

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Valtair Severino dos Santos Junior

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS TIAZOLILHIDRAZONAS COMO
POTENCIAIS ANTIFÚNGICOS**

Belo Horizonte

2022

Valtair Severino dos Santos Junior

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS TIAZOLILHIDRAZONAS COMO
POTENCIAIS ANTIFÚNGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Gonçalves Maltarollo

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira

Belo Horizonte

2022

S237p Santos Junior, Valtair Severino dos.
Planejamento e síntese de derivados tiazolilhidrazonas como potenciais antifúngicos [recurso eletrônico] / Valtair Severino dos Santos Junior. – 2022.
1 recurso eletrônico (211 f. : il.) : pdf

Orientador: Vinícius Gonçalves Maltarollo.
Coorientadora: Renata Barbosa de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Antifúngicos – Teses. 2. Aprendizado de máquina – Teses. 3. Cândida – Teses. 4. Cryptococcus – Teses. I. Maltarollo, Vinícius Gonçalves. II. Oliveira, Renata Barbosa de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO ALUNO VALTAIR SEVERINO DOS SANTOS JÚNIOR

Realizou-se, no dia 31 de agosto de 2022, às 14:00 horas, Plataforma Microsoft Teams, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 373ª defesa de dissertação, intitulada *Planejamento e síntese de derivados tiazolilhidrazonas como potenciais antifúngicos*, apresentada por VALTAIR SEVERINO DOS SANTOS JÚNIOR, número de registro 2020659802, graduado no curso de QUÍMICA TECNOLÓGICA - NOTURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Prof. Vinícius Gonçalves Maltarollo - Orientador (UFMG), Prof(a). Renata Barbosa de Oliveira - Coorientadora (UFMG). Prof(a). Carolina Horta Andrade (UFG), Prof(a). Rossimíriam Pereira de Freitas (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

(X) Aprovada

() Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 31 de agosto de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Barbosa de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 31/08/2022, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius Goncalves Maltarollo, Professor do Magistério Superior**, em 31/08/2022, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rossimiriam Pereira de Freitas, Professora do Magistério Superior**, em 06/09/2022, às 13:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Horta Andrade, Usuária Externa**, em 13/09/2022, às 14:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1693430** e o código CRC **9CB45854**.

AGRADECIMENTOS

Aquele Valtair de dezembro de 2019 que ficou feliz demais quando passou no processo seletivo do mestrado não fazia ideia de onde ele estava se metendo. Foi a jornada mais intensa, maluca e conturbada que eu tive em minha vida (até então, pois o doutorado vem aí em algum momento). Sair da Química e ir me aventurar nas Ciências Farmacêuticas foi uma das decisões mais difíceis e mais arriscadas que eu tomei em meus vinte e alguns anos, mas foi, provavelmente, a melhor de todas as decisões difíceis que eu já tomei.

Acho que finalizar esse mestrado representa, para mim, muito mais do que só concluir um curso e receber um título de mestre (apesar de ser um baita benefício). Se entender enquanto um ser político e compreender de fato o peso das bandeiras que você representa na sociedade e na sua própria vida também é um dos maiores dilemas que temos em vida. O mestrado não foi só importante para que eu aprendesse o que era um algoritmo de floresta aleatória, que hidrogênios e carbonos podem acoplar magneticamente com átomos de flúor ou sei lá mais o quê. Acho que o mais importante foi crescer tanto como pesquisador quanto como ser humano.

O mestrado me fez entender que o que eu realmente quero trabalhar o resto da vida é com química medicinal mesmo. O mestrado me fez amadurecer e aprender a lidar melhor com as dificuldades, com as frustrações, com os prazos (estou tentando) e com os dias difíceis em que tudo dava errado. O mestrado me fez ter mais perseverança e tentar outras vezes mesmo que parecesse que não ia dar certo, mas no fim deu. O mestrado me fez aprender de vez que não sou tão medíocre, tanto que até dei conta de fazer isso tudo que está escrito nessa dissertação (mais do que está escrito, na verdade). O mestrado me ajudou a me valorizar mais como estudante e como profissional!

Mas, esses dois anos e meio foram cheios de influências externas que a gente teve que aprender a lidar de uma hora para a outra. De ter que passar por um monte de perrengue em casa e tentar segurar as pontas para realizar um sonho e objetivo de vida. E também aprender a tentar sobreviver em meio a uma pandemia caótica causada por um vírus que surgiu da forma mais aleatória possível, mas que, infelizmente, matou milhões de pessoas mundo a fora. Imagina ter toda a sua visão do que é viver em sociedade, de desconfigurar totalmente a sua rotina por causa de

um pastel de proteínas e RNA? E soma isso tudo a um governo que fez praticamente nada para mudar isso. Tive(mos) também que aprender (e reaprender todos os dias) que nada ali no laboratório é gratuito e que nós temos que valorizar cada grãozinho de cloreto de sódio, cada gota de solvente, cada pedaço de papel de filtro. Até porque fazer pesquisa no Brasil hoje é mais sobre política e gostar do que faz do que ganhar um simples título ou ter um aprimoramento profissional.

Mas, de tudo isso, acho que o mais difícil foi finalmente enxergar que minha presença ali na pós-graduação representa muito mais do que eu imaginava! Ter vindo de um berço semianalfabeto e paupérrimo e ter sido o primeiro da minha família a concluir uma graduação em uma universidade pública e, agora (espero que tudo dê certo), ser o primeiro a ter um mestrado. Isso diz muito sobre os sacrifícios que meus familiares fizeram e as dificuldades que passamos para que eu chegasse até aqui, e sou muito grato a isso. Entender, por fim, que carrego certas bandeiras comigo e que me encontro em um local de privilégio que muitos como eu infelizmente não chegaram ainda – ou sequer chegarão. Eu espero que essa dissertação sirva como exemplo para os próximos de que podemos sim ocupar os espaços que queremos e que temos todo o direito para isso.

Primeiro, gostaria de agradecer a minha família por, mais uma vez, toda a paciência, inúmeros sacrifícios, apoio e entender minhas ausências em alguns (na verdade vários) momentos. Em especial, destaco minha mãe, Jandira, minhas irmãs, Fabiana e Vitória, meu irmão, Alex, e meus sobrinhos, Adrian e Maria Beatriz; obrigado por tudo!

Muito obrigado à banca (Carolina, João Paulo e Rossi) pela disponibilidade e interesse em participar dessa etapa e lerem o trabalho. Tenho certeza de que trarão contribuições incríveis (por favor tenham dó de mim)!

Agradeço à UFMG pela estrutura e pelo suporte (na medida do possível), bem como todos os funcionários e funcionárias da limpeza e serviços gerais, técnicos, os porteiros e demais pessoas que trabalham dia a dia para manter uma universidade desse porte funcionando sem parar. Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro que recebi por meio da bolsa de mestrado, a qual permitiu que eu me mantivesse na pós-graduação. Estendo o agradecimento às demais agências de fomento que, apesar do sucateamento, ainda auxiliam na manutenção das atividades de pesquisa no Brasil.

Agradeço às colaborações que permitiram que esse trabalho fosse concluído. Um grande obrigado à profa. Susana e sua aluna, Sofia, pela disponibilidade em

realizar os ensaios biológicos com os fungos. Obrigado também à Ivana por obter alguns dos espectros de RMN deste trabalho. Agradeço aos professores que muito contribuíram para a minha formação na graduação e na pós-graduação e que, assim, permitiram eu tivesse o mínimo de conhecimento para escrever esse texto aqui e não saísse um tanto de baboseira.

Agradeço aos colegas do ACS Student Chapter UFMG, projeto que orgulho muito de ter participado e de ver crescendo. Fiz amigos maravilhosos lá e foi uma experiência incrível ter feito parte (e que inclusive permitiu que eu tivesse o meu emprego atual). Agradeço aos meus amigos, colegas e associados que fiz no departamento de Química durante a graduação e que levei até aqui e sou muito grato por suas existências. Um obrigado especial para a Ana Carolina, Júlia, Nayara, Rafael, Rodrigo (agora é químico) e Yuri.

Agradeço e sempre agradecerei ao NEPLAM por ter sido um local tão importante para a minha formação enquanto cientista. Muito obrigado à Grasiely e à Lucienir, por terem me orientado e me ensinado tanto, e por terem me dado a oportunidade de trabalhar nesse laboratório tão incrível. Agradeço ao Rafael por ter me ensinado tanto sobre química orgânica e RMN, mas também por me ajudar quando precisei de alguém que entendesse minhas dores. Agradeço também aos demais colegas e professores: Acácio, Diogo, Daiane, Josana, Karen, Leila e Mariana. Agradeço muito à Raquel pela amizade que cultivamos nesses últimos anos e que foi uma pessoa muito especial e importante nesse período de mestrado. Agradeço também à Reislá, que conheci no NEPLAM, por todo o apoio, conversas profundas e incontáveis risadas frouxas que tivemos nesses meses. A companhia virtual mais divertida que eu tive durante a pandemia.

Agradeço aos demais amigos e pessoas que encontrei na UFMG, ou na vida, ou não sei onde e que foram importantes para que eu concluísse esse trabalho. Um obrigado especial para à Áurea, uma amiga incrível que, se ela não tivesse me arrastado a força para a terapia, nem estaria aqui escrevendo este texto. Agradeço também ao Alaor, à Izabella Pisani, à Lyrra e à Renata Diniz. Agradeço imensamente à minha psicóloga, Rosário, por literalmente segurar os frangalhos esfarelados que carinhosamente chamamos a minha Saúde Mental™ e por não deixar que as situações ruins tirassem o melhor de mim.

Por fim, agradeço aos meus amigos e colegas do Laboratório de Química Farmacêutica e do Laboratório de Modelagem Molecular por terem me acolhido e me

recebido tão bem durante o mestrado. Inicialmente, agradeço de coração ao Gabriel Lima, por ter obtido os espectros de RMN em 600 MHz, mas também pela amizade que construímos durante a pós-graduação. Agradeço também ao Inácio e à Marina, que gentilmente obtiveram os espectros de RMN em 400 MHz para mim (do que deu certo e do que deu errado) e, assim, pude caracterizar os meus produtos. Eles também me ajudaram bastante tirando minhas dúvidas no laboratório, então sou muito grato pelo convívio e assistência até aqui. Obrigado à Ângela e a à Raquel, técnicas do laboratório, que fazem aquele caos funcionar apesar de todos os empecilhos. Obrigado aos demais colegas de laboratório pela convivência, em especial à Fabiana e ao Rodolfo, por terem me ajudado em vários momentos no dia a dia do laboratório. Um enorme obrigado ao professor Ricardo, pelas longas e produtivas conversas filosóficas sobre a vida e sobre química orgânica também. Ele me ajudou em muitos momentos de pressa e sempre recebi muito aprendizado de sua parte!

Um grandiosíssimo obrigado ao Eduardo, Marcel e Rafael, e para a Alice e a Daniela também. Apesar de conhecê-los a menos tempo que os demais, já se tornaram muito especiais (a Alice mandou eu escrever um textão para ela, mas vou encher linguiça até cansar, e eu cansei nesse exato instante. Valeu pelas caronas e por me ouvir te enchendo o saco com meus vários casos sendo um grande trouxa).

