MA (96,95%)	MA (95,23%)	MA (93,87%)
20		Mo (52,70%)	PA (33,76%)	PA (45,52%)
	DOX (controle posit.)	MA (97,30 %)	MA (96,94 %)	MA (87,67 %)

HCT-8: linhagem celular tumoral de cólon;

MDAMB-435: linhagem celular de melanoma;

SF-295: linhagem celular de glioblastoma;

SA: sem atividade;

PA: pouca atividade (inibição de 1 a 50%);

Mo: atividade moderada (inibição de 50 a 75%);

MA: muita atividade (inibição de 75 a 100%).

Os resultados obtidos indicam que as estruturas moleculares mais lipofílicas apresentaram melhor atividade. Os dois grupamentos alifáticos di-tert-butil presentes em **(10)** fornecem características de lipossolubilidade mais elevada a este protótipo. As fenilas presentes em **(14)** e **(19)** são grupos volumosos e que também fornecem características de lipofilicidade a estes isômeros constitucionais. Pode-se observar que em **(19)** há predominância do confômero *anti* em função do efeito orto-orto causado pela fenila, o que não ocorre em **(14)**.

Por outro lado, as substâncias detentoras de grupamentos polares como metoxila (**4, 5, 6, 16**), grupamentos hidroxila e ácido carboxílico (**4, 6, 7, 11**), ou heteroátomos mais eletronegativos como oxigênio e nitrogênio (**1, 3, 9, 13**), demonstraram-se pouco promissoras, haja vista terem apresentado moderada, pouca ou nenhuma atividade. Foye e colaboradores (1990) demonstraram que várias guanilhidrazonas derivadas do 4-quinolinacarboxialdeído, avaliadas contra a leucemia linfocítica em ratos, demonstraram-se pouco ativas, apesar de apresentarem razoável atividade antihipertensiva, o mesmo ocorreu com a substância **(13)**, que possui o anel quinolínico, e apresentou pouca atividade nas três linhagens celulares testadas. O oposto ocorre com Andreani e colaboradores (2000) e Foye e colaboradores (1990) que demonstraram um bom potencial antitumoral de derivados guanilhidrazonas, com o anel piperidínico, contra células tumorais (Figura 3, pág. 23) (Foye, 1990; Andreani, 2000).

A partir da identificação dos protótipos com melhor atividade citotóxica, realizou-se a determinação da concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI_{50}), haja vista que, inicialmente todos os análogos foram testados na dose de 5 $\mu\text{g/mL}$. Este ensaio foi realizado frente a quatro linhagens tumorais, ainda utilizando o método colorimétrico do MTT. Os resultados deste ensaio podem ser observados na Tabela 4, pág. 46. Além das três linhagens celulares tumorais utilizadas anteriormente adicionou-se, nesta avaliação, uma linhagem celular de leucemia promielocítica (HL-60).

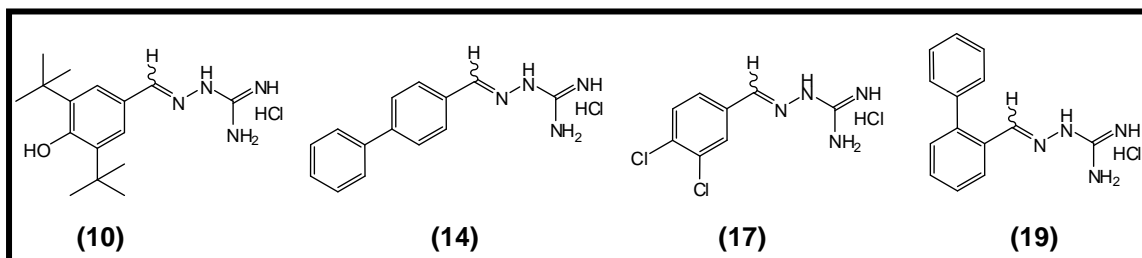


Figura 6. As quatro guanilhidrazonas que apresentaram maior citotoxicidade *in vitro* em células tumorais.

Tabela 4. Valores de CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) em quatro linhagens tumorais. Os valores são apresentados em $\mu\text{g/mL}$.

Linhagem Celular	10	14	17	19
MDAMB 435	1,13	0,13	1,14	2,70
HL-60	2,20	0,35	1,08	2,20
HCT8	1,28	0,20	0,49	1,00
SF295	1,28	0,19	0,56	1,65

MDAMB-435: linhagem celular de melanoma;

HL-60: leucemia promielocítica;

HCT-8: linhagem celular tumoral de cólon;

SF-295: linhagem celular de glioblastoma.

Observa-se que os quatro protótipos apresentaram CI_{50} inferior a 4 $\mu\text{g/mL}$, sendo que destas a substância (14) apresentou as mais baixas concentrações inibitórias capazes de provocar 50% do efeito máximo frente as quatro linhagens tumorais utilizadas. Em seguida estão as substâncias (17) e (19) que apresentaram CI_{50} de até 1,14 $\mu\text{g/mL}$ e 2,70 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Após a avaliação da citotoxicidade em células tumorais, realizou-se a avaliação da toxicidade das substâncias mais ativas (10, 14, 17 e 19) frente a células saudáveis (linfócitos humanos) (Tabela 5, pág. 46).

Tabela 5. Valores de CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) em linfócitos humanos. Os valores são apresentados em $\mu\text{g/mL}$.

Linhagem Celular	10	14	17	19
Linfócitos humanos	1,34	0,56	1,23	2,24

Pode-se observar que as substâncias apresentaram CI_{50} em linfócitos humanos próxima ao valor de CI_{50} nas linhagens tumorais testadas (Tabela 4, pág. 44).

Neste caso, os protótipos, apesar de terem apresentado significativa atividade citotóxica contra células tumorais, se demonstraram pouco seletivos, pois foram citotóxicos frente a células saudáveis (linfócitos humanos) em concentrações semelhantes. Um protótipo de fármaco antineoplásico, para ser considerado eficiente, necessita seletividade. Para um novo antineoplásico ser lançado ao mercado ele deverá apresentar melhor eficiência e maior segurança que os já comercializados, ou eficiência semelhante, porém com uma maior segurança que os atuais.

Neste contexto, estes quatro protótipos (**10**, **14**, **17** e **19**) foram utilizados para a síntese dos seus respectivos análogos tiossemicarbazona, objetivando reverter a citotoxicidade frente a células saudáveis, e manter a citotoxicidade frente a células tumorais, buscando, assim, o aumento da seletividade, como descrito a partir do item 4.3, pág. 48.

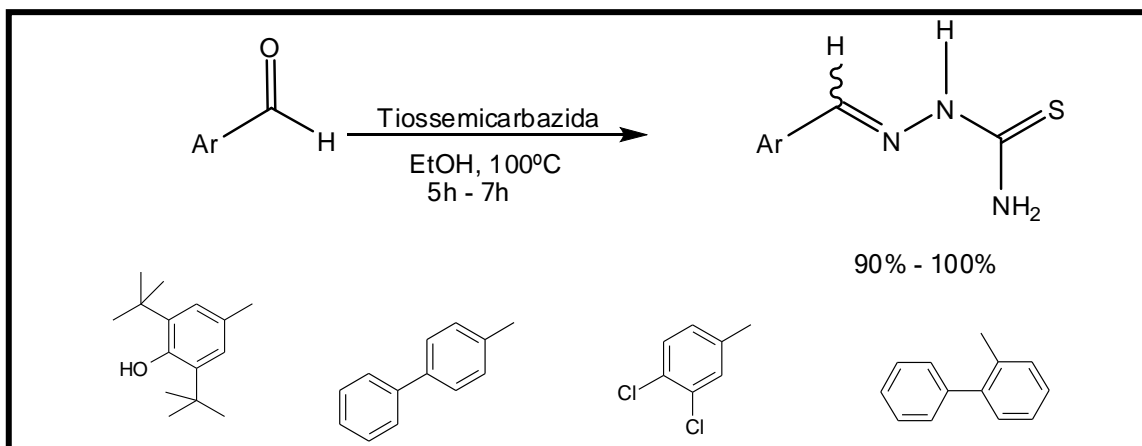
4.3. Obtenção das tiossemicarbazonas

Conforme o planejamento de modificações moleculares previsto (Esquema 4, pág. 34) foram utilizados, nesta etapa, os mesmos aldeídos que deram origem às quatro guanilhidrazonas com melhor atividade (**10**, **14**, **17** e **19**), para manter a mesma região aromática, e variar apenas a região R, que passou a consistir, após a síntese, em grupamentos tiona.

As tiossemicarbazonas são compostos de considerável interesse científico, devido as suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, dentre outras (Feun, 2002; Kasuga, 2003; Teitz, 1994; Bharti, 2002; Karah, 2002).

Do ponto de vista sintético, apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, assim como sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (Tenório, 2005).

A síntese utilizada, assim como no caso das guanilhidrazonas, é descrita pela condensação equimolar de um derivado carbonilado, do tipo aldeído ou cetona, com tiossemicarbazidas em meio alcoólico sob refluxo. Esta reação é bastante conhecida por sua alta quimiosseletividade, versatilidade e rapidez, apresentando geralmente altos rendimentos (Esquema 7, pág. 49) (Holla, 2003; Sarodnick, 2003).



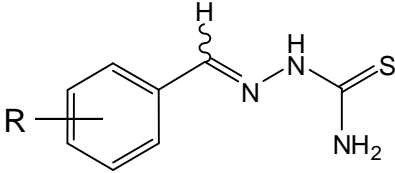
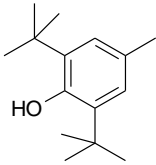
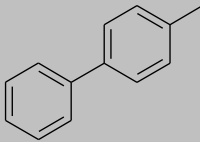
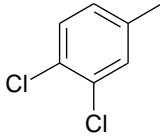
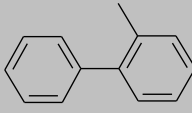
Esquema 7. Esquema geral da síntese das tiossemicarbazonas.

O mecanismo reacional é semelhante ao de formação das guanilhidrazonas. Inicia-se com a protonação do oxigênio da carbonila para formar o intermediário íon oxônio, seguida de ataque nucleofílico do nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida para formar o intermediário hemiaminal protonado. Este perde uma molécula de água e, após neutralização, forma-se a tiossemicarbazona (Esquema 6, pág 36).

O progresso das reações foi acompanhado através de placas de cromatografia em camada delgada onde observou-se o desaparecimento total ou parcial do produto de partida. As tiossemicarbazonas foram numeradas como **10a**, **14a**, **17a** e **19a**. Foram obtidas como produtos cristalinos após resfriamento à temperatura ambiente e adição de um solvente apropriado: hexano para a substância **10a** e acetato de etila para as demais.

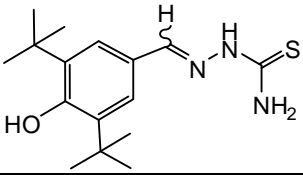
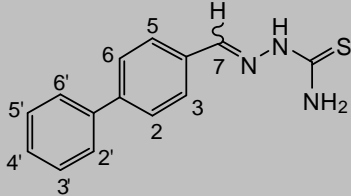
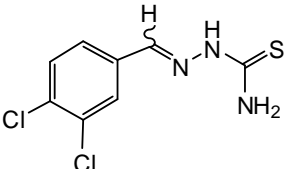
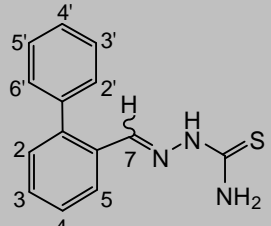
A metodologia utilizada demonstrou-se eficaz e forneceu os produtos com elevados rendimentos para as quatro tiossemicarbazonas (entre 90% e 100%) (Tabela 6, pág. 50).

Tabela 6. Rendimentos e tempos reacionais da síntese das tiossemicarbazonas.

			
	R	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)
10a		5	100
14a		6	97
17a		6	90
19a		7	95

Foi verificada a formação dos derivados tiossemicarbazona pelos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , sinais característicos, como os sinais referentes aos hidrogênios imínicos em torno de δ 8,0, além dos hidrogênios aromáticos, e demais. Na análise de RMN ^{13}C é característica o sinal do carbono da tiona em torno de δ 175,0, além da exata quantidade de carbonos (C, CH, CH_2 e CH_3 , quando presentes) (Tabela 7, pág. 51).

Tabela 7. Dados de RMN ^1H das tiossemicarbazonas.

	Substância	RMN ^1H		
		^1H imínico	^1H aromáticos (J em Hz)	Demais ^1H
10a		7,96 (s, 1H)	2 e 6: 7,42 (s, 2H)	CH_3 : 1,38 (s, 18H)
14a		8,08 (s, 1H)	2'-6': 7,46 (m, 5H) 2 e 6: 7,70 (d, 2H, $J=8,0$) 3 e 5: 7,88 (d, 2H, $J=8,0$)	
17a		7,98 (s, 1H)	5: 7,62 (d, 1H, $J=8,0$) 6: 7,70 (dd, 1H, $J=8,0$ e 2,0) 2: 8,22 (d, 2H, $J=2,0$);	
19a		8,07 (s, 1H)	2'-6': 7,46 (m, 5H) 2-5: 7,30 (m, 4H)	

Após a síntese das tiossemicarbazonas, estas foram submetidas a avaliação da atividade citotóxica para verificar qual a relação entre as modificações moleculares, e a atividade biológica.

4.4. Avaliação farmacológica das tiossemicarbazonas

Como mencionado anteriormente, as tiossemicarbazonas pertencem a uma classe de substâncias bastante conhecidas por suas aplicações importantes na pesquisa de novos fármacos, em função de seu largo espectro de ação. Alguns autores atribuem esta propriedade à alta afinidade que as tiossemicarbazonas apresentam pela enzima ribonucleotídeo redutase, responsável pelo passo crucial na síntese do DNA e, conseqüentemente, da divisão celular (Louie, 1999; Cory, 1988).

Entretanto, a análise de citotoxicidade pelo método do MTT das tiossemicarbazonas demonstrou uma perda de atividade citotóxica, o que

demonstra a importância da região guanidínica para a referida atividade biológica.

A atividade citotóxica das substâncias (**10a**, **14a**, **17a** e **19a**) está apresentada na Tabela 8, com seus respectivos percentuais de inibição. As substâncias com valores de inibição $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais testadas são utilizadas para avaliações subsequentes, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral. No entanto, nenhuma das substâncias apresentou valores de inibição $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens (Figura 7, pág. 52; Tabela 8, pág. 52).

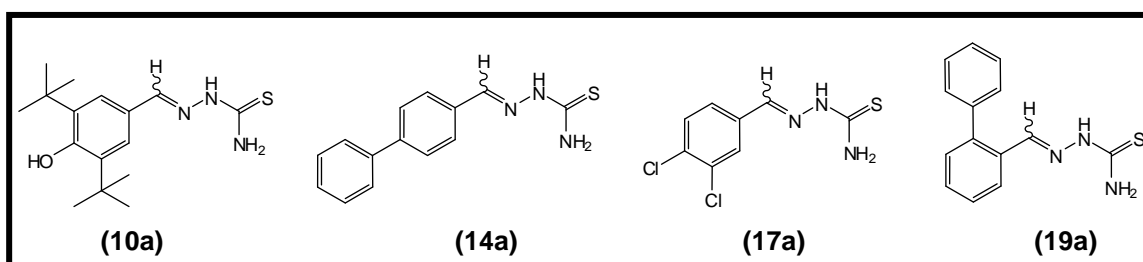


Figura 7. As quatro tiossemicarbazonas sintetizadas e avaliadas quanto à citotoxicidade *in vitro* em células tumorais.

Tabela 8. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das tiossemicarbazonas em três linhagens tumorais testadas na dose de 5 $\mu\text{g/mL}$.

Linhagem Celular	10a	14a	17^a	19a	DOX
MDAMB 435	PA	PA	PA	PA	MA
IC% (média)	(27,38%)	(36,70%)	(46,59%)	(30,80%)	(96,32%)
HCT8	PA	SA	MA	PA	MA
IC% (média)	(7,35%)		(78,59%)	(28,86%)	(97,24%)
SF295	PA	PA	PA	PA	MA
IC% (média)	(18,09%)	(27,32%)	(44,74%)	(34,85%)	(97,80%)

MDAMB-435: linhagem celular de melanoma;

HCT-8: linhagem celular tumoral de cólon;

SF-295: linhagem celular de glioblastoma.

DOX: Doxorubicina.

SA: sem atividade;

PA: pouca atividade (inibição de 1 a 50%);

Mo: atividade moderada (inibição de 50 a 75%);

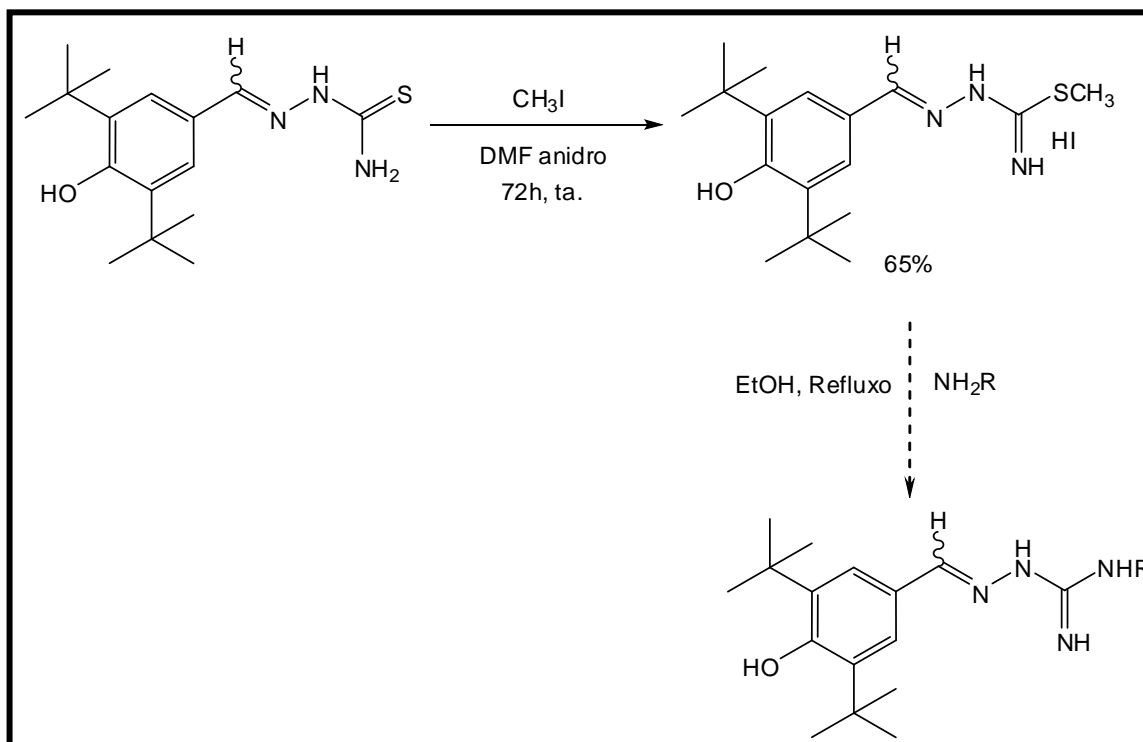
MA: muita atividade (inibição de 75 a 100%).

Deste modo, pode-se propor que a guanidina constitui um grupamento farmacofórico para as quatro guanilhidrazonas (**10**, **14**, **17** e **19**), pois uma vez

substituído (**10a**, **14a**, **17a** e **19a**) há um decréscimo substancial da atividade citotóxica (Tabela 8, pág. 52).

Neste contexto, foi iniciada uma etapa adicional de modificação molecular, não prevista inicialmente, por duas razões principais. Primeiramente, os quatro análogos mais ativos (**10**, **14**, **17** e **19**), apesar da elevada atividade citotóxica contra células tumorais, demonstraram-se pouco seletivos, apresentando níveis de citotoxicidade equivalentes em células tumorais e linfócitos humanos. Posteriormente, como visto, as modificações realizadas com o objetivo de elevar a seletividade (**10a**, **14a**, **17a** e **19a**) demonstraram-se ineficazes, pois implicaram em perda de atividade citotóxica frente a células tumorais.

Deste modo, iniciamos outras modificações moleculares no protótipo (**10**), apesar desta substância ter apresentado, em geral, as concentrações mais elevadas de CI_{50} , chegando a 2,20 $\mu\text{g/mL}$ para linhagem de leucemia promielocítica; um levantamento bibliográfico realizado previamente, utilizando o desenho molecular de cada protótipo e o programa *SciFinder Scholar*, indicou não existirem referências para o protótipo (**10**). Assim, este foi escolhido – em detrimento dos demais, ao menos em princípio - para realizar etapas adicionais de modificação molecular. Impende salientar que esta etapa constitui-se em perspectiva para trabalhos posteriores, mas já iniciados (Esquema 8, pág. 54).



Esquema 8. Síntese do derivado SCH₃ e perspectiva de obtenção dos derivados amínicos.

A síntese de protótipos modificados nesta região pode ser útil para elevar a seletividade. Para isto realizou-se a reação com iodeto de metila em DMF anidro, a temperatura ambiente, por 72 horas segundo a metodologia de Buchheit, 1995. O produto foi obtido na forma de iodeto, sendo um pó cristalino de coloração amarelada. Precipitou em Hexano:AcOEt 50%, com rendimento de 65%. Foi identificado por RMN ¹H e ¹³C onde verificou-se a presença do SCH₃ no espectro RMN ¹H em δ2,71 (s, 3H) e no espectro RMN ¹³C em 14,02.

Posteriormente, será realizada a síntese de novos análogos através da substituição do grupamento SCH₃ por aminas substituídas com grupamentos alquila ou arila. Com estas modificações poderá ser mantido o caráter amínico da região da molécula e, em razão do substituinte, elevar a lipofilidade da mesma. Estes últimos protótipos serão submetidos aos testes farmacológicos para avaliar a relação estrutura-atividade das modificações realizadas.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5. Conclusões e Perspectivas

De acordo com os resultados encontrados podemos concluir que:

- A metodologia utilizada para a síntese das guanilhidrazonas mostrou-se eficiente para as modificações propostas e apresentou ótimos rendimentos compreendidos entre 71% e 95%;
- Foram sintetizados 20 protótipos derivados da aminoguanidina (guanilhidrazonas) que foram avaliados quanto a atividade citotóxica frente a células tumorais.
- Destes vinte, quatro substâncias (**10**, **14**, **17** e **19**) apresentaram elevada atividade citotóxica, compreendidas entre 92% e 100%, e CI_{50} abaixo de 4 μ g/mL.
- A avaliação frente a linfócitos humanos saudáveis demonstrou que estas substâncias (**10**, **14**, **17** e **19**) não são seletivas, apresentando frente a estas células perfil de citotoxicidade semelhante ao apresentado frente as células cancerígenas.
- A modificações estruturais feitas na região da amina, que levou a obtenção das tiossemicarbazonas (**10a**, **14a**, **17a** e **19a**), demonstrou diminuição na atividade citotóxica frente a células cancerígenas, o que evidencia a importância da região da guanidina como um farmacóforo importante para a atividade antineoplásica;
- Os derivados sintetizados poderão ser utilizados para avaliação da atividade citotóxica frente a outras linhagens celulares tumorais, ampliando o espectro de ação dos mesmos.
- Serão necessários outros ensaios para elucidar o mecanismo pelo qual estas substâncias atuam;
- Outras modificações estruturais já estão em fase de realização, visando a diminuição da citotoxicidade frente a células saudáveis, e a manutenção da citotoxicidade contra células tumorais, elevando a seletividade;
- Tendo em vista o amplo espectro de atividades descrito na literatura para estas duas classes de substâncias, outras atividades biológicas já estão sendo avaliadas;

6. EXPERIMENTAL

6. Experimental

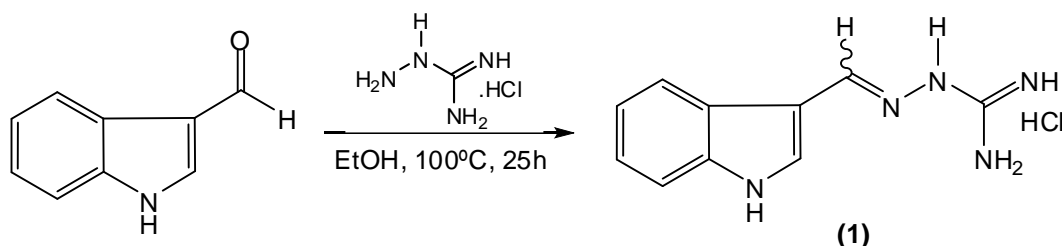
Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas e no Laboratório de Oncologia Experimental, na Universidade Federal do Ceará.

6.1 Especificações dos materiais e equipamentos

- Todas as vidrarias utilizadas foram previamente limpas e secas em estufa a 150 °C por 24 horas.
- Nas reações e demais metodologias químicas foram utilizados solventes PA;
- Para a evaporação dos solventes foram utilizados evaporadores rotatórios, da marca BÜCHI (modelo RE-114V);
- Para as cromatografias em camada delgada analítica (CCDA - 0,25mm) utilizaram-se placas Merck, sílica gel 60 F₂₅₄;
- Os cromatogramas foram revelados em lâmpada UV da SPECTROLINE, modelo ENF-260 CIF, em comprimentos de onda de 254 e 366 nm;
- Os espectros de RMN (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz) foram obtidos em espectrômetros da BRUKER DPX-500 (ETTLINGER, ALEMANHA), no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFAL. Sinal residual do solvente não deuteroado ou o TMS foi utilizado como referência interna;
- Os dados de RMN foram processados através do programa NMRNotebook versão 2.50.
- Os reagentes foram pesados em balança eletrônica analítica (Modelo AX 200 Shimadzu);
- Para solubilização das substâncias foi utilizado ultrassom da marca Unique.
- Para as sínteses foi utilizada placa da marca IKA® C-MAG HS 7, com termômetro IKA® ETS-D5 acoplado;
- As estruturas químicas, as reações e os esquemas foram desenhados utilizando os programas ChemDraw Ultra® Versão 10.0 e MDL ISIS™/Draw versão 2.5;

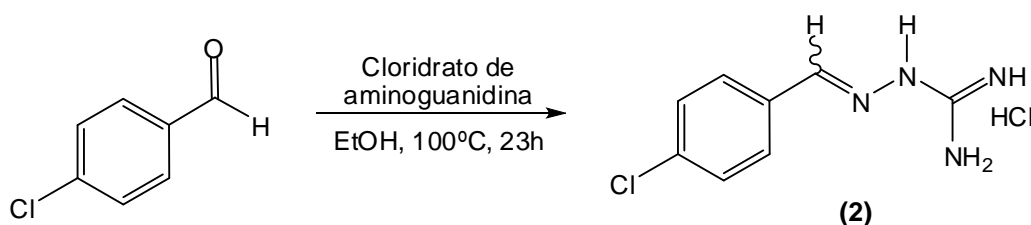
- A análise bioestatística da avaliação farmacológica foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism®;

6.1.1 Obtenção do Indol-3-carboxialdeídoguanilhidrazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2000 g (1,3778 mmol) do Indol-3-carboxialdeído e 0,1522 g (1,3778 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA e uma barra magnética. A mistura reacional obtida foi levada a refluxo durante 25 horas a 100 °C. A confirmação de consumo dos reagentes foi realizada por meio de placas cromatográficas de camada delgada (CCDA). O solvente foi retirado com evaporador rotatório e o material suspenso em AcOEt. Ao adicionar AcOEt ocorreu a precipitação do produto. Após trituração o precipitado foi filtrado em funil de buchner/kitassato com papel filtro sob pressão negativa e acondicionado em frasco de vidro pesado. Foi obtido 0,2311 g da substância 1 (0,9723 mmol) com rendimento de 71%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7,12(t, 1H, *J*=7,2Hz); 7,19 (t, 1H, *J*=7,2Hz); 7,45 (d, 1H, *J*=7,2Hz); 7,8 (s, 1H); 8,28 (d, 1H, *J*=7,2); 8,36 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 121,23; 122,75; 123,27; 124,31; 132,24; 137,51; 145,35; 155,20.

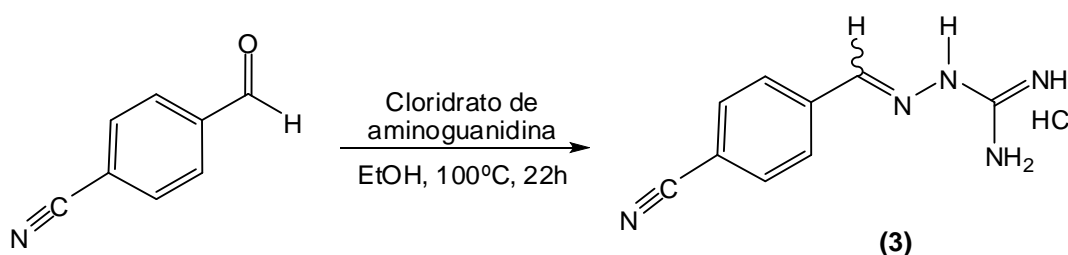
6.1.2 Obtenção da 4-Clorobenzaldeídoguanilhidrazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2003 g (1,4249 mmol) do 4-Clorobenzaldeído e 0,1579 g (1,4249 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 23 horas a uma temperatura de 100 °C. A

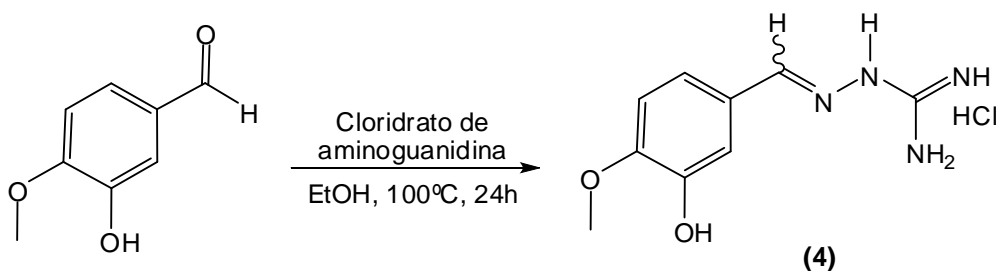
confirmação de consumo dos reagentes foi realizada por meio de placas cromatográficas de camada delgada (CCDA). Evaporou-se o EtOH, o material apresentou aspecto oleoso e incolor. Foi suspenso em AcOEt ocorrendo a formação de precipitado que foi filtrado conforme a metodologia padrão. Foi obtido 0,2369 g da substância **2** (1,0163 mmol) com rendimento de 71%. **RMN** ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7,45(d, 2H, $J=8,5\text{Hz}$); 7,85 (d, 2H, $J=8,5\text{Hz}$); 8,15 (s, 1H). **RMN** ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 129,23; 129,70; 132,81; 135,43; 146,01; 155,83.

6.1.3 Obtenção da 4-Formilbenzonitrilguanilhidrazona



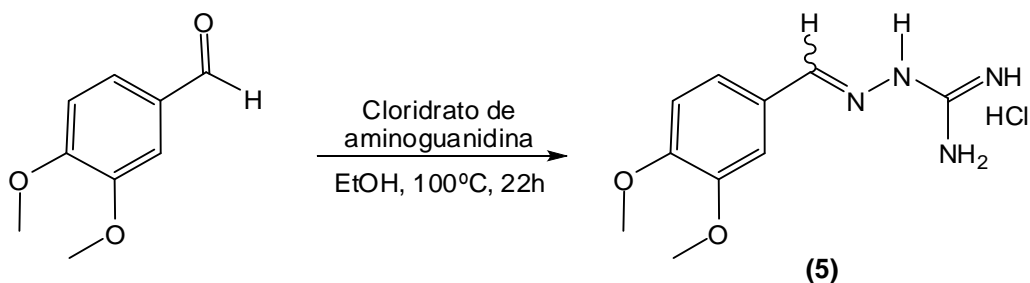
Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,0212 g (1,5267 mmol) do aldeído 4-Formilbenzonitrila e 0,1687 g (1,5267 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 22 horas a uma temperatura de 100 °C. Cerca de 30 minutos após a adição do EtOH observou-se a formação de um precipitado branco. Após 22 horas apresentavam-se ainda como uma suspensão. A CCDA indicou o término da reação. Foi dado sequência ao procedimento para a separação do produto sem a necessidade de evaporar o EtOH pois já havia precipitado. Assim, o produto foi logo filtrado em funil de buchner/kitassato sendo lavado com AcOEt. A suspensão foi então filtrada novamente e o produto acondicionado em frasco de vidro pesado. Foi obtido 0,3023 g da substância **3** (1,3515 mmol) com rendimento de 88%. **RMN** ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7,87(d, 2H, $J=8,5$); 8,04 (d, 2H, $J=8,5\text{Hz}$); 8,24 (s, 1H,). **RMN** ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 112,67; 119,11; 128,60; 133,02; 138,30; 145,36; 155,89.

6.1.4 Obtenção da 3-Hidroxi-4-metoxibenzaldeído-guanilhidrazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2002 g (1,2654 mmol) do 3-Hidroxi-4-metoxibenzaldeído e 0,1399 g (1,2654 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 40 horas a uma temperatura de 100 °C. O produto, após a evaporação, apresentou aspecto oleoso e coloração amarelada. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração do sólido obtido. A princípio não precipitou, mas após alguns minutos triturando com espátula foi possível perceber que haveria a formação do precipitado, que se formou completamente após mais alguns minutos. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2857 g da substância **4** (1,1676 mmol) com rendimento de 92%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 3,79 (s, 3H); 6,95 (d, 1H, *J*=8,3); 7,18 (dd, 1H, *J*=8,3Hz e 2,0Hz); 7,33 (d, 1H, *J*=2,0Hz) 8,04 (s, 1H,). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 56,11; 112,05; 113,81; 121,09; 126,63; 147,06; 147,62; 150,49; 155,61.

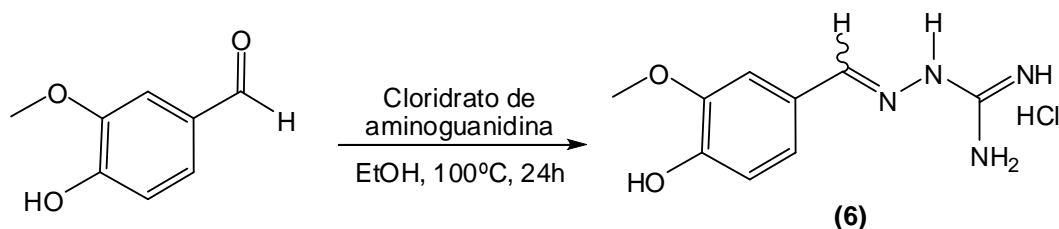
6.1.5 Obtenção da 3,4-Dimetoxibenzaldeído-guanilhidrazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2003 g (1,2053 mmol) do 3,4-Dimetoxibenzaldeído e 0,1332 g (1,2053 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 22 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração.

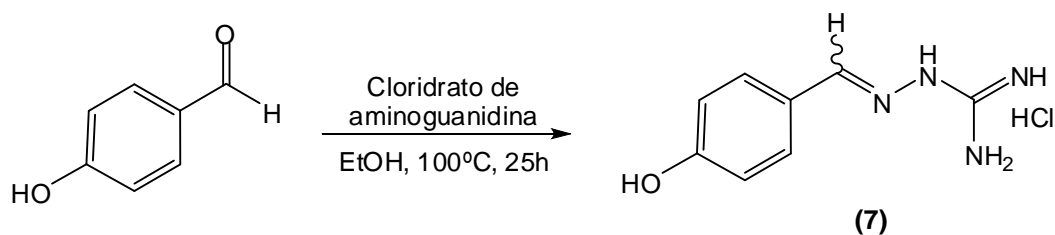
Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2889 g da substância **5** (1,1167 mmol) com rendimento de 93%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 3,80 (s, 6H); 6,97(d, 1H, *J*=7,9); 7,23 (d, 1H, *J*=7,9Hz); 7,54 (s, 1H) 8,09 (s, 1H,). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 109,17; 111,60; 123,09; 126,53; 147,39; 149,51; 151,47; 155,63; 155,70; 56,16.

6.1.6 Obtenção da 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeídoguanilhidrazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2009 g (1,3204 mmol) do 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeído e 0,1460 g (1,3204 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 24 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,3175 g da substância **6** (1,2976 mmol) com rendimento de 98%. **RMN ¹H** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 3,81 (s, 3H); 6,83(d, 1H, *J*=8,0); 7,13 (dd, 1H, *J*=8,0Hz e 1,8Hz); 7,50 (1,8, 1H); 8,04 (s, 1H,). **RMN ¹³C** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 56,24; 110,08; 115,67; 123,18; 125,22; 147,74; 148,51; 149,78; 155,52.