Um obrigado gigantesco, do tamanho da Via Láctea, ao Gabriel Veríssimo, que virou um amigo sem-igual para mim nesses últimos anos. Eu nem sei se eu teria terminado esse mestrado se não fosse por ele. Muito obrigado por toda a ajuda, por me ouvir, por me dar bronca e por me fazer sentir bem sendo eu mesmo, não importando o quão perdido eu estava. Agradeço ao Pedro Augusto por ser um amigo tão especial e tão querido, muito por confiar e acreditar em mim e no meu potencial quando eu não tinha um pingão de autoestima para isso (e por ter me dado a primeira oportunidade de participar de uma banca; desculpa pelas perguntas cabeludas). Agradeço ao Philipe, pela amizade de tantos anos, por ter me acolhido em sua casa na pandemia para ir ao laboratório, ter pegado COVID-19 juntos nesse rolê e ter me ajudado em algumas atividades deste trabalho. Agradeço demais ao Christian e ao Mateus, o Zeus da Microbiologia, que sempre se empolgam e me apoiam nas minhas tarefas e atividades do laboratório.

Por fim, agradeço àqueles que permitiram que esse trabalho fosse concebido e concluído. Primeiramente agradeço à minha coorientadora, Renata, por ter sido a primeira grande inspiração de eu ter migrado para a Farmácia. Nunca vou esquecer

daquele minicurso sobre planejamento de fármacos em 2018 que embaralhou toda a minha cabeça sobre o que eu queria ser quando eu crescesse e, a partir daí, toda a minha visão sobre a química e a minha trajetória acadêmica mudou. Espero que todos os pesquisadores um dia tenham o mesmo brilho nos olhos para a pesquisa como você tem, de uma pessoa que entende o real valor da ciência e que realmente gosta e é feliz com o que faz. Obrigado por ter aceitado a orientação, pelo apoio, pelas várias assistências e pelos ensinamentos nas disciplinas até aqui.

Por último, agradeço ao meu querido orientador Vinícius. Cumpri a promessa dos agradecimentos do TCC de ser seu aluno de mestrado e é uma grande honra para mim em ser seu primeiro aluno (oficial como orientador) de pós-graduação a concluir o curso. Tenho certeza de que só nós do MMLab temos o privilégio de ter o melhor orientador do mundo, porque ele realmente é. Infelizmente são poucos os orientadores e orientadoras que são realmente compreensíveis, que entendem as limitações de cada um e que ninguém nasce sabendo tudo. Um cara incrível, muito humilde, ótimo professor, que nos ajuda em qualquer instância, que tem os melhores conselhos de vida e que tá devendo uma pizza pra gente até hoje (faz uns 10 anos essa dívida). Muito obrigado mesmo por ter aceitado me orientar, pelo projeto, por ter sido meu “psicólogo” até eu começar a fazer terapia, pelos inúmeros ensinamentos e pela paciência durante todo esse percurso. Você é uma grande inspiração para mim!

Achei que eu fosse escrever pouco aqui, mas a gente não faz nada sozinho nessa vida. Mesmo que singelo, um simples “obrigado” é a melhor forma de expressar esse sentimento de gratidão. Obrigado aos que vieram antes de mim e aos que virão depois. Espero que meu trabalho ajude alguém em algum momento assim como outros trabalhos me ajudaram.

RESUMO

Infecções fúngicas enquadram um problema emergente na comunidade sanitária. Com base em dados de 2017, estima-se que mais de um bilhão de pessoas manifestam algum tipo de micose, sendo que 150 milhões delas são invasivas e consideradas graves, levando à quase dois milhões de óbitos. Outro problema é a resistência de algumas cepas aos fármacos disponíveis no mercado, o que leva à urgência na descoberta de novos antifúngicos como alternativas terapêuticas no tratamento dessas infecções. Substâncias contendo o esqueleto 2-tiazolilhidrazona apresentam um destaque na literatura como uma promissora nova classe de antifúngicos, especialmente frente aos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. Neste trabalho, buscou-se planejar e obter derivados 2-tiazolilhidrazonas com potencial atividade antifúngica. Inicialmente, foram construídos modelos de classificação baseados em algoritmos de aprendizado para a predição da atividade antifúngica frente às espécies *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, em que os seis modelos de classificação mais robustos (três para cada fungo), de acordo com as métricas de validação interna e externa, foram selecionados para um protocolo de triagem virtual. Os modelos foram aplicados em duas quimiotecas virtuais com mais de 175 mil moléculas ao todo, selecionando 486 moléculas com predição positiva em consenso pelos seis modelos. Algumas substâncias desse conjunto com propriedades físico-químicas (hidrossolubilidade e lipofilia) adequadas para administração oral foram selecionadas como representantes para a seleção dos análogos a serem sintetizados. Foram calculadas propriedades eletrônicas e moleculares de dois derivados 2-tiazolilhidrazonas (**63** e **72**) que foram estudados quanto à sua estabilidade em meio aquoso, bem como de outros cinco análogos (**62**, **78**, **96**, **121** e **123**), buscando relacionar essas propriedades com o potencial de hidrólise do grupo hidrazona. Foi visto que as cargas eletrostáticas e as energias dos orbitais de fronteira corroboram os dados experimentais, podendo extrapolar os dados na predição da hidrólise das demais substâncias em meio aquoso. Quatro intermediários tiossemicarbazonas foram sintetizados (**TS2-5**) com rendimentos de 61 a 100% e, após uma reação de condensação com diferentes α -halocetonas, levaram à obtenção de 18 derivados 2-tiazolilhidrazonas (**TH2a-h**, **TH3a**, **TH4a-h** e **TH5a**) com rendimentos de 41 a 93%. Quatro derivados 2-tiazolilhidrazinas (**TH6a-d**) foram sintetizados com rendimentos de 25 a 59%. As substâncias sintetizadas foram

avaliadas *in vitro* frente à quatro espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. auris*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) por meio do ensaio de microdiluição em caldo. Cinco 2-tiazolilhidrazonas apresentaram valores de MIC menores que 10 µmol/L contra, pelo menos, uma das espécies testadas (**TH2h**, **TH3a**, **TH4e-f** e **TH5a**). As quatro 2-tiazolilhidrazinas apresentaram valores de MIC menores que 10 µmol/L para todas as espécies.

Palavras-chave: antifúngicos, tiazolilhidrazonas, aprendizado de máquina, *Candida*, *Cryptococcus*.

ABSTRACT

Fungal infections are an emergent issue in the sanitary community. Estimates from 2017 state that more than one billion people present a mycosis, whilst 150 million cases of them are invasive infections and are considered serious comorbidities. These infections result in two million deaths per year. Another concern relies on the multidrug resistance presented by some fungal strains, leading to an urgency in the discovery of novel antifungal classes as therapeutical alternatives for the treatment of these type of infections. A promising chemical skeleton to develop new antifungals is the 2-thiazolyldihydrazone scaffold, which presents potent bioactivity, especially against *Candida* and *Cryptococcus* species. In this work, we aimed to design and synthesize 2-thiazolyldihydrazone derivatives as potential antifungal agents. Machine learning-based classifications models were constructed and validated for the prediction of antifungal activity of 2-thiazolyldihydrazones. The species *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* were selected as representatives for each genus. The six most robust models (three for each fungus), according to the statistical parameters, were selected for a virtual screening protocol. They were applied to classify two virtual chemical libraries with >175 thousand molecules. The six models, in a consensus, selected 486 compounds as potential antifungal agents against both fungi. Another filter based on lipophilicity and water solubility was applied to define the analogs to be synthesized with probable good oral bioavailability. Electronic and molecular properties were calculated for two 2-thiazolyldihydrazones (**63** and **72**) previously studied regarding their stabilities in aqueous medium, as well as for other five analogs (**62**, **78**, **96**, **121**, and **123**), aiming to establish a relationship between those properties with hydrolysis potential of the hydrazone moiety. According to the results, the electrostatic charges and the calculated energies for the frontier orbitals could be related to the experimental results for **X-Y**, thus it has been able to extend this interpretation for the five analogs to predict the possible hydrolysis. Four thiosemicarbazone intermediates (**TS2-TS5**) were obtained with 61-100% yield. They lead to the synthesis of 18 2-thiazolyldihydrazones (**TH2a-h**, **TH3a**, **TH4a-h**, and **TH5a**) after a condensation reaction with α -haloketones, with 41-93% yield. Also, another four 2-thiazolyldihydrazines (**TH6a-d**) were obtained with 25-59% yield. The biological activity of the synthesized compounds was assessed *in vitro* using broth microdilution assay against four *Candida* species (*C. albicans*, *C. auris*, *C. krusei*, and *C. tropicalis*). Five 2-thiazolyldihydrazones

showed MIC values lower than 10 $\mu\text{mol/L}$ against one of the species, at least (**TH2h**, **TH3a**, **TH4e-f**, and **TH5a**). The four 2-thiazolyhydrazines showed MIC < 10 $\mu\text{mol/L}$.

Keywords: antifungals, thiazolyhydrazones, machine learning, *Candida*, *Cryptococcus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Fotomicrografia ampliada (125 vezes) de células de pulmão humano infectadas por fungos do gênero *Blastomyces*, causadores da blastomicose.28
- Figura 2** – Estrutura química da anfotericina B, o fármaco da classe dos polienos mais utilizado no tratamento de infecções sistêmicas.30
- Figura 3** – Estrutura química do fluconazol, um dos antifúngicos azólicos mais utilizados na terapêutica de infecções fúngicas.30
- Figura 4** – Estrutura química da caspofungina, representante da classe das equinocandinas.31
- Figura 5** – Fotomicrografia de esporos da espécie *Candida albicans*.34
- Figura 6** – Fotomicrografia de leveduras da espécie *Candida auris* (cepa JCM15448^T). As células vegetativas foram inoculadas em caldo de extrato de levedura peptonaglicose por três dias a 25 °C. A barra de escala em preto no canto inferior direito da figura indica uma distância de 10 µm.36
- Figura 7** – Placa de petri contendo colônias de *Cryptococcus neoformans* em meio Ajello-Shields. A cultura formada é resultado de um inóculo feito com excrementos de pombos coletado em 1966. A placa foi incubada a 37 °C por tempo não informado.38
- Figura 8** – Estruturas químicas da abafungina (à esquerda) e do ravuconazol (à direita), exemplos de fármacos que apresentam um heterociclo tiazólico.39
- Figura 9** – Estrutura geral das 2-tiazolilhidrazonas.40
- Figura 10** – Estruturas químicas das substâncias **10-15** obtidas por Maccioni *et al.* (2002) e suas faixas de valores de MIC e MFC frente a cepas de referência das espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.42
- Figura 11** – Estruturas químicas das substâncias **16-35** obtidas por Chimenti *et al.* (2007) e suas faixas de valores de MIC frente à isolados clínicos de pacientes hematológicos, oncológicos e submetidos a algum tipo de cirurgia infectados com espécies de *Candida* sp.43
- Figura 12** – Estruturas químicas das substâncias **36-47** obtidas por Łączkowski *et al.* (2016) e suas faixas de valores de MIC e MFC frente a cepas ATCC e isolados clínicos das espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. lusitaniae*, *C. sake*, *C. parapsilosis* e *C. pulcherrima*.44

Figura 13 – Estruturas químicas dos compostos 48-57 obtidos por Łączkowski <i>et al.</i> (2018) e suas faixas de valores de MIC e MFC frente a cepas ATCC das espécies <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i>	45
Figura 14 – Estruturas químicas das substâncias 58-70 obtidas por Sá <i>et al.</i> (2015) e suas faixas de valores de MIC frente a <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> . Os compostos também apresentaram baixa citotoxicidade frente a células Vero e macrófagos murinos.....	46
Figura 15 – Estruturas químicas das substâncias 71-85 obtidos por Lino <i>et al.</i> (2018) e suas faixas de valores de MIC contra várias espécies dos gêneros <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i> , e a espécie <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	47
Figura 16 – Estruturas químicas dos derivados 63 e 83 estudados por Tonholo e colaboradores (2020) em seu ensaio toxicológico e suas faixas de valores de IC ₅₀ frente às linhagens de células A549, H9C2, HepG2, LLC-PK ₁ e Neuro-2a.....	49
Figura 17 – Consenso de propriedades físico-químicas e estruturas importantes para a atividade antifúngica prevista pelos modelos de QSAR e similaridade molecular construídos por Lino <i>et al.</i> (2018).....	52
Figura 18 – Estrutura química da halicina, uma substância com amplo espectro de atividade antibacteriana, identificada após triagem utilizando um modelo de aprendizado profundo construído por Stokes <i>et al.</i> (2020).....	54
Figura 19 – (A) Gráfico de dispersão e (B) de linha correlacionando os valores de $\log P$ e $\log S$ (em mol/L) para as 2-tiazolilhidrazonas selecionadas pelo protocolo de triagem virtual.....	67
Figura 20 – Gráficos de dispersão correlacionando as propriedades físico-químicas (A) $X_{\log P}$ e MW, (B) HBD e HBA, e (C) nRotB e TPSA, calculadas para as 2-tiazolilhidrazonas selecionadas pelo protocolo de triagem virtual.	68
Figura 21 – Derivados 2-tiazolilhidrazonas propostos para síntese.	70
Figura 22 – Espectro na região do infravermelho (ATR) do 4-metoxibenzaldeído (95), produto de oxidação do álcool 4-metoxibenzílico (94).	74
Figura 23 – Representação das conformações <i>anti</i> e <i>sin</i> das tiossemicarbazonas, tomando como referência o nitrogênio imínico e o enxofre da ligação tiocarbonila. .	77
Figura 24 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) (δ_{H} 1,50-4,00 ppm) de TS2	79
Figura 25 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) (δ_{H} 7,00-8,15 ppm) de TS2	79

Figura 26 – Seção expandida do mapa de contornos ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, DMSO- d_6) de TS2	80
Figura 27 – Correlações observadas para os mapas de contornos ^1H - ^1H -COSY (–) e ^1H - ^{13}C -HMBC (→) de TS2 , destacando as correlações mais relevantes para a caracterização com base no espectro 2D heteronuclear.	81
Figura 28 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de TS2	81
Figura 29 – Interações orbitales associadas à formação do heterociclo tiazólico. 83	
Figura 30 – Correlações observadas (→) para o mapa de contornos ^1H - ^{13}C -HMBC dos derivados 2-tiazolilhidrazonas TH2a-h , destacando as correlações mais relevantes para a caracterização com base no espectro 2D heteronuclear.	87
Figura 31 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ_{H} 1,80-4,00 ppm) de TH2b	87
Figura 32 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ_{H} 7,10-7,80 ppm) de TH2b	88
Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) de TH2b	89
Figura 34 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ_{H} 1,50-8,00 ppm) de TH4e	94
Figura 35 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) de TH4e	94
Figura 36 – Estruturas químicas dos produtos TH2a-h e suas faixas de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies de <i>Candida</i> spp. testadas.	97
Figura 37 – Estruturas químicas do produto TH3a e de seus análogos (62 e 96-100), obtidos por Sá <i>et al.</i> (2015) e Oliveira (2021), e suas faixas de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies de <i>Candida</i> spp. testadas.....	97
Figura 38 – Estruturas químicas dos produtos TH4a-h e suas faixas de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies de <i>Candida</i> spp. testadas.	98
Figura 39 – Estruturas químicas dos produtos 101-107 obtidos por Oliveira (2021) e seus intervalos de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies <i>C. albicans</i> (ATCC 18804), <i>C. auris</i> (CBS 10913), <i>C. krusei</i> (ATCC 202298) e <i>C. tropicalis</i> (ATCC 750).	99
Figura 40 – Estruturas químicas do produto TH5a e de seus análogos (108-114), obtidos por Oliveira (2021), e seus intervalos de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies de <i>Candida</i> spp. testadas.	100
Figura 41 – Estruturas químicas dos produtos 115-119 , obtidos por Pricopie <i>et al.</i> (2019), e seus intervalos de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies	

<i>C. albicans</i> (ATCC 10231), <i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019) e <i>C. zeylanoides</i> (ATCC 201082).....	101
Figura 42 – Estruturas químicas das substâncias 62-63 , obtidas por Sá <i>et al.</i> (2015), 73 e 75 , obtidas por Lino <i>et al.</i> (2018), e 120-121 , obtidas por Oliveira <i>et al.</i> (2022), aplicadas na construção da quimioteca virtual de 2-tiazolilhidrazonas por meio da técnica de <i>scaffold hopping</i>	107
Figura 43 – Estruturas químicas da substância 72 e de seu produto de degradação por hidrólise 122 , obtido e caracterizado por Franco <i>et al.</i> (2021).	136
Figura 44 – Estruturas químicas das substâncias 62-63 , 72 , 78 , 96 , 121 e 123 estudadas neste capítulo. Os derivados 63 e 72 tiveram suas estabilidades avaliadas experimentalmente por Silva (2019) e Franco <i>et al.</i> (2021), respectivamente.	137
Figura 45 – Representação do grupo hidrazona com a identificação dos três átomos principais que o compõem (C ₁ , N ₁ e N ₂).	138
Figura 46 – Projeções dos orbitais HOMO (à esquerda) e LUMO (à direita) do derivado 72	141
Figura 47 – Projeções das densidades do HOMO (à esquerda) e LUMO (à direita) do derivado 72 . Regiões coloridas em vermelho representam contribuições nulas, em branco contribuições intermediárias, e coloridas em azul, contribuições positivas.	142
Figura 48 – Projeções dos orbitais HOMO (à esquerda) e LUMO (à direita) do derivado 63	142
Figura 49 – Projeções das densidades eletrônicas dos orbitais HOMO (à esquerda) e LUMO (à direita) do derivado 63 . Regiões coloridas em vermelho representam contribuições nulas, em branco contribuições intermediárias, e coloridas em azul, contribuições positivas.	143
Figura 50 – Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de TH6c	146
Figura 51 – Espectro de RMN de ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de TH6c	146
Figura 52 – Estruturas químicas dos produtos TH6a-d e de seu análogo 122 , obtido e caracterizado por Franco <i>et al.</i> (2021), e seus intervalos de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies de <i>Candida</i> spp. testadas.....	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de fármacos, mecanismos de ação e mecanismos de resistência das três principais classes de antifúngicos (azóis, equinocandinas e polienos) disponíveis no mercado.	33
Tabela 2 – Dados sobre os conjuntos de <i>fingerprints</i> moleculares, parâmetros, e coeficientes de correlação de Matthews (MCC) das validações dos modelos de classificação selecionados para <i>C. albicans</i> . Os três modelos mais robustos estão destacados em negrito e em cinza.....	60
Tabela 3 – Matriz de confusão da validação externa para os modelos 2, 3 e 5 , selecionados para o protocolo de triagem virtual de compostos potencialmente bioativos contra <i>C. albicans</i>	61
Tabela 4 – Métricas calculadas para as validações interna e externa dos modelos 2, 3 e 5 , selecionados para o protocolo de triagem virtual de compostos potencialmente bioativos contra <i>C. albicans</i>	62
Tabela 5 – Dados sobre os conjuntos de <i>fingerprints</i> moleculares, parâmetros, e coeficientes de correlação de Matthews (MCC) das validações dos modelos de classificação selecionados para <i>C. neoformans</i> . Os três modelos mais robustos estão destacados em negrito e em cinza.....	63
Tabela 6 – Matriz de confusão da validação externa para os modelos 11, 12 e 14 , selecionados para o protocolo de triagem virtual de compostos potencialmente bioativos contra <i>C. neoformans</i>	64
Tabela 7 – Métricas calculadas para as validações interna e externa dos modelos 11, 12 e 14 , selecionados para o protocolo de triagem virtual de compostos potencialmente bioativos contra <i>C. neoformans</i>	65
Tabela 8 – Estruturas químicas de algumas das substâncias selecionadas pelos modelos de classificação no protocolo de triagem virtual. Estão listadas também as probabilidades médias do consenso dos modelos e os seus valores de $\text{Alog } P$ e $\text{log } S$ (em mol/L) respectivos.	70
Tabela 9 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) para as tiosemicarbazonas TS2-5	78
Tabela 10 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) para as tiosemicarbazonas TS2-T5	78

Tabela 11 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para os derivados 2-tiazolilhidrazinas TH2a-h	85
Tabela 12 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para os derivados 2-tiazolilhidrazonas Th2a-h	86
Tabela 13 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para os derivados 2-tiazolilhidrazinas TH3a, TH4a-h e TH5a . 92	92
Tabela 14 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para os derivados 2-tiazolilhidrazonas TH3a, TH4a-h e TH5a	93
Tabela 15 – Atividades antifúngicas dos derivados 2-tiazolilhidrazonas (TH2a-h, TH3a, TH4a-h e TH5a), além dos fármacos de referência Anfotericina B, Caspofungina, Fluconazol e Itraconazol, representadas pelos seus respectivos valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em µmol/L frente à diferentes espécies dos gêneros <i>Candida</i> . Destacou-se em negrito os valores de MIC menores que 10 µmol/L.....	96
Tabela 16 – Propriedades eletrônicas e moleculares calculadas utilizando a teoria do funcional de densidade para as 2-tiazolilhidrazonas 62-63, 72, 78, 96, 121 e 123 . Destacou-se em negrito e em cinza os dados das duas substâncias 63 e 72 , previamente estudadas experimentalmente quanto à sua estabilidade.	138
Tabela 17 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para os derivados 2-tiazolilhidrazinas TH6a-d	145
Tabela 18 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para os derivados 2-tiazolilhidrazinas TH6a-d	145
Tabela 19 – Atividades antifúngicas dos derivados 2-tiazolilhidrazinas (TH6a-d), além dos fármacos de referência Anfotericina B, Caspofungina, Fluconazol e Itraconazol, representadas pelos seus respectivos valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em µmol/L frente à diferentes espécies dos gêneros <i>Candida</i> . Destacou-se em negrito os valores de MIC menores que 10 µmol/L.	147

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Procedimento utilizado por Hantzsch em 1889 para obtenção do produto 2,4-dimetiltiazol (1).	40
Esquema 2 – Procedimento geral para preparação de 2-tiazolilhidrazonas, quando em solventes próticos.....	41
Esquema 3 – Procedimento utilizado por Anbazhagan e Sankaran (2013) para obtenção das 2-tiazolilhidrazonas 3-9 derivadas da tiossemicarbazona 2 , sintetizada a partir do (<i>E</i>)-2-metilcinamaldeído.	41
Esquema 4 – Mecanismo proposto para a formação de uma tiossemicarbazona em meio ácido.	71
Esquema 5 – Reação para a síntese do 3-butin-1-al (93), de acordo com a metodologia proposta Gore <i>et al.</i> (2013).	72
Esquema 6 – Reação para síntese do 4-metoxibenzaldeído (95), de acordo com a metodologia proposta por Niknam (2005).	73
Esquema 7 – Reação para síntese do 3-butin-1-al (93), de acordo com a metodologia proposta por Niknam (2005).	74
Esquema 8 – Reação para síntese da tiossemicarbazona TS2	75
Esquema 9 – Reação para síntese das tiossemicarbazonas TS3 e TS5	75
Esquema 10 – Reação para a síntese da tiossemicarbazona TS4	76
Esquema 11 – Mecanismo proposto para a formação de uma 2-tiazolilhidrazona...	82
Esquema 12 – Reação para a síntese das 2-tiazolilhidrazonas TH2a-h	84
Esquema 13 – Reação para a síntese das 2-tiazolilhidrazonas TH4a-h	90
Esquema 14 – Reação para a síntese das 2-tiazolilhidrazonas TH3a e TH5a	90
Esquema 15 – Mecanismo proposto por Kalia e Raines (2008) e Franco <i>et al.</i> (2021) para a hidrólise de hidrazonas em meio ácido.	140
Esquema 16 – Mecanismo proposto por Franco <i>et al.</i> (2021) para a hidrólise de hidrazonas em meio básico.	140
Esquema 17 – Reação para a síntese das 2-tiazolilhidrazinas TH6a-d	144