6.1.7 Obtenção da 4-Hidroxibenzaldeídoguanilhidrazona

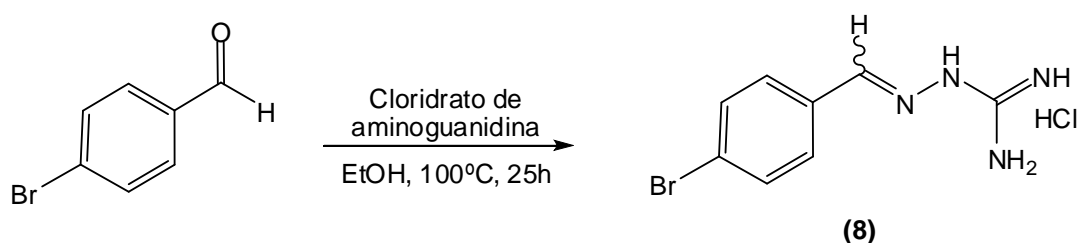


Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2009 g (1,6451 mmol) do 4-Hidroxibenzaldeído e 0,1819 g (1,6451 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 25 horas a uma temperatura de 100 °C. A

CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,3357 g da substância **7** (1,5639mmol) com rendimento de 95,06%.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 6,83 (d, 2H, *J*= 8,5); 7,66 (d, 2H, *J*=8,5); 8,06 (s, 1H,). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 116,06; 124,79; 129,85; 147,52; 155,62; 160,28.

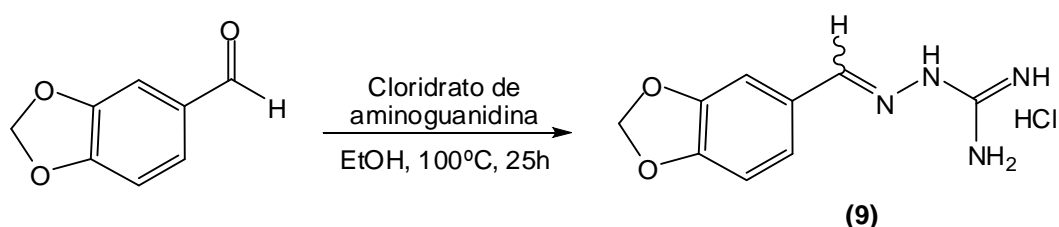
6.1.8 Obtenção da 4-Bromobezaldeídoguanilhidrazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2006 g (1,0842 mmol) do 4-Bromobenzaldeído e 0,1199 g (1,0842 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 25 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2506 g da substância **8** (0,9029 mmol) com rendimento de 83%.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7,63 (d, 2H, *J*= 8,5); 7,81 (d, 2H, *J*=8,5); 8,17 (s, 1H,). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 124,31; 129,93; 132,15; 133,15; 146,11; 155,79.

6.1.9 Obtenção da Piperonalguanilhidrazona

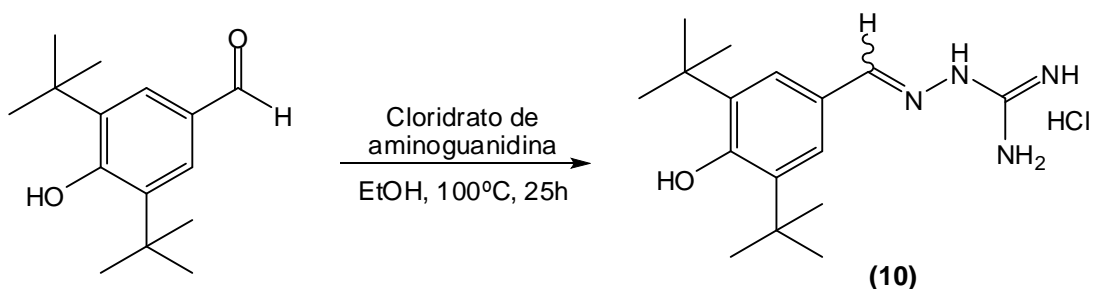


Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2003 g (1,3321 mmol) do Piperonal e 0,1473 g (1,3321 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 25 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término

da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2632 g da substância **9** (1,0846 mmol) com rendimento de 81%.

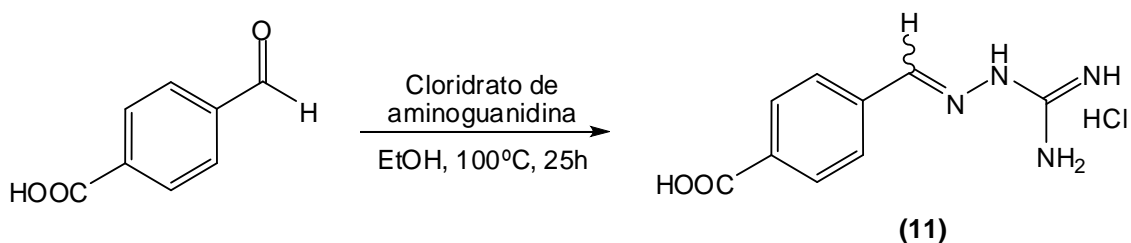
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 6,05 (s, 2H); 6,94 (d, 1H, *J*=8,0); 7,17 (dd, 1H, *J*=8,0Hz e 1,6Hz); 7,64 (d, 1H, *J*=1,6Hz); 8,07 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 102,03; 105,94; 108,65; 124,80; 128,37; 146,83; 148,45; 149,80; 155,74.

6.1.10 Obtenção da 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzaldeídoguanilhidrazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2000 g (0,8535 mmol) do 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzaldeído e 0,0944 g (0,8535 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 25 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se Hexano e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt:Hexano 50%. Obteve-se 0,2379 g da substância **10** (0,7283 mmol) com rendimento de 85%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,38 (s, 18H); 7,50 (s, 2H); 8,09 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 30,69; 35,01; 124,99; 139,66; 148,96; 155,53; 156,98.

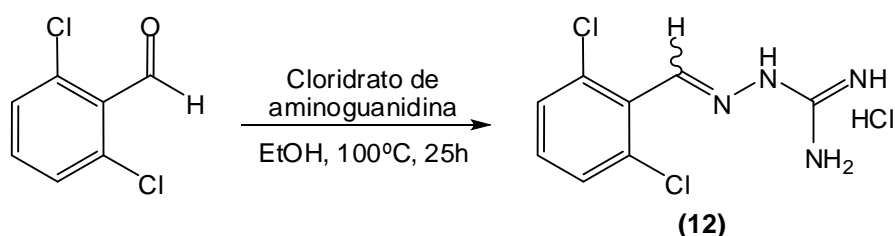
6.1.11 Obtenção da 4-Carboxibenzaldeídoguanilhidrazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2003 g (1,3321 mmol) do 4-Carboxibenzaldeído e 0,1473 g (1,3321 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura

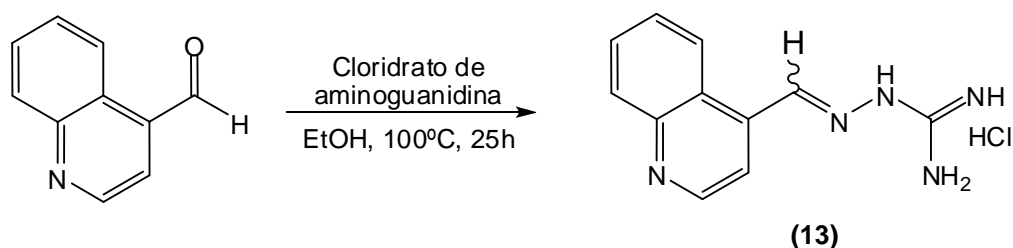
reacional foi levada a refluxo por 25 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2308 g da substância **11** (0,9486 mmol) com rendimento de 71%. **RMN** ¹H (100 MHz, DMSO-*d*₆): 7,90 (s, 4H); 8,20 (s, 1H). **RMN** ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 128,07; 130,01, 132,45, 137,86; 146,18; 155,84; 167,36.

6.1.12 Obtenção da 2,6-Diclorobenzaldeídoguanilhidrazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2005 g (1,1428 mmol) do 2,6-Diclorobenzaldeído e 0,1263 g (1,1428 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 25 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2725 g da substância **12** (1,0185 mmol) com rendimento de 89%. **RMN** ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7,45 (m, 1H); 7,57 (d, 2H, *J*=7,9); 8,42 (s, 1H). **RMN** ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): 129,56; 130,01; 132,18; 134,53; 142,99; 155,78.

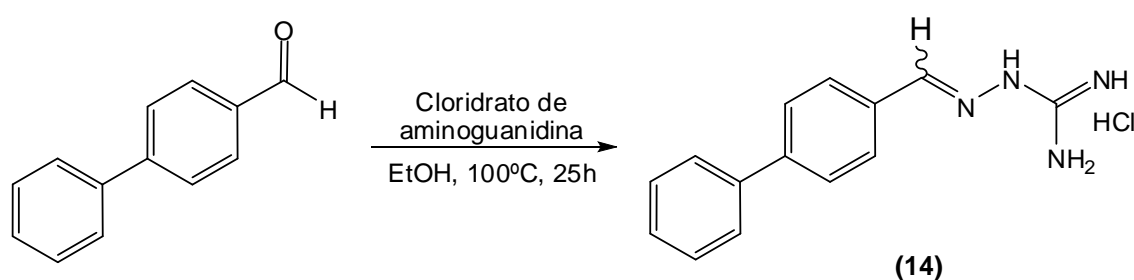
6.1.13 Obtenção da 4-Quinolinacarboxibenzaldeídoguanilhidrazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2001 g (1,2725 mmol) do 4-Quinolinacarboxibenzaldeído e 0,1407 g (1,2725 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 25 horas a uma temperatura de 100

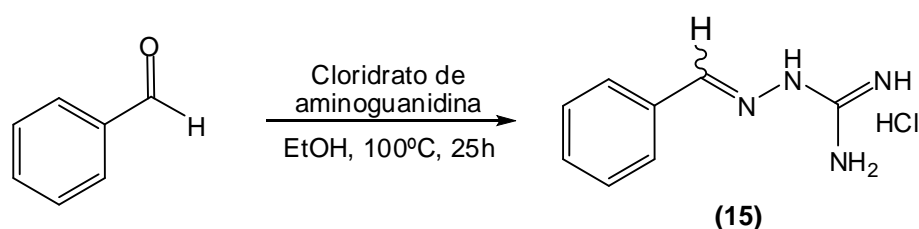
°C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2808 g da substância **13** (1,1534 mmol) com rendimento de 91%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7,72 (t, 1H, *J*=7,5); 7,84 (t, 1H, *J*=7,5); 8,09 (d, 1H, *J*=8,2); 8,40 (d, 1H, *J*=8,2); 8,18 (d, 1H, *J*=4,3); 8,98 (d, 1H, *J*=4,3); 9,05 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 119,08; 123,89; 125,31; 128,12; 130,14; 130,29; 137,09; 143,47; 148,70; 150,61; 155,77.

6.1.14 Obtenção da 4-Bifenilcarboxialdeídoguanilhidrazona



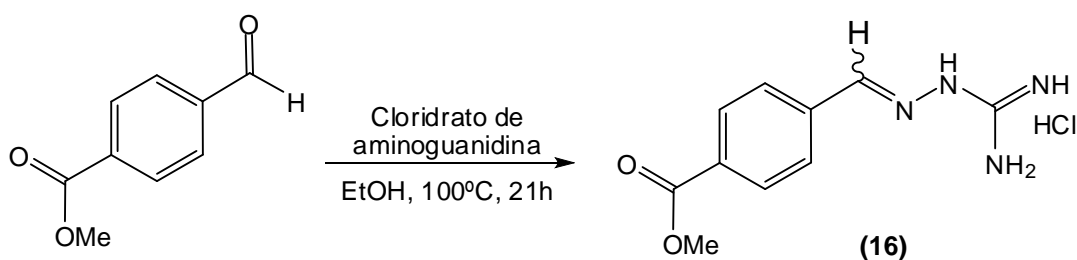
Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2003 g (1,0976 mmol) do 4-Bifenilcarboxialdeído e 0,1213 g (1,0976 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 25 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2706 g da substância **14** (0,9849 mmol) com rendimento de 90%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7,47 (m, 5H); 7,74 (d, 2H, *J*=8,4); 7,94 (d, 2H, *J*=8,4); 8,24 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 127,20; 127,35; 128,44; 128,68; 129,51; 132,94; 139,68; 142,41; 146,95; 155,79.

6.1.15 Obtenção da Benzaldeídoguanilhidrazona



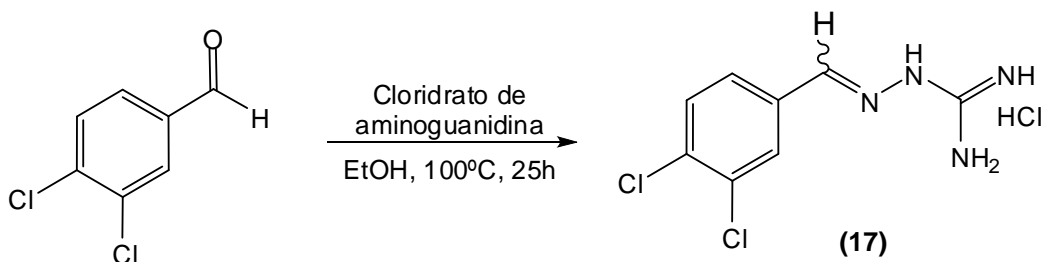
Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2000 g (1,8847 mmol) do Bezaldeído e 0,2083 g (1,8847 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 25 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,3333 g da substância **15** (1,6777 mmol) com rendimento de 89%. **RMN** ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7,43 (m, 3H); 7,84 (m, 2H); 8,19 (s, 1H). **RMN** ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 128,03; 129,17; 130,99; 133,81; 147,35; 155,80.

6.1.16 Obtenção da Metil-4-formilbenzoatoguanilhidrazona



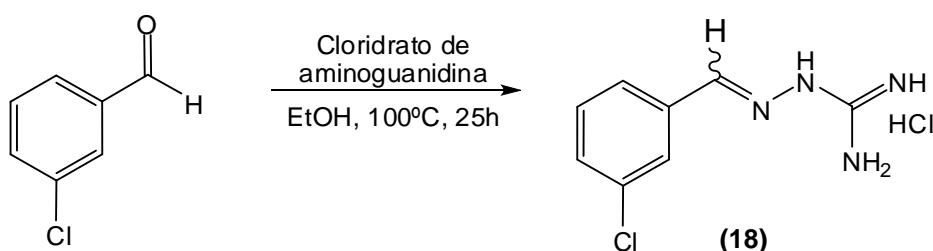
Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2001 g (1,2183 mmol) do 4-Metilformilbenzoato e 0,1347 g (1,2183 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 21 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2885 g da substância **16** (1,12397 mmol) com rendimento de 92%. **RMN** ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 3,84 (s, 3H); 7,98 (s, 4H); 8,25 (s, 1H). **RMN** ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 52,79; 128,19; 129,87; 131,21; 138,25; 146,08; 155,82; 166,30.

6.1.17 Obtenção da 3,4-Diclorobenzaldeídoguanilhidrazona



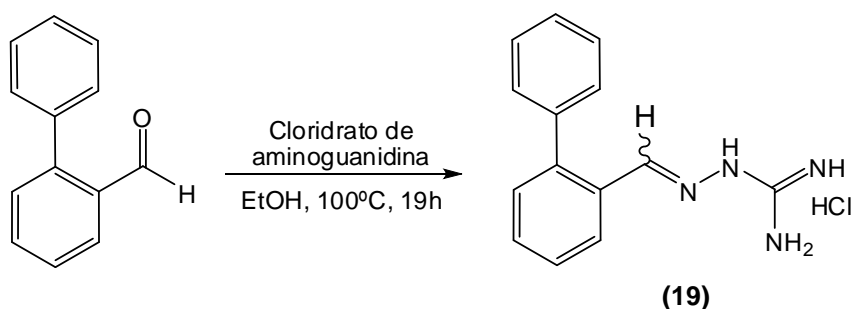
Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2003 g (1,1427 mmol) do 3,4-Diclorobenzaldeído e 0,1263 g (1,1427 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 25 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2823 g da substância **17** (1,0551 mmol) com rendimento de 92%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7,68 (d, 1H, *J*=8,4); 7,79 (dd, 1H, *J*=8,4 e 2,0); 8,24 (d, 1H, *J*=2,0); 8,16 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 128,45; 129,02; 131,33; 132,25; 133,13; 134,66; 144,75; 155,81.

6.1.18 Obtenção da 3-Clorobenzaldeídoguanilhidrazona



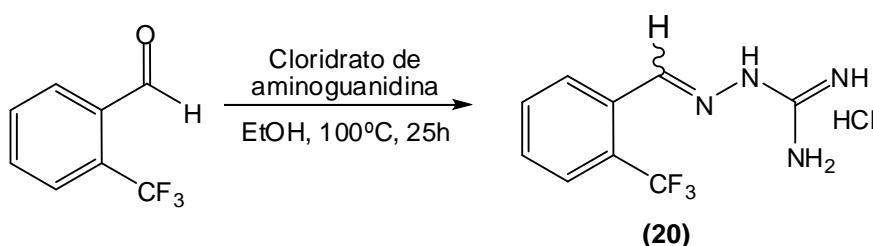
Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2003 g (1,4228 mmol) do 3-Clorobenzaldeído e 0,1573 g (1,4228 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 22 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,3015 g da substância **18** (1,2934 mmol) com rendimento de 93%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7,47 (m, 2H); 7,74 (d, 1H, *J*=8,0); 8,06 (s, 1H); 8,17 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 126,84; 127,30; 130,58; 131,04; 134,19; 136,05; 145,79; 155,81.

6.1.19 Obtenção da 2-Bifenilcarboxialdeídoguanilhidrazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2000 g (1,0977 mmol) do 2-Bifenilcarboxialdeído e 0,1214 g (1,0977 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 19 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2761 g da substância **19** (1,0049 mmol) com rendimento de 92%. **RMN** ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7,36 (m, 5H); 7,49 (m, 4H); 8,06 (s, 1H). **RMN** ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 126,84; 127,30; 130,58; 131,04; 134,19; 136,05; 145,79; 155,81.

6.1.20 Obtenção da 2-(trifluorometil)benzaldeídoguanilhidrazona

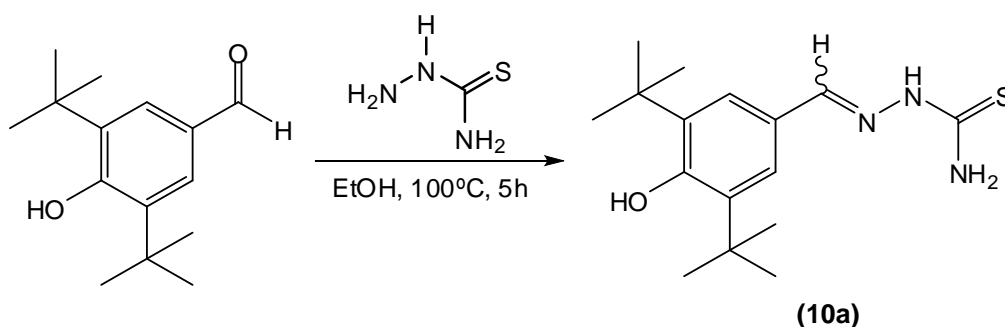


Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,2003 g (1,1486 mmol) do 2-Trifluorometilbenzaldeído e 0,1270 g (1,1486 mmol) do cloridrato de aminoguanidina. Posteriormente foi adicionado 5 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 22 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Adicionou-se AcOEt e fez-se a trituração. Foi filtrado e lavado com AcOEt. Obteve-se 0,2694 g da substância **20** (1,0104 mmol) com rendimento de 88%. **RMN** ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 7,60 (t, 2H, $J=7,8$); 7,70 (d, 1H, $J=7,8$); 8,12 (d, 1H, $J=7,8$); 8,21 (s, 1H); 8,31 (s, 1H). **RMN** ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 124,17; 125,83; 127,15; 130,29; 132,20; 134,95; 145,92; 123,12; 155,74.

6.2 Obtenção das tiossemicarbazonas

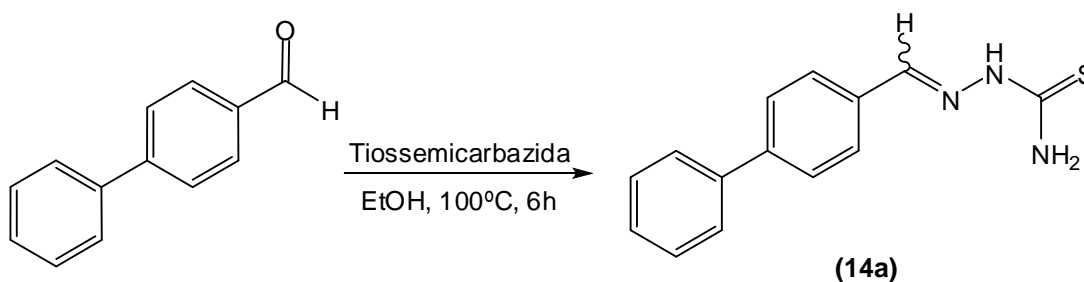
A partir dos protótipos guanilhidrazonas que apresentaram os melhores resultados farmacológicos, utilizamos os respectivos aldeídos que originaram tais compostos para realização da síntese das tiossemicarbazonas.

6.2.1 Obtenção da 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzaldeídotiossemicarbazona



Em um balão monocolo de 125 mL foram adicionados 2,5000 g (10,6683 mmol) do 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzaldeído e 0,9723 g (10,6683 mmol) da tiossemicarbazida. Posteriormente foi adicionado 20 mL de EtOH PA. A mistura reacional foi levada a refluxo por 5 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Ocorreu a precipitação do produto ao adicionar hexano. Foi filtrado e lavado com hexano. Obteve-se 3,2709 g da substância **10a** (10,6677 mmol) com rendimento quantitativo de 100%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,38 (s, 18H); 7,42 (s, 2H); 7,96 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 30,68; 34,99; 124,56; 125,69; 139,65; 144,70; 156,51; 177,67.

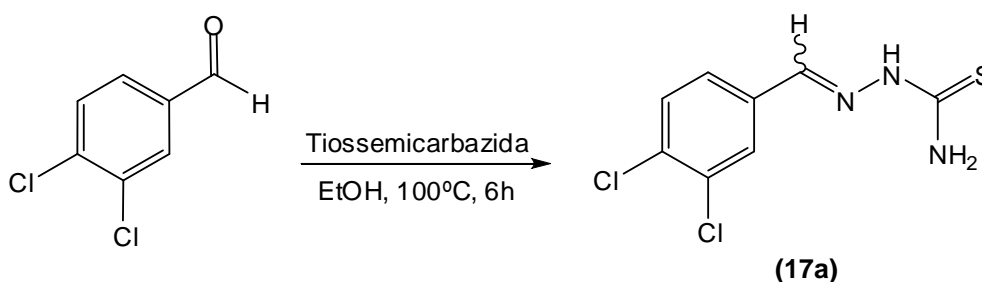
6.2.2 Obtenção da 4-Bifenilcarboxialdeídotiossemicarbazona



Em um balão monocolo de 125 mL foram adicionados 2,5000 g (13,7197 mmol) do 4-Bifenilcarboxialdeído e 1,2504 g (13,7197 mmol) da tiossemicarbazida. Posteriormente foi adicionado 20 mL de EtOH PA. A mistura

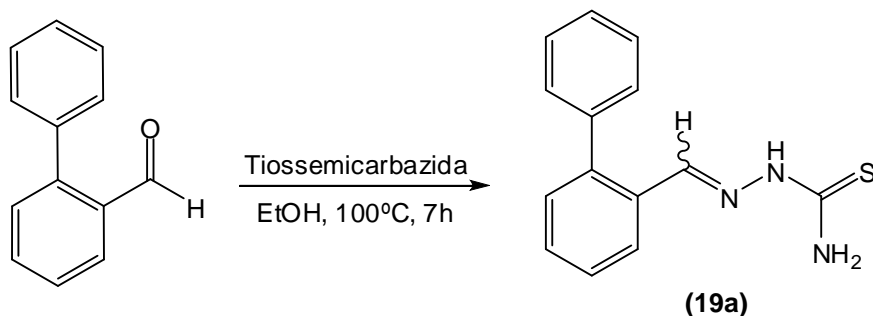
apresentou-se como uma suspensão com precipitado branco. O material foi levado a refluxo por 6 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Como já estava precipitado não foi utilizado outro solvente para precipitação, sendo o material diretamente filtrado. Obteve-se 3,4108 g da substância **14a** (13,3853 mmol) com rendimento de 98%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7,46 (m, 5H); 7,70 (d, 2H, *J*=8,0); 7,88 (d, 2H, *J*=8,0); 8,08 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 127,33; 128,32; 128,39; 129,50; 133,74; 139,81; 141,77; 142,40; 127,13; 178,34.

6.2.3 Obtenção da 3,4-Diclorobenzaldeídotiossemicarbazona



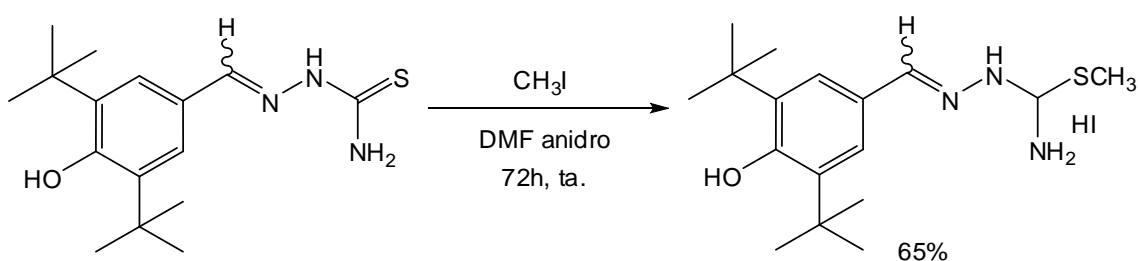
Em um balão monocolo de 125 mL foram adicionados 2,5000g (14,2841 mmol) do 3,4-Diclorocarboxialdeído e 1,3019g (14,2841 mmol) da tiossemicarbazida. Posteriormente foi adicionado 20 mL de EtOH PA. O material foi levado a refluxo por 6 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Como já estava precipitado não foi utilizado outro solvente para precipitação, sendo o material diretamente filtrado. Obteve-se 3,1953 g da substância **17a** (12,8770 mmol) com rendimento de 90 %. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7,62 (d, 1H, *J*=8,0); 7,70 (dd, 1H, *J*=8,0 e 2,0); 8,22 (d, 2H, *J*=2,0); 7,98 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 128,23; 128,62; 131,22; 132,25; 132,34; 135,52; 139,97; 178,63.

6.2.4 Obtenção da 2-Bifenilcarboxialdeídotiossemicarbazona



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 0,6000 g (3,2927 mmol) do 2-Bifenilcarboxialdeído e 0,3001 g (3,2927 mmol) da tiossemicarbazida. Posteriormente foi adicionado 20 mL de EtOH PA. O material foi levado a refluxo por 7 horas a uma temperatura de 100 °C. A CCDA indicou o término da reação. Como já estava precipitado não foi utilizado outro solvente para precipitação, sendo o material diretamente filtrado. Obteve-se 0,8022 g da substância **19a** (3,1417 mmol) com rendimento de 95%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 7,46 (m, 5H); 7,30 (m, 4H); 8,07 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 126,59; 127,94; 128,04; 128,94; 130,08; 130,17; 130,68; 131,74; 139,45; 141,84; 142,45; 178,25.

6.3 Obtenção do derivado SCH₃



Em um balão monocolo de 50 mL foram adicionados 1,1500 g (3,7403 mmol) do 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzaldeídotiossemicarbazona (10a) e 0,8 mL de iodeto de metila. Posteriormente foi adicionado 3mL de DMF anidro e uma barra de agitação magnética, em atmosfera inerte (N₂). O material foi deixado sob agitação em temperatura ambiente por 72h, incluindo-se, a cada 24 horas o mesmo número de mols de iodometano. O DMF foi evaporado em evaporador rotatório. Precipitou em Hex:AcOEt 50%, sendo lavado durante a

filtragem em AcOEt. Forneceu 1,0850g do produto (2,4143mmol), com rendimento de 65%. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1,38 (s, 18H); 2,71 (s, 3H); 7,58 (s, 2H); 8,24 (s, 1H). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-*d*₆): 14,02; 30,59; 24,00; 35,00; 126,05; 139,67; 154,23; 158,09; 165,38.

6.4 Ensaios Biológicos

6.4.1 Citotoxicidade *in vitro* em células tumorais

As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (Glioblastoma – humana) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Para o *screening* os resultados foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança a partir da regressão não linear no programa GraphPad Prism. Cada amostra foi testada em duplicata em dois experimentos independentes. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (Mo, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%). Já para o cálculo de CI₅₀ os dados foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular, também usando o programa GraphPad Prism.

A citotoxicidade das substâncias foi avaliada pelo método do MTT (Mosman, 1983). As células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades nas seguintes densidades: 0,7 x 10⁵ (HCT-8), 0,1 x 10⁶ (SF-295) e 0,1 x10⁶ (MDAMB-435). As amostras foram adicionadas e as placas foram incubadas por 72 h em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Estas foram testadas em uma única concentração (5 µg/mL). Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas, e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 mL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 mL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Doxorrubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo.

6.4.2 Determinação da CI_{50}

As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano); e SF-295 (Glioblastoma – humana) e HL60 (leucemia promielocítica) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO_2 .

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ células/mL para as linhagens MDA-MB435 e SF-295, $0,3 \times 10^6$ para a linhagem HL-60 e $0,7 \times 10^5$ para HCT-8. Em seguida foram adicionadas as amostras numa concentração variando de 0,001 a 5 $\mu\text{g/mL}$, e as placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas, e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 μL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 μL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

6.4.3 Citotoxicidade *in vitro* em linfócitos humanos

Os linfócitos humanos utilizados foram isolados de sangue coletado de voluntários sadios e cultivados em meio RPMI 1640, suplementados com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e 2% de fitohemaglutinina mantidos em estufa a 37° C e atmosfera contendo 5% de CO_2 .

Para o isolamento dos linfócitos, foram coletados 5 mL de sangue de voluntários sadios em tubos contendo heparina. O sangue foi lavado com tampão fosfato (PBS) e os linfócitos foram isolados por gradiente de densidade usando Ficoll (Histopaque). Os linfócitos foram plaqueados (placa de 96 poços) na concentração de $2,0 \times 10^6$ células/poço e mantidos sob incubação por 48h a 37°C e 5% CO_2 .

As substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas em série em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,048-25 $\mu\text{g/mL}$) e adicionadas (100 μL /poço) às placas contendo os linfócitos. Após um período de incubação de 72h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500rpm/15

minutos. O sobrenadante foi aspirado e adicionaram-se 150 μ L de solução de MTT 10% em RPMI, sendo a placa colocada na estufa a 5% de CO₂ por 3h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000rpm/ 10 minutos, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuscitado em 150 μ L de DMSO e agitado por 30 minutos, até completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placa a um comprimento de onda de 595nm.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O cálculo das CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos desvios foram realizados a partir da regressão não-linear no programa GraphPad Prism (versão 4). Cada amostra foi analisada a partir de dois experimentos realizados em duplicata.

Referências Bibliográficas

- AFRASIABI, Z.; SINN, E.; PADHYE, S.; DUTTA, S.; PADHYE, S.; NEWTON, C.; ANSON, C. E.; POWELL, A. K.; **J. Inorg. Biochem**, v.95, p.306, 2003.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.118-129, 2005.
- ANDREANI, A.; LEONI, A.; LOCATELLI, A.; MORIGI, R.; RAMBALDI, M.; RECANATINI, M.; GARALIENE, V. Potential antitumor agents. Part 29: Synthesis and potential coanthracyclinic activity of imidazo[2,1-b]thiazole guanylhydrazones. **Bioorg. Med. Chem**, v.8, n.9, p.2359–2366, 2000.
- ANTONINI, I.; CLAUDI, F.; CRISTALLI, G.; FRANCHETTI, P.; GRIFANTINI, M.; MARTELLI, S.; **J. Med. Chem.** v.24, p.1181 1981.
- ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. et al. Sequential regio and chemoselective crosscoupling reactions by means of O6-tri-isopropylsulfonate of 4-bromo-pyridazine 3,6-dione. **Tetrahedron letters**, v. 47, p.6125-6128, 2006.
- ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. et al. Synthesis of regiospecifically polysubstituted pyridazinones. **Tetrahedron letters**, v. 48, p. 7817-7820, 2007.
- BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos na produção de medicamentos. **Química nova**, v.14, n. 3, p.169-178, 1991.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Ed. ArtMed. Porto Alegre, 2001.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Ed. ArtMed. Porto Alegre, 2008.
- BARREIRO, E. J.; A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo **Rev. Virtual Quim.**, v.1, n., p.26-34, 2009.
- BENDERITTER, P. et al. 2-Amino-6-iodo-4-tosyloxypyrimidine: a versatilekey intermediate for regioselective functionalization of 2-

- aminopyrimidines in 4- and 6-positions. **Tetrahedron**, v.63, p.12465-12470, 2007
- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4: 14-19, 1996.
 - BHARTI, N.; HUSAIN, K.; GARZA, M. T. G.; VEGA, D. E. C.; GARZA, J. C.; CARDENAS, B. D. M.; NAQVI, F.; **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2002, 12, 3475.
 - BORGES, M.N.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. NMR interaction studies of aromatic guanyl hydrazones with micelles: model for mechanism of action of cationic antibiotics. **Biopolymers**, v.62, n.1, 9–14, 2001.
 - BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa **Caminhos do direito à saúde no Brasil** (Série B. Textos Básicos de Saúde), Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Caminhos_do_Direitos_em_Saude_no_Brasil.pdf>, acesso em jun. 2010.
 - BRASILEIRO-FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BOGLIOLO, L. **Patologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, pág. 174-236.
 - BRZOSOWSKI, Z.; SACZEWSKI, F.; SLAWINSKI, J. Synthesis of novel 3-amino-2-(4-chloro-2-mercaptobenzenesulfonyl)-guanidine derivatives as potential antitumor agents, **Eur. J. of Med. Chem.**, v. 42 p. 1218-1225, 2007.
 - BUCHHEIT K. et al. The Serotonin 5-HT₄ Receptor. 2. Structure-Activity Studies of the Indole Carbazimidamide Class of Agonists. **J. of Med. Chem.**, v. 38, p. 2331–2338, 1995.
 - CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. Nucleophilic Substitutions. In: **Advanced Org. Chem.:** Part A: Structures and Mechanisms. 5. ed. Springer, 2007. Cap. 4, p. 389-472.
 - CASAS, J. S.; TASENDE, M. S. G.; SORDO, J.; **Coord. Chem. Rev.**, v.209, p.197, 2000.