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico (RMN)
π	Orbital molecular do tipo π
σ	Orbital molecular do tipo σ
Ac	Acetila
ACC	Acurácia
AcOEt	Acetato de etila
ATR	<i>Attenuated total reflection</i> (refletância total atenuada)
AUC	Área sob a curva
CCD	Cromatografia em camada delgada de sílica
d	Dupleto (RMN)
dd	Duplo dupleto (RMN)
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i> (intensificação sem distorção por transferência de polarização)
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentração inibitória mediana
i-PrOH	Isopropanol (2-propanol)
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento (RMN)
Log P	Logaritmo do coeficiente de partição em <i>n</i> -octanol/água
Log S	Logaritmo do coeficiente de solubilidade
m	múltiplo (RMN)
<i>m</i>	Posição <i>meta</i>
MCC	Coefficiente de correlação de Matthews

Me	Metila
MeOH	Metanol
MFC	Concentração fungicida mínima
MHz	MegaHertz
MIC	Concentração inibitória mínima
η	Orbital molecular não ligante
<i>p</i>	Posição <i>para</i>
p.	Página
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Logaritmo negativo da constante de acidez
q	quarteto (RMN)
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
ROC	Receiver operating characteristic curve (curva característica de operação do receptor)
s	simpleto (RMN)
TMS	Tetrametilsilano

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	27
Emergência das infecções fúngicas	27
Quimioterapia das infecções fúngicas	29
Fungos multirresistentes e a necessidade de se desenvolver novos fármacos antifúngicos	32
O gênero <i>Candida</i> e a candidíase	34
O gênero <i>Cryptococcus</i> e a criptococose	37
Tiazóis como uma promissora classe de antifúngicos	39
Planejamento de fármacos auxiliado por computador	49
A inteligência artificial na descoberta de substâncias bioativas	52
OBJETIVOS	55
1 – OBJETIVO GERAL	55
2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
CAPÍTULO 1: PLANEJAMENTO BASEADO EM APRENDIZADO DE MÁQUINA, SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE 2-TIAZOLILHIDRAZONAS COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS	57
1 – CONTEXTUALIZAÇÃO	57
2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
2.1 – Modelos preditivos de aprendizado de máquina	59
2.1.1 – Modelos de classificação para <i>Candida albicans</i>	60
2.1.2 – Modelos de classificação para <i>Cryptococcus neoformans</i>	62
2.2 – Triagem virtual de 2-tiazolilhidrazonas	65
2.2.1 – Classificação das substâncias presentes nas quimiotecas	65
2.2.2 – Caracterização quimioinformática	66
2.2.3 – Proposição de novos derivados 2-tiazolilhidrazonas	69
2.3 – Obtenção e caracterização das tiossemicarbazonas	71

2.3.1 – Tentativa de obtenção da tiossemicarbazona TS1	72
2.3.2 – Obtenção das tiossemicarbazonas TS2-5	75
2.4 – Obtenção e caracterização das 2-tiazolilhidrazonas	82
2.4.1 – Obtenção das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo aromático	84
2.4.2 – Obtenção das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo álcool ou ácido carboxílico	89
2.5 – Atividade antifúngica de 2-tiazolilhidrazonas contra <i>Candida</i> spp.....	95
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	102
3.1 – Curadoria e preparo dos conjuntos de dados	102
3.2 – Seleção dos conjuntos de treinamento e de teste	103
3.3 – Construção e validação dos modelos de classificação por aprendizado de máquina.....	104
3.4 – Construção de quimiotecas virtuais de 2-tiazolilhidrazonas	106
3.5 – Triagem virtual.....	107
3.6 – Métodos gerais para a síntese de derivados 2-tiazolilhidrazonas	108
3.6.1 – Métodos cromatográficos	108
3.6.2 – Métodos de caracterização	109
3.7 – Preparação das tiossemicarbazonas.....	110
3.7.1 – Tentativa de síntese da 2-(but-3-in-1-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (TS1)	110
3.7.2 – Síntese da (<i>E</i>)-2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (TS2)	111
3.7.3 – Síntese do (<i>E/Z</i>)-2-(4-hidroxibutan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (TS3)	113
3.7.4 – Síntese do ácido (<i>E</i>)-2-(2-carbamotioilhidrazineilideno)propanoico (TS4) ..	113
3.7.5 – Síntese do ácido (<i>E</i>)-4-(2-carbamotioilhidrazineilideno)pentanoico (TS5)...	115
3.8 – Preparação das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo aromático	116

3.8.1 – Síntese do (<i>E</i>)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol (TH2a)	117
3.8.2 – Síntese do (<i>E</i>)-4-(4-metilfenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2b)	118
3.8.3 – Síntese do (<i>E</i>)-4-(4-cianofenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2c)	119
3.8.4 – Síntese do (<i>E</i>)-4-(4-metoxifenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2d)	120
3.8.5 – Síntese do (<i>E</i>)-4-(4-fluorofenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2e)	120
3.8.6 – Síntese do (<i>E</i>)-4-(4-clorofenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2f)	121
3.8.7 – Síntese do (<i>E</i>)-4-(4-bromofenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2g)	122
3.8.8 – Síntese do (<i>E</i>)-2-(2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol-4-il)etanoato de etila (TH2h)	123
3.9 – Preparação das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo álcool ou ácido carboxílico	124
3.9.1 – Síntese do (<i>E</i>)-3-(2-(4-metilfenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)butan-1-ol (TH3a)	125
3.9.2 – Síntese do ácido (<i>E</i>)-2-(2-(4-feniltiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4a)	126
3.9.3 – Síntese do ácido (<i>E</i>)-2-(2-(4-(4-metilfenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4b).....	126
3.9.4 – Síntese do ácido (<i>E/Z</i>)-2-(2-(4-(4-cianofenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4c).....	127
3.9.5 – Síntese do ácido (<i>E</i>)-2-(2-(4-(4-metoxifenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4d).....	128
3.9.6 – Síntese do ácido (<i>E</i>)-2-(2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4e).....	129

3.9.7 – Síntese do ácido (<i>E</i>)-2-(2-(4-(4-clorofenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4f).....	130
3.9.8 – Síntese do ácido (<i>E/Z</i>)-2-(2-(4-(4-bromofenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4g).....	130
3.9.9 – Síntese do ácido (<i>E/Z</i>)-2-(2-(4-(2-etoxi-2-oxoetil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4h).....	131
3.9.10 – Síntese do ácido (<i>E</i>)-4-(2-(4-(4-metilfenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)pentanoico (TH5a).....	132
3.10 – Micro-organismos e preparo dos inóculos	133
3.11 – Ensaio de microdiluição em caldo.....	133
CAPÍTULO 2: ESTUDO TEÓRICO DO POTENCIAL DE HIDRÓLISE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS PROVÁVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE 2-TIAZOLILHIDRAZONAS	135
1 – CONTEXTUALIZAÇÃO	135
2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
2.1 – Propriedades eletrônicas e moleculares de 2-tiazolilhidrazonas	137
2.2 – Relação das propriedades calculadas com a hidrólise de hidrazonas em meio aquoso	139
2.3 – Obtenção e caracterização das 2-tiazolilhidrazinas	143
2.4 – Atividade antifúngica de 2-tiazolilhidrazinas contra <i>Candida</i> spp.....	146
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	149
3.1 – Curadoria e preparo das estruturas químicas	149
3.2 – Otimização das estruturas químicas e cálculo das propriedades eletrônicas e moleculares.....	149
3.3 – Preparação das 2-tiazolilhidrazinas.....	150
3.3.1 – Síntese do 2-hidrazineil-4-feniltiazol (TH6a).....	150
3.3.2 – Síntese do 2-hidrazineil-4-(4-metilfenil)tiazol (TH6b)	151
3.3.3 – Síntese do 2-hidrazineil-4-(4-cianofenil)tiazol (TH6c).....	152

3.3.4 – Síntese do 2-hidrazineil-4-(4-fluorofenil)tiazol (TH6d)	152
3.4 – Micro-organismos, preparo dos inóculos e ensaio de microdiluição em caldo	153
CONCLUSÃO	154
REFERÊNCIAS.....	156
APÊNDICES	172
APÊNDICE A – Espectros das tiossemicarbazonas.....	172
Apêndice A.1 – Espectros de RMN de TS2	172
Apêndice A.2 – Espectros de RMN de TS3	175
Apêndice A.3 – Espectros de RMN de TS4	176
Apêndice A.4 – Espectros de RMN de TS5	176
APÊNDICE B – Espectros das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo aromático	177
Apêndice B.1 – Espectros de RMN de TH2a	177
Apêndice B.2 – Espectros de RMN de TH2b	180
Apêndice B.3 – Espectros de RMN de TH2c	182
Apêndice B.4 – Espectros de RMN de TH2d	185
Apêndice B.5 – Espectros de RMN de TH2e	187
Apêndice B.6 – Espectros de RMN de TH2f	189
Apêndice B.7 – Espectros de RMN de TH2g	191
Apêndice B.8 – Espectros de RMN de TH2h	194
APÊNDICE C – Espectros das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo álcool ou ácido carboxílico	197
Apêndice C.1 – Espectros de RMN de TH3a	198
Apêndice C.2 – Espectros de RMN de TH4a	198
Apêndice C.3 – Espectros de RMN de TH4b	199
Apêndice C.4 – Espectros de RMN de TH4c	200

Apêndice C.5 – Espectros de RMN de TH4d	201
Apêndice C.6 – Espectros de RMN de TH4e	202
Apêndice C.7 – Espectros de RMN de TH4f	203
Apêndice C.8 – Espectros de RMN de TH4g	204
Apêndice C.9 – Espectros de RMN de TH4h	205
Apêndice C.10 – Espectros de RMN de TH5a	206
APÊNDICE D – Espectros das 2-tiazolilhidrazinas	207
Apêndice D.1 – Espectros de RMN de TH6a	208
Apêndice D.2 – Espectros de RMN de TH6b	208
Apêndice D.3 – Espectros de RMN de TH6c	209
Apêndice D.4 – Espectros de RMN de TH6d	210

INTRODUÇÃO

Emergência das infecções fúngicas

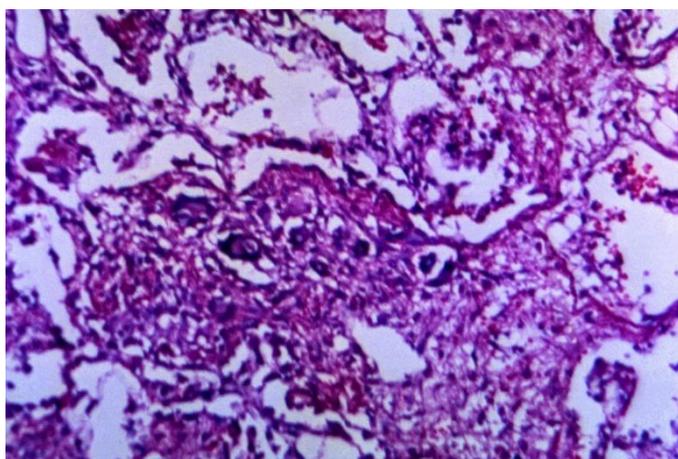
O reino Fungi apresenta uma diversidade muito grande de espécies, que variam significativamente entre si em fisiologia e morfologia. Hawksworth e Lücking estimaram em 2017 a existência de 2,2 a 3,8 milhões de espécies de fungos espalhadas pelo planeta, mas apenas 120 mil delas foram identificadas até o momento (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017). Os fungos são seres eucariontes uni ou multicelulares, que apresentam como característica principal a compartimentalização do material genético em suas células dentro um núcleo demarcado por uma membrana; diferindo dos procariontes, em que material genético desses organismos está presente no citosol (BALDAUF; PALMER, 1993; SIMPSON; ROGER, 2004; TIROSH *et al.*, 2006). Outra característica morfológica marcante das células fúngicas é a presença de uma parede celular rígida externa à membrana celular composta por quitina e β -glicanos, além de mananos, glicoproteínas e enzimas que degradam substâncias exógenas para a nutrição do organismo (HAY, 2006).