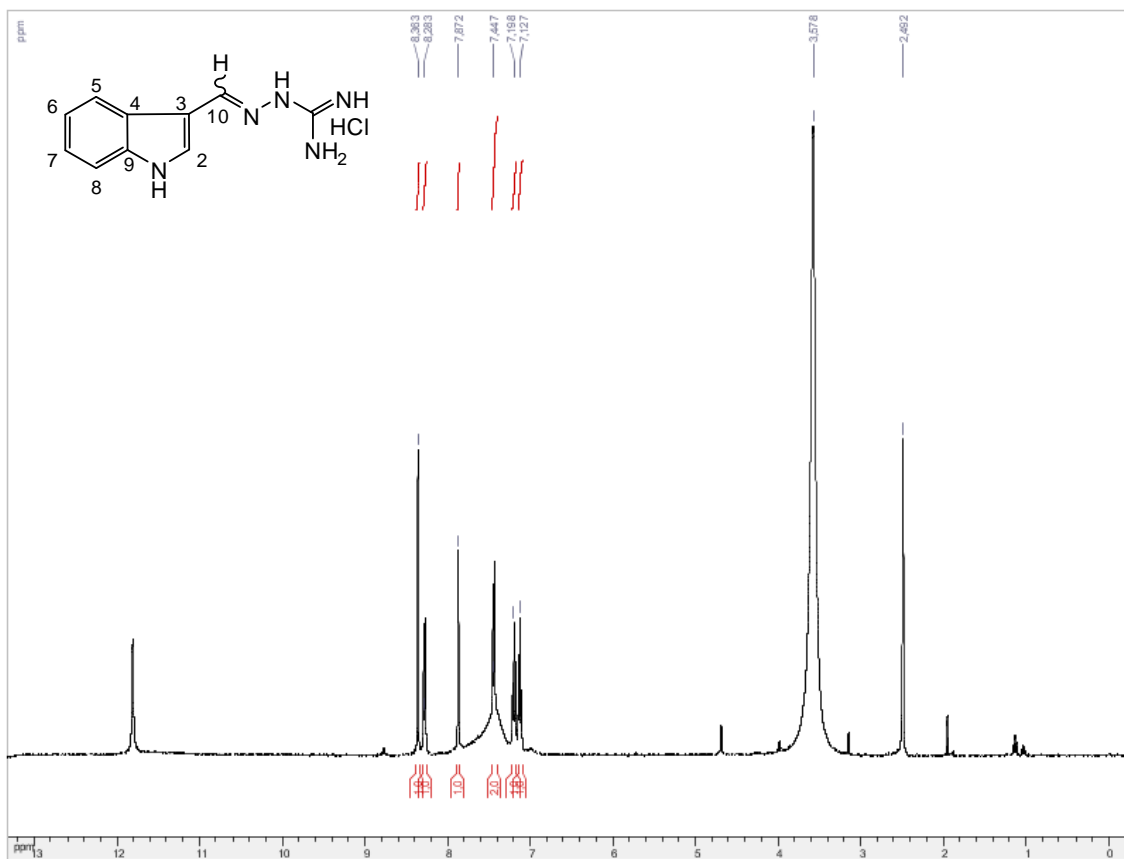
- CHATTOPADHYAY, D.; MAZUMDAR, S. K.; BANERJEE, T.; SHELDRIK, W. S.; **Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.**, v. 45, p. 314, 1989.
- CHIYANZU, I.; HANSELL, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H.; CHIBALE, K. **BIOORG. Med. Chem. Lett**, v.13, p.3527, 2003.
- CORY, J. G. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 27, p. 437. 1988.
- EDMONT, D. et al. Synthesis and evaluation of quinoline carboxyguanidines as antidiabetic agents. **Bioorg. & Med. Chem. Letters**, v_10, n.16, p.1831-1834, 2000.
- FEUN, L.; MODIANO, M.; LEE, K.; MAO, J.; MARINI, A.; SAVARAJ, N.; PLEZIA, P.; ALMASSIAN, B.; COLACINO, E.; FISCHER, J.; MACDONALD, S.; **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.50, p. 223. 2002.
- FOYE, W.O.; ALMASSIAN, B.; EISENBERG, M.S.; MAHER, T.J. Synthesis and biological activity of guanylhydrazones of 2-pyridine and 4-pyridine and 4-quinoline carboxaldehydes. **J. Pharm. Sci**, v.79, n.6, p.527–530, 1990.
- GADAD, A.K.; MAHAJANSHETTI, C.S.; NIMBALKAR, S.; RAICHURKAR, A. Synthesis and antibacterial activity of some 5-guanylhydrazone/thiocyanato-6-arylimidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives. **Eur. J. Med. Chem**, v.35, n.9, p.853–857, 2000.
- HANG, H. C.; BERTOZZI, C. R.; **Acc. Chem. Res.**, v.34, p.727, 2001.
- HOFFMAN, B. B.; Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos. In: GILMAN, A.G.; HARDMAN J.G.; LIMBIRD L.E. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2003. Pág. 163-203.
- HOLLA, B. S.; MALINI, K. V.; RAO, B. S.; SAROJINI, B. K.; KUMARI, N. S.; **Eur. J. Med. Chem.**, v.38, p.313, 2003.
- INCA 2008 (Instituto Nacional do Câncer) **Como é o processo de carcinogênese?** Disponível <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319> acesso em: 08 ago. 2010.

- INCA 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
- INCA 2011 (Instituto Nacional do Câncer) **Atlas de mortalidade por cancer**. Disponível em <<http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>>, acesso em 20 fev. 2011.
- KARAH, N. **Eur. J. Med. Chem.**, v.37, p.909, 2002.
- KASUGA, N. C.; SEKINO, K.; ISHIKAWA, M.; HONDA, A.; YOKOYAMA, M.; NAKANO, S.; SHIMADA, N.; KOUMO, C.; NOMIYA, K. **J. Inorg. Biochem.**, v.96, p.298, 2003.
- KLAYMAN, D. L.; LIN, A. J.; MCCALL, J. W.; WANG, S. Y.; TOWNSON, S.; GRÖGL, M.; KINNAMON, K. E. **J. Med. Chem.** v.34, p.1422, 1991.
- KOROLKOVAS, A; **Fundamentos da farmacologia molecular: base para o planejamento de fármacos**, 2^o ed., EDART: São Paulo, 1977.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robins & Cotran: Bases patológicas das doenças**. 7^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Saunder, 2005, p. 281-356.
- LARSEN, S. D. et al. Synthesis and Biological Activity of Analogues of the Antidiabetic/Antiobesity Agent 3-Guanidinopropionic Acid: Discovery of a Novel Aminoguanidinoacetic Acid Antidiabetic Agent. **J. Med. Chem.**, v.44, n.8, p.1217–1230, **2001**.
- LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. ROCHE, V. F. ZITO, S. W. **Foye's principles of Medicinal Chemistry**, 6^a Ed. Baltimore: Wolter Kluer, Lippincott Williams & Wilkins, 2008a, p. 728-785.
- LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. ROCHE, V. F. ZITO, S. W. **Foye's principles of Medicinal Chemistry**, 6^a Ed. Baltimore: Wolter Kluer, Lippincott Williams & Wilkins, 2008b, p. 48-54.
- LI, J.; LUO, X.; WANG, Q.; ZHENG, L.; KING, I.; DOYLE, T. W.; CHEN, S.; **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.8, n.3159, 1998.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23-49, 2005.

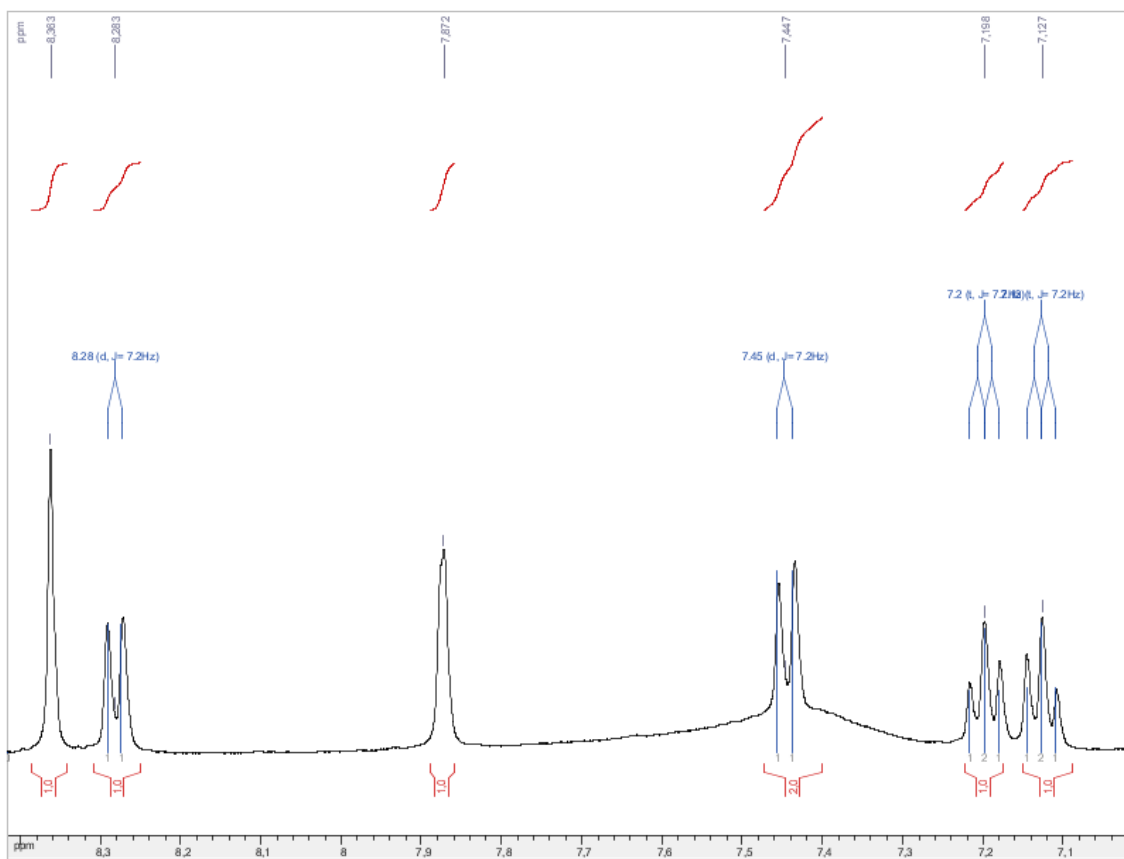
- LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Quim. Nova**, v.30, n6, 1456-1468, 2007.
- LIU, M.; LIN, T.; SARTORELLI, A. C.; **J. Med. Chem.**, v.35, p.3672, 1992.
- LOUIE, A. Y.; MEADE, T. J.; **Chem. Rev.**, v.99, p.2711, 1999.
- MARCH, J.; SMITH, M. B. Aliphatic substitution: nucleophilic and organometallic. In: **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**. 6. ed. John Wiley & Sons, Inc., 2007. Cap. 10, p. 425-656.
- MENEGATTI, R.; FRAGA C. A. M.; E BARREIRO, E. J. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n.3, Maio 2001.
- MESSEDER, J.C.; TINOCO, L.W.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.; SOUZA, E.M.; SANTA RITA, R.; DE CASTRO, S.L. Aromatic guanyl hydrazones: Synthesis, structural studies and in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.5, n.24, 3079–3084, 1995.
- MORRISON, R.; BOYD, R. **Química orgânica**. 14^a Ed. Lisboa: 2005, p. 197-252.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. of Immunological Methods**, v. 65, p.55-59, 1983.
- PALENIK, G. J.; RENDLE, D. F.; CARTER, W. S.; **Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.** v. 30, p. 2390, 1974.
- PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p.171-177, 2007.
- RUIZ, R.; AVIADO, M. Pharmacology of new antimalarial drugs—3 guanylylhydrazones. **Pharmacology**, v.4, n.1, p.45, 1970.
- SARODNICK, G.; HEYDENREICH, M.; LINKER, T.; KLEINPETER, E.; **Tetrahedron**, v.59, p.6311, 2003.
- SANTOS-FILHO, O.A.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.; ARAÚJO, M.T. Molecular modeling of the interaction of trypanocide guanyl hydrazones with B-DNA. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.7n.13, 1797–1802, 1997.
- SCHMITT, M. et al. Use of 4-bromo pyridazine 3,6-dione for building 3-amino pyridazine libraries. **Molecular Diversity**, v. 10, p.429-434, 2006.

- SHAIENDRA; BHARTI, N.; NAQVI, F.; AZAM, A.; **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.13, p.689, 2003.
- SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82(13): 1107-1112, 1990.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Reações iônicas: substituição nucleofílica e reações de eliminação dos haletos de alquila. In: **Química orgânica 1**. 7. ed. LTC, 2000. Cap. 6, p. 193-236.
- SUNDBERG, R.J.; DAHLHAUSEN, D.J.; MANIKUMAR, G.; MAVUNKEL, B.; BISWAS, A.; SRINIVASAN, V.; MUSSALLAM, H.A.; REID, W.A.; AGER, A.L. **J. Med. Chem**, v.33, n.1, p.298–307, 1990.
- TEITZ, Y.; RONEN, D.; VANSOVER, A.; STEMATSKY, T.; RIGGS, J. L. **Antiviral Res.**, v.24, p.305, 1994.
- TENÓRIO R. P.; GÓES A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica, **Quím. Nova**, v. 28, n. 6, p.1030-1037, 2005.
- ULRICH, P. C.; CERAMI, A. J. **Med. Chem.** v.27, n.35, 1984.
- VIEGAS-JR, C. BOLZANI, V. S; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna, **Quim. Nova**, v.29, n.2, 326-337, 2006.
- WALZER, P. D. Et al. Guanylhydrazones in Therapy of *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Immunosuppressed Rats. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.38, n.11, p. 2572-2576, 1994.
- WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2008, p. 98-132.
- WERMUTH, C.G. **The Practice of Medicinal Chemistry**, ed. Academic Press: New York, 1996, p. 123-143, 1996.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **National cancer control programmes: policies and managerial guidelines**. – 2ª ed: Geneva, 2002.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Cancer**. 2006 Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>>, a. Acesso em: 20 Ago. 2010.

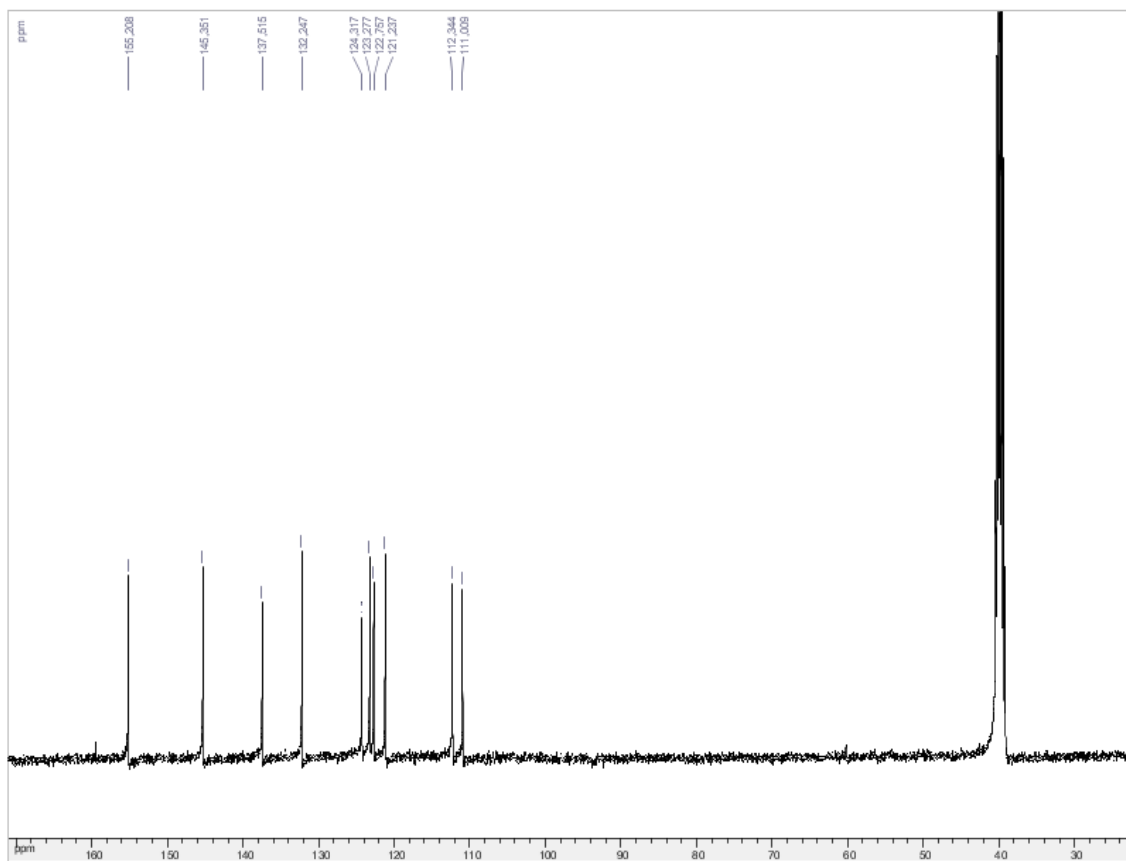
ANEXOS



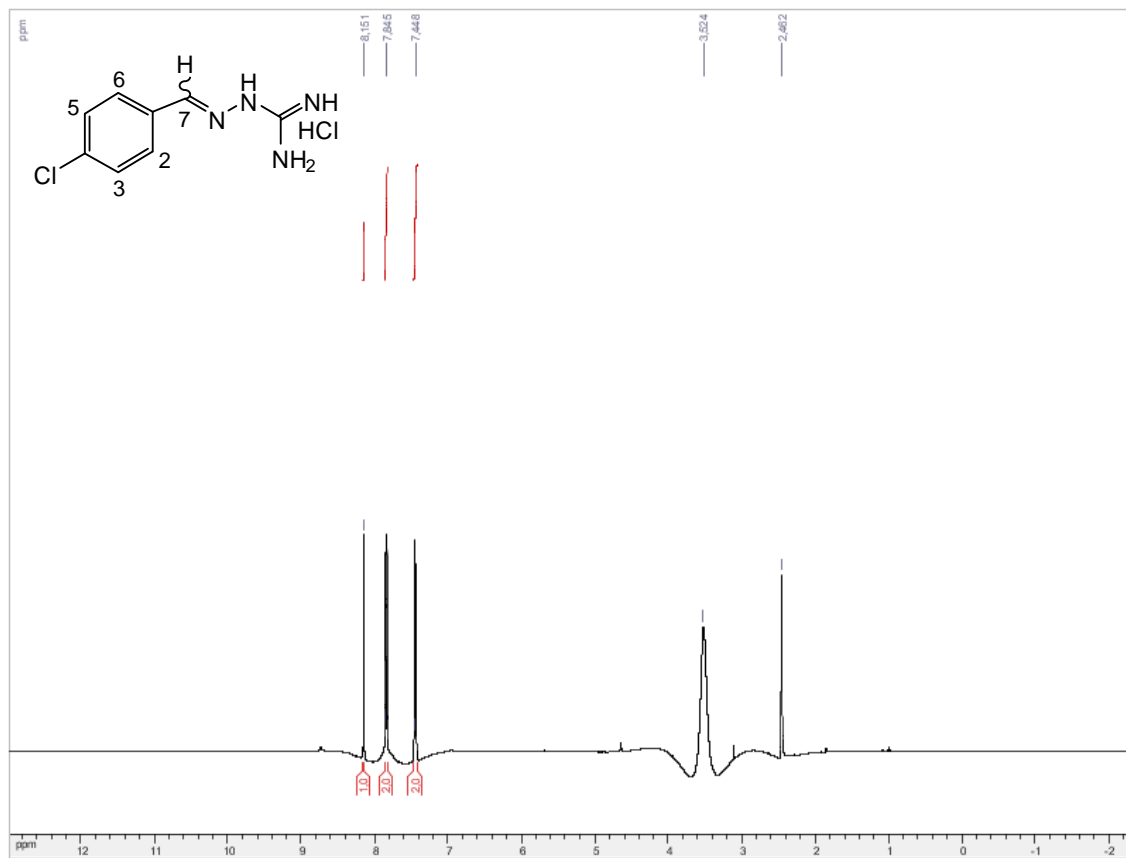
Espectro 1a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO}-d_6$ da substância 1.



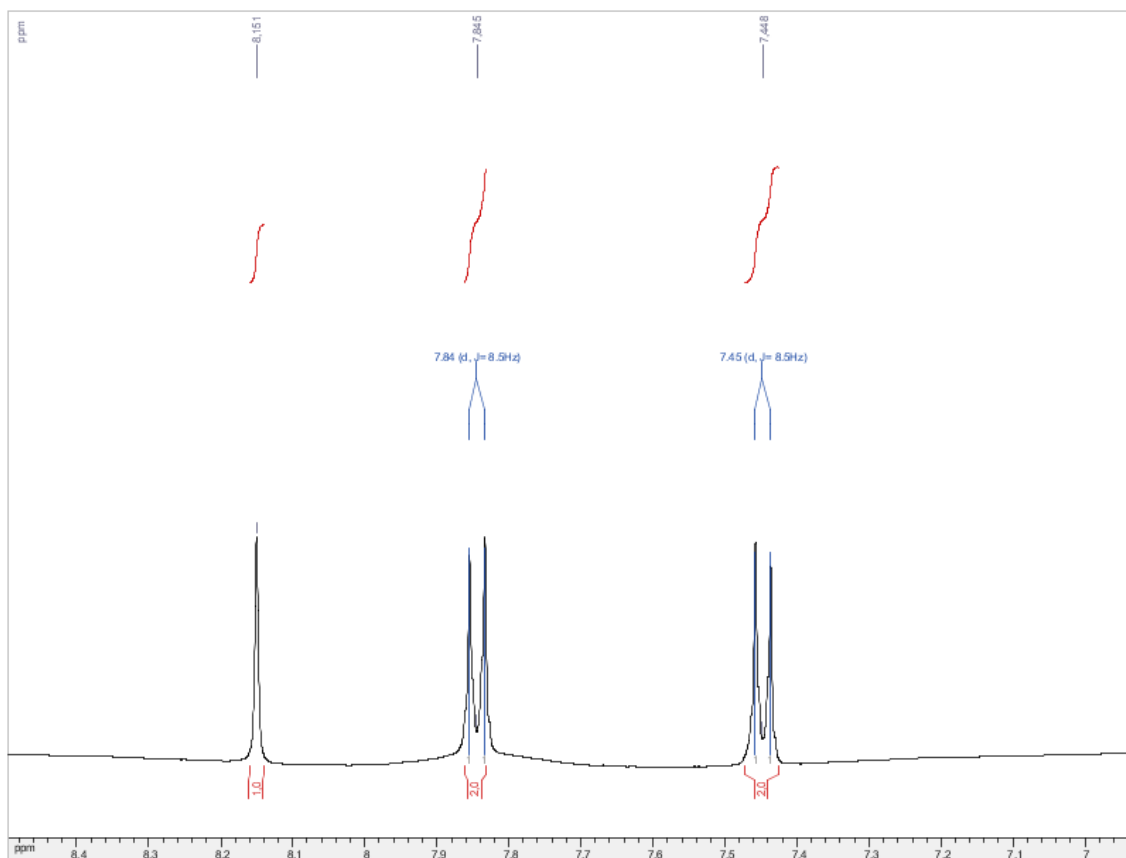
Espectro 1b. Ampliação do espectro de $\delta 7,1$ a $\delta 8,3$.



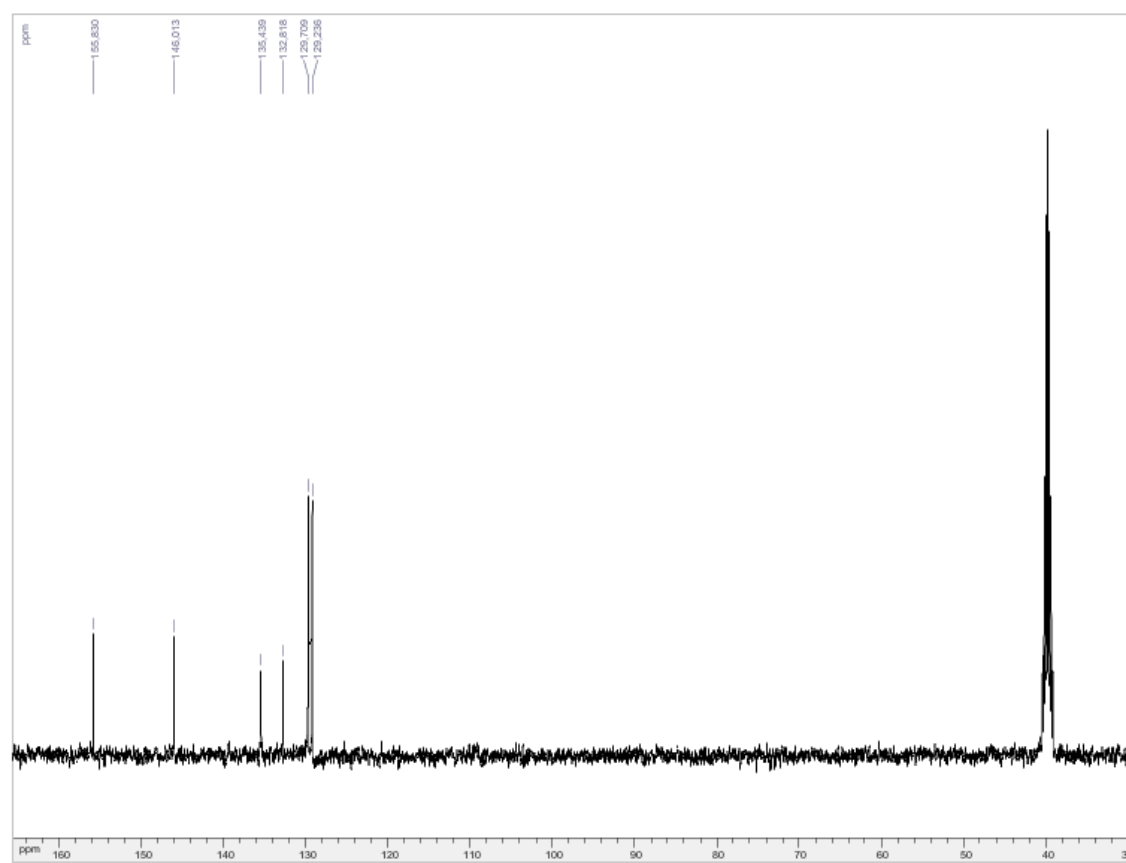
Espectro 1c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 1.



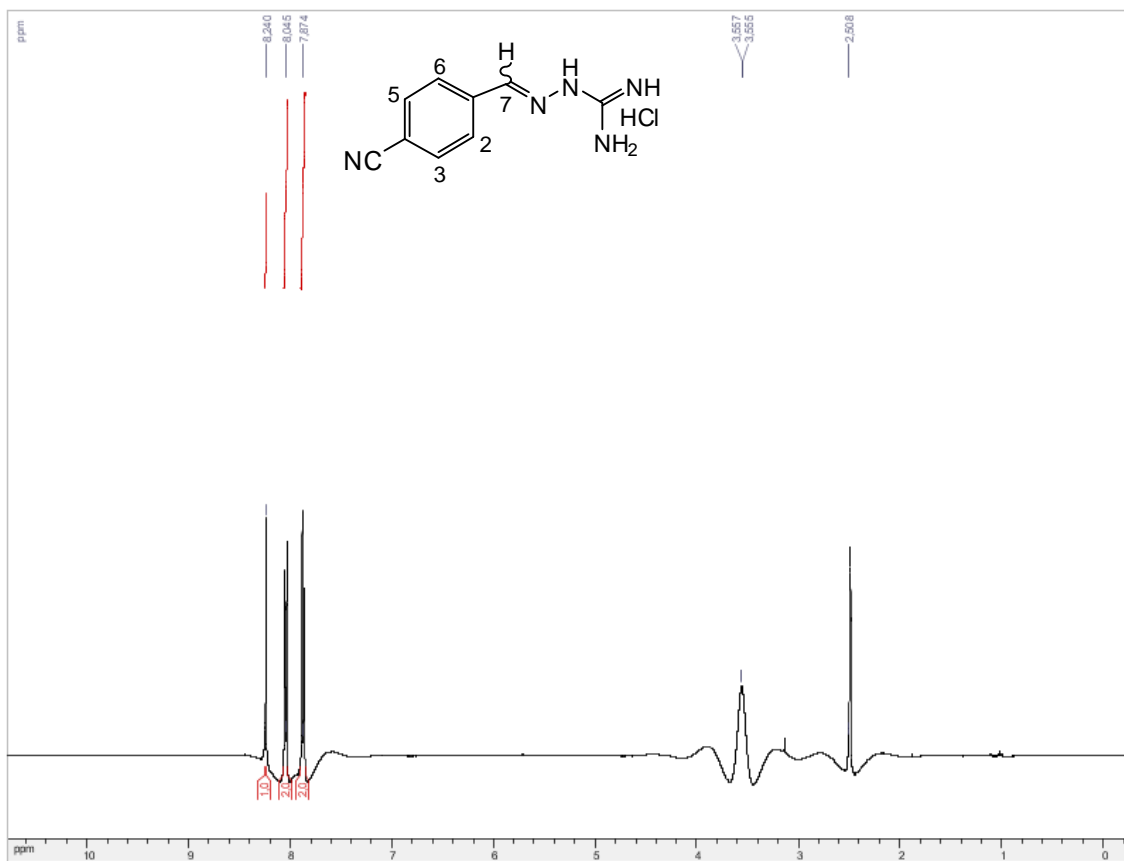
Espectro 2a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 2.



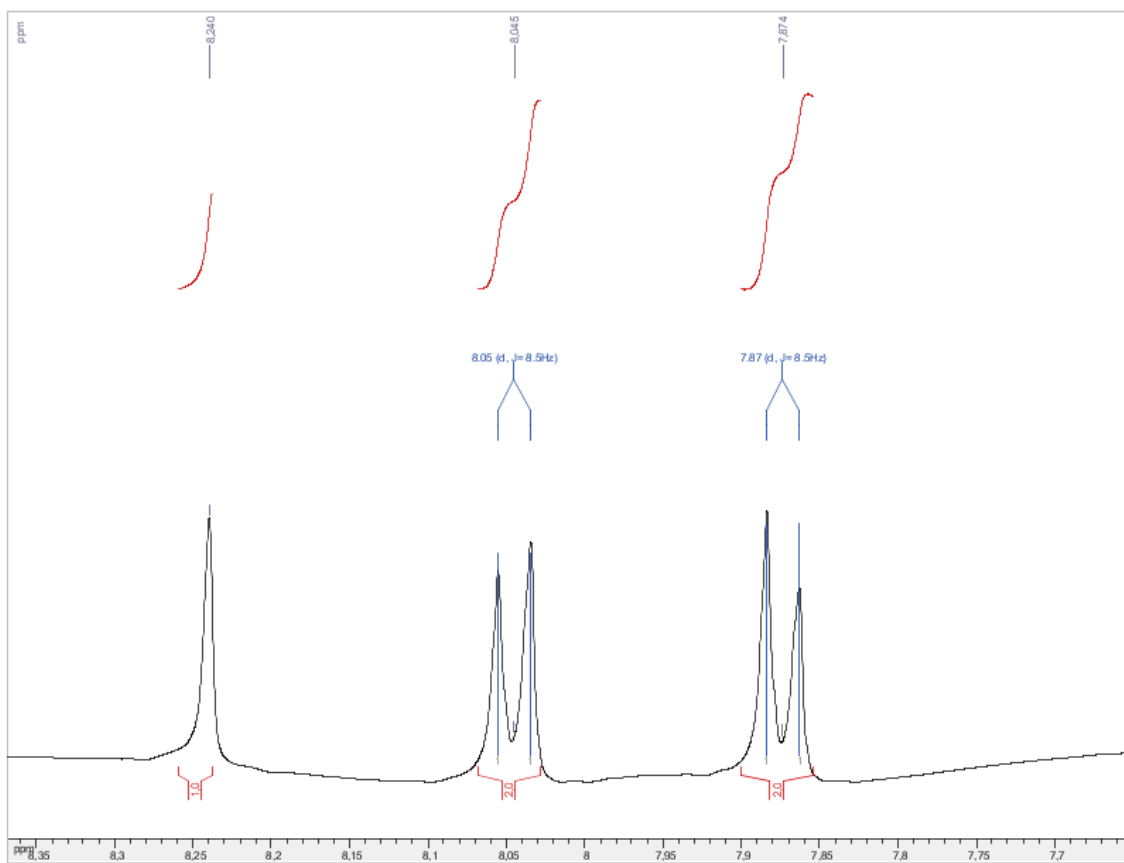
Espectro 2b. Ampliação do espectro de $\delta 7,0$ a $\delta 8,4$.



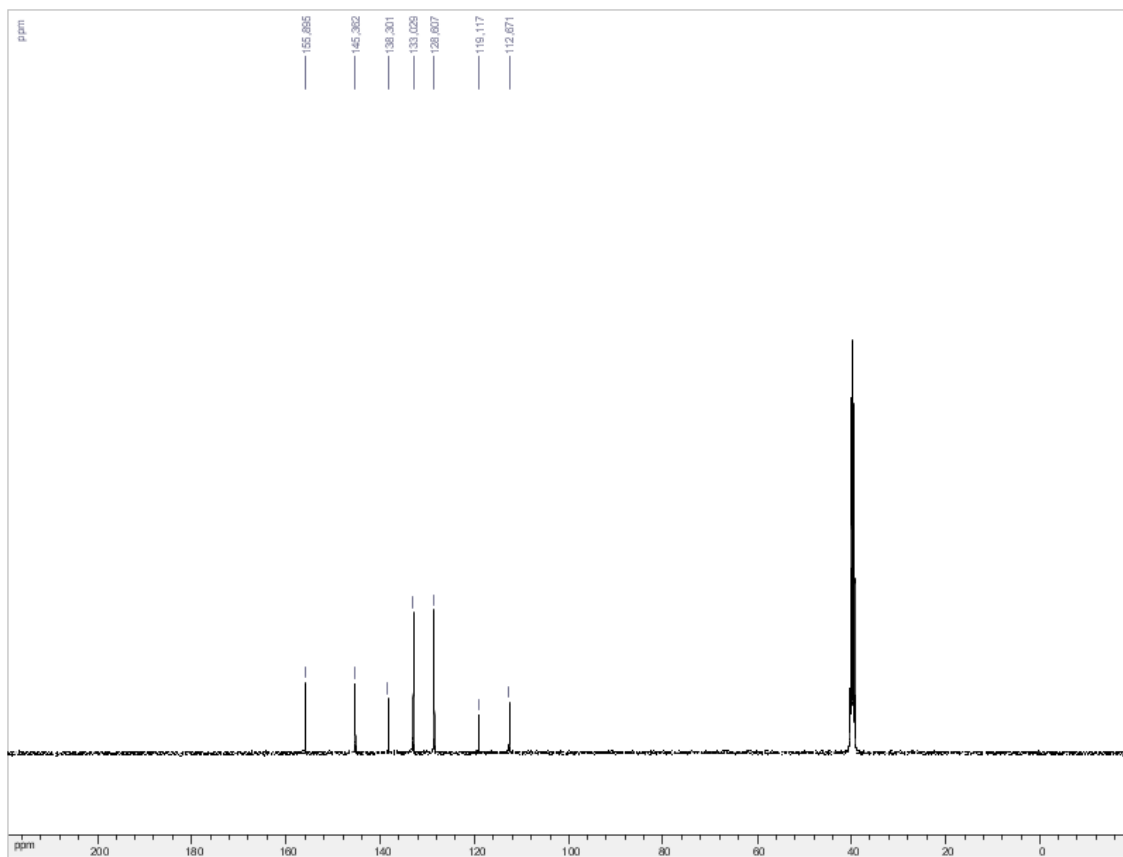
Espectro 2c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 2.



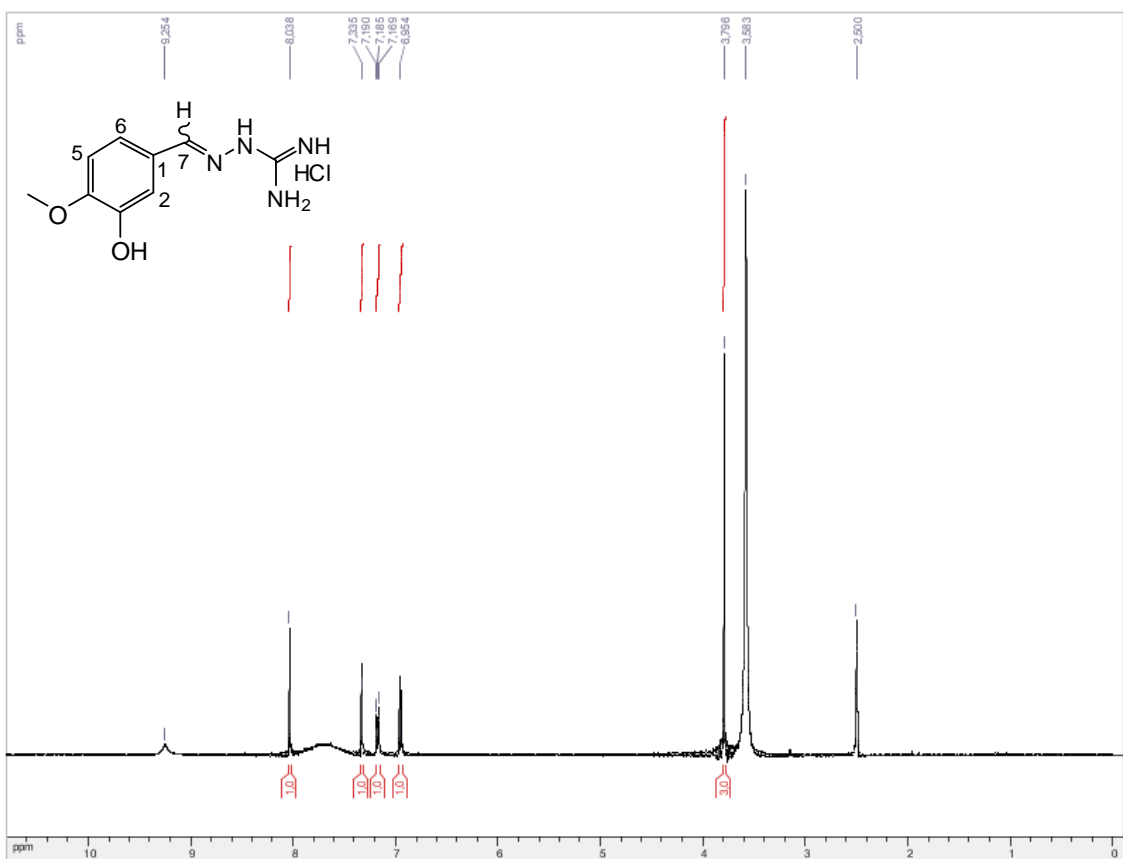
Espectro 3a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 3.



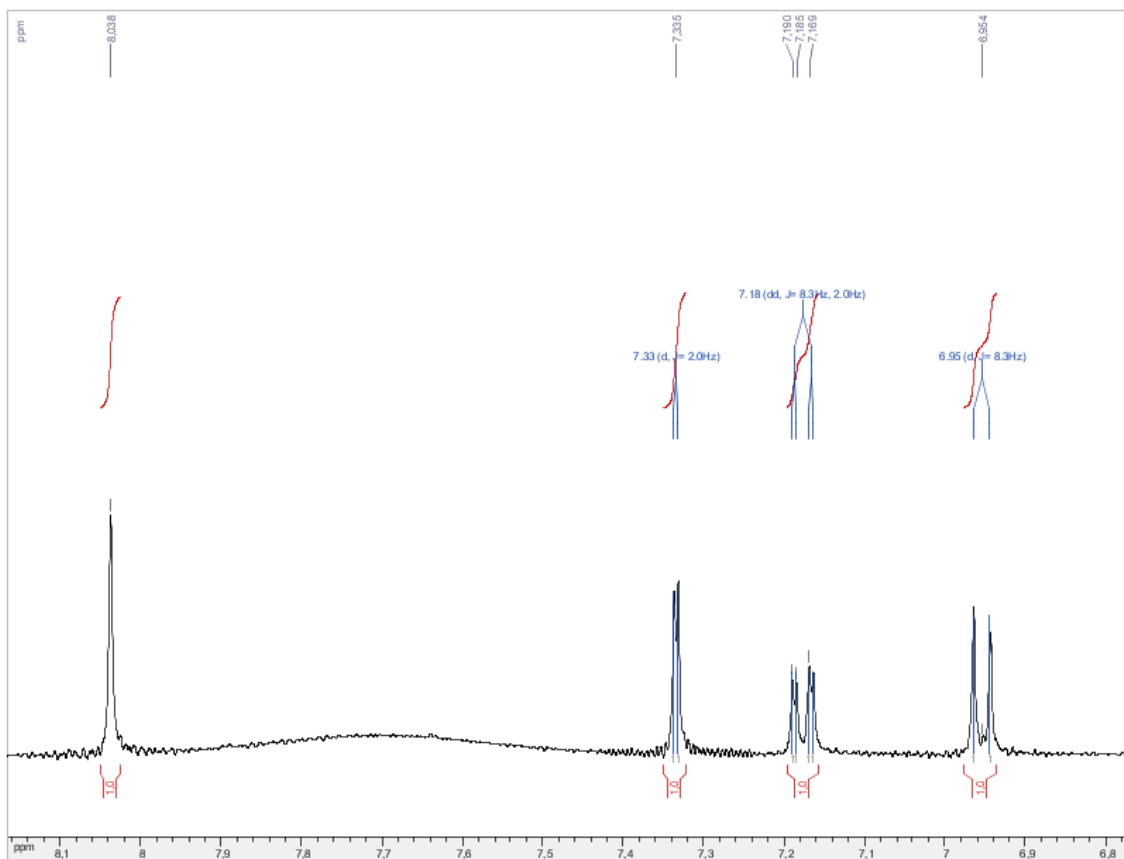
Espectro 3b. Ampliação do espectro de $\delta 7,6$ a $\delta 8,4$.



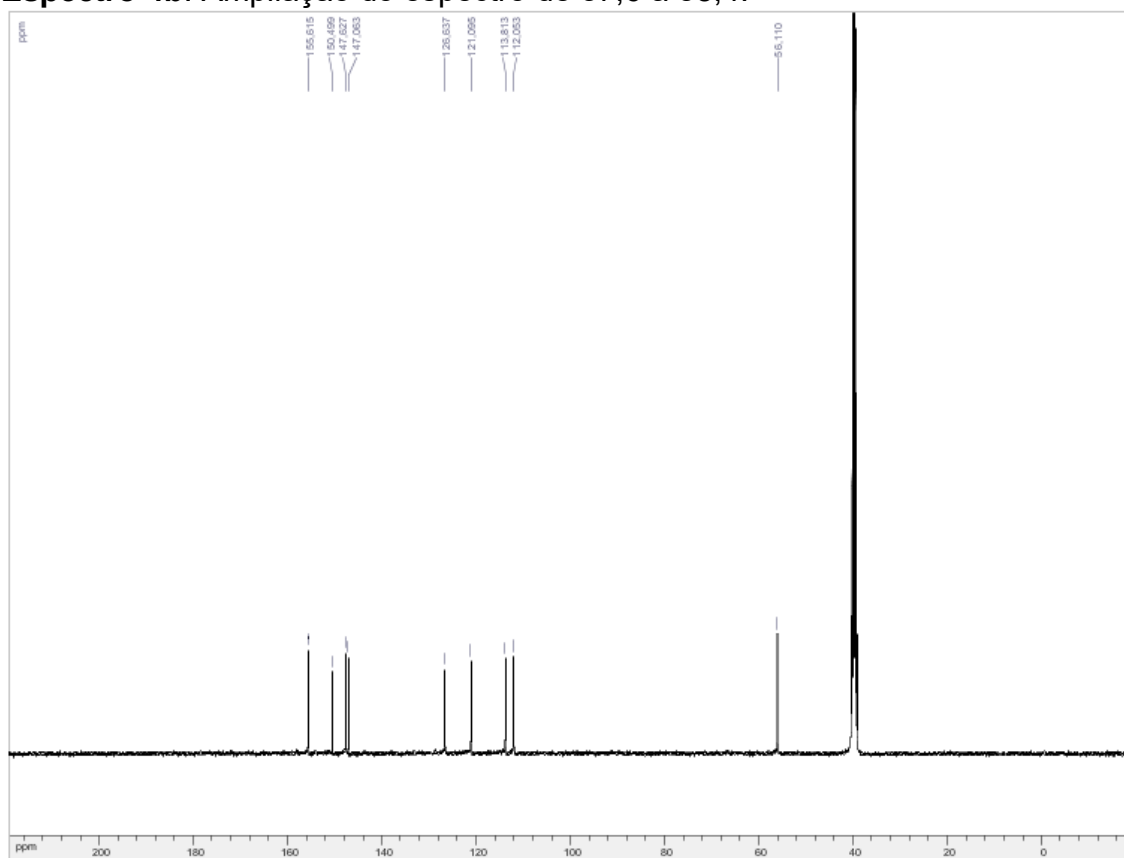
Espectro 3c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 3.



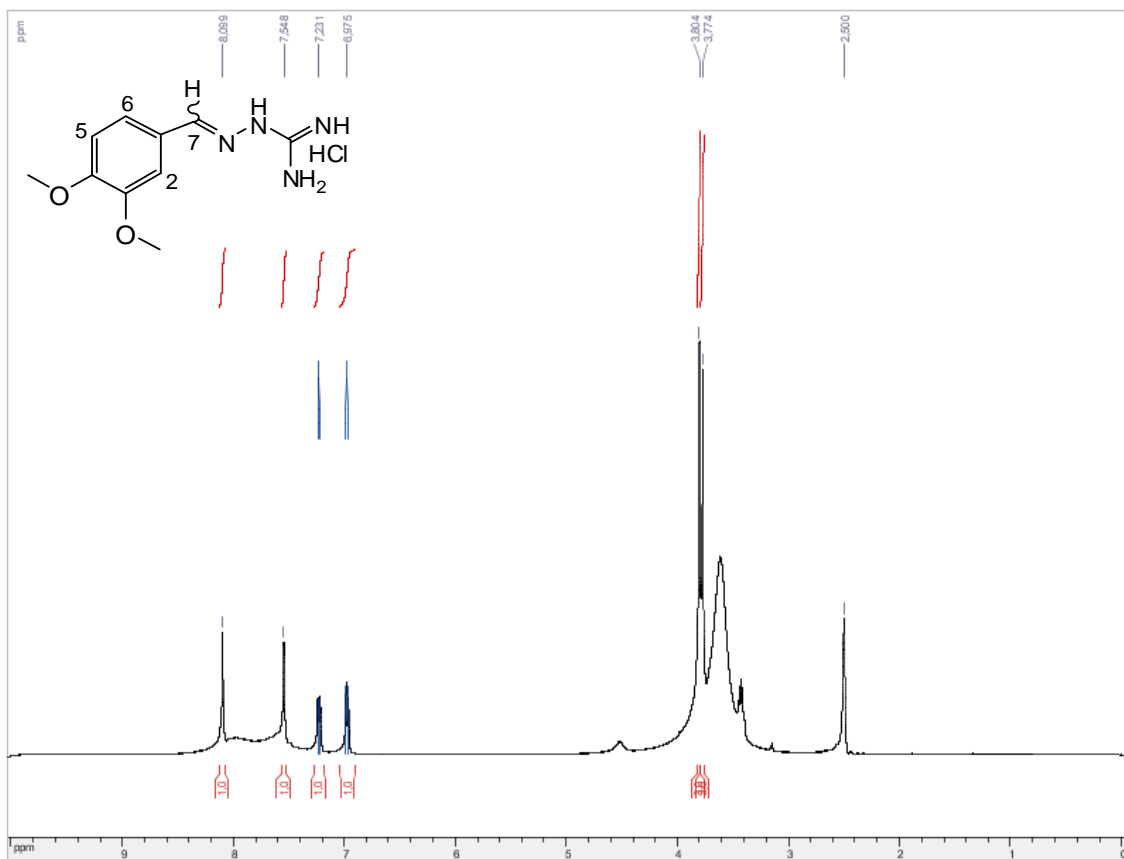
Espectro 4a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 4.



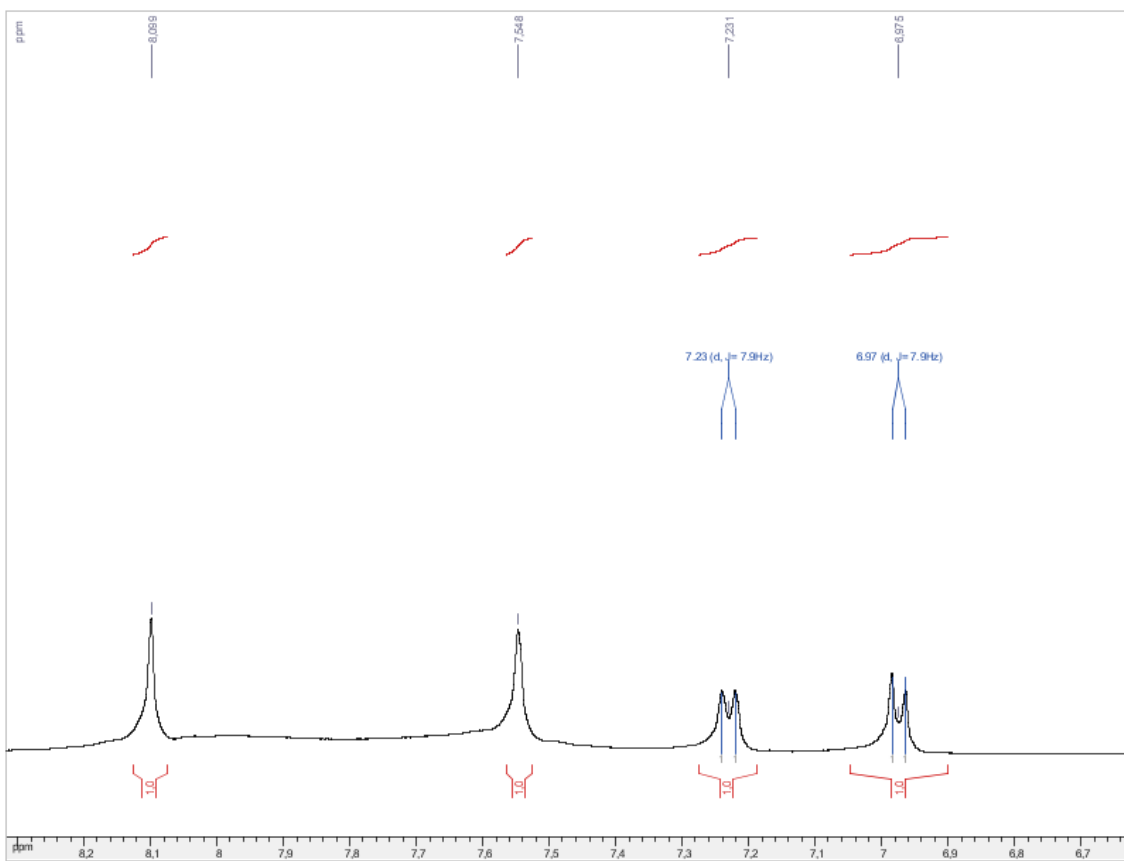
Espectro 4b. Ampliação do espectro de δ 7,6 a δ 8,4.



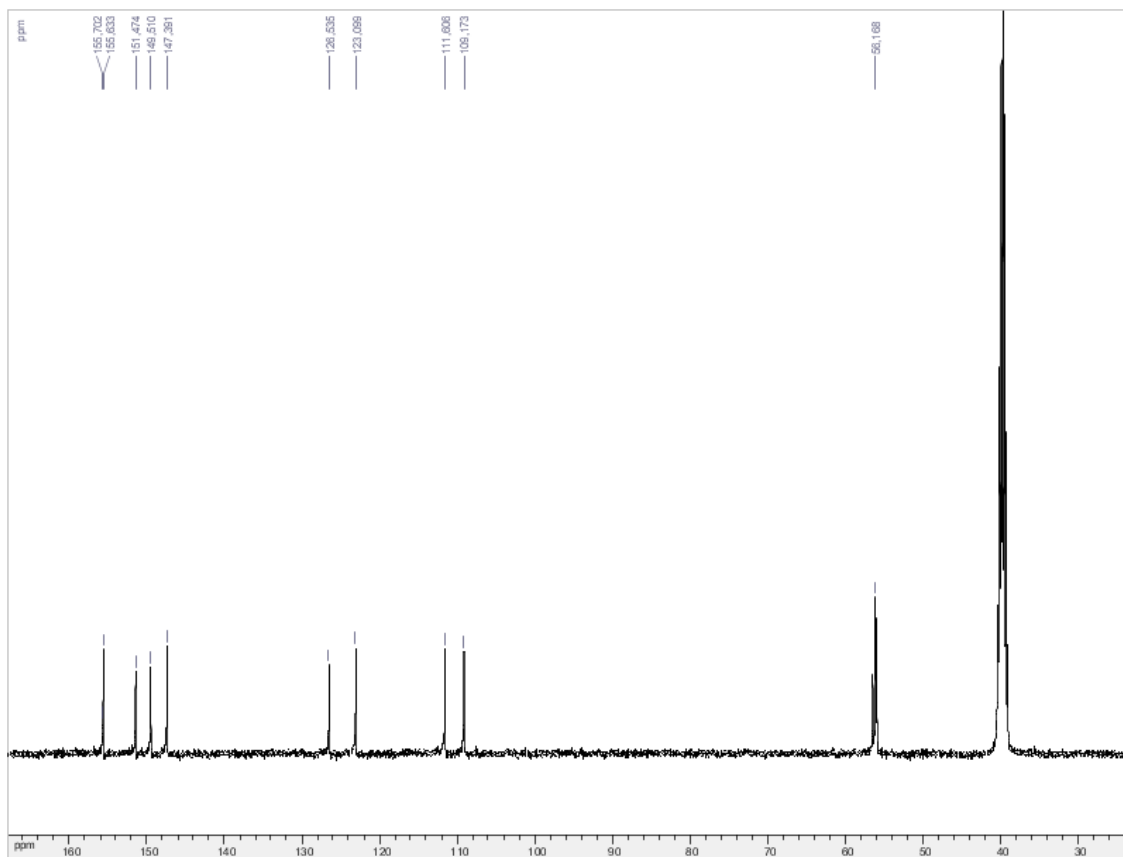
Espectro 4c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 4.



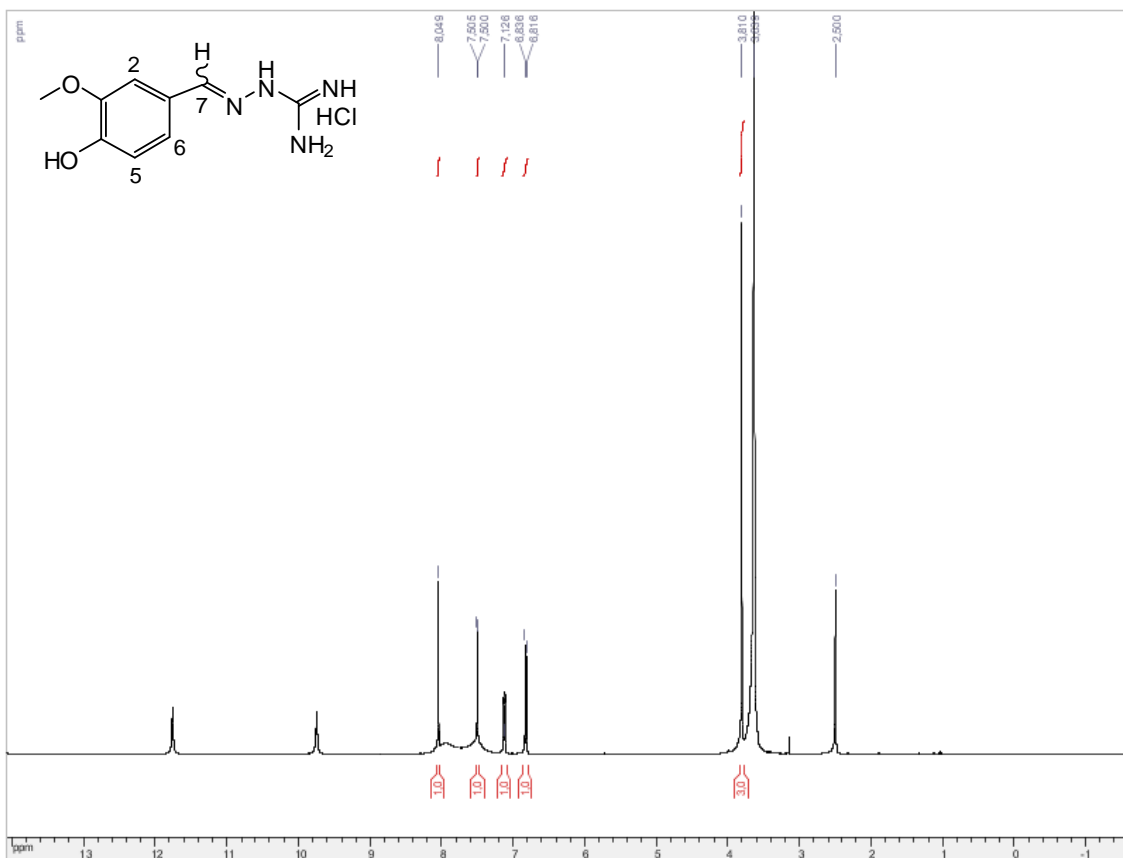
Espectro 5a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 5.



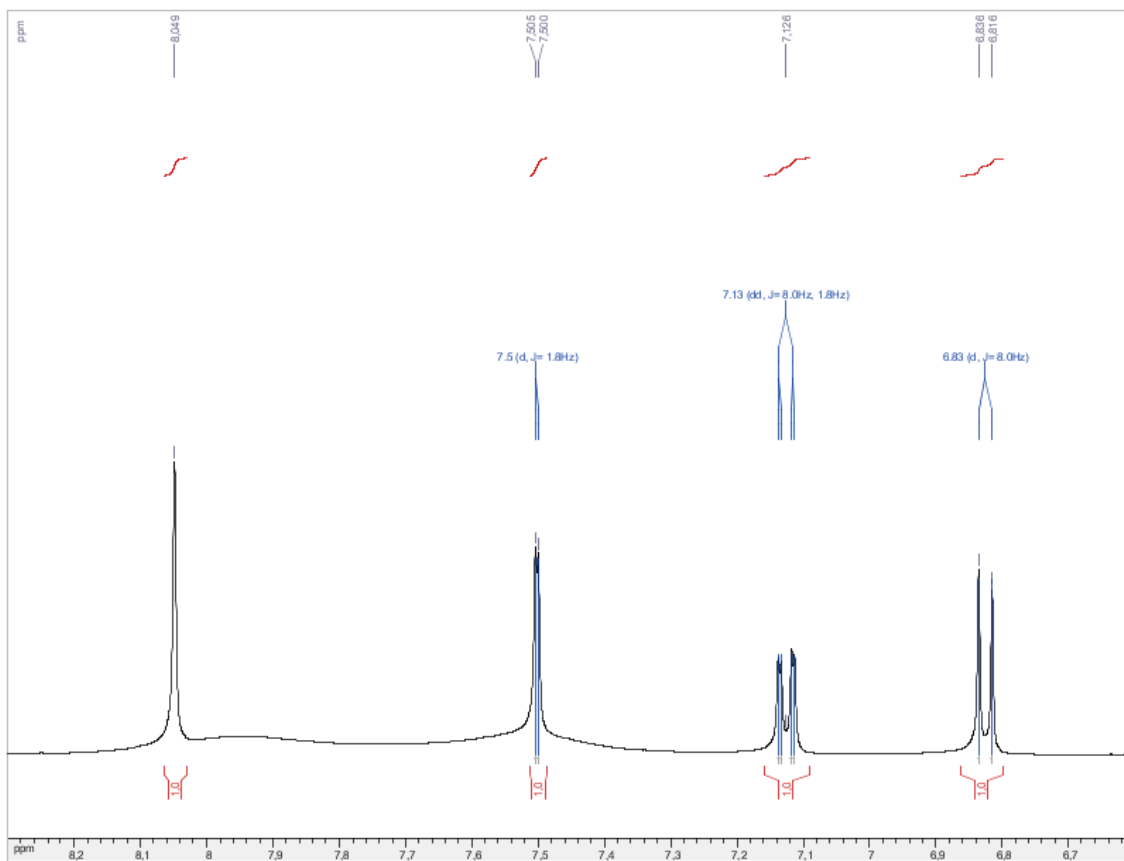
Espectro 5b. Ampliação do espectro de δ 7,6 a δ 8,5.



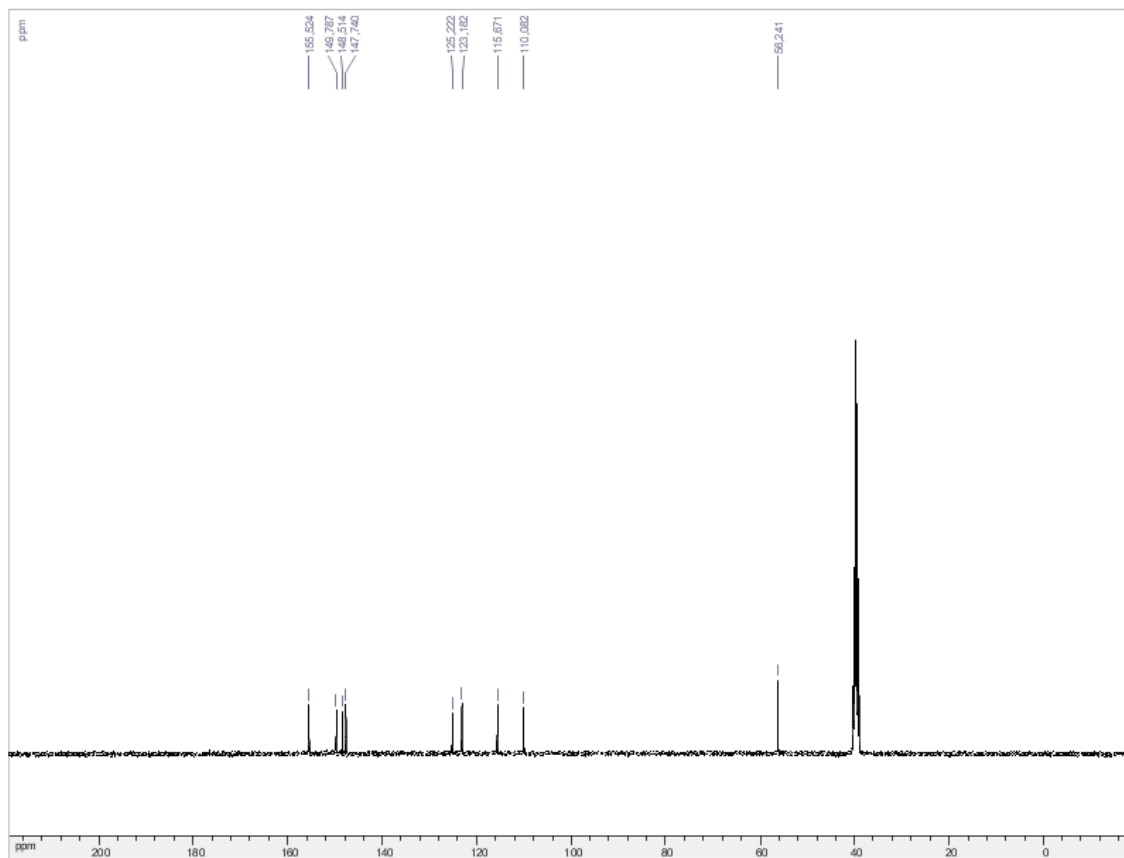
Espectro 5c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 6.



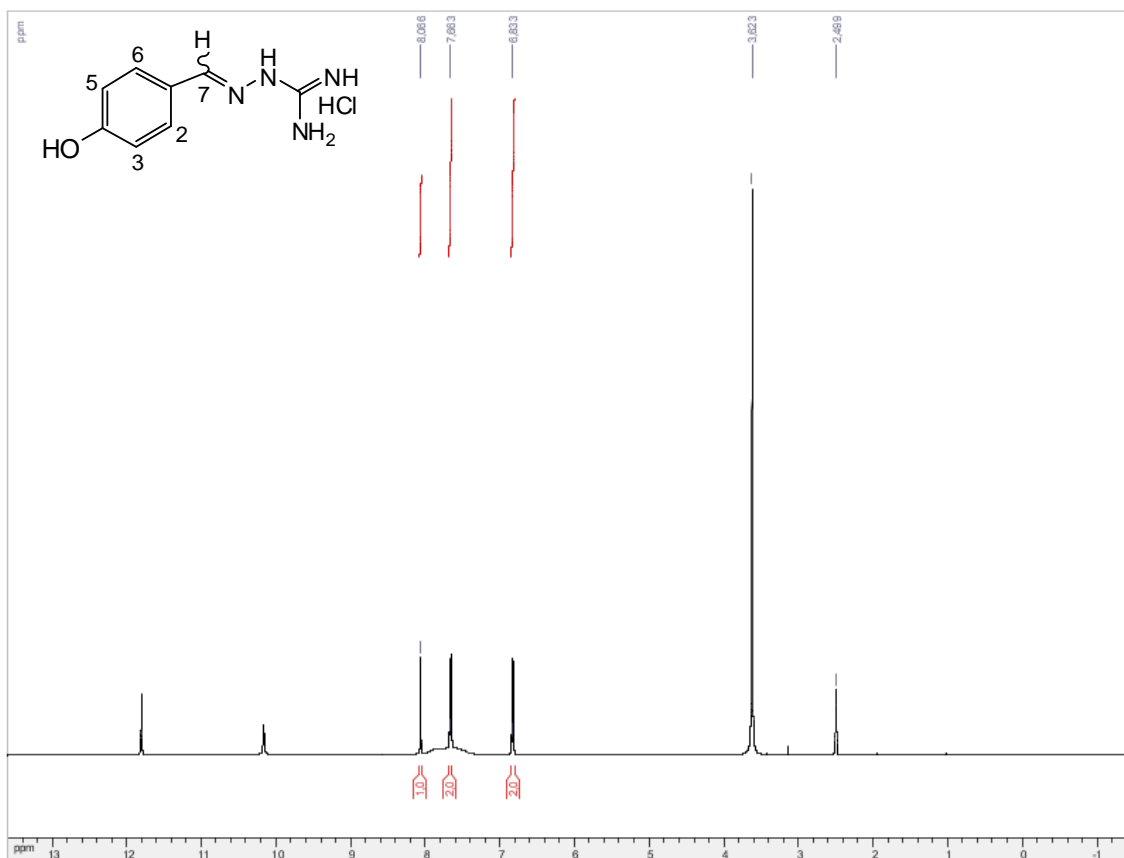
Espectro 6a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 6.



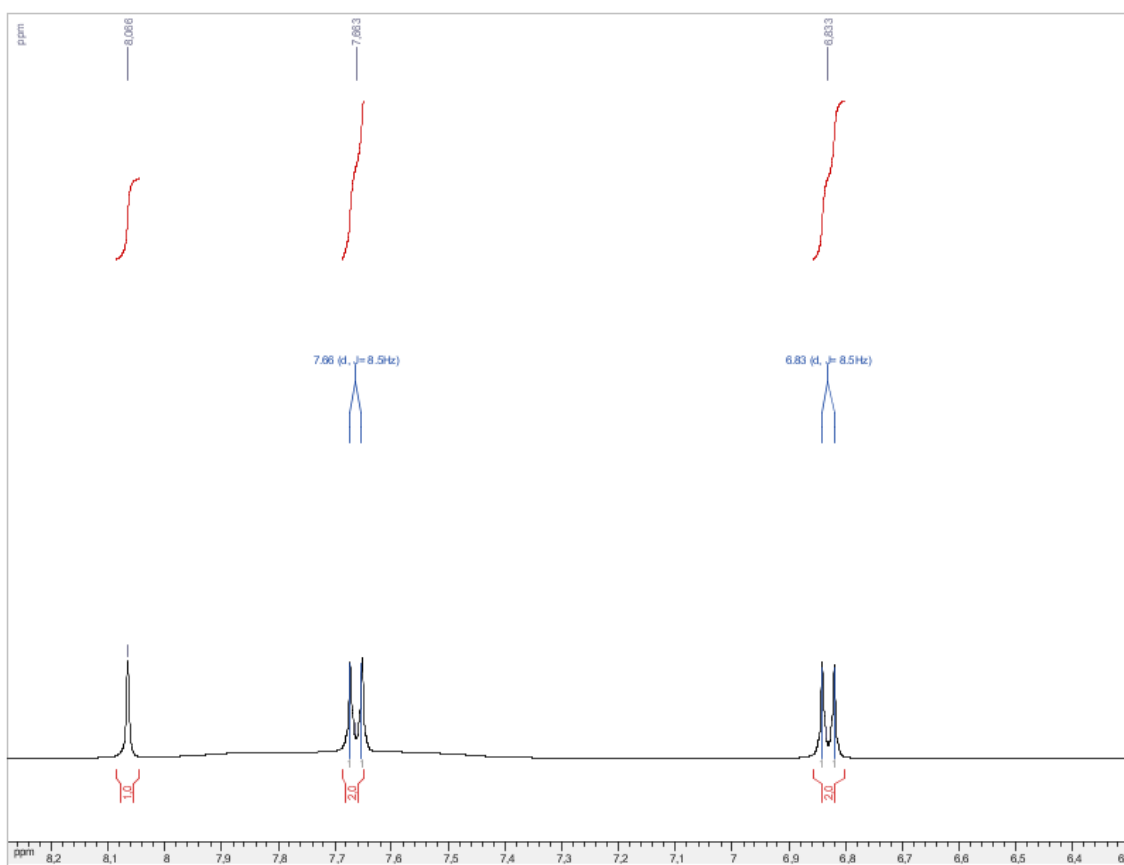
Espectro 6b. Ampliação do espectro de δ 7,6 a δ 8,4.



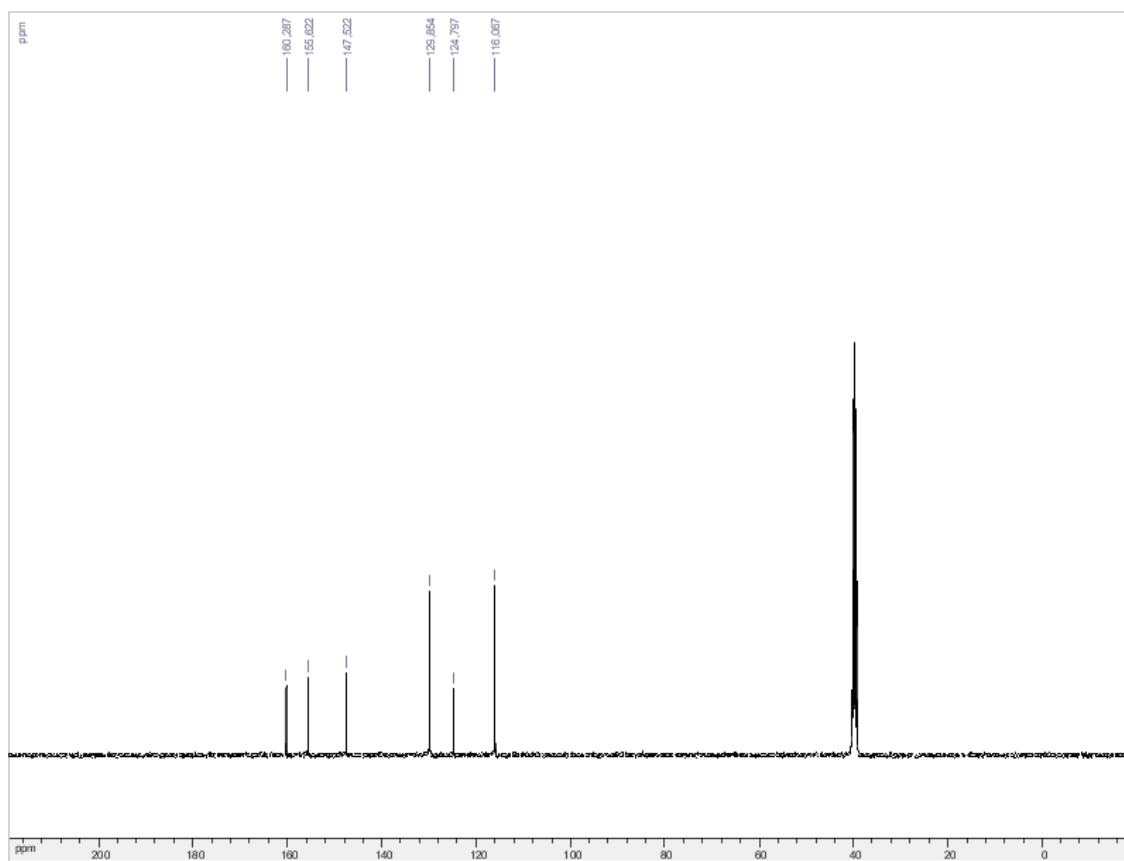
Espectro 6c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 6.



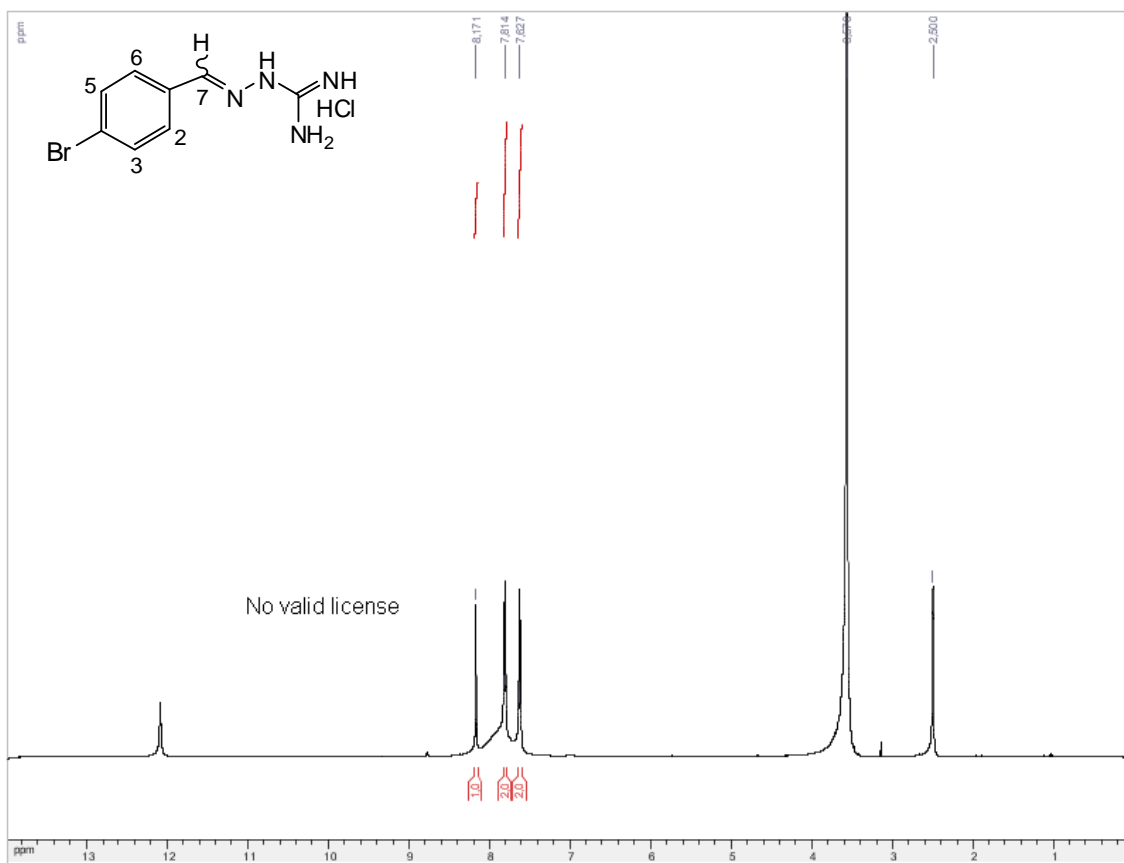
Espectro 7a. RMN ¹H (400Hz) em DMSO-*d*₆ da substância 7.