Alguns fungos fazem parte da microbiota humana em perfeita simbiose. Outros são utilizados na alimentação e em vários processos industriais e biotecnológicos importantes, como a produção de alimentos e medicamentos. Entretanto, cerca de 600 espécies são patogênicas para seres humanos, causando enfermidades preocupantes (CACERES *et al.*, 2020). Bongomin e colaboradores estimaram em 2017 que quase um bilhão de pessoas apresentam infecções fúngicas superficiais, especialmente na pele, unhas e couro cabeludo, além de aproximadamente um milhão de casos de queratite fúngica. Ademais, os autores destacam que fungos patogênicos levam a mais de 150 milhões de casos de infecções sistêmicas mais sérias, com mais de 1,6 milhão de óbitos associados (BONGOMIN *et al.*, 2017).

A maior parte dos casos globalmente é causada pelos fungos que se enquadram no grupo denominado “*big five*”: os gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e *Pneumocystis*, e a ordem Mucorales, termo conferido por Caceres e colaboradores (2020). Essas espécies acometem, em maior número, indivíduos imunocomprometidos, levando a muitos quadros de infecções invasivas agudas, com taxas de mortalidade que variam entre 30 e 90% (CACERES *et al.*, 2020; PFALLER

et al., 2005; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Outras espécies que causam infecções comunitárias crônicas também ganham destaque, como *Blastomyces* spp. (**Figura 1**, p. 28), *Histoplasma* spp., e *Paracoccidioides* spp – em que as duas últimas são hiperendêmicas no Brasil e em outras regiões da América Latina (ASHRAF et al., 2020; BONGOMIN et al., 2017).

Figura 1 – Fotomicrografia ampliada (125 vezes) de células de pulmão humano infectadas por fungos do gênero *Blastomyces*, causadores da blastomicose.



Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention (EUA)* (Domínio público).

Muitos são os fatores que influenciam no aumento do número de casos e óbitos relacionados às infecções fúngicas. Os principais fatores relacionados ao crescimento na prevalência são o aumento de pacientes imunocomprometidos, infecções hospitalares e condições precárias dos estabelecimentos de saúde, e os patógenos comunitários e emergentes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020). Pessoas convivendo com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DENNING, 2016), receptores de transplantes de órgão, sangue ou medula (FUKUDA et al., 2003; KONTOYIANNIS et al., 2010; PAPPAS et al., 2010; SHOHAM; MARR, 2012), pacientes em tratamento quimioterápico para o câncer (BODEY et al., 1992; CRAWFORD; DALE; LYMAN, 2004; LORTHOLARY et al., 2013) ou com medicamentos imunossupressores (ALI et al., 2013), e pacientes hospitalizados (VINCENT et al., 1998; PFALLER; DIEKEMA, 2007) se enquadram nos grupos de indivíduos mais vulneráveis e acometidos pelas micoses invasivas.

Por exemplo, estima-se mais de 300 mil casos de aspergilose invasiva no início da década de 2010, um tipo de infecção comum em indivíduos

imunocomprometidos, com uma taxa de mortalidade de 30 a 80%. Desses, pelo menos 45 mil derivam de pessoas infectadas com o HIV e/ou convivendo com a AIDS (BADDLEY et al., 2010; XU et al., 2012). Outro ponto de preocupação tem sido as infecções comunitárias, em que as dinâmicas de número e origem dos casos foram alteradas nos últimos anos, com pacientes diagnosticados em regiões não-endêmicas anteriormente. Alguns fatores podem explicar essas mudanças, como o aumento do número de pacientes imunossuprimidos, maior cobertura de testes e diagnósticos, migração e mudanças climáticas (ASHRAF et al., 2020).

Quimioterapia das infecções fúngicas

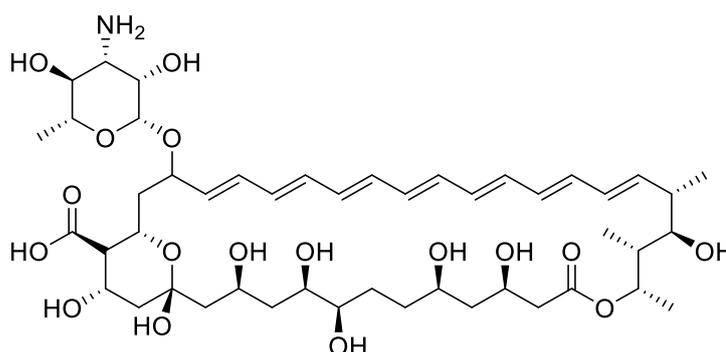
A quimioterapia antifúngica é bem menos diversa em número de classes e fármacos em comparação com outras quimioterapias antimicrobianas. As três principais classes atuais de antifúngicos disponíveis no mercado são os azóis, equinocandinas, e polienos (GEDDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2019).

Os polienos foram a primeira classe de antifúngicos a ser disponibilizada no mercado, atuando como fungicidas de amplo espectro. São lactonas macrocíclicas de origem natural, isoladas primeiramente de bactérias do gênero *Streptomyces*. São biossintetizadas a partir de uma série de condensações de Claisen catalisadas por policetídeo sintases, com posteriores reações de metilação, oxidação e glicosilação. Os polienos anfotericina B (**Figura 2**, p. 30), natamicina e nistatina são os principais e mais prescritos antifúngicos que compõe essa classe (CAFFREY et al., 2001; KHAN; RAWLINGS; CAFFREY, 2011). Seu mecanismo de ação envolve o estabelecimento de interações intermoleculares com moléculas de ergosterol presentes na membrana celular dos fungos, deslocando-as da membrana. Isso causa uma desestabilização da estrutura, formando poros que provocam o deslocamento de eletrólitos e outros componentes do citosol para fora da célula, levando à morte do micro-organismo (ionóforos). Além disso, esses fármacos também provocam um estresse oxidativo, ao estimular a produção de radicais livres nas células (ANDERSON et al., 2014; GRAY et al., 2012; WALL; LOPEZ-RIBOT, 2020).

Os polienos possuem baixa biodisponibilidade quando administrados por via oral, razão pela qual, por exemplo, a anfotericina B é administrada apenas por via intravenosa para tratamento de infecções sistêmicas causadas por leveduras e fungos filamentosos, utilizando formulações lipídicas ou nanoestruturadas para aumentar a

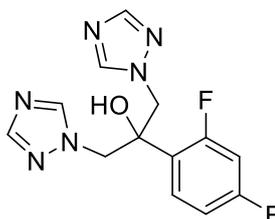
concentração nos tecidos (ANDERSON et al., 2014). Os fármacos natamicina e nistatina apresentam ainda menor biodisponibilidade por via oral e maior toxicidade por via parenteral, sendo quase exclusivamente aplicadas topicamente no tratamento de micoses superficiais e vulvovaginais (ZOTCHEV, 2003).

Figura 2 – Estrutura química da anfotericina B, o fármaco da classe dos polienos mais utilizado no tratamento de infecções sistêmicas.



Os azóis representam a classe mais ampla e mais utilizada dentre os antifúngicos, também com amplo espectro de atividade. São compostos sintéticos contendo, ao menos, um anel heterocíclico nitrogenado (por isso o prefixo azo), como o fluconazol, que apresenta um anel triazólico (**Figura 3**, p. 30).

Figura 3 – Estrutura química do fluconazol, um dos antifúngicos azólicos mais utilizados na terapêutica de infecções fúngicas.

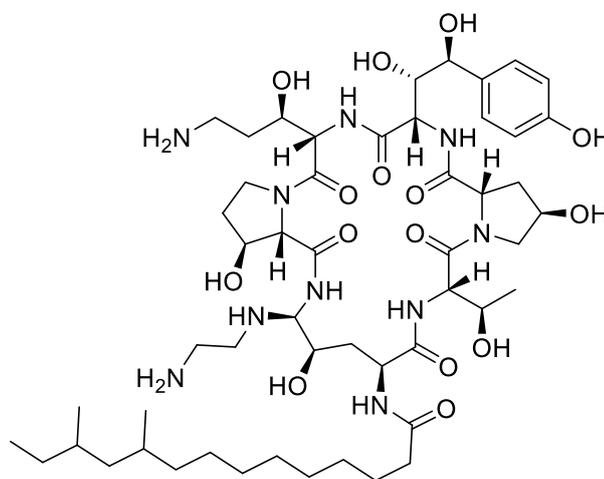


Esses fármacos atuam como inibidores da síntese de ergosterol, inibindo a enzima 14- α -esterol desmetilase (*ERG11* ou *CYP51*, a depender do organismo). Essa enzima do tipo citocromo P-450 catalisa uma reação de desmetilação, em que há a desalquilação da metila C-14 α do lanosterol, precursor na biossíntese de esteroides em fungos. Com isso, há um acúmulo de metabólitos altamente lipofílicos e tóxicos no citoplasma, além da desestabilização da membrana, devido à menor concentração de

ergosterol na célula (COWEN et al., 2015; SHEEHAN; HITCHCOCK; SIBLEY, 1999; WHALEY et al., 2017). Os azóis apresentam caráter fungicida frente a *Aspergillus* spp., mas são fungistáticos, independentemente da concentração, contra espécies dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* (MANAVATHU; CUTRIGHT; CHANDRASEKAR, 1998; PIANALTO; ALSPAUGH, 2016).

As equinocandinas enquadram um grupo de lipopeptídeos macrocíclicos de origem natural (assim como os polienos) e é a classe de antifúngicos mais recentemente descoberta. As estruturas químicas desses fármacos apresentam um macrociclo polipeptídico característico (usualmente hexapeptídeos) ligados a um grupo acila de caráter graxo. A caspofungina (**Figura 4**, p. 31), a micafungina e a anidulafungina são os principais fármacos dessa classe. São produtos semissintéticos derivados de pneumocandinas, obtidos por meio de processos de fermentação (EMRI et al., 2013).

Figura 4 – Estrutura química da caspofungina, representante da classe das equinocandinas.



Seu mecanismo de ação envolve a inibição da β -(1,3)-D-glucano sintase, enzima que participa da biossíntese do oligossacarídeo β -(1,3)-D-glucano, um componente estrutural importante da parede celular fúngica. Se sua biossíntese for comprometida, pode causar instabilidade na parede celular, levando a um desequilíbrio osmótico e, conseqüentemente, à morte da célula fúngica (DENNING, 2002; JOHNSON; PERFECT, 2003).

Seu efeito fenotípico pode variar entre gêneros, em que as equinocandinas apresentam caráter fungicida contra *Candida* spp., mas fungistático contra *Aspergillus* spp. Devido às suas estruturas e propriedades físico-químicas, não são absorvidas por via oral, sendo exclusivamente administradas por via parenteral, sendo mais aplicadas na terapia de infecções invasivas (PAPPAS et al., 2016). Estudos também relatam que as equinocandinas podem aumentar a resposta imune do hospedeiro a possíveis epítomos antígenos formados por beta-glucanos, estimulando a biossinalização inflamatória (WHEELER; FINK, 2006).