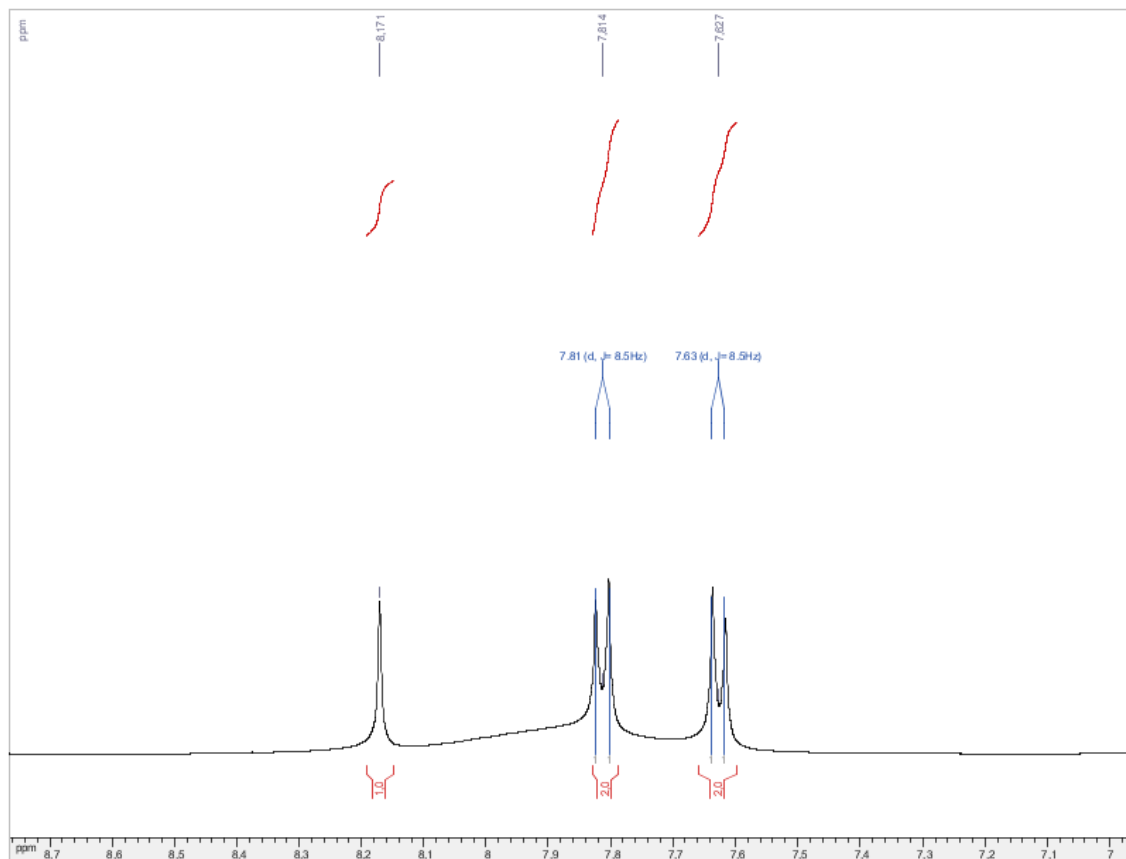
Espectro 7b. Ampliação do espectro de δ7,6 a δ8,4.



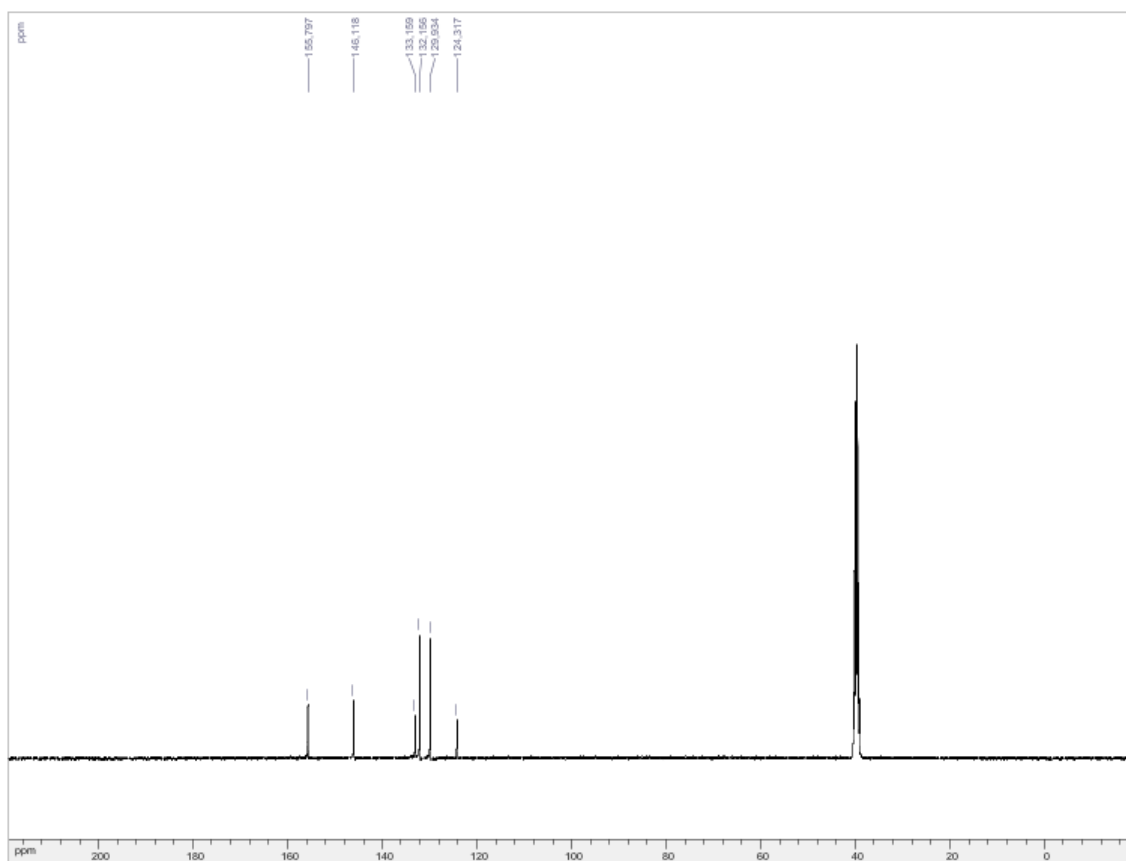
Espectro 7c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 7.



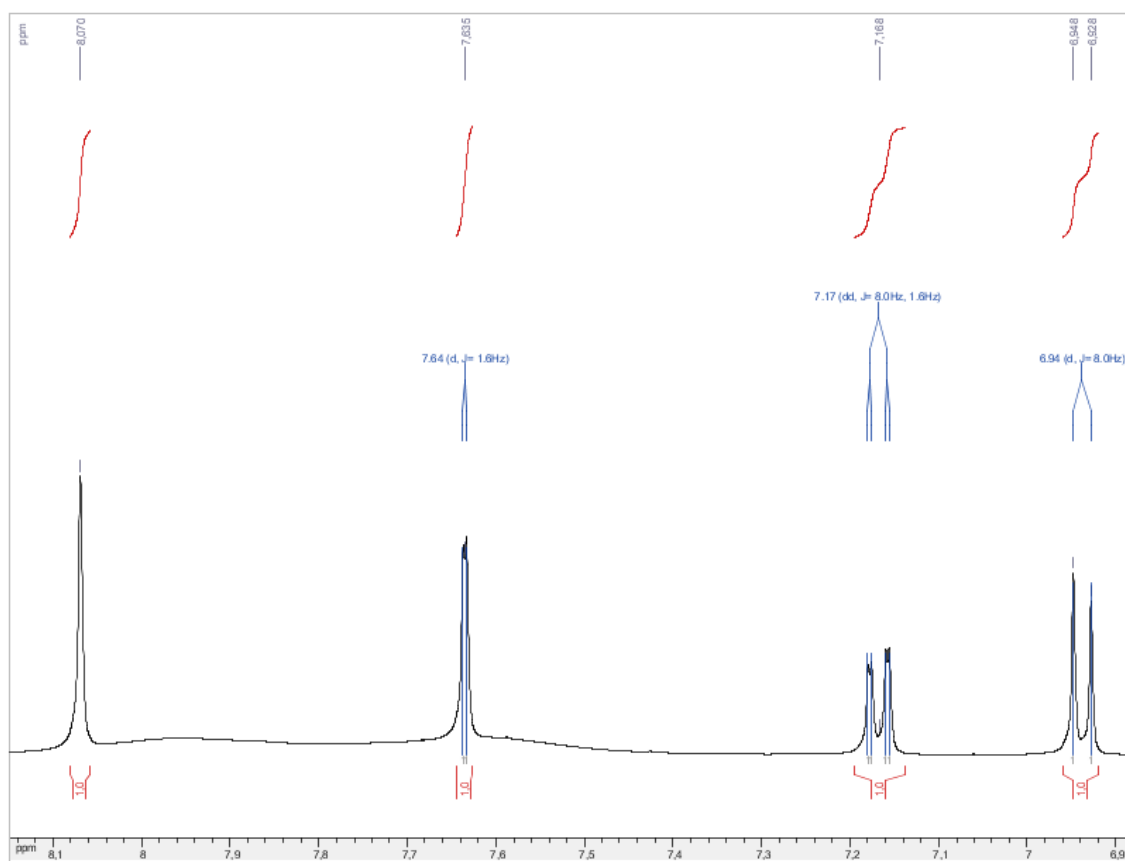
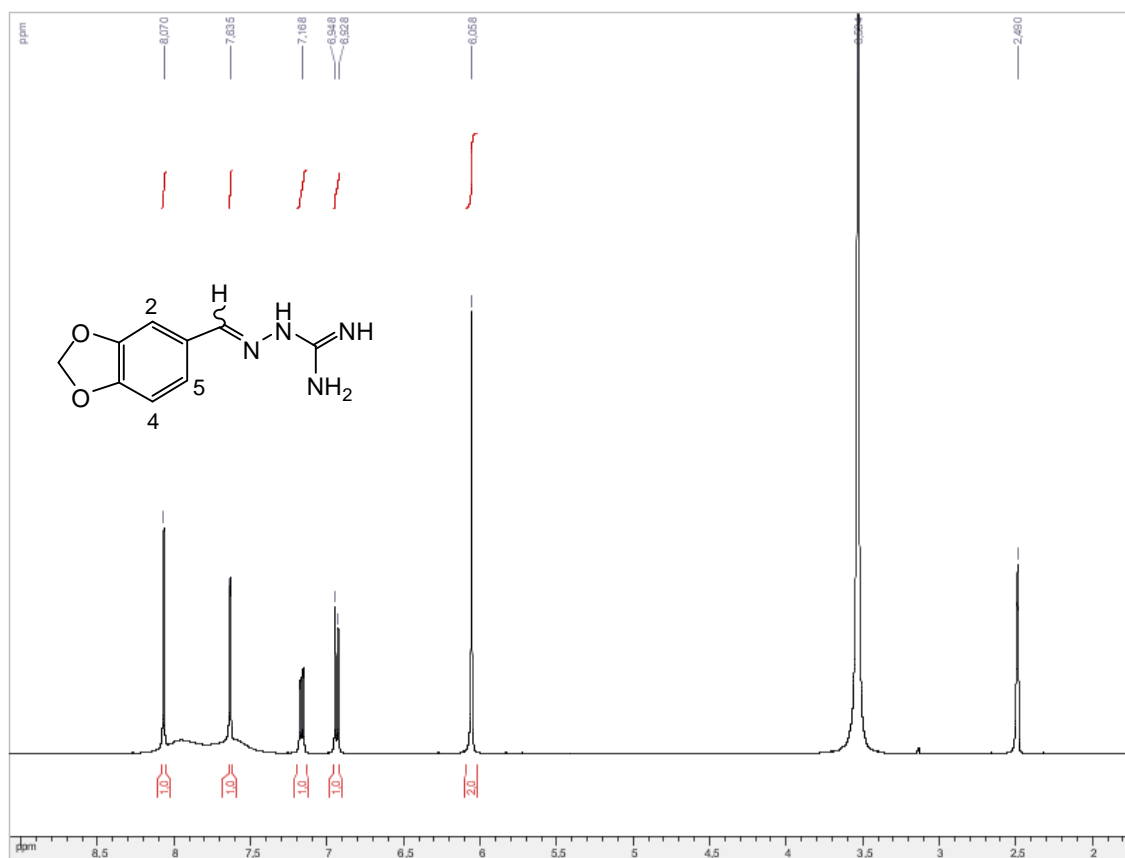
Espectro 8a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 8.

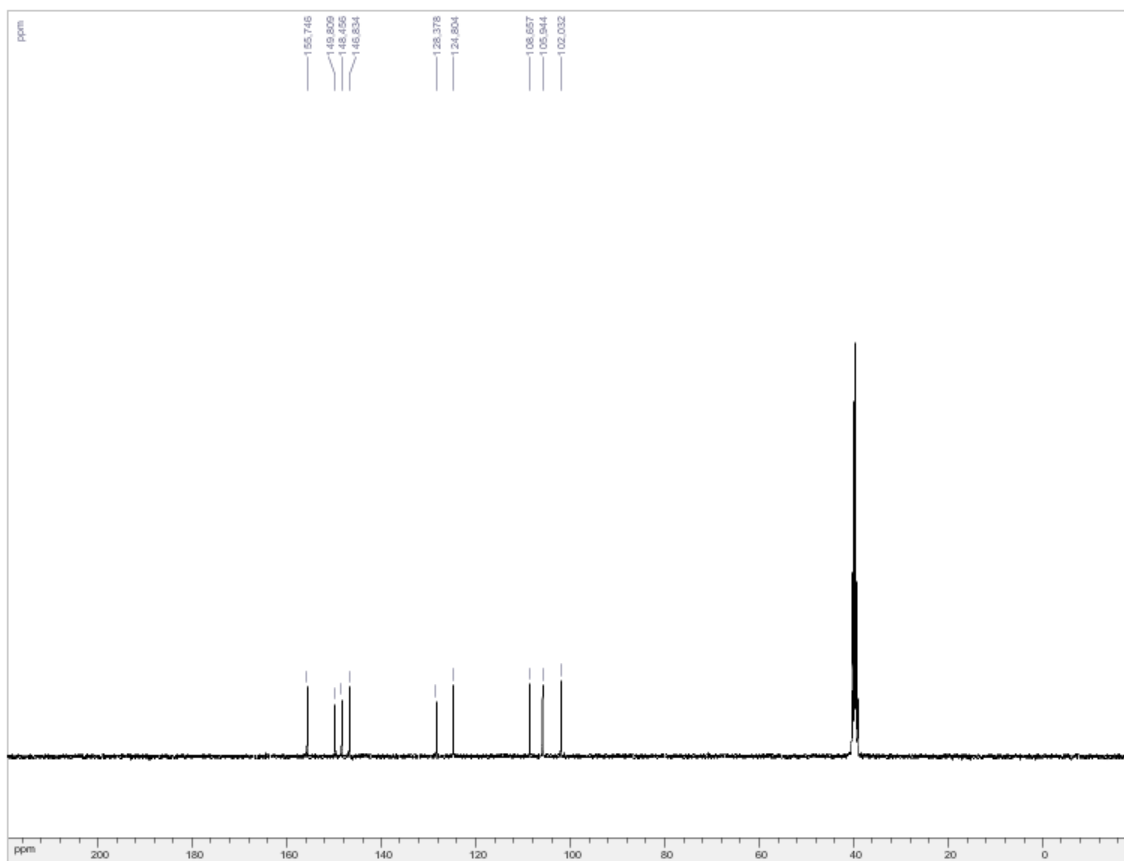


Espectro 8b. Ampliação do espectro de $\delta 7,6$ a $\delta 8,4$.

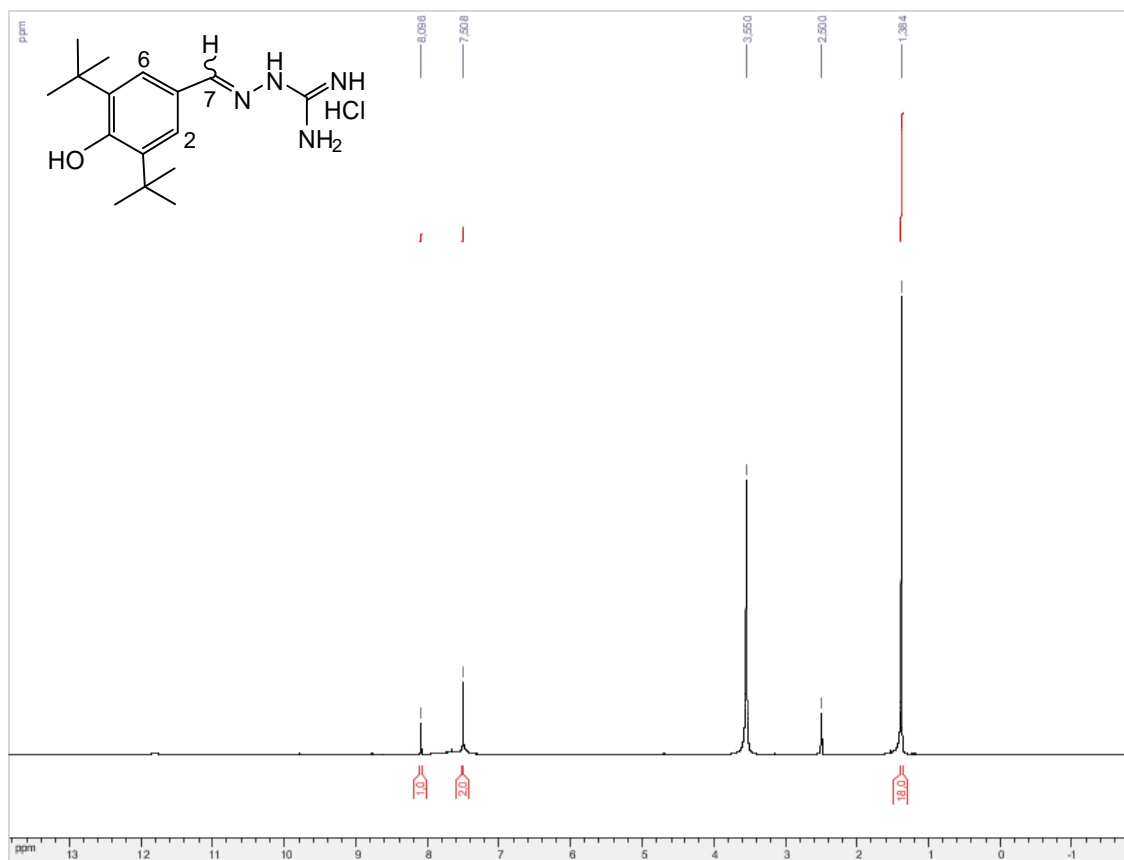


Espectro 8c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 8.

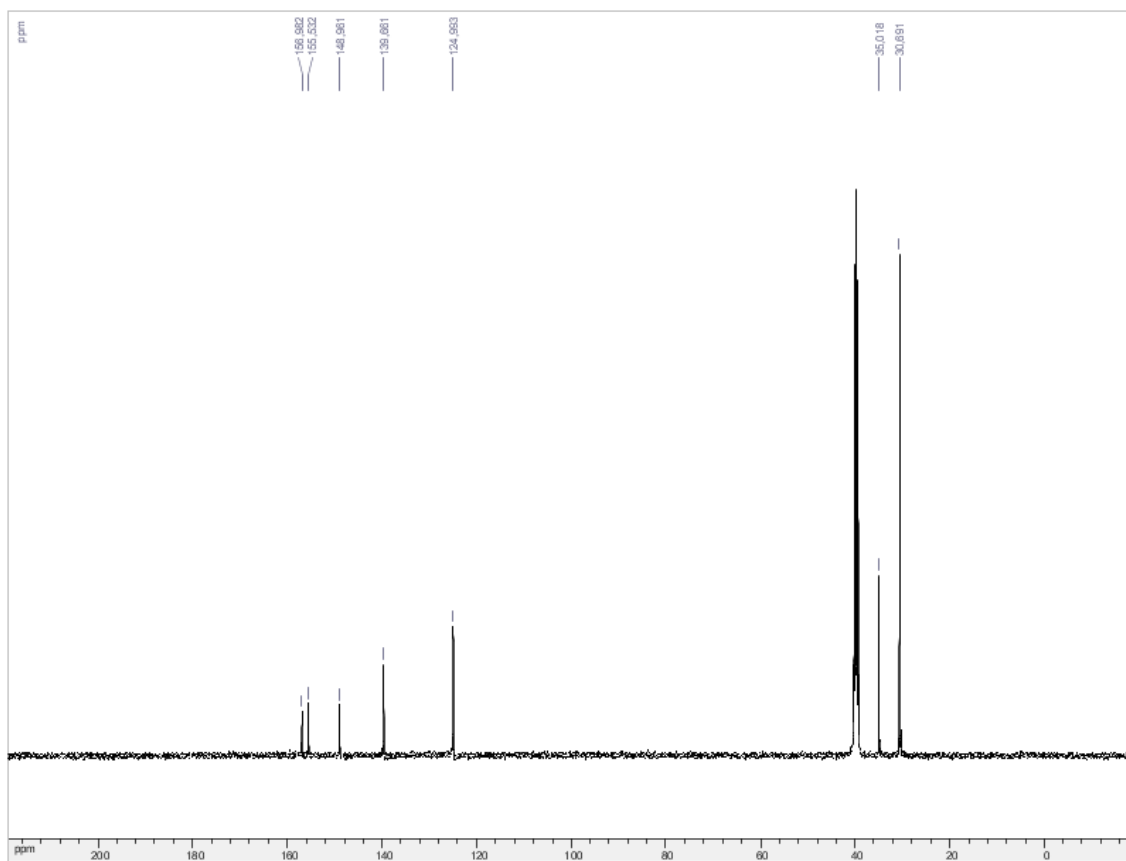




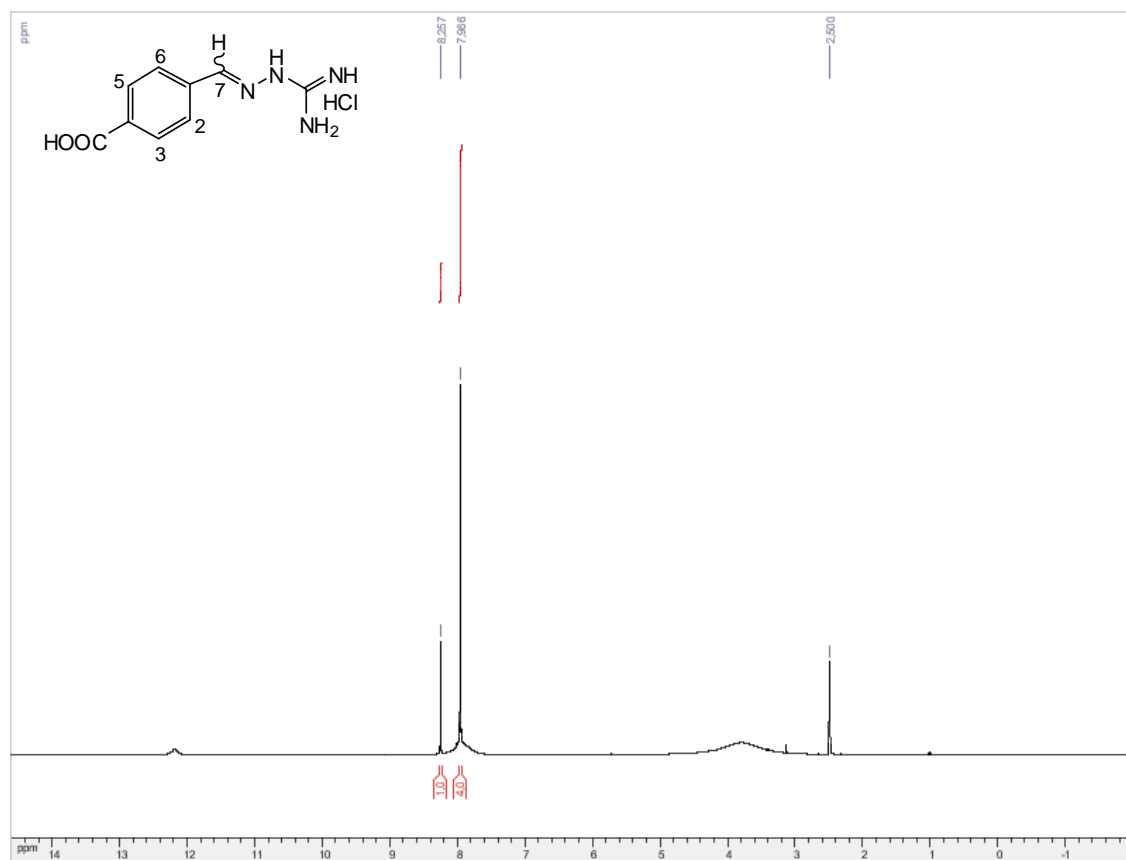
Espectro 9c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 9.



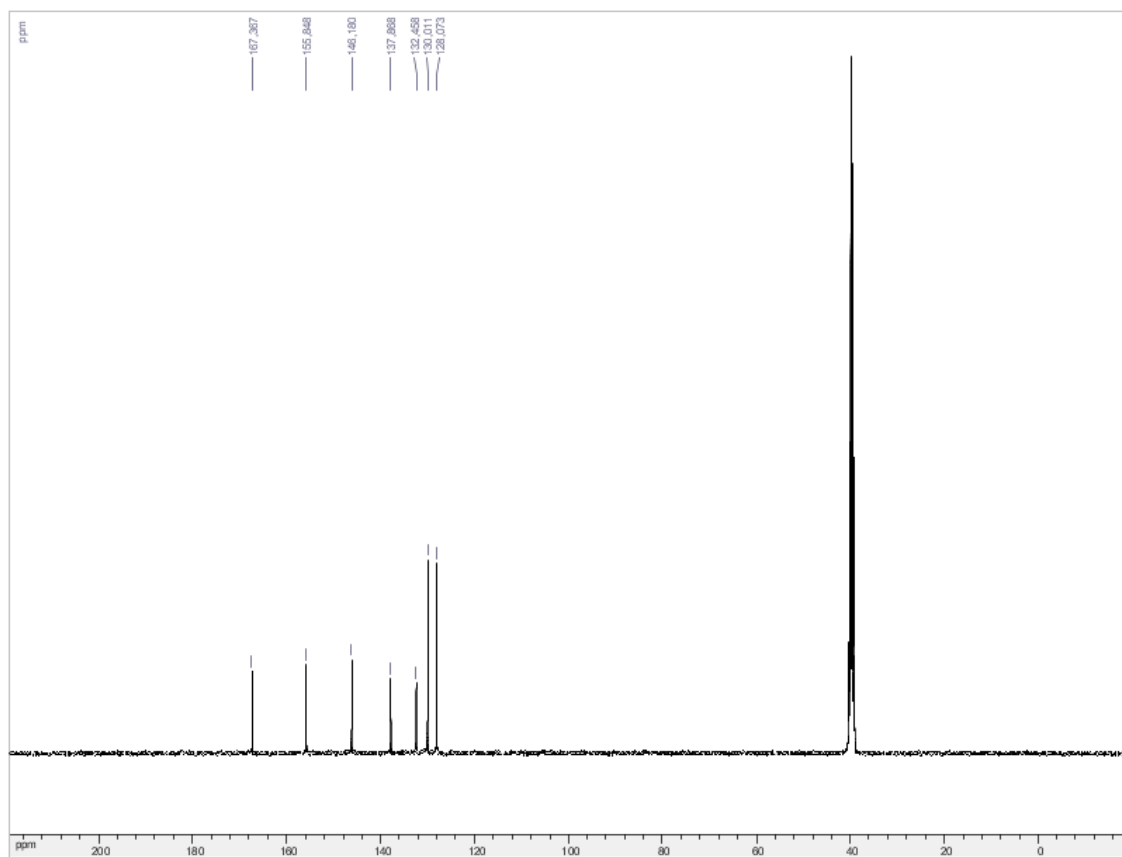
Espectro 10a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 10.



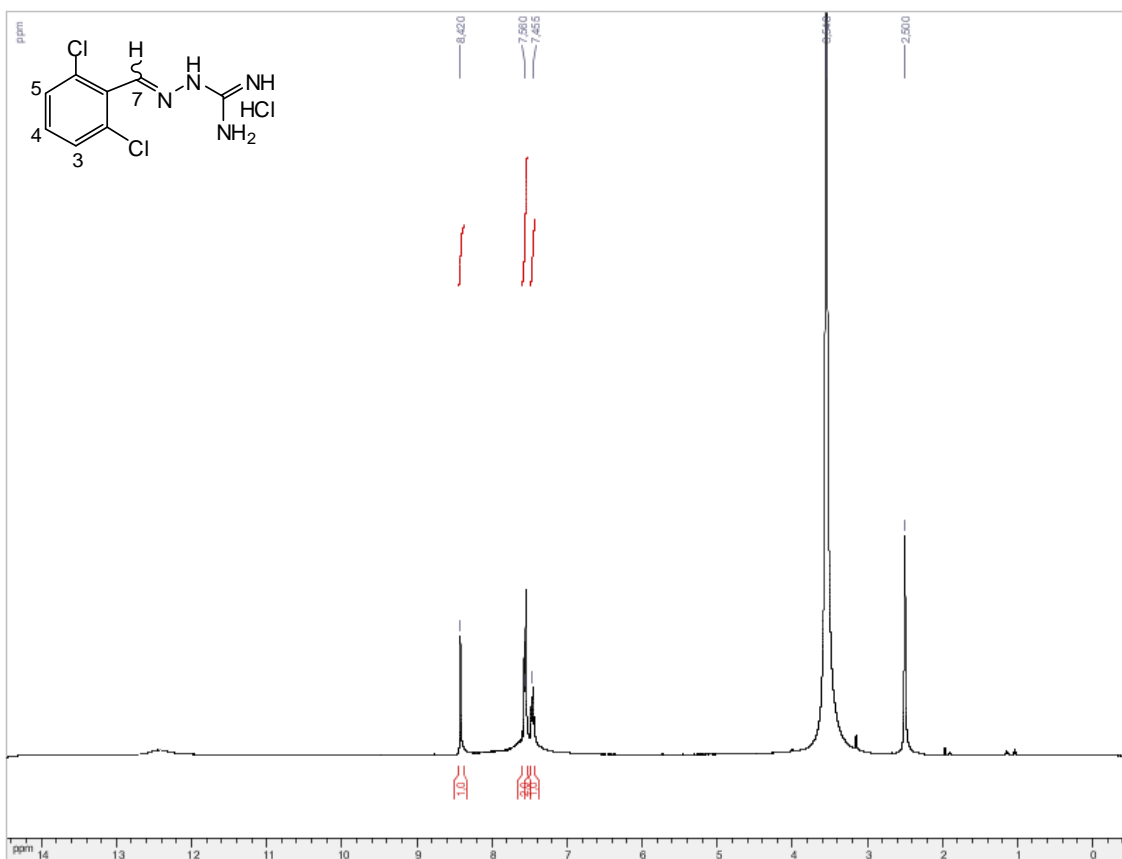
Espectro 10b. RMN ^{13}C (100Hz) em DMSO- d_6 da 10.



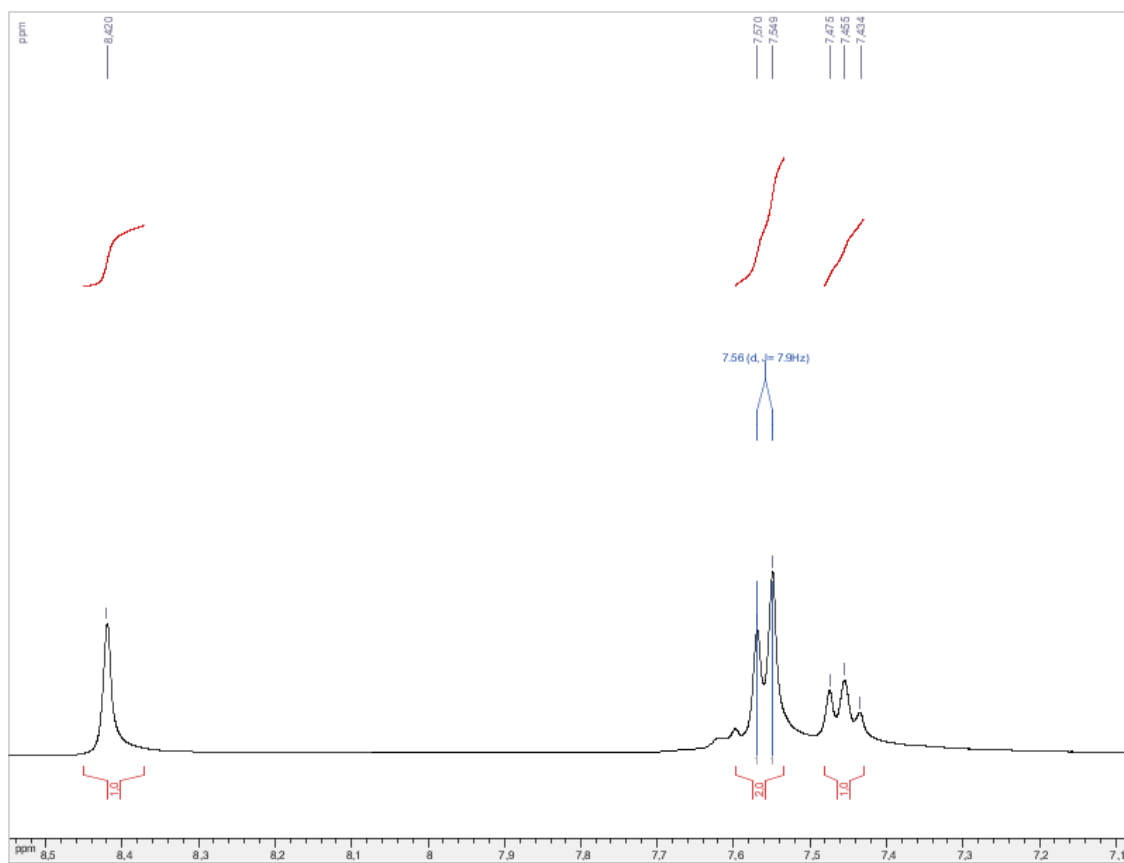
Espectro 11a. RMN ^1H (400Hz) em DMSO- d_6 da substância 11.



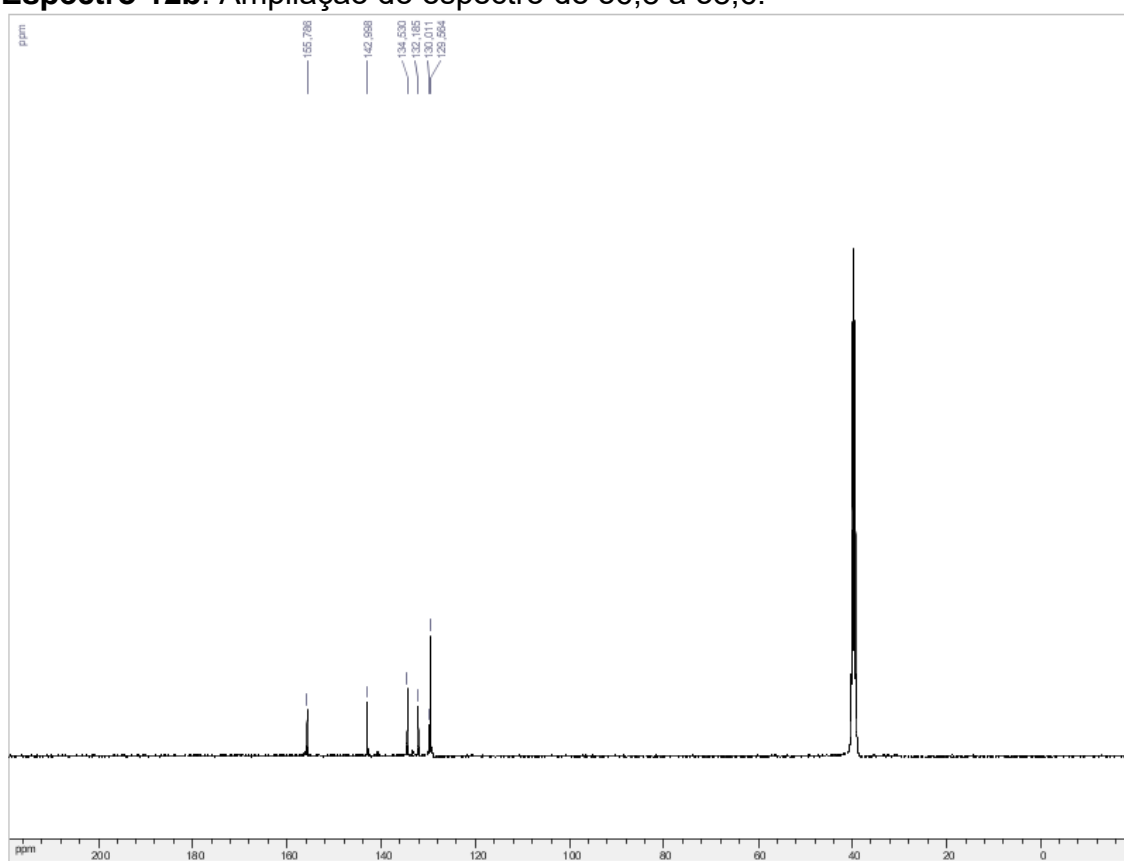
Espectro 11b. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 11.



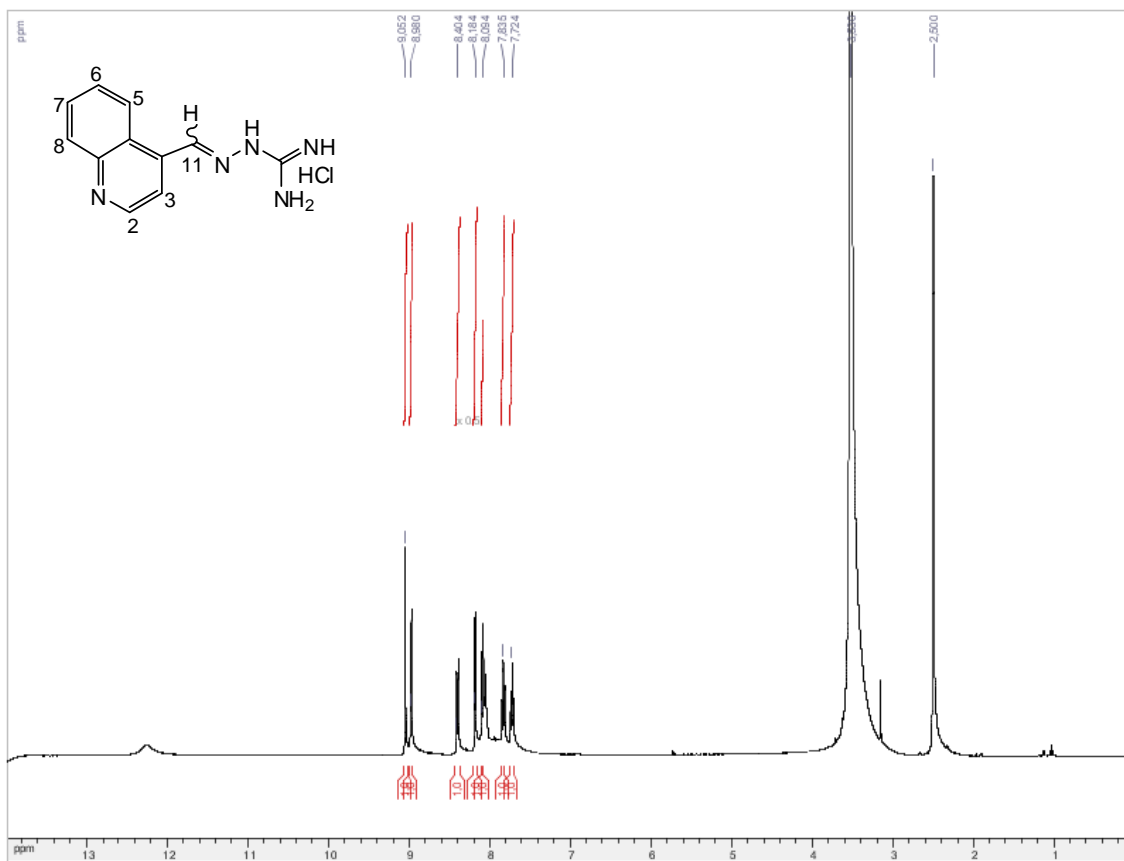
Espectro 12a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 12.



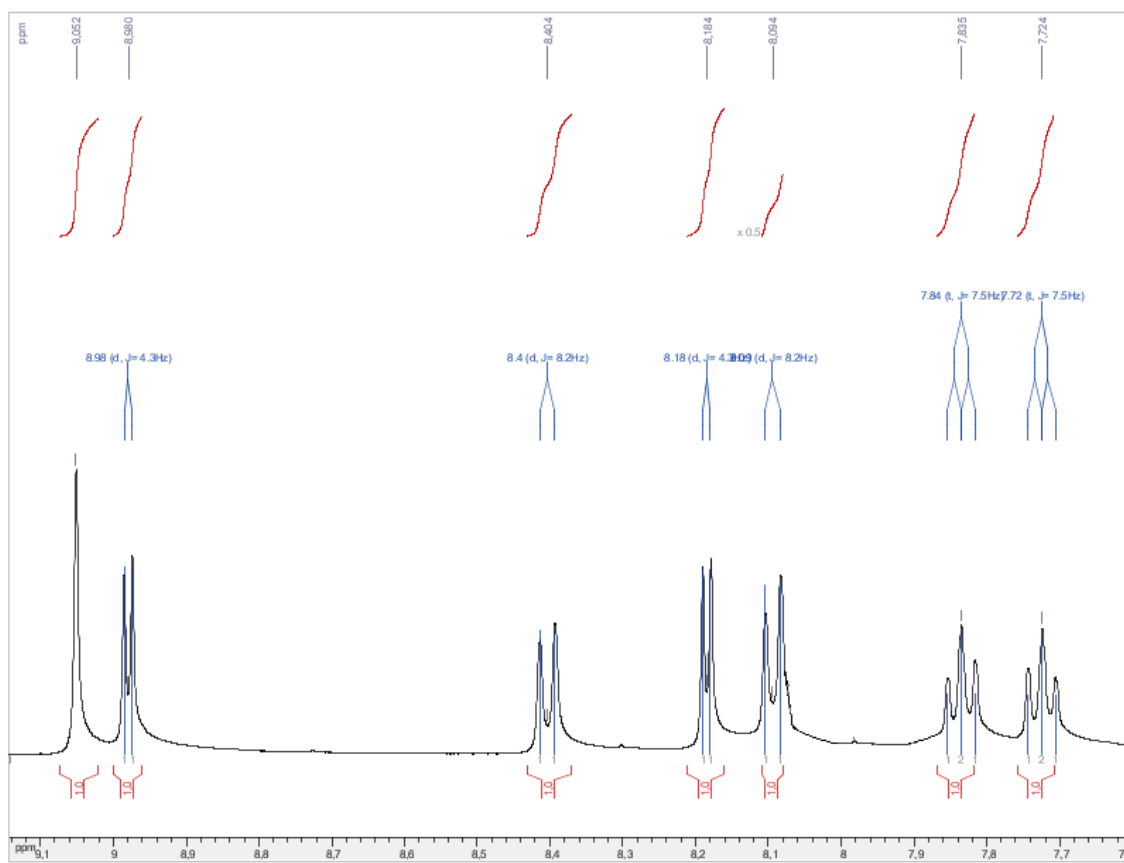
Espectro 12b. Ampliação do espectro de $\delta 6,8$ a $\delta 8,6$.



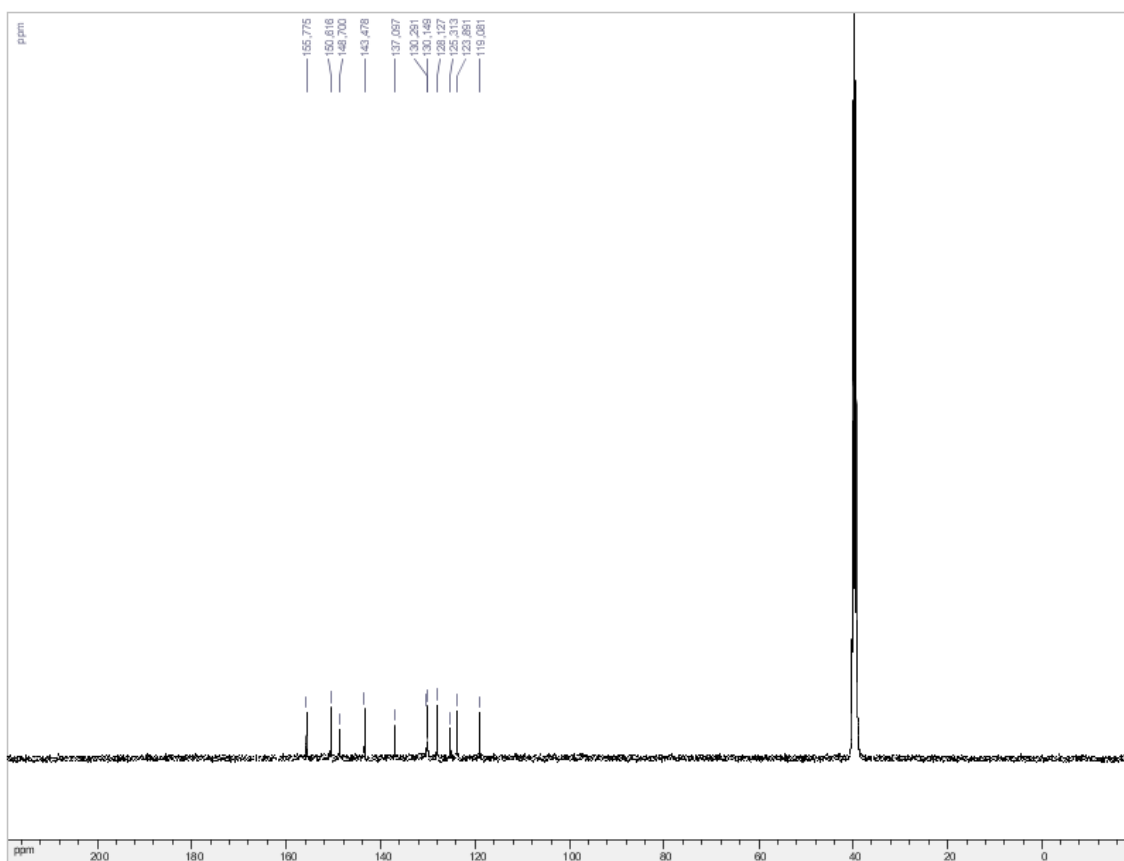
Espectro 12c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 12.



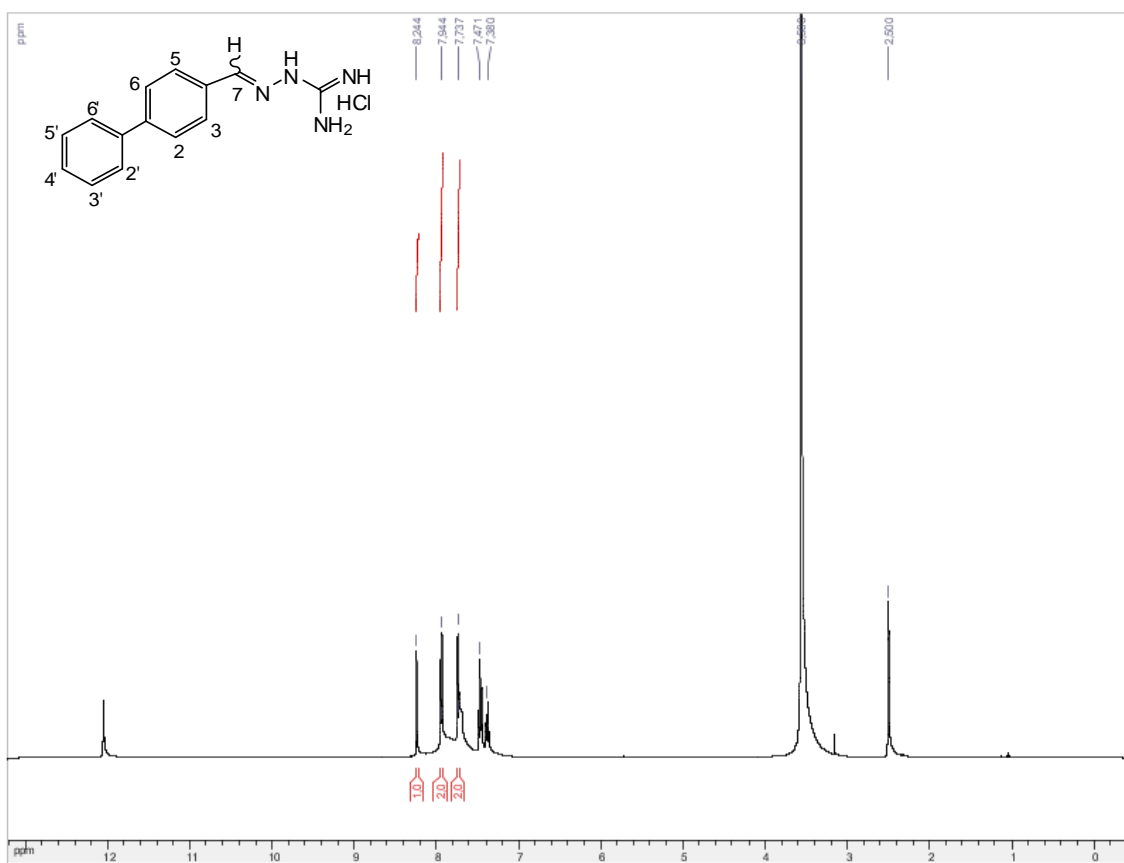
Espectro 13a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO}-d_6$ da substância 13.



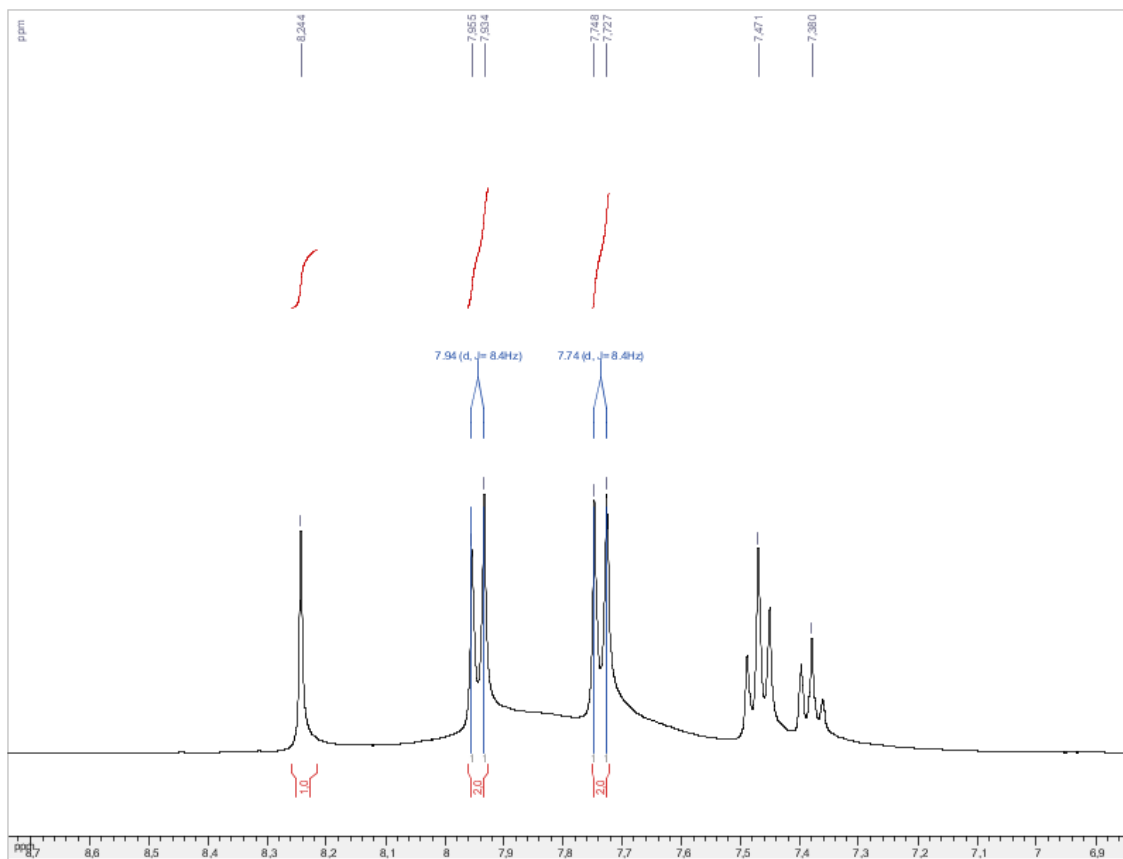
Espectro 13b. Ampliação do espectro de $\delta 6,8$ a $\delta 8,6$.



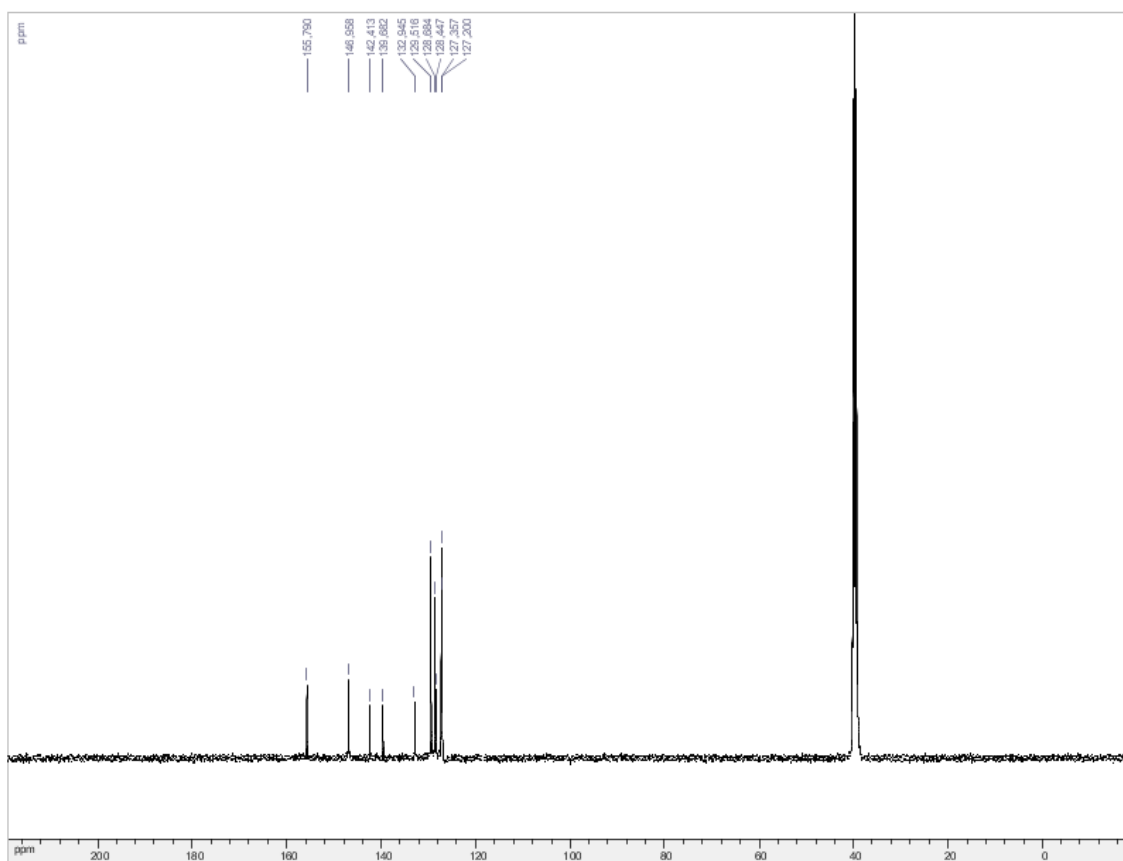
Espectro 13c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 13.



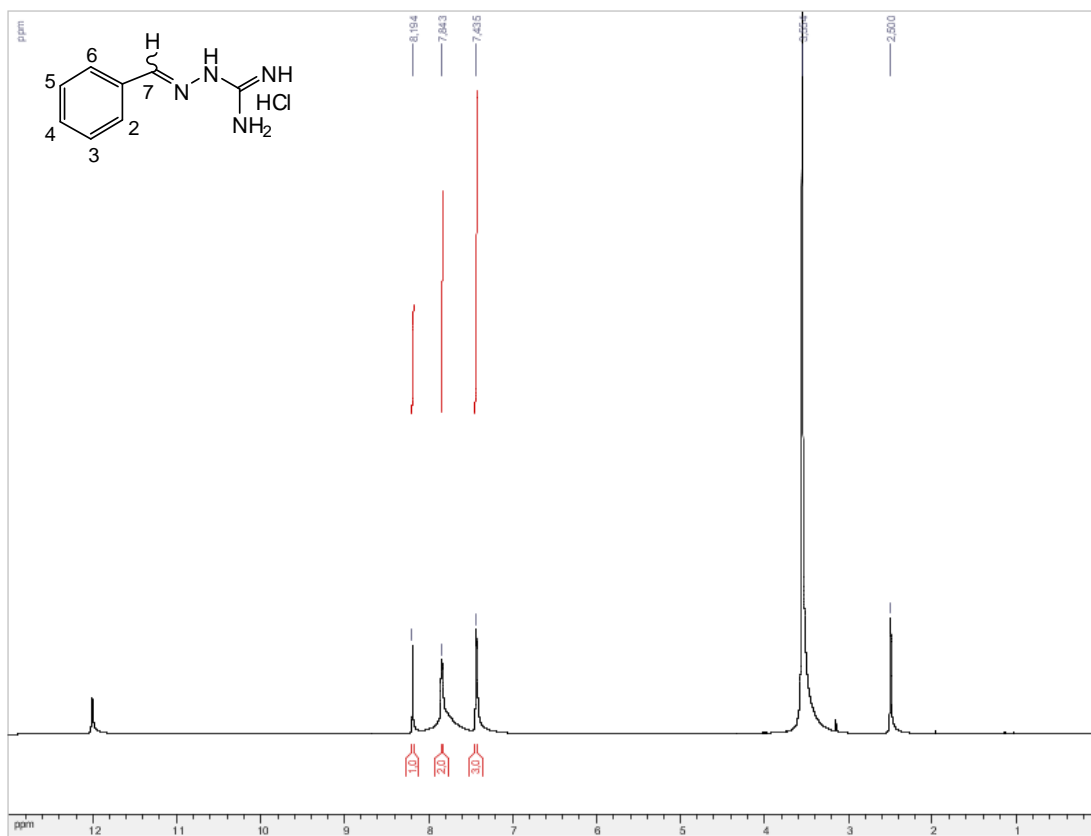
Espectro 14a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 14.



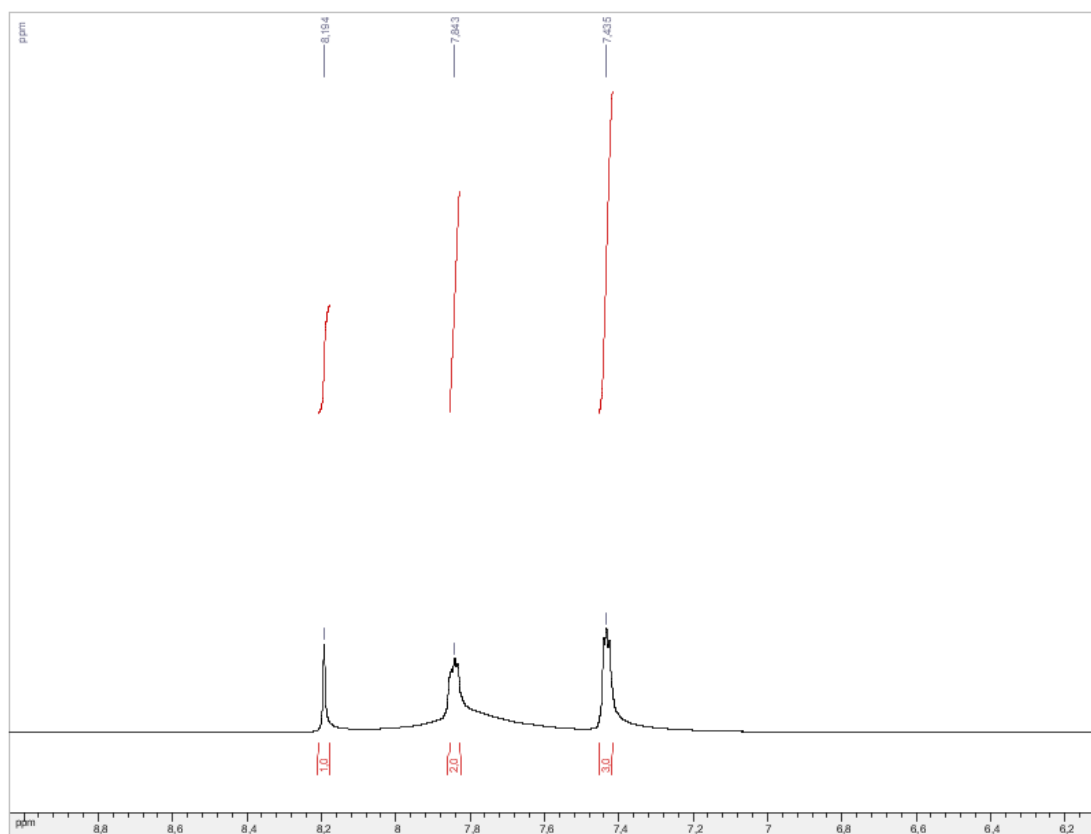
Espectro 14b. Ampliação do espectro de $\delta 8,8$ a $\delta 8,6$.



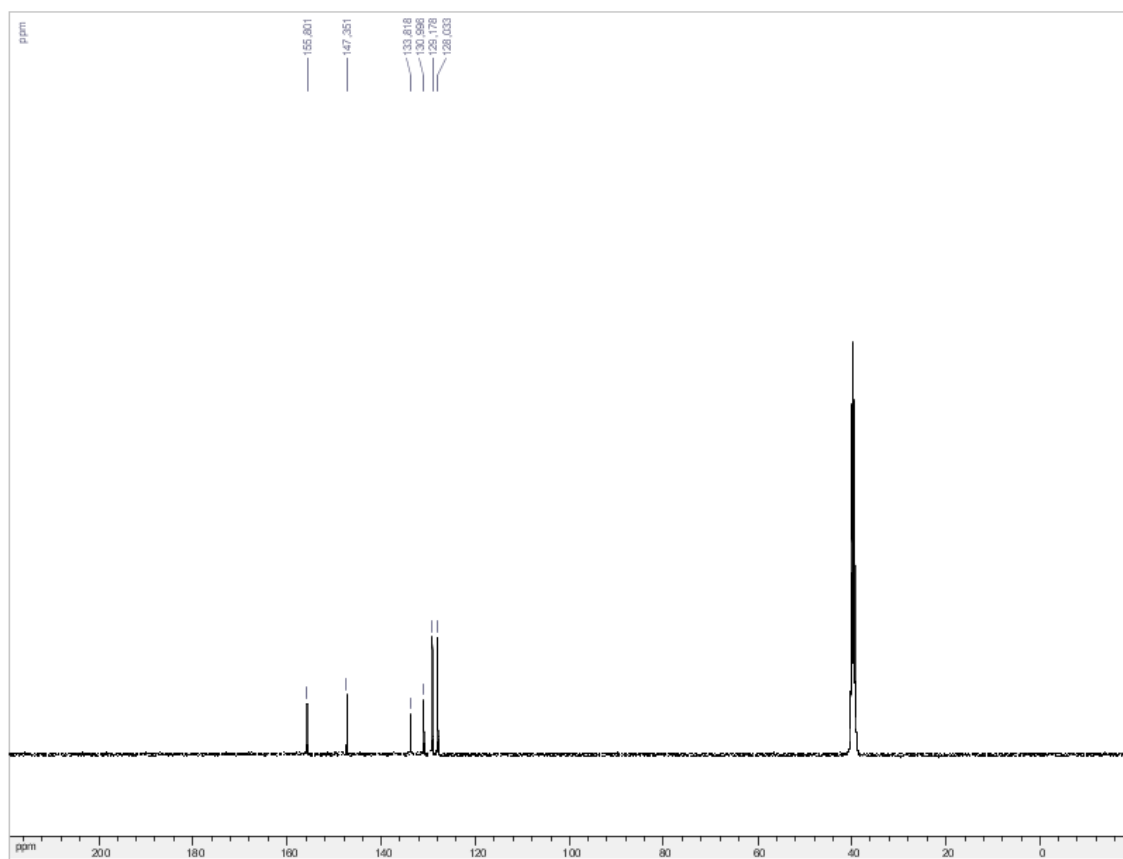
Espectro 14c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 14.



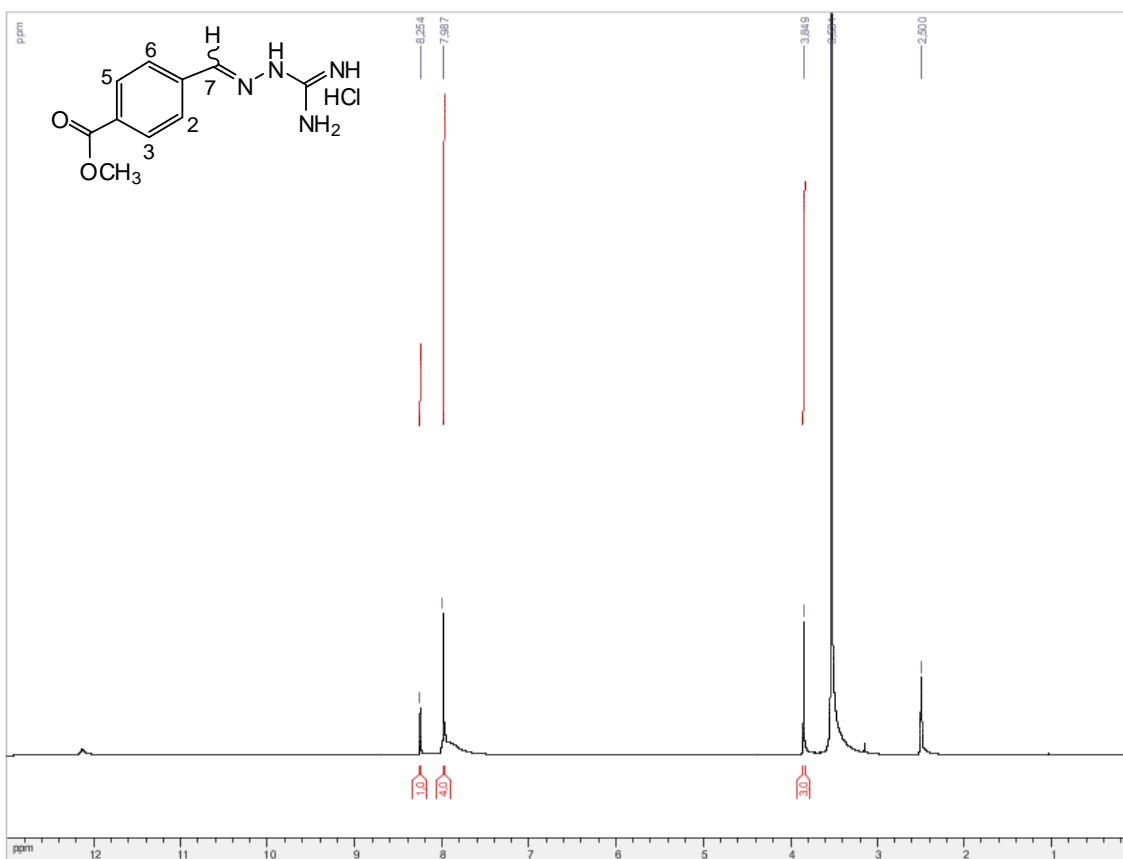
Espectro 15a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 15.



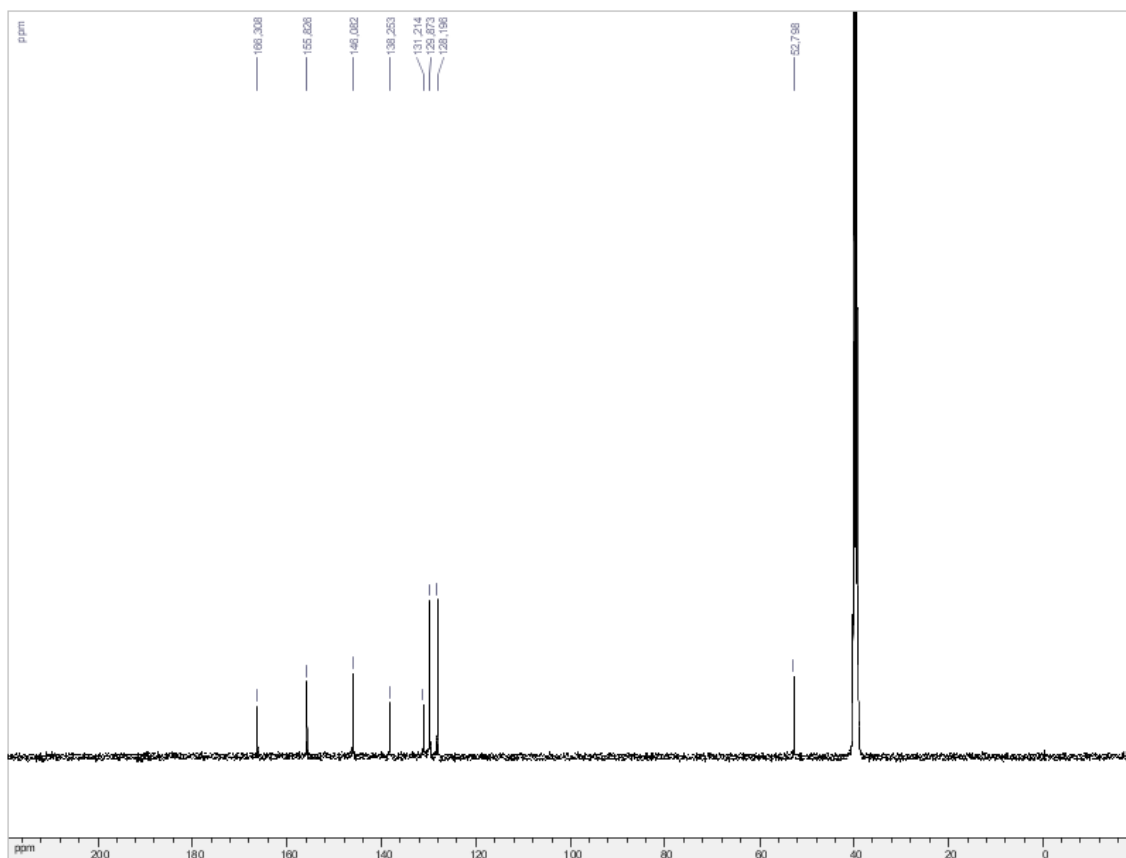
Espectro 15b. Ampliação do espectro de $\delta 6,2$ a $\delta 8,8$.



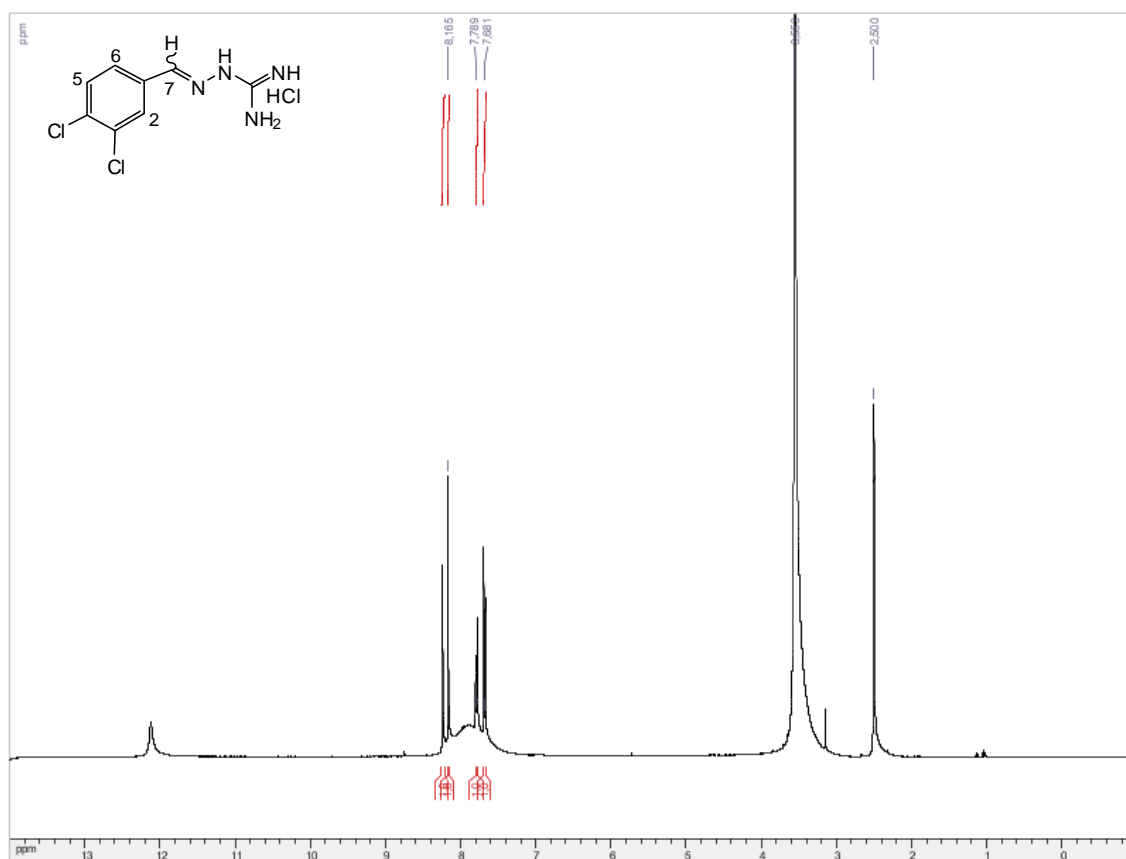
Espectro 15c. RMN ^{13}C (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 15.