Fungos multirresistentes e a necessidade de se desenvolver novos fármacos antifúngicos

A emergência de fungos multirresistentes é uma questão de saúde pública recorrente. O agravamento dessa situação se dá especialmente pelo aparecimento de novas espécies, cepas com resistência intrínseca com maior prevalência, uso indiscriminado e inadequado de fármacos antimicrobianos, limitação no número de medicamentos disponíveis no mercado, dentre outros fatores que provocam a seleção de cepas resistentes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020). Um outro problema é a aplicação indiscriminada e, às vezes, incorreta de antifúngicos na agricultura para o controle de pragas. Estima-se que o uso de antifúngicos azólicos na agricultura nos Estados Unidos aumentou 434% de 2013 a 2016, o que pode provocar o crescimento de fungos patogênico resistente a esses fármacos (TODA et al., 2021).

Nas últimas décadas, viu-se um aumento nas taxas de mortalidade e de morbidade causadas por fungos resistentes, principalmente em pacientes imunocomprometidos comprometidos por infecções invasivas. Relatos de resistência às três principais classes de antifúngicos são encontrados para a maior parte dos gêneros de fungos patogênicos, em que algumas cepas apresentam pouca susceptibilidade à fármacos de todas as classes. Os mecanismos de resistência costumam ser conservados mesmo entre diferentes gêneros. Espécies como *Aspergillus fumigatus*, possui resistência aos principais fármacos azólicos; *Fusarium* spp. possui resistência intrínseca às equinocandinas, com taxa de mortalidade entre 50 e 80% (VALLABHANENI et al., 2016). Estão descritos, na **Tabela 1** (p. 33), alguns

dos principais mecanismos de resistência encontrados para os polienos, azóis e equinocandinas.

Tabela 1 – Exemplos de fármacos, mecanismos de ação e mecanismos de resistência das três principais classes de antifúngicos (azóis, equinocandinas e polienos) disponíveis no mercado.

Classe	Exemplos	Mecanismo de ação	Mecanismos de resistência	Espécies com resistência intrínseca ou em alta frequência
Azóis	Fluconazol, itraconazol, voriconazol	Inibição da biossíntese de ergosterol (inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase)	Aumento na atividade de bombas de efluxo, mutações no gene <i>ERG11</i> , mutações no promotor do gene <i>CYP51</i>	<i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida albicans</i>
Equinocandinas	Caspofungina, micafungina, anidulafungina	Inibição da 1,3- β -glucano sintase	Mutações no gene <i>FKS</i>	<i>Cryptococcus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.
Polienos	Anfotericina B, nistatina, natamicina	Sequestro de ergosterol presente na membrana celular	Diminuição na concentração de ergosterol na membrana, mutações nos genes <i>ERG</i>	<i>Candida auris</i> , <i>Aspergillus terreus</i>

Fonte: Adaptado de Berman *et al.* (2020).

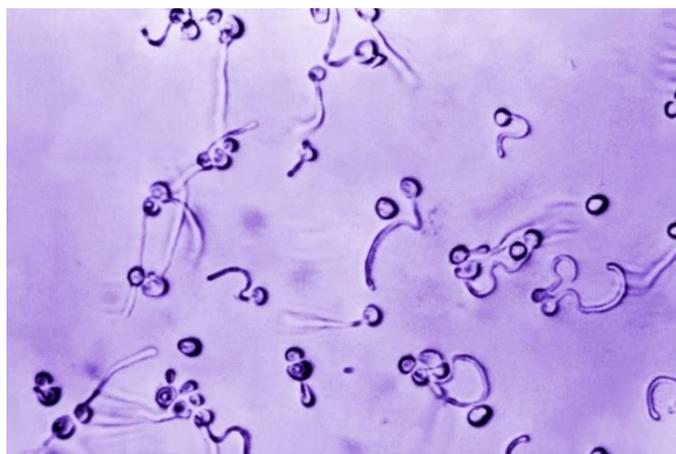
A *Food and Drug Administration* (FDA), agência reguladora sanitária dos EUA, aprovou 34 medicamentos antifúngicos entre janeiro de 1981 e setembro de 2019, englobando farmoquímicos de origem natural e sintética, fitoterápicos e produtos biológicos. Esse número é consideravelmente menor em comparação com outras classes de antimicrobianos, visto que a agência aprovou 162 antibacterianos e 186 antivirais no mesmo período. Dos dez fármacos contra fungos aprovados nos últimos vinte anos, nove são da classe dos azóis, o que destaca a pouca evolução na

descoberta de novas classes químicas e mecanismos de ação para antifúngicos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Essa diferença é, em parte, reflexo do certo descaso da comunidade de saúde pública com o assunto. Boa parte das infecções fúngicas apresentam baixas taxas de mortalidade e baixa transmissibilidade em comparação com bactérias e vírus, causando menos surtos e epidemias, o que leva a um baixo investimento no desenvolvimento de novos antifúngicos (DENNING, 2017).

O gênero *Candida* e a candidíase

A candidíase é uma doença infecciosa causada por espécies do gênero *Candida*, como, por exemplo, a espécie *Candida albicans* é a mais comumente encontrada (Figura 5, p. 34). Esses fungos se apresentam na forma de leveduras e podem ser encontrados na microbiota humana, principalmente na pele e em mucosas (tratos gastrointestinal e geniturinário), não causando sintomas (NUCCI; ANAISSIE, 2001). Entretanto, quadros de infecção podem aparecer quando o fungo se prolifera de forma descontrolada, principalmente por inoculação via relação sexual, ou quando ele se aloca em um tecido interno importante onde não é comum encontrá-lo, situações comuns em casos de baixa imunidade (e.g., pacientes imunossuprimidos) (LALLA et al., 2010).

Figura 5 – Fotomicrografia de esporos da espécie *Candida albicans*.



Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention (EUA)* (Domínio público).

A candidíase pode ocorrer em várias regiões do corpo, em que os três tipos listados a seguir são os mais frequentes: (i) a candidíase orofaríngea, ocorrendo na

região bucal, garganta e esôfago (quando se manifesta na boca e garganta, é popularmente conhecida como “sapinho” no Brasil) (PANKHURST, 2012); (ii) a candidíase vaginal, que ocorre no trato vaginal (GONÇALVES et al., 2016); e (iii) a candidíase invasiva, que ataca tecidos internos vitais (KULLBERG; ARENDRUP, 2015). A candidemia, infecção do tecido sanguíneo por *Candida* spp., é o principal tipo de candidíase invasiva, com uma taxa de mortalidade atribuída de 49% dentre todas as infecções sanguíneas (WISPLINGHOFF et al., 2014).

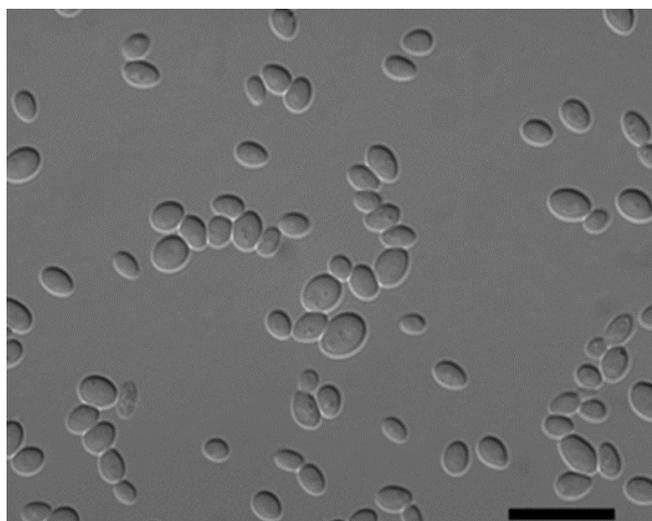
As candidíases se enquadram entre as infecções fúngicas mais prevalentes no mundo. O principal agente etiológico do gênero é a espécie *C. albicans*, seguida das espécies *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, e *Candida tropicalis* (não descritas em ordem crescente de número de casos). Estima-se a incidência de dois milhões de casos anuais de candidíase oral e 1,3 milhão de casos de candidíase esofágica. 70% das pessoas com vagina apresentam ou irão apresentar em vida ao menos um episódio de candidíase vulvovaginal, com mais de 130 milhões de casos recorrentes. Cerca de 750 mil casos de candidíases invasivas foram relatados em 2017, em que quase 160 mil eram de candidemia. No Brasil foram diagnosticados 28.991 casos, numa prevalência de 14,9 casos a cada 100 mil pessoas (BONGOMIN et al., 2017).

A espécie emergente *Candida auris* (**Figura 6**, p. 36) tem sido uma preocupação para a comunidade sanitária, mesmo apresentando uma prevalência de casos mais baixa que outros componentes do gênero. O isolamento de uma cepa do fungo foi relatado pela primeira vez no Japão em 2009, sendo identificada de uma amostra de otorreia coletada de uma paciente diagnosticada com otite fúngica (por isso o nome científico *C. auris*, pois *auris* é a palavra em latim para ouvido) (SATOH et al., 2009), mas uma análise regressiva de amostras coletadas de *Candida* spp. anteriores mostraram que a primeira cepa isolada de *C. auris* data de 1996, na Coreia do Sul (CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017).

Segundo dados da CDC de 15 de fevereiro de 2021, no mínimo 47 países registraram ao menos um caso positivo de infecção por *C. auris* até a data (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022). Este fungo acomete frequentemente pacientes hospitalizados que receberam intervenções cirúrgicas ou receberam medicamentos com ação antimicrobiana ou imunossupressora, causando infecções nosocomiais graves (SCHELENZ et al., 2016). É estimado que ao menos um a cada três pacientes com infecções invasivas causadas por *C. auris* falecem

(CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018). Seu tratamento é dificultado devido ao protocolo necessário para diagnóstico, sendo limitado por necessitar de técnicas mais robustas, além de ser facilmente confundido com outras espécies do gênero. Também, sua multirresistência a vários fármacos das principais classes de antifúngicos pode dificultar o tratamento (GEDDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2019).

Figura 6 – Fotomicrografia de leveduras da espécie *Candida auris* (cepa JCM15448^T). As células vegetativas foram inoculadas em caldo de extrato de levedura peptona-glicose por três dias a 25 °C. A barra de escala em preto no canto inferior direito da figura indica uma distância de 10 µm.



Fonte: Satoh et al. (2009) (a editora John Wiley and Sons concedeu o direito de reprodução da imagem para este trabalho acadêmico).

Vários são os sintomas que podem se manifestar para a candidíase. Para os casos do tipo orofaríngeo, os principais sintomas são: manchas brancas na língua e regiões internas da boca e faringe; vermelhidão; perda de paladar; dor ao comer e engolir; ressecamento nos lábios e cantos da boca (LYNCH, 1994; PANKHURST, 2012). No caso da candidíase vulvovaginal, coceira na região da virilha, dor ao urinar ou durante o ato sexual e fluidos anormais são os sintomas mais comuns (GONÇALVES et al., 2016).

Para as infecções causadas por fungos dos gêneros *Candida* mais leves e moderadas, o tratamento mais comum é com o uso de azóis (clotrimazol, fluconazol, miconazol), sendo administrados por via oral (no caso da candidíase vaginal, pode-se

fazer a administração intravaginal). Em infecções mais graves de candidíases invasivas, faz-se uso de fármacos da classe das equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina) (PAPPAS et al., 2010, 2016).

Alguns componentes do gênero *Candida* apresentam resistência significativa aos azóis e equinocandinas (BERMAN; KRYSAN, 2020). A taxa de resistência de *C. albicans* ao fluconazol é estimada entre <1 e 5%, em que esse número pode aumentar para até 65% para outras espécies do gênero (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). Por exemplo, a espécie *C. glabrata* apresenta certa resistência ao fluconazol e, para esses casos, dá-se preferência ao tratamento com equinocandinas (TODA, 2019). A *C. auris* é ainda mais preocupante, em que 90% das cepas isoladas nos EUA são resistentes ao fluconazol, e mais de um terço à anfotericina B (LOCKHART et al., 2017). Alguns trabalhos destacam que essa espécie pode adquirir resistência ou tolerância aos polienos e equinocandinas com muita facilidade (KORDALEWSKA et al., 2018).