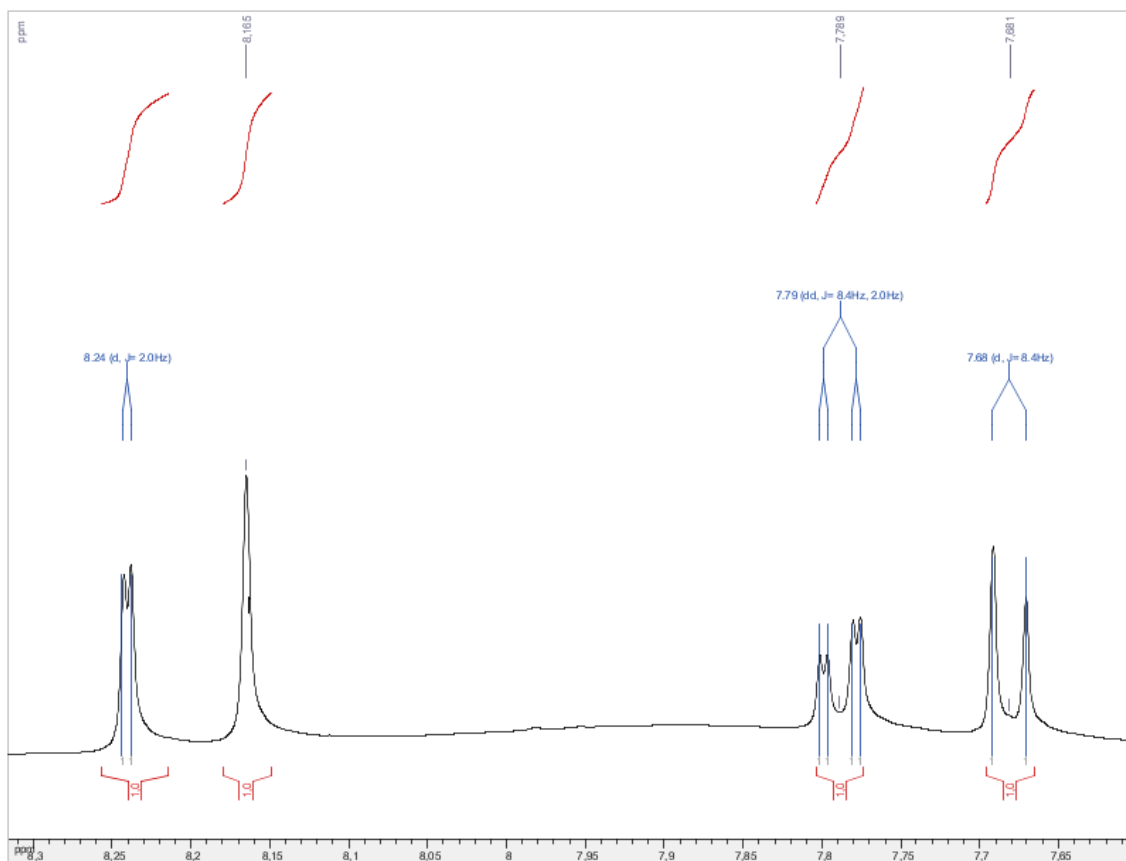
Espectro 16a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 16.



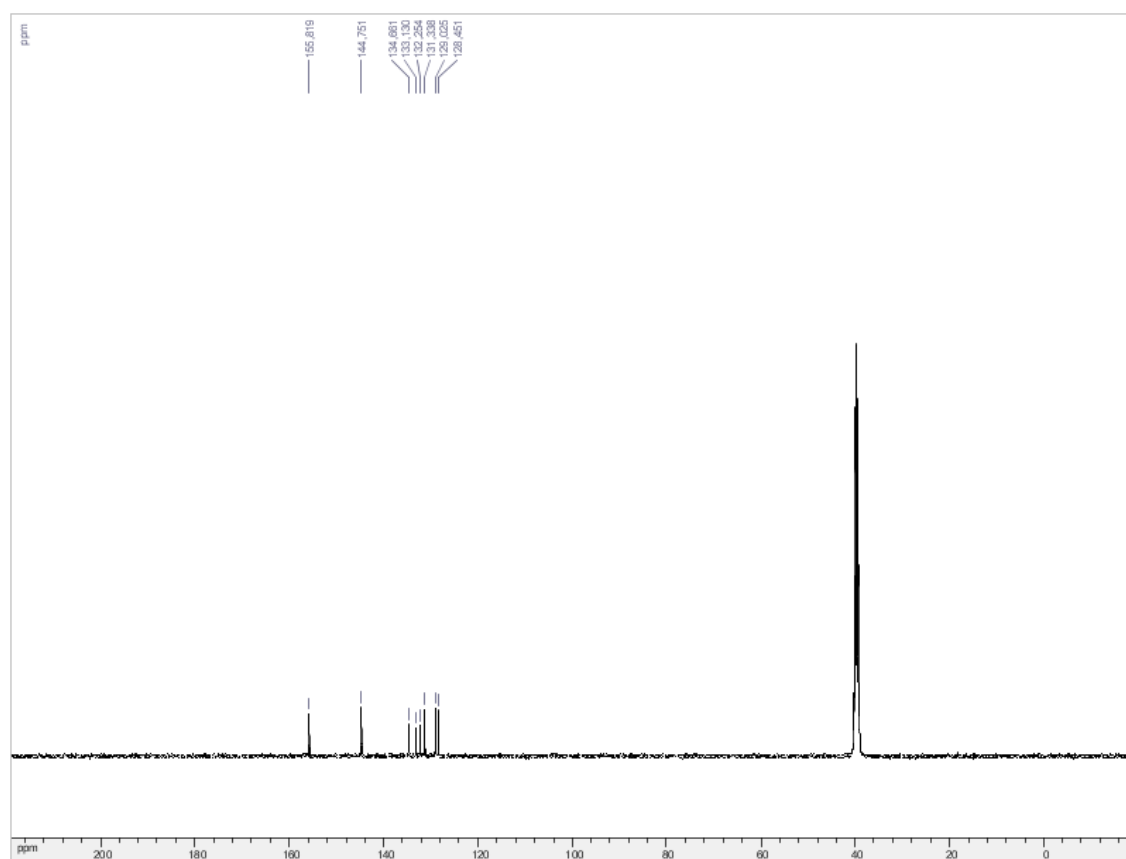
Espectro 16b. RMN ^{13}C (100Hz) em DMSO- d_6 da 16.



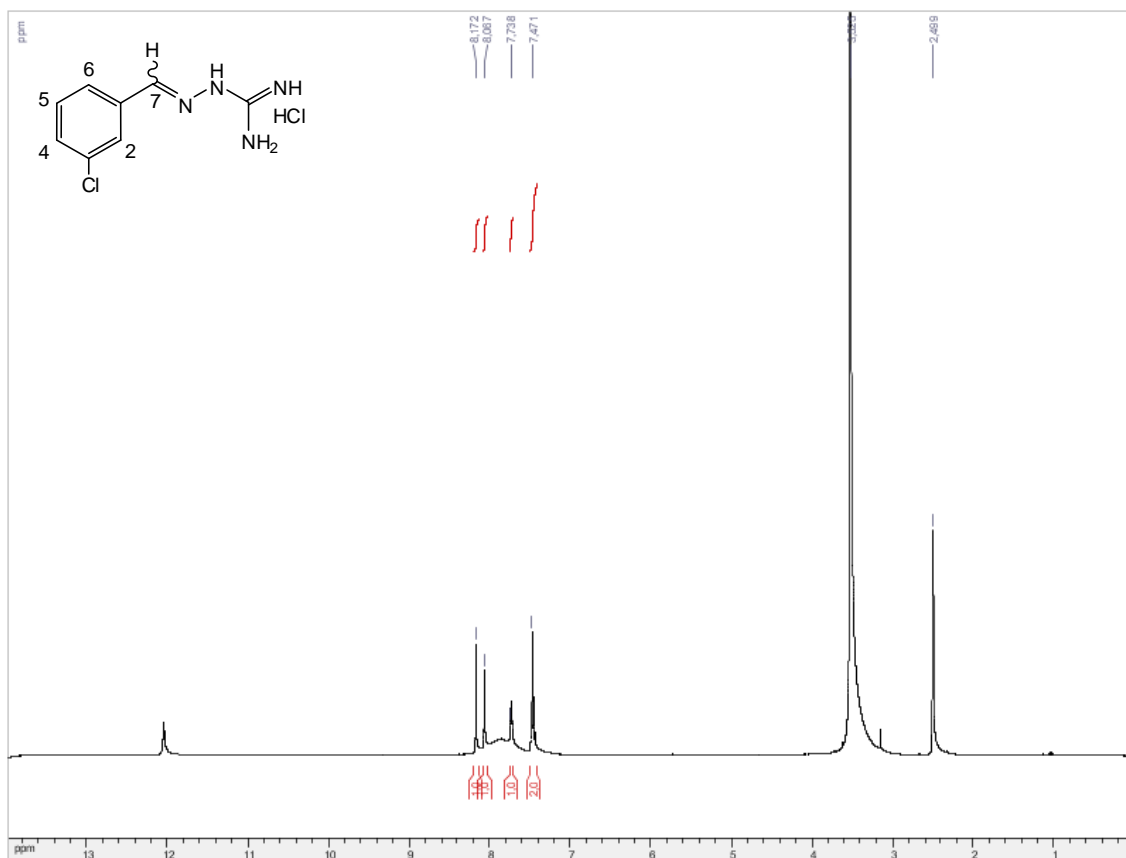
Espectro 17a. RMN ^1H (400Hz) em DMSO- d_6 da substância 17.



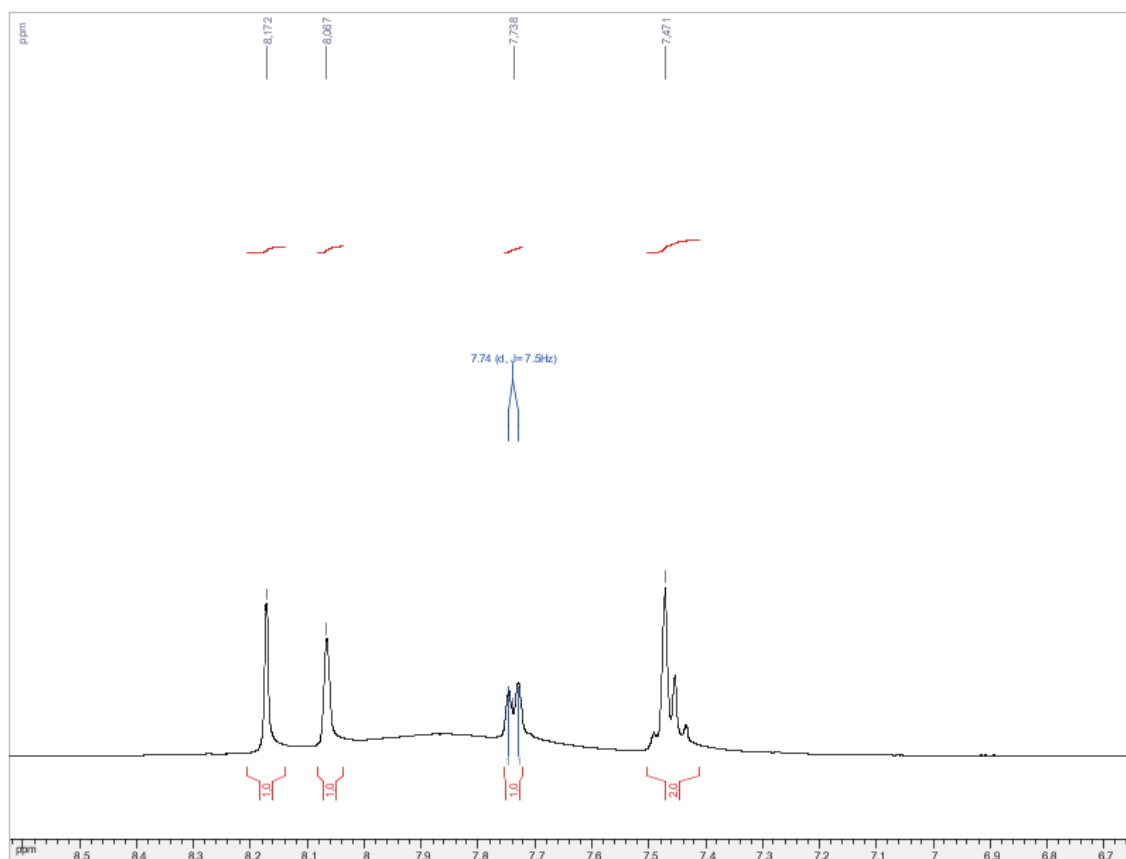
Espectro 17b. Ampliação de $\delta 7,0$ a $\delta 8,3$.



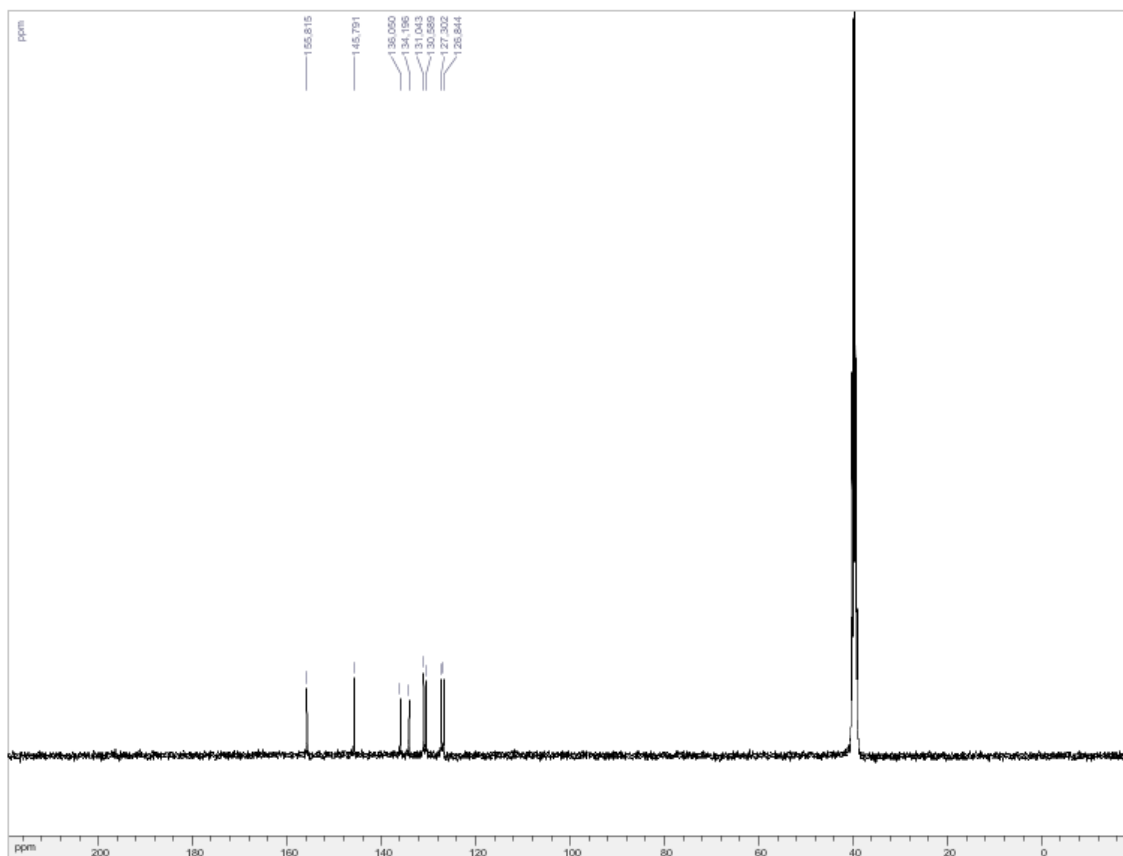
Espectro 17c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO}-d_6$ da substância 17.



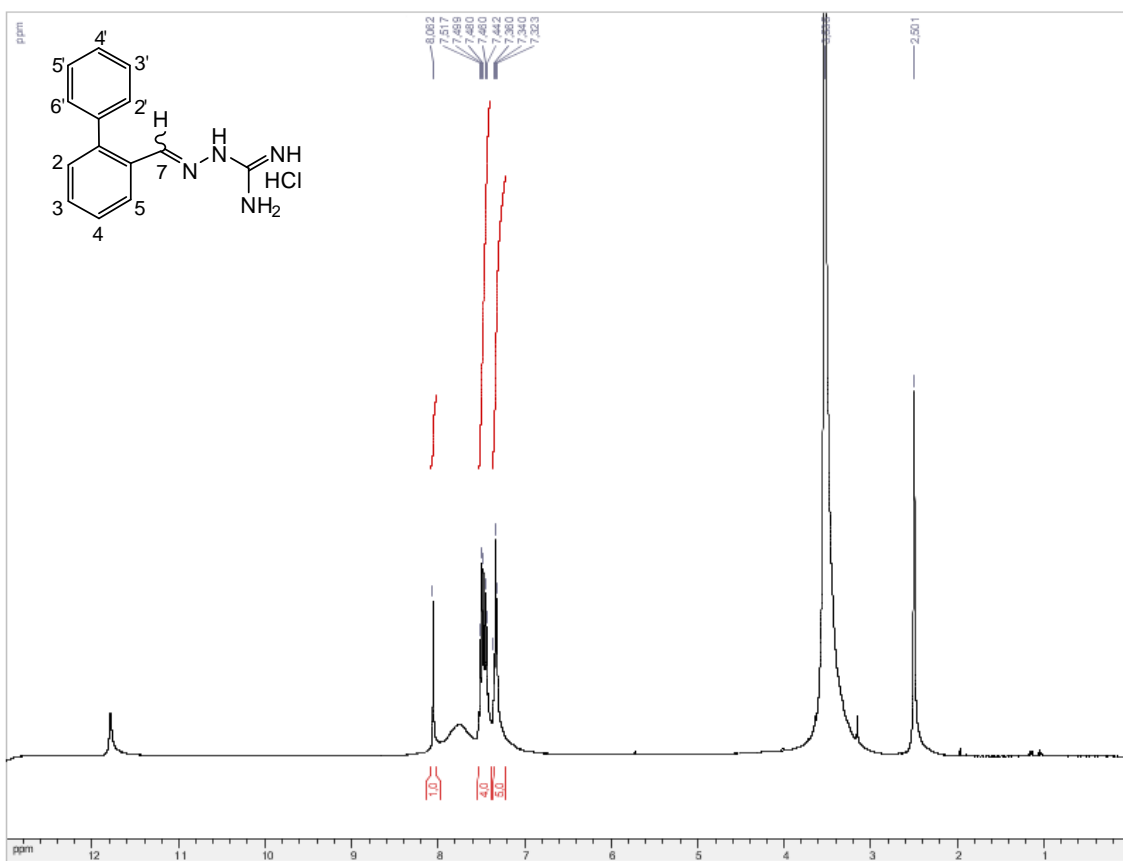
Espectro 18a. RMN ¹H (400Hz) em DMSO-*d*₆ da substância 18.



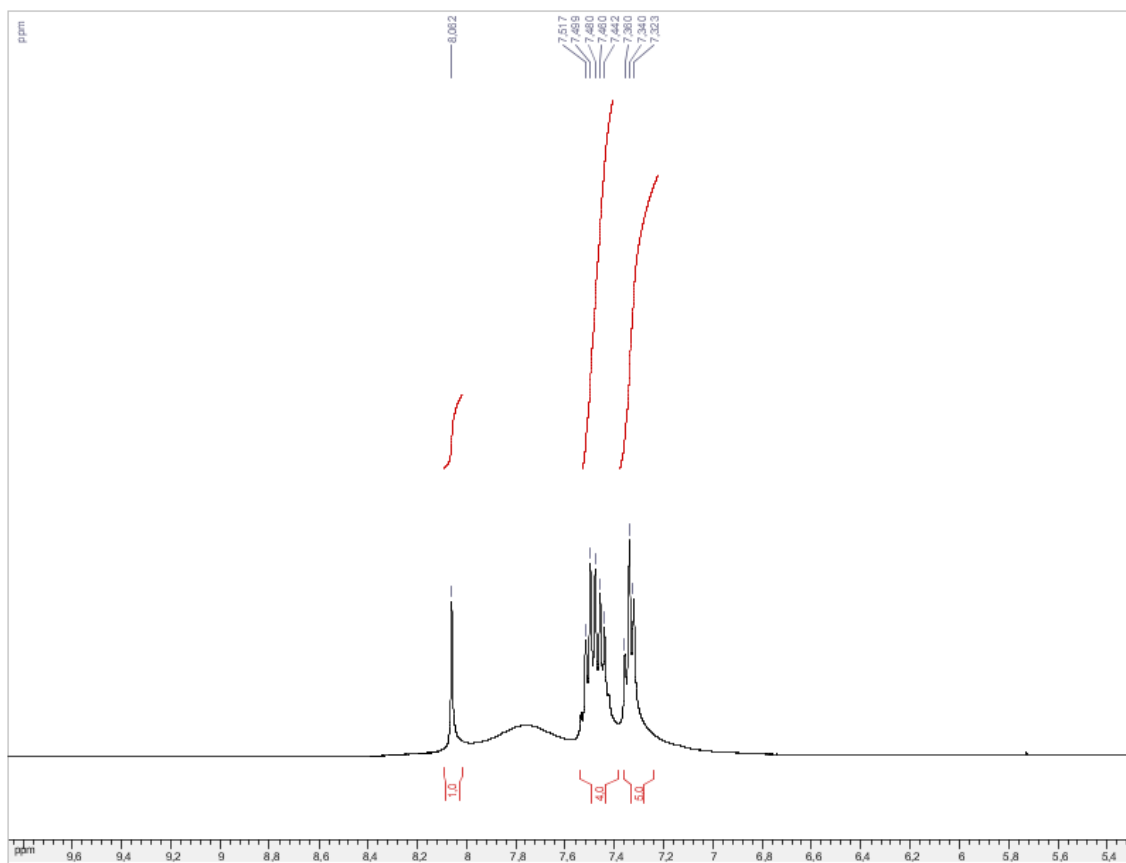
Espectro 18b. Ampliação de $\delta 6,7$ a $\delta 8,5$.



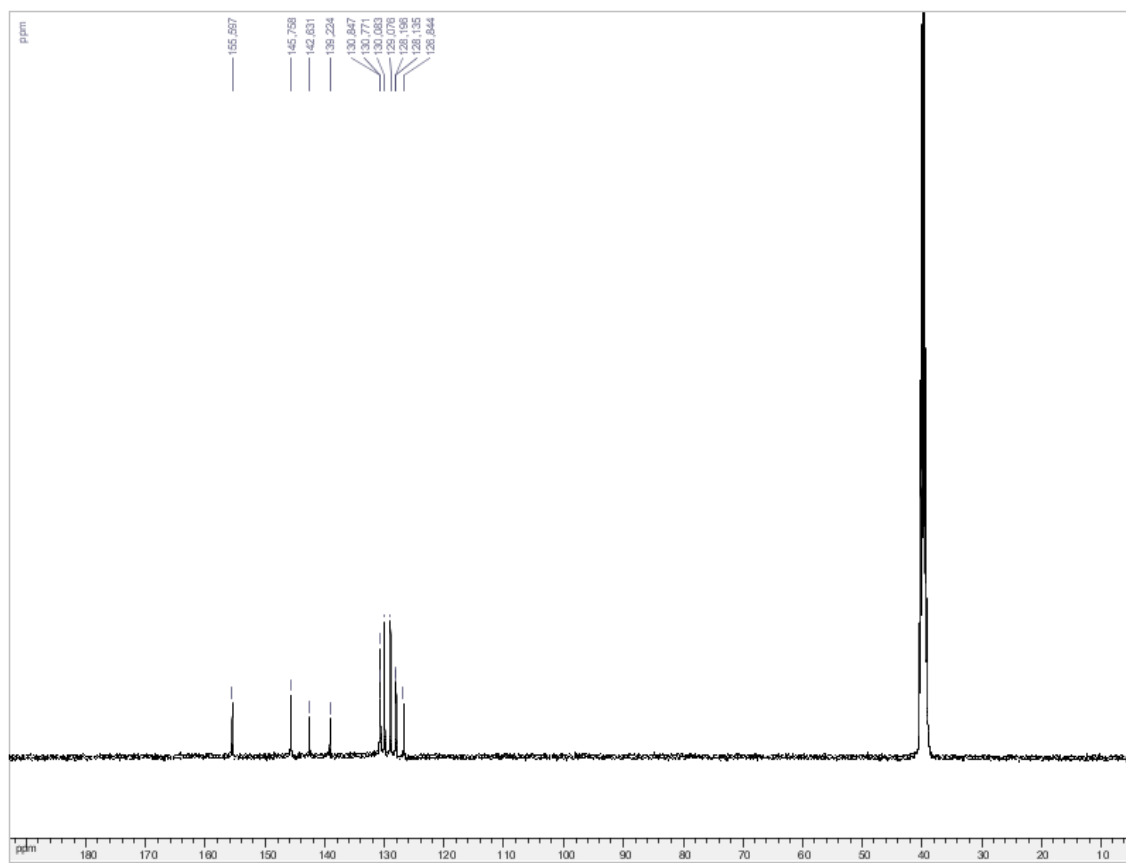
Espectro 18c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 18.



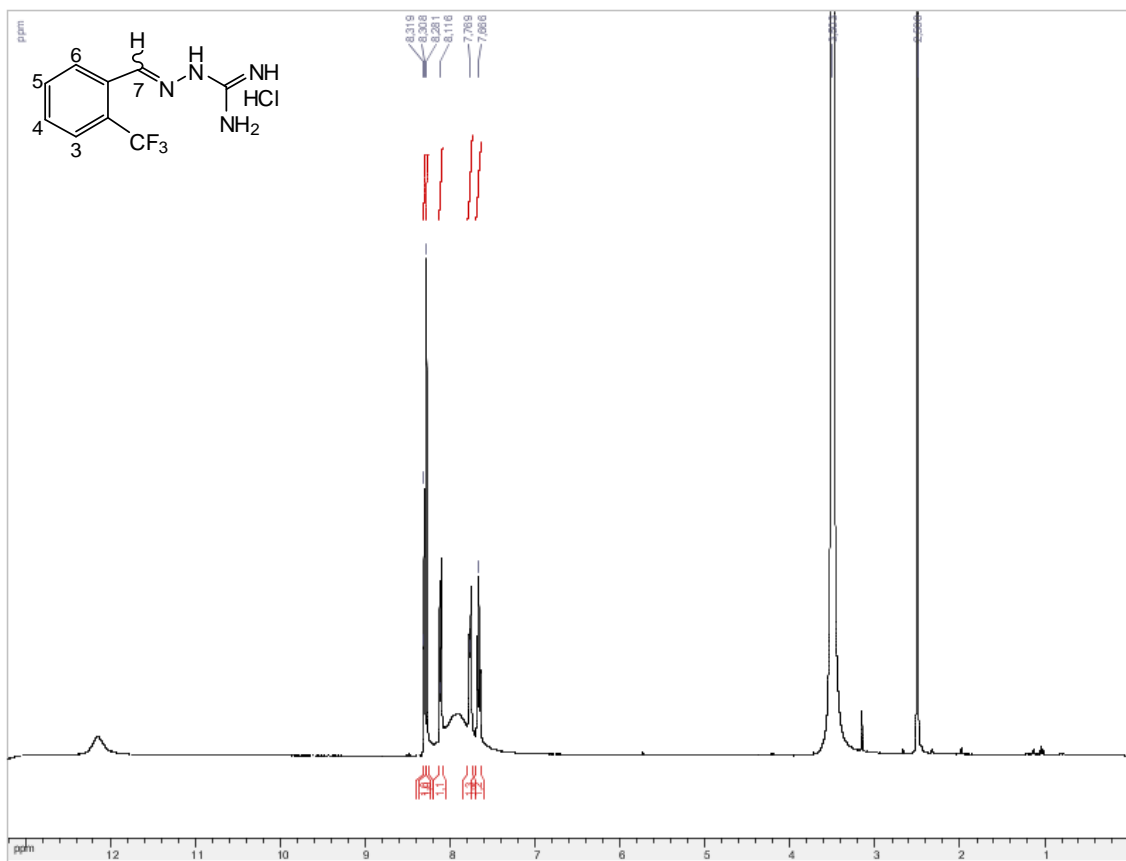
Espectro 19a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 19.



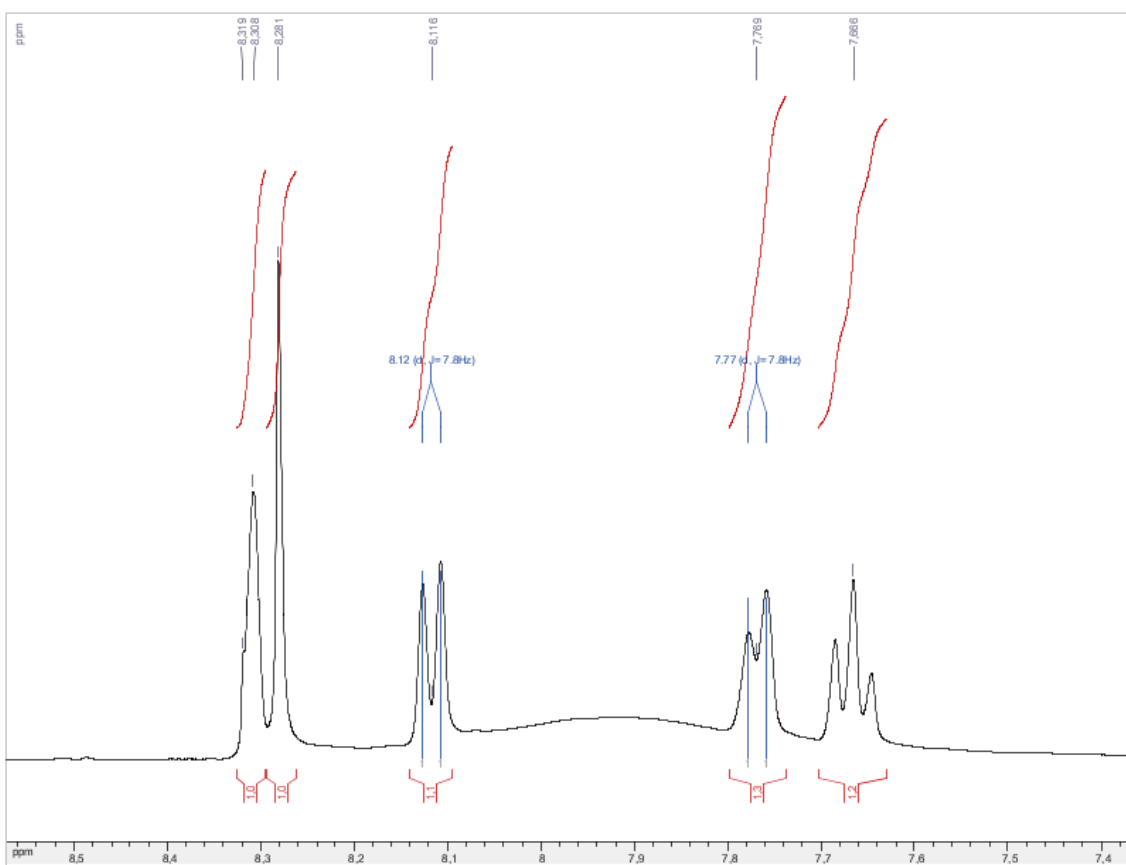
Espectro 19b. Ampliação de δ 5,4 a δ 9,6.



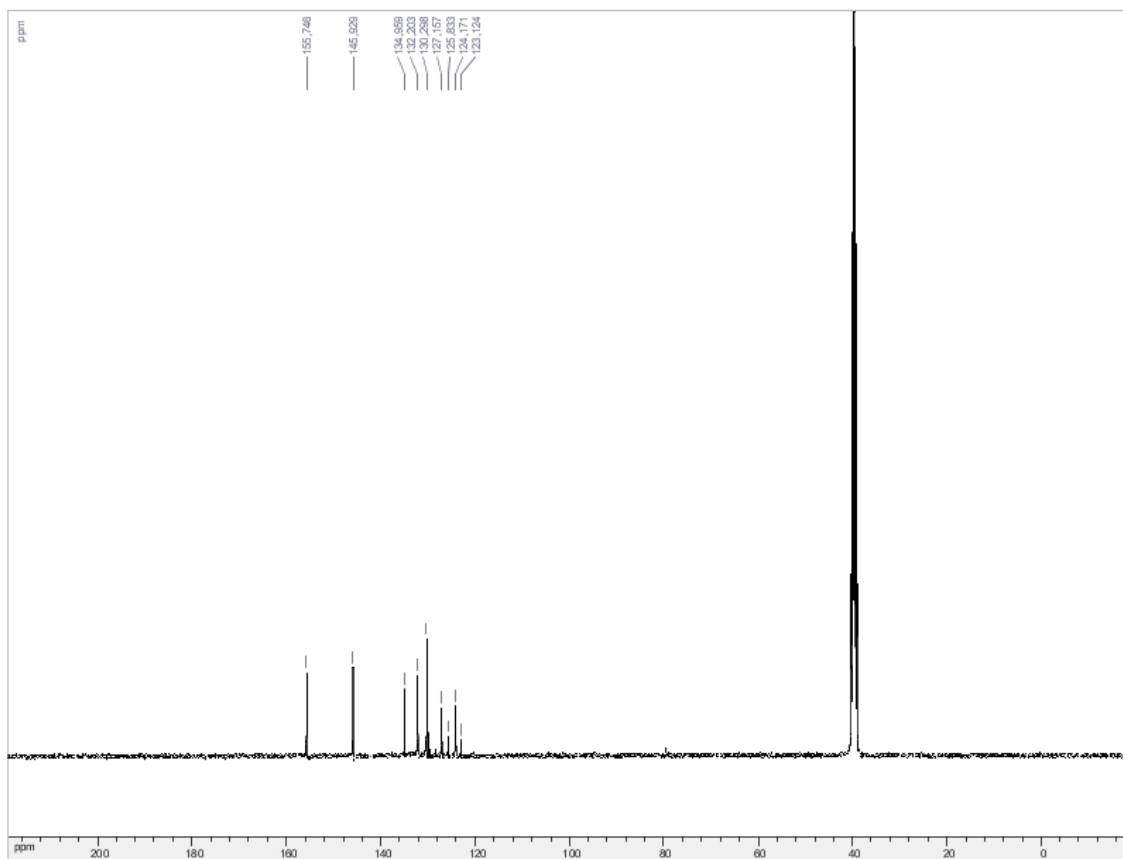
Espectro 19c. RMN ¹³C (100Hz) em DMSO-*d*₆ da substância 19.