O gênero *Cryptococcus* e a criptococose

A criptococose é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Cryptococcus*, também com morfologia leveduriforme. Estes fungos residem principalmente no solo, em torno de árvores, podendo entrar em contato com matéria orgânica mais facilmente para fins de nutrição e, assim, manter sua reprodução. São encontrados também em excrementos de algumas aves, mais comumente de pombos. Esse fato explica o nome popular de “doença do pombo” para a criptococose no Brasil (HARRIS; LOCKHART; CHILLER, 2012; LAZERA et al., 2000; REOLON; PEREZ; MEZZARI, 2004). A inoculação ocorre ao inspirar as leveduras ou esporos do ambiente, tendo os pulmões como principal local de alojamento, e que depois podem se espalhar para outros tecidos. A doença não é contagiosa, ou seja, não há a transmissão entre indivíduos (GOLDMAN et al., 2001).

A criptococose se manifesta, na maioria dos casos, no próprio tecido pulmonar (criptococose respiratória), mas manifestações clínicas cutâneas e oculares, por exemplo, também são relatadas (SPRINGER et al., 2014). Em casos mais graves, os micro-organismos se espalham pelo corpo e podem até atravessar a barreira hematoencefálica, levando à chamada meningite criptocócica, quadro mais grave da doença (CHEN et al., 2000; SABIITI; MAY, 2012).

Os dois principais agentes etiológicos do gênero são as espécies *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* (**Figura 7**, p. 38), a segunda possuindo o maior destaque clínico. A espécie *C. neoformans* é de caráter oportunista, acometendo em maior parte pacientes com doenças imunodepressoras, principalmente indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou que convivem com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (BRATTON et al., 2012; IDNURM et al., 2005). Estima-se, ao menos, 223 mil casos de criptococose relacionadas a HIV/AIDS pelo mundo (BONGOMIN et al., 2017). A espécie *C. gattii* tende a infectar indivíduos imunocompetentes, acometendo, em maior número, crianças e jovens (GEORGI et al., 2009; MACDOUGALL et al., 2011).

Figura 7 – Placa de petri contendo colônias de *Cryptococcus neoformans* em meio Ajello-Shields. A cultura formada é resultado de um inóculo feito com excrementos de pombos coletado em 1966. A placa foi incubada a 37 °C por tempo não informado.



Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention* (EUA) (Domínio público).

Disponível em: < <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=21391>>. Acesso em 04 ago. 2022.

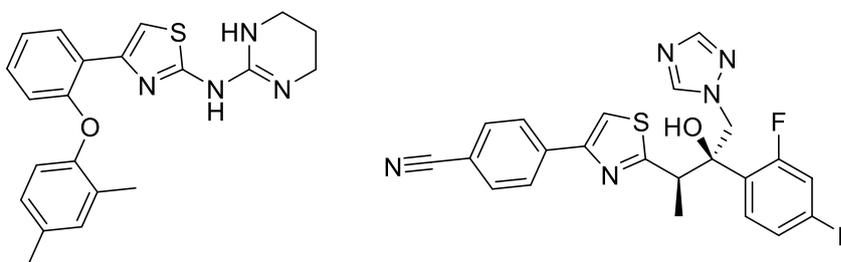
Para as criptococoses pulmonares, os principais sintomas envolvem tosse, falta de ar, dor no peito e febre. Em casos de infecções invasivas, como a meningite criptococócica, os sintomas mais comuns são: dor de cabeça e na nuca, febre, náusea e vômitos, sensibilidade à luz, tonteira e confusão mental (BRATTON et al., 2012; CHANG et al., 2006; CLARK et al., 1990; SABIITI; MAY, 2012). Devido à resistência intrínseca de *Cryptococcus* spp. às equinocandinas, as infecções mais leves são tratadas com os fármacos azólicos, especialmente o fluconazol. No caso de infecções

invasivas mais graves, a associação de anfotericina B e flucitosina é indicada como tratamento inicial, com posterior prescrição de fluconazol por um longo prazo (PAPPAS et al., 2010, 2016). Entretanto, há relatos clínicos de resistência de *C. gattii* e *C. neoformans* aos antifúngicos azólicos, especialmente o fluconazol. As espécies *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii*, patógenos oportunistas que correspondem a 80% das criptococoses não causadas por *C. neoformans* e *C. gattii*, são relatadas como pouco susceptíveis à flucitosina e ao fluconazol, o que dificulta o tratamento de criptococoses invasivas (GEDDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2019).

Tiazóis como uma promissora classe de antifúngicos

Os heterociclos tiazólicos possuem certa notoriedade na química medicinal. Diversas atividades biológicas foram descritas para compostos desse grupo, em que listamos as atividades antidiabética (RESENDE et al., 2019), antioxidante (MALTAROLLO et al., 2019), antiviral (FARGHALY et al., 2022; GUO et al., 2019; SOKOLOVA et al., 2018), citotóxica (AYATI et al., 2019; BRAGA et al., 2016; DE SANTANA et al., 2018) e neuroprotetora (CARRADORI et al., 2014; CHIMENTI et al., 2008, 2010; TRIPATHI et al., 2018) como exemplos, além da atividade antifúngica, é claro. Alguns fármacos disponíveis no mercado possuem o grupo tiazol em suas estruturas químicas, incluindo antimicrobianos, como a abafungina e o ravuconazol (Figura 8, p. 39).

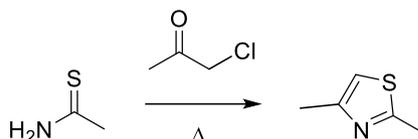
Figura 8 – Estruturas químicas da abafungina (à esquerda) e do ravuconazol (à direita), exemplos de fármacos que apresentam um heterociclo tiazólico.



O primeiro relato de síntese de um derivado tiazólico data de 1889, da pesquisa desenvolvida por A. Hantzsch. O autor obteve o 2,4-dimetiltiazol (1) a partir

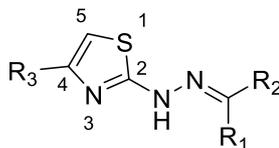
da reação de condensação entre a cloroacetona e a tioacetamida (**Esquema 1**, p. 40) (HANTZSCH, 1889).

Esquema 1 – Procedimento utilizado por Hantzsch em 1889 para obtenção do produto 2,4-dimetiltiazol (**1**).



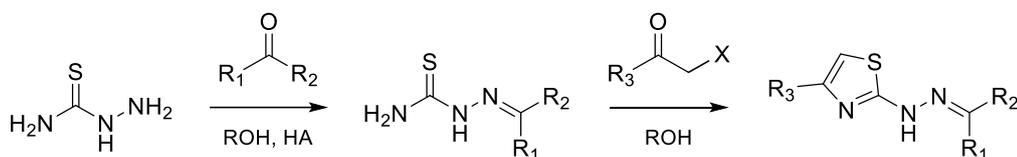
Dentre os vários derivados já obtidos contendo o heterociclo tiazólico, as 2-tiazolilhidrazonas apresentam um maior destaque quanto à atividade antifúngica. Sua estrutura geral corresponde a um anel tiazol conectado a um grupo hidrazona na posição 2 (**Figura 9**, p. 40).

Figura 9 – Estrutura geral das 2-tiazolilhidrazonas.



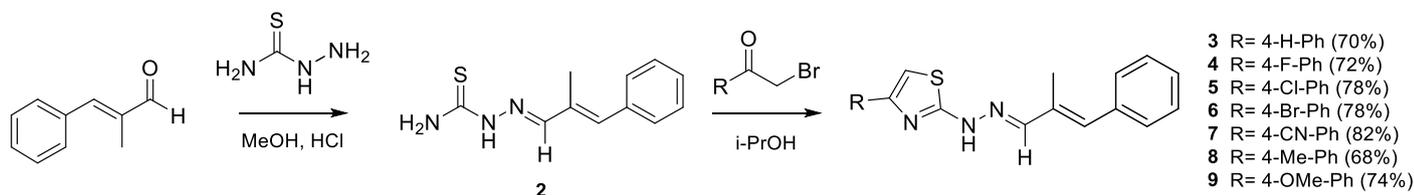
A obtenção dessas substâncias é relativamente pouco laboriosa. Quando em duas etapas, a primeira envolve a obtenção do intermediário tiossemicarbazona a partir do tratamento de aldeídos ou cetonas com tiossemicarbazida sob refluxo e na presença de um catalisador ácido. O catalisador ácido garante as condições reacionais necessárias para a formação da ligação imina. Na segunda etapa, a formação do anel heterocíclico se dá por meio de uma reação de condensação equimolar entre o intermediário tiossemicarbazona e uma α -haloetona, também sob aquecimento. Em ambas as reações, solventes próticos, como os álcoois, são os mais comuns de serem utilizados (**Esquema 2**, p. 41) (HUSSEIN; TURAN-ZITOUNI, 2018). Aspectos sobre o mecanismo das reações para a obtenção de derivados tiazolilhidrazonas serão mais detalhadamente discutidos no **Capítulo 1** (p. 82) deste trabalho.

Esquema 2 – Procedimento geral para preparação de 2-tiazolilhidrazonas, quando em solventes próticos.



O trabalho de Anbazhagan e Sankaran (2013) ilustra bem essa estratégia de síntese em duas etapas. Os autores obtiveram sete derivados tiazolilhidrazonas a partir do (*E*)-2-metilcinamaldeído e 2-bromoacetofenonas *p*-substituídas (**Esquema 3**, p. 41). A tiossemicarbazona **2** foi obtida reagindo o aldeído correspondente com a tiossemicarbazida em metanol sob aquecimento, com algumas gotas de ácido clorídrico concentrado como catalisador, obtendo o produto com 88% de rendimento. Por fim, as sete tiazolilhidrazonas (**3-9**) foram sintetizadas em 2-propanol a 120 °C por duas horas, com rendimentos de 68 a 82% (ANBAZHAGAN; SANKARAN, 2013).

Esquema 3 – Procedimento utilizado por Anbazhagan e Sankaran (2013) para obtenção das 2-tiazolilhidrazonas **3-9** derivadas da tiossemicarbazona **2**, sintetizada a partir do (*E*)-2-metilcinamaldeído.

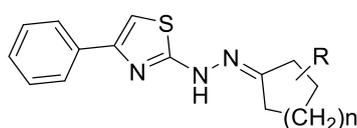


Muitos são os trabalhos que descrevem a atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de derivados 2-tiazolilhidrazonas contra várias cepas de referência e isolados clínicos de *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. A seguir estão listados alguns exemplos que descrevem o planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica desses derivados, a fim de acompanhar a evolução das estratégias nos últimos 20 anos.

Maccioni e colaboradores (2002) realizaram a síntese de seis derivados 4-fenil-2-tiazolilhidrazonas (**10-15**) a partir de quatro cetonas cíclicas, e a atividade antifúngica foi avaliada por um método de macrodiluição em caldo para determinação dos valores de concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) frente a espécies de *Candida* spp. (**Figura 10**, p. 42). O derivado **10** foi o mais potente contra as espécies *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (MIC = 0,78 µg/mL

para todos), enquanto **15** foi o mais potente para *C. albicans* (MIC = 0,39 µg/mL, mas com baixa potência frente aos outros fungos), ambos com valores próximos aos controles positivos miconazol (MIC = 0,09-12,5 µg/mL) e clotrimazol (MIC = 0,04-12,5 µg/mL). Todos apresentaram baixa atividade frente à *C. glabrata* (MIC > 25 µg/mL). O produto **13** foi o menos ativo da série, com valores de MIC maiores que 100 µg/mL para todos os fungos. Os derivados **10** e **14** mostraram atividades fungicidas mais potentes que os fármacos de referência miconazol e clotrimazol frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (MFC = 3,12 µg/mL para ambos contra as três cepas). Em uma análise geral dos valores de MIC e MFC, os fungos foram mais susceptíveis às substâncias contendo anéis de 5 ou 6 carbonos ligados ao grupo hidrazona (MACCIONI et al., 2002).