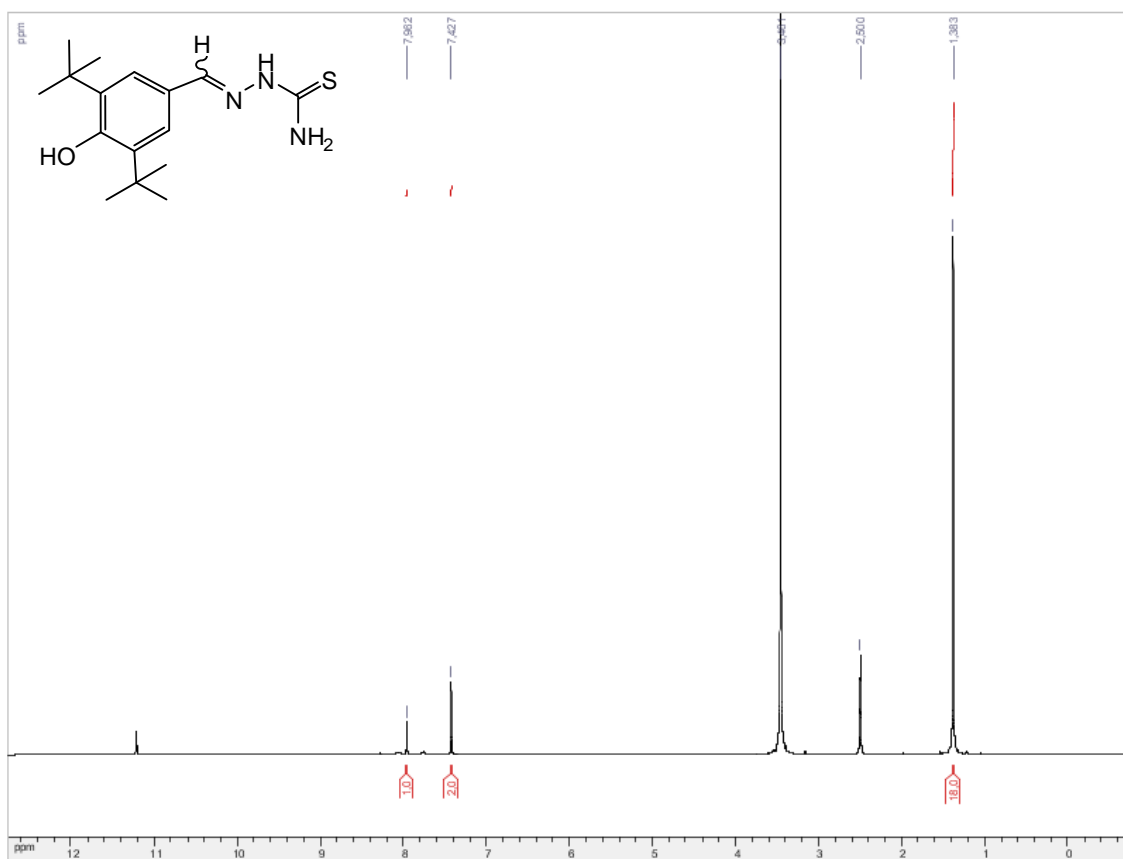
Espectro 20a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 20.



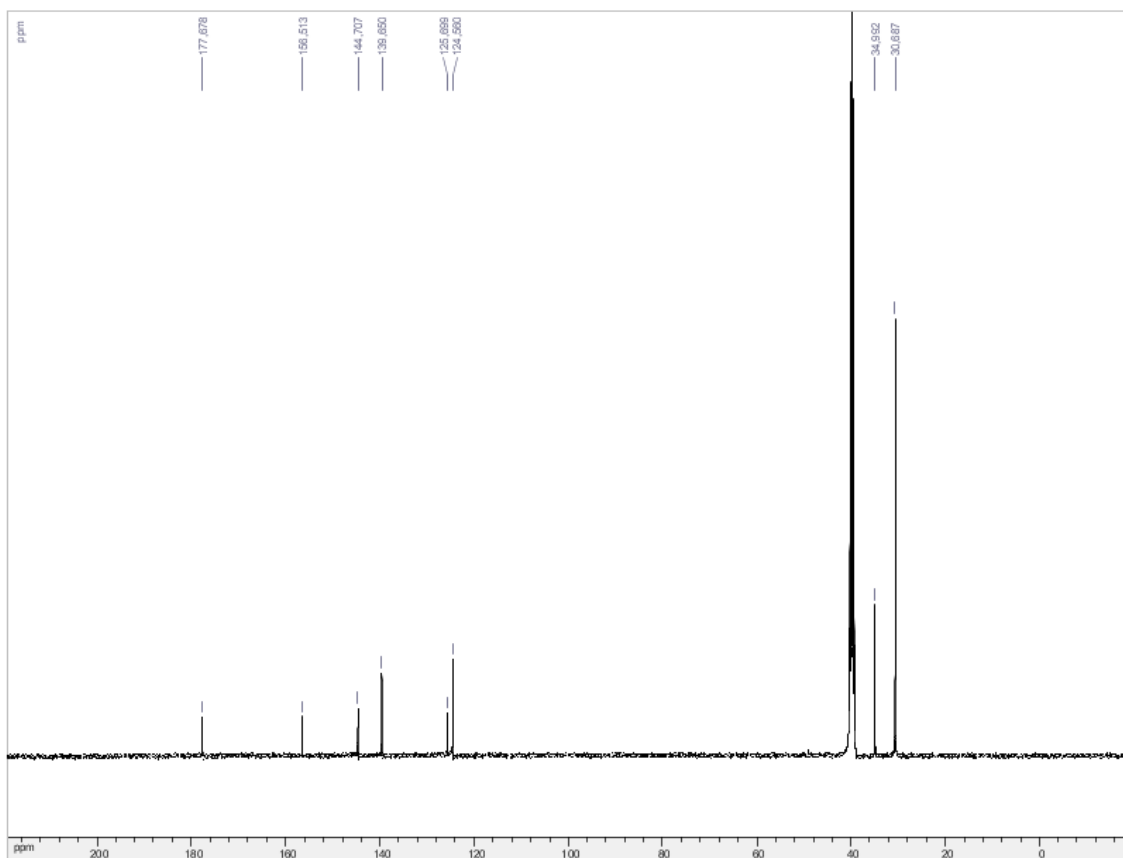
Espectro 20b. Ampliação de δ 7,4 a δ 8,5.



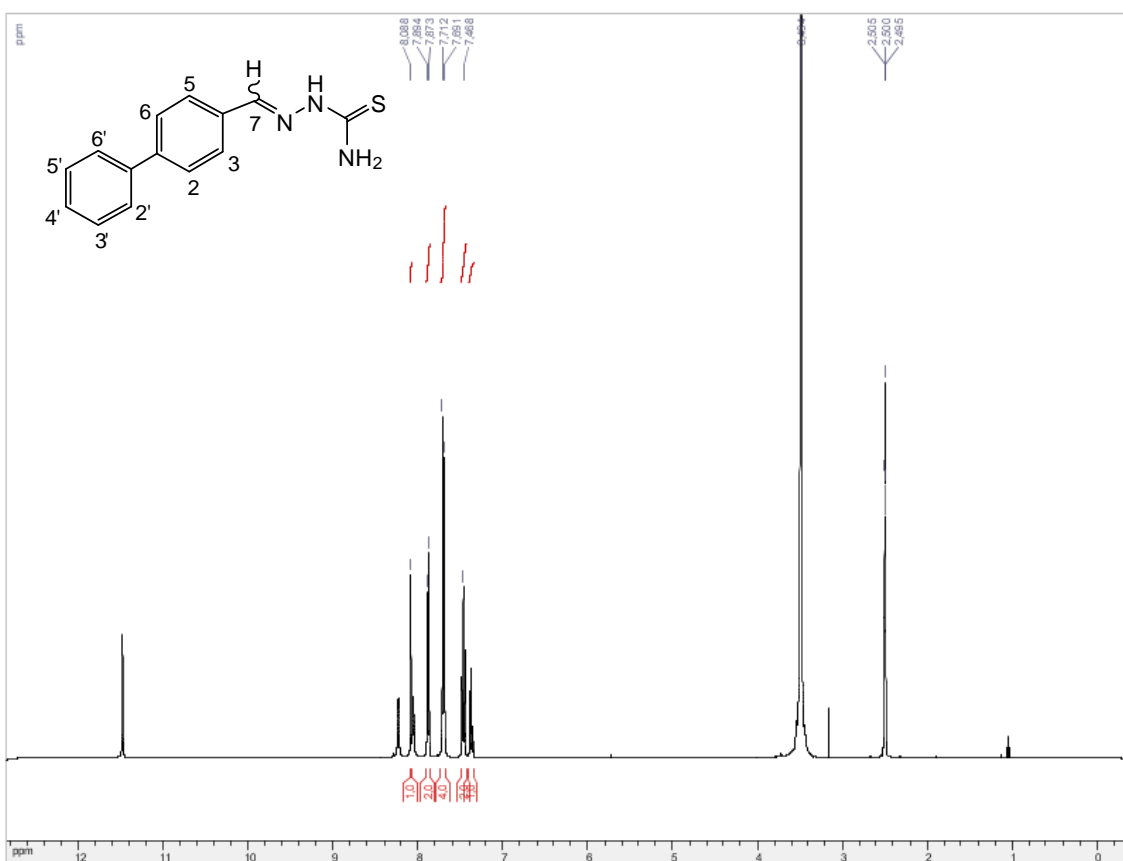
Espectro 20c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 20.



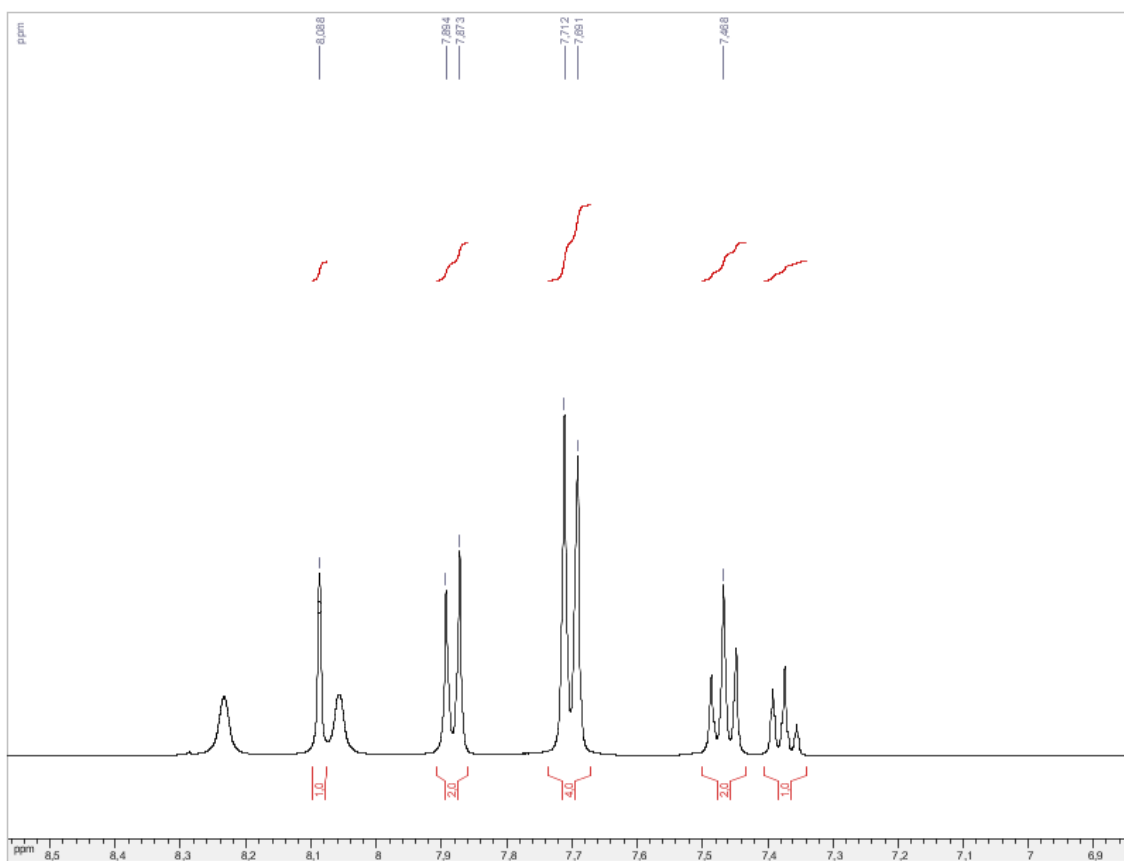
Espectro 21a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 10a.



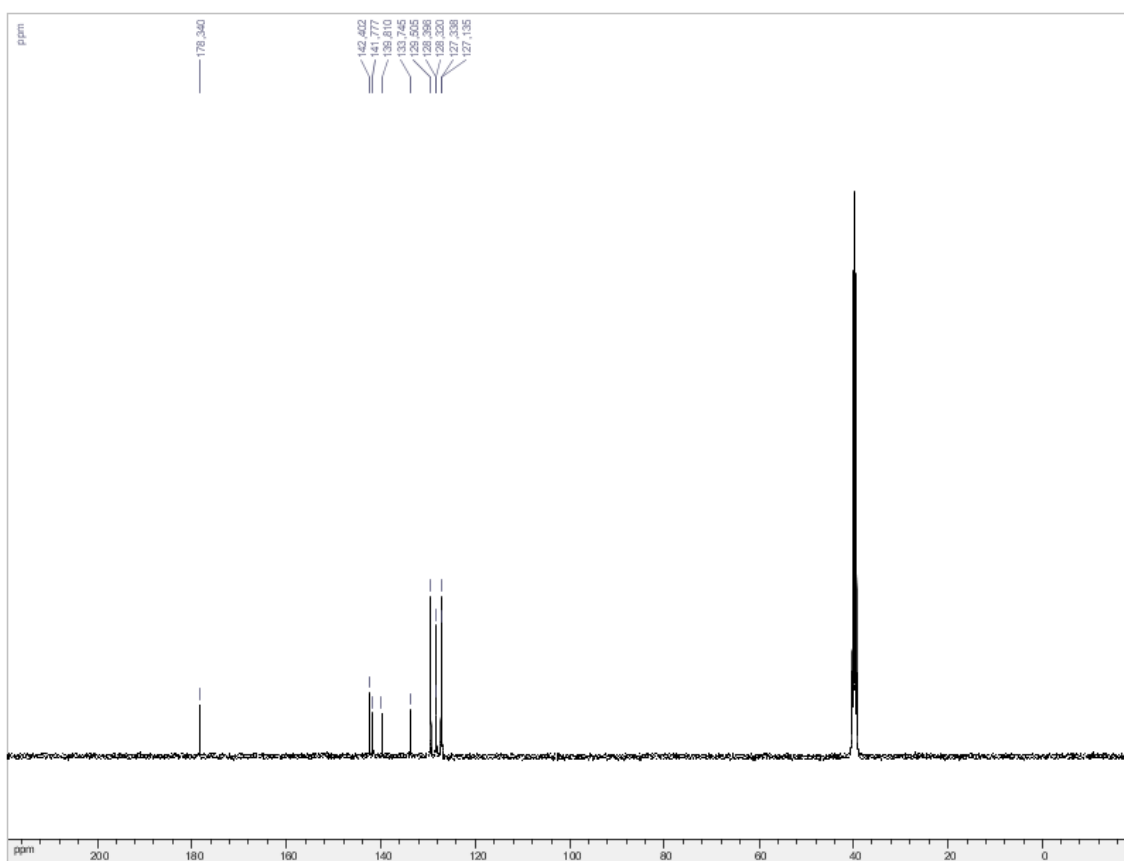
Espectro 21b. RMN ^{13}C (100Hz) em DMSO- d_6 da 10a.



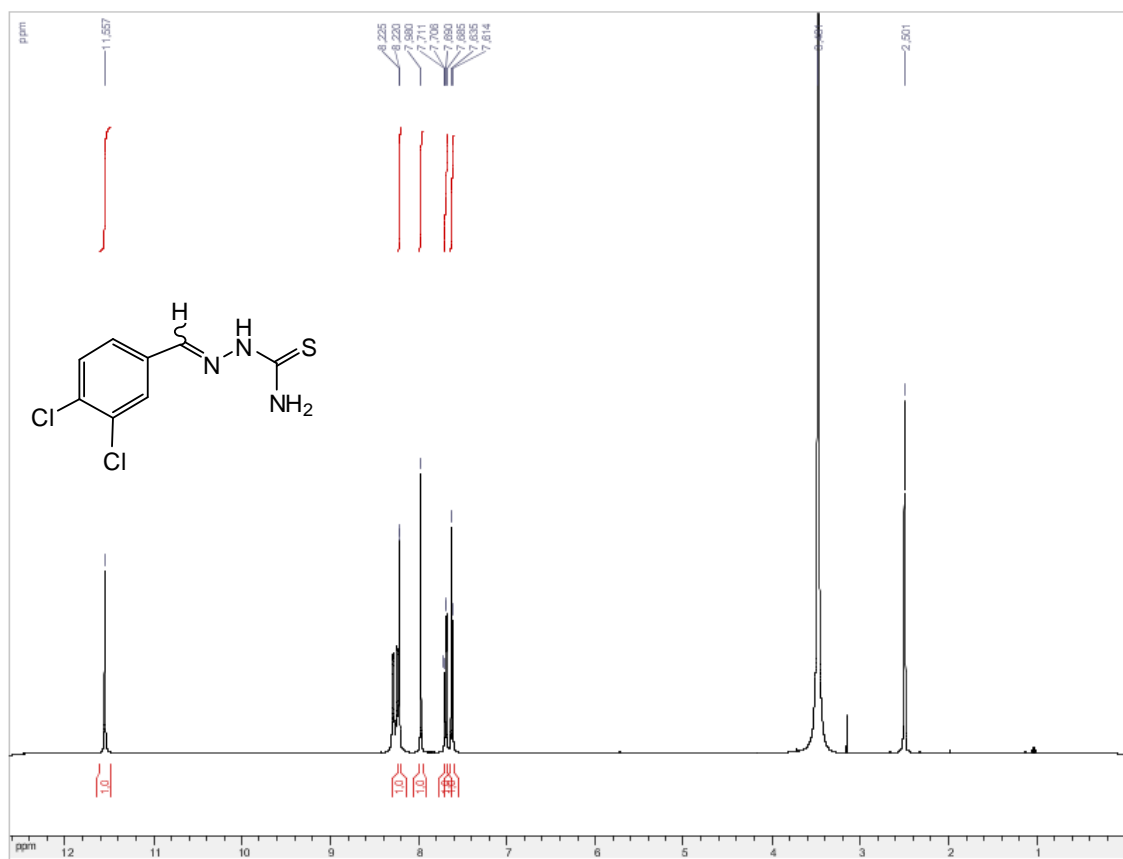
Espectro 22a. RMN ^1H (400Hz) em DMSO- d_6 da substância 14a.



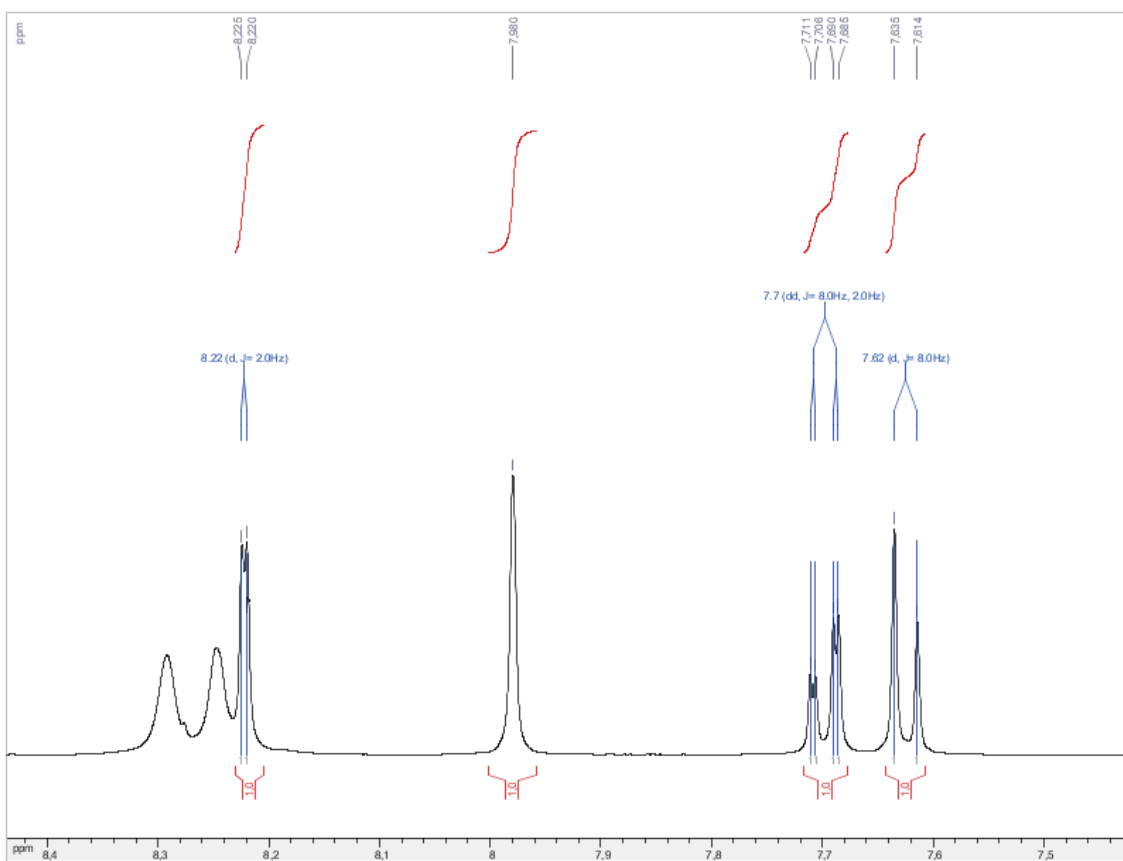
Espectro 22b. Ampliação de $\delta 7,0$ a $\delta 8,5$.



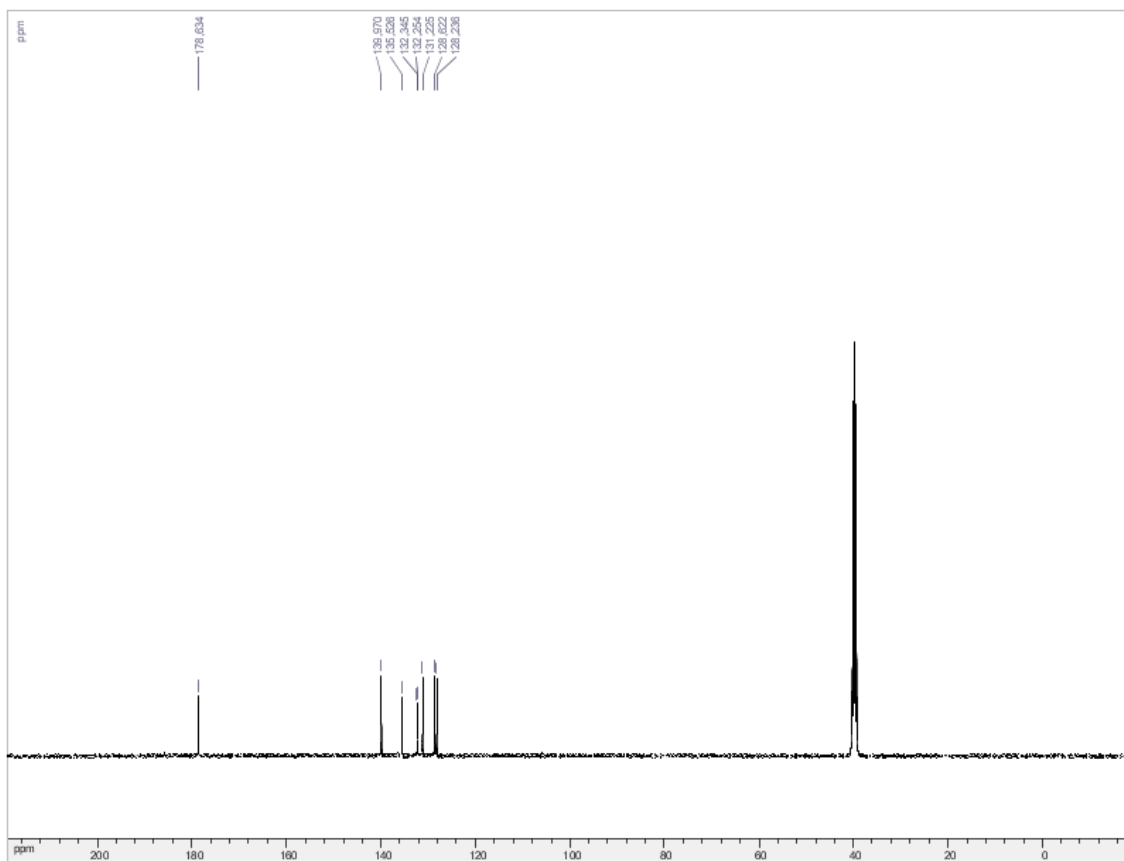
Espectro 22c. RMN ¹³C (100Hz) em DMSO-*d*₆ da substância 14a.



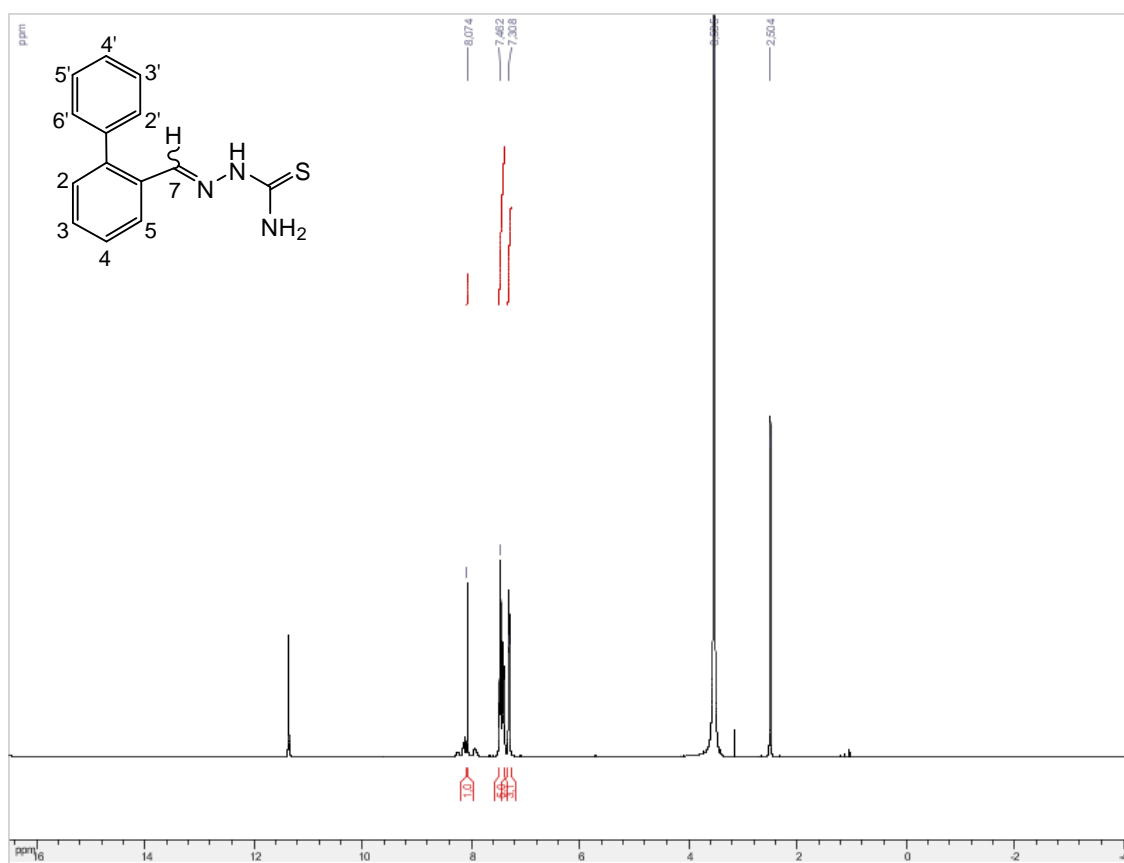
Espectro 23a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 17a.



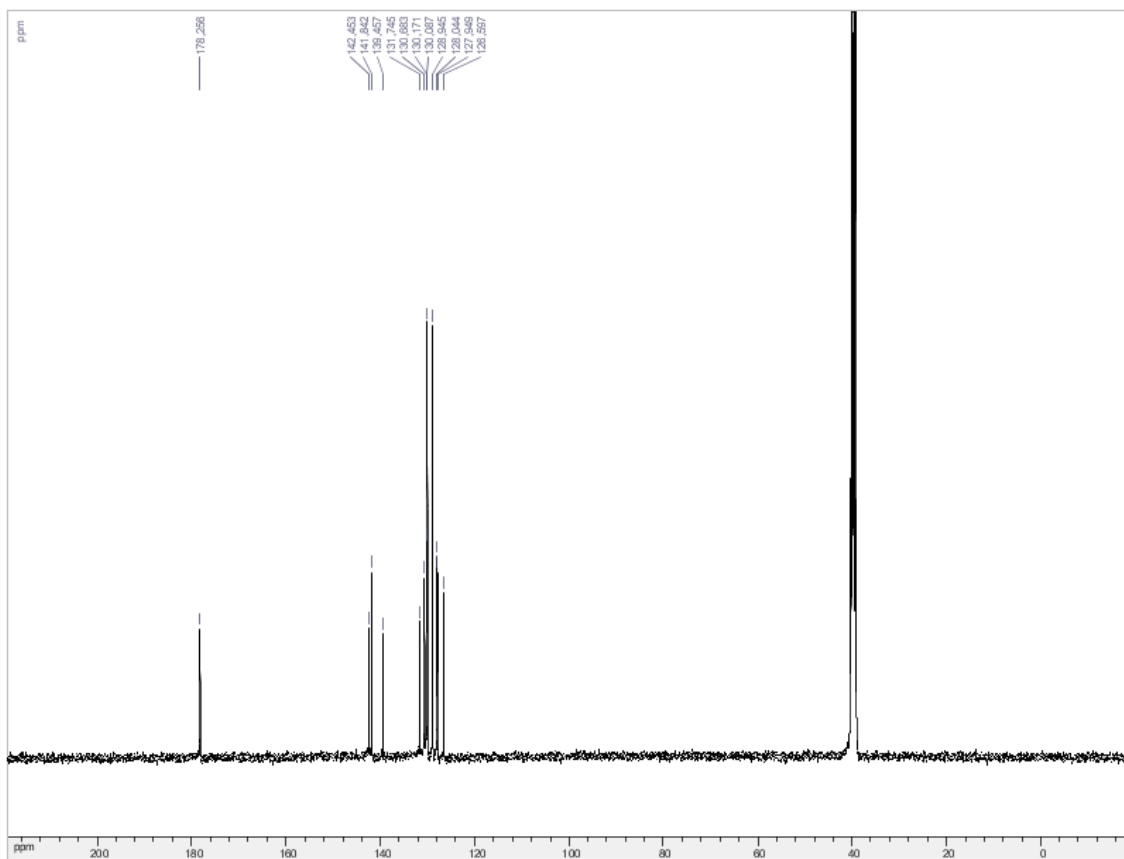
Espectro 23b. Ampliação de $\delta 7,0$ a $\delta 8,5$.



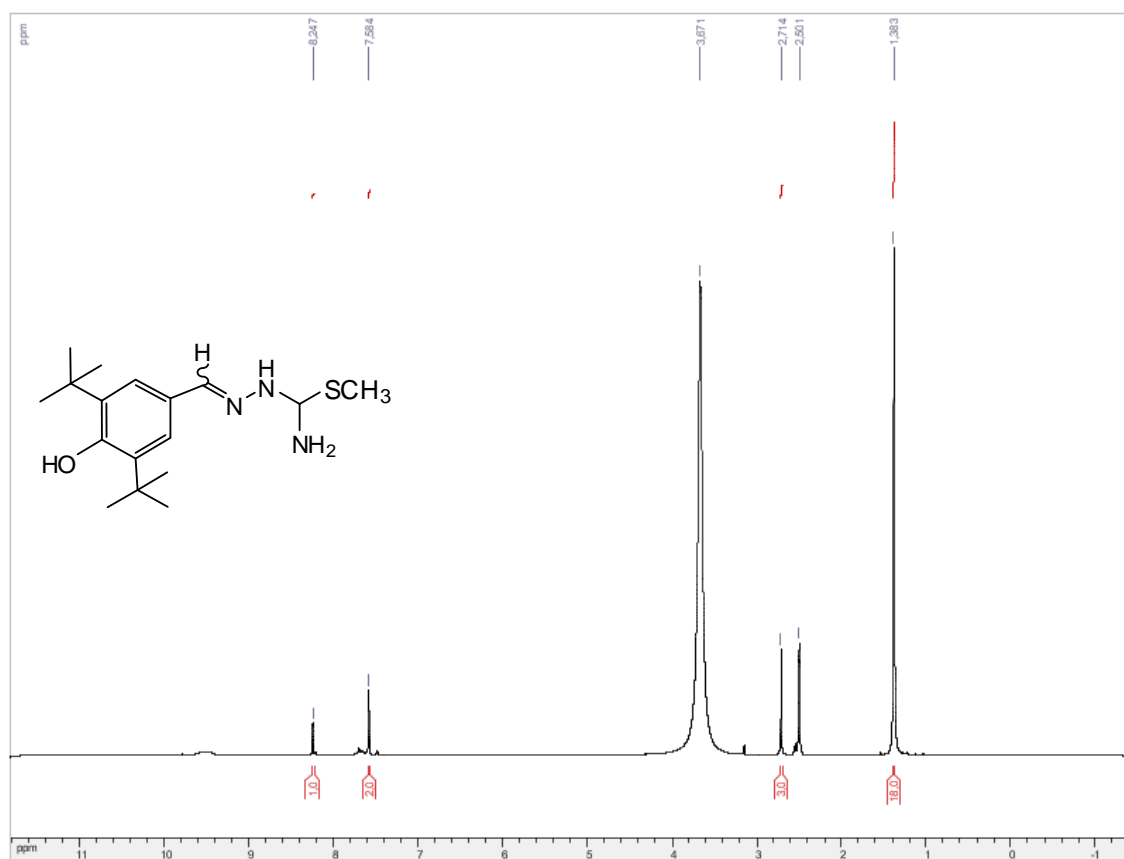
Espectro 23c. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 17a.



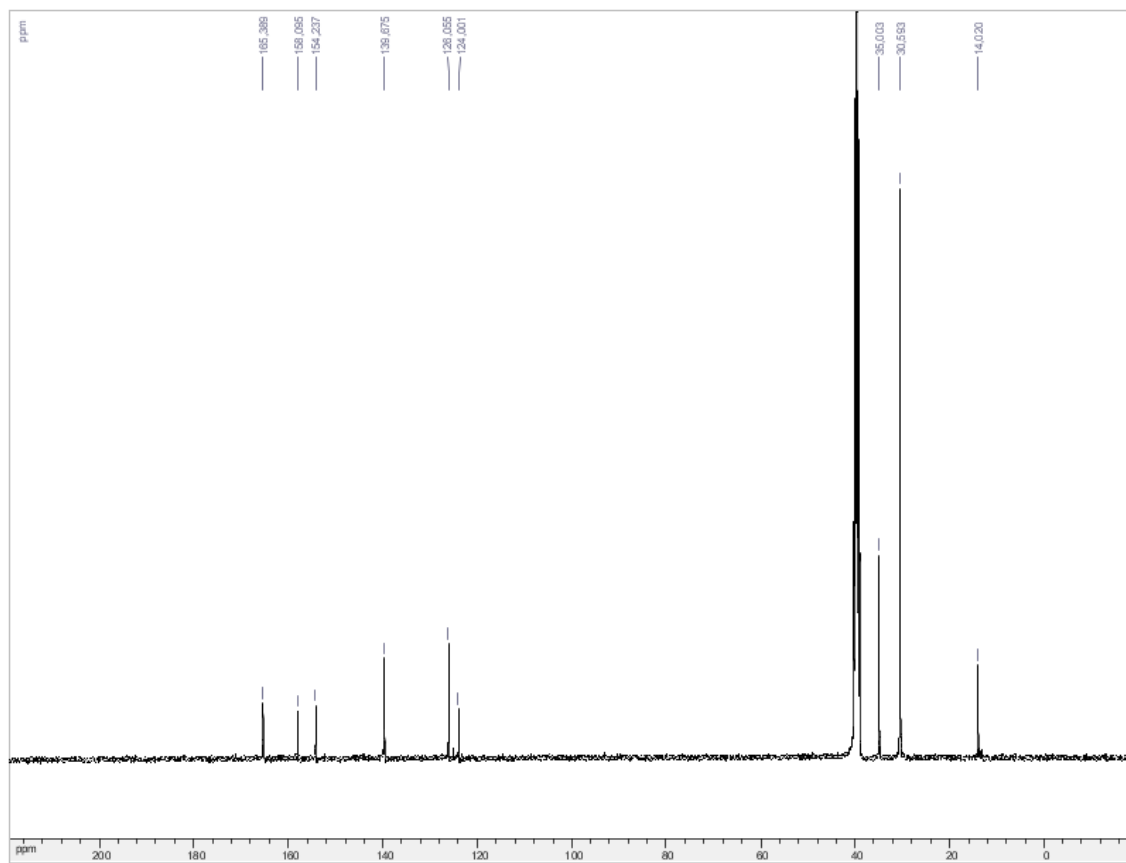
Espectro 24a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 19a.



Espectro 24b. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ da substância 19a.



Espectro 25a. RMN ^1H (400Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ do derivado S-metil.



Espectro 25b. RMN ^{13}C (100Hz) em $\text{DMSO-}d_6$ do derivado S-metil.