Figura 10 – Estruturas químicas das substâncias **10-15** obtidas por Maccioni *et al.* (2002) e suas faixas de valores de MIC e MFC frente a cepas de referência das espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.



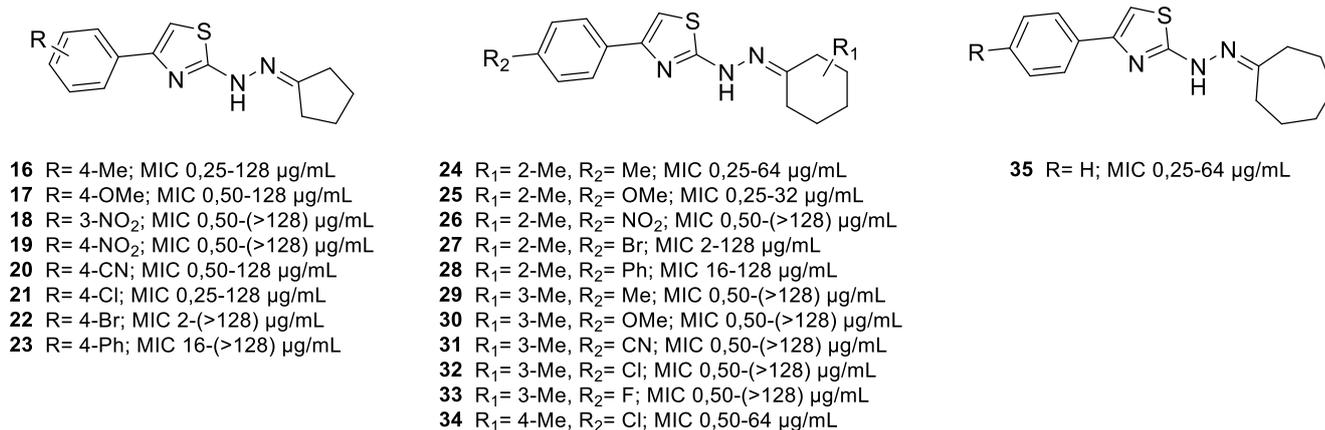
- 10** n=1, R= H; MIC 0,78-25 µg/mL, MFC 3,12-(>100) µg/mL
11 n=2, R= H; MIC 0,78-50 µg/mL, MFC 12,5-(>100) µg/mL
12 n=3, R= H; MIC 3,12-(>100) µg/mL, MFC 6,25-(>100) µg/mL
13 n=4, R= H; MIC >100 µg/mL, MFC >100 µg/mL
14 n=2, R= 2-Me; MIC 0,78-25 µg/mL, MFC 3,12-(>100) µg/mL
15 n=2, R= 4-Me; MIC 0,39-50 µg/mL, MFC 25-(>100) µg/mL

Em continuação ao trabalho, Logu e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antifúngica do tiazol **11** contra isolados clínicos de *Candida* sp., em que o produto mostrou atividade comparável ou mais potente que os controles positivos anfotericina B e fluconazol. Além disso, a substância **11** mostrou baixa citotoxicidade frente a células Vero (células epiteliais de rins da espécie *Cercopithecus aethiops*, ou macaco-verde africano) (IC₅₀ > 1000 mg/L) e inibiu consideravelmente o crescimento de biofilmes de *C. albicans* em modelo *in vitro*, quando em associação com anfotericina B (DE LOGU et al., 2005).

Chimenti *et al.* (2007) relataram a obtenção e avaliação da atividade antifúngica de vinte 2-tiazolilhidrazonas contendo substituintes cíclicos alifáticos (ciclopentila, cicloexila e cicloheptila) conectados ao grupo imina (**16-35**) (Figura 11, p. 43). Os compostos foram avaliados contra 22 isolados clínicos das espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. sakè* e *C. tropicalis*. Os tiazóis **24** e **25** apresentaram uma atividade significativa de amplo espectro, com os menores

valores de valores de MIC, especialmente frente às cepas de *C. albicans* (MIC = 0,25-2 µg/mL para **24**, e 0,5-2 µg/mL para **25**) e *C. glabrata* (MIC = 0,5-2 µg/mL para **24**, e 0,25-2 µg/mL para **25**), com valores comparáveis ou mais potentes que o controle positivo clotrimazol. Os resultados mostraram menores valores de MIC para os derivados contendo os grupos 2-metilcicloexila (**24-28**), 3-metilciclohexila (**29-33**) e 4-metilcicloexila (**34**), exceto para a espécie *C. glabrata*, que foi mais susceptível aos compostos contendo o grupo ciclopentila (**16-23**, exceto **17**) e 2-metilcicloexila (exceto **26** e **28**). A variação dos ligantes na posição *para* do grupo fenila não parece ser muito influente na potência da atividade biológica, exceto os derivados contendo o grupo bifenila (**23** e **34**), que apresentaram baixa potência para todas as cepas (MIC = 16-128 µg/mL para ambos) em comparação com os outros tiazóis. Os compostos apresentaram baixa citotoxicidade frente células EAhy (células somáticas híbridas endoteliais) com viabilidade celular de 73,0 a 94,7% (em concentrações menores que 0,5 µg/mL) (CHIMENTI et al., 2007).

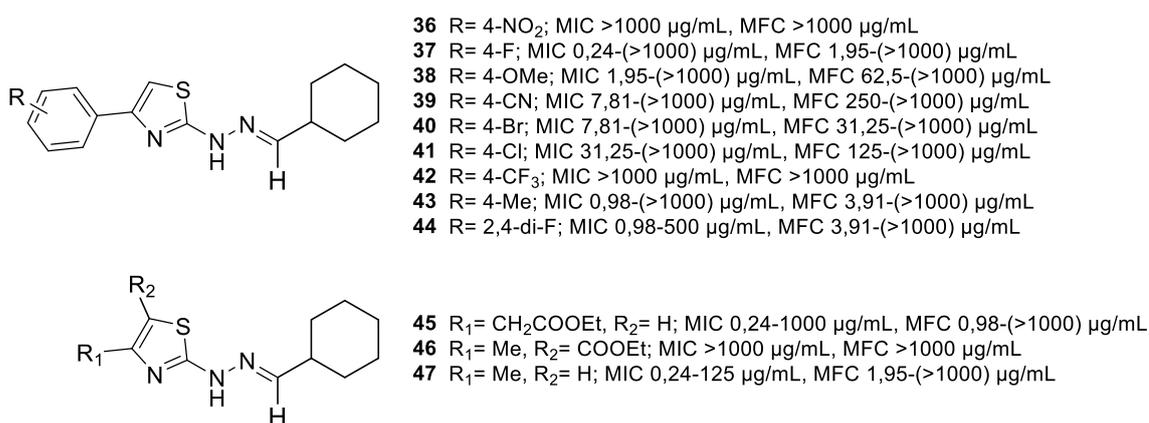
Figura 11 – Estruturas químicas das substâncias **16-35** obtidas por Chimenti *et al.* (2007) e suas faixas de valores de MIC frente à isolados clínicos de pacientes hematológicos, oncológicos e submetidos a algum tipo de cirurgia infectados com espécies de *Candida* sp.



Łączkowski *et al.* (2016) relataram a síntese de doze derivados 2-(2-(cicloexilmetileno)hidrazineil)thiazólicos, variando os grupos ligados no anel heterocíclico (**36-47**) (**Figura 12**, p. 44). Os compostos foram avaliados contra treze espécies de *Candida* spp., sendo três cepas ATCC e dez isolados clínicos. Os derivados **37** (MIC = 0,24-7,81 µg/mL), **45** e **47** (MIC = 0,24-3,91 µmol/L) mostraram

potência comparável ou melhor que o fármaco de referência fluconazol (MIC = 0,12-1000 µg/mL), especialmente frente aos isolados clínicos. Interessante notar que os derivados mais ativos apresentaram grupos alifáticos ligados ao anel heterocíclico (2-etoxi-2-oxoetila para **45** e metila para **47**). Entretanto, para os isolados de *Candida lambica* e *Candida pulcherrima*, todos os doze compostos avaliados apresentaram valores de MIC muito maiores (62,5 a >1000 µg/mL) que o fluconazol (7,81-15,62 µg/mL) (ŁĄCZKOWSKI et al., 2016).

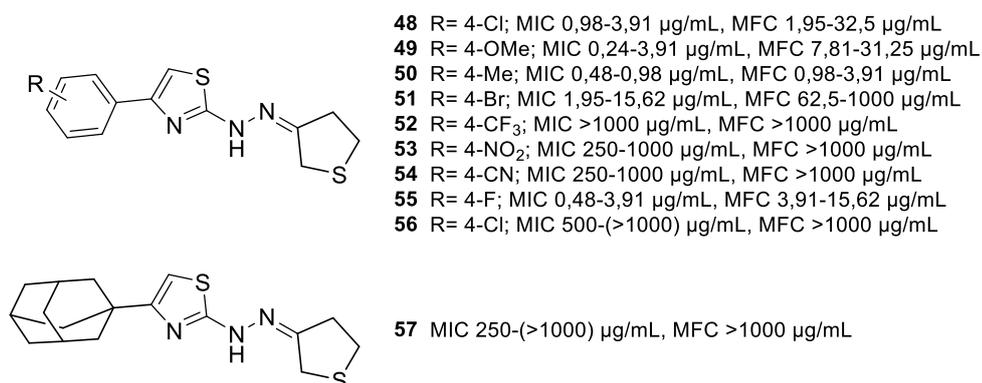
Figura 12 – Estruturas químicas das substâncias **36-47** obtidas por Łączkowski et al. (2016) e suas faixas de valores de MIC e MFC frente a cepas ATCC e isolados clínicos das espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. lusitaniae*, *C. sake*, *C. parapsilosis* e *C. pulcherrima*.



Em um trabalho posterior, Łączkowski e colaboradores (2018) obtiveram outros dez derivados tiazólicos a partir da dihidrotiofen-3(2H)-ona (**48-57**) (Figura 13, p. 45). Os compostos foram avaliados contra cepas ATCC de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. O tiazol **50** foi o mais ativo da série (MIC = 0,48-0,98 µg/mL), com potência próxima ao fármaco controle nistatina (MIC = 0,24-0,48 µg/mL). O composto **49** foi o único com MIC similar ao da nistatina para a espécie *C. krusei* (0,24 µg/mL). Os tiazóis **48**, **51** e **55** apresentaram potências moderadas (MIC = 0,48-15,62 µg/mL). Os derivados **52-54** e **56** foram inativos contra as três cepas (MIC = 250-1000 µg/mL). Essas quatro substâncias apresentam grupos fortemente retiradores de elétrons ligados ao anel benzílico (trifluorometila, nitro, ciano e *m,p*-dicloro, respectivamente), indicando que essas modificações promoveram uma contribuição negativa para a atividade biológica. Em contrapartida, **49** e **50**, os mais ativos, apresentam grupos

doadores de elétrons (metoxila e metila, respectivamente), indicando que essas modificações contribuem positivamente para o potencial antifúngico. A troca do anel benzílico pelo grupo adamantila (**57**) não levou a um derivado mais ativo (MIC = 250-1000 µg/mL) (ŁĄCZKOWSKI et al., 2018).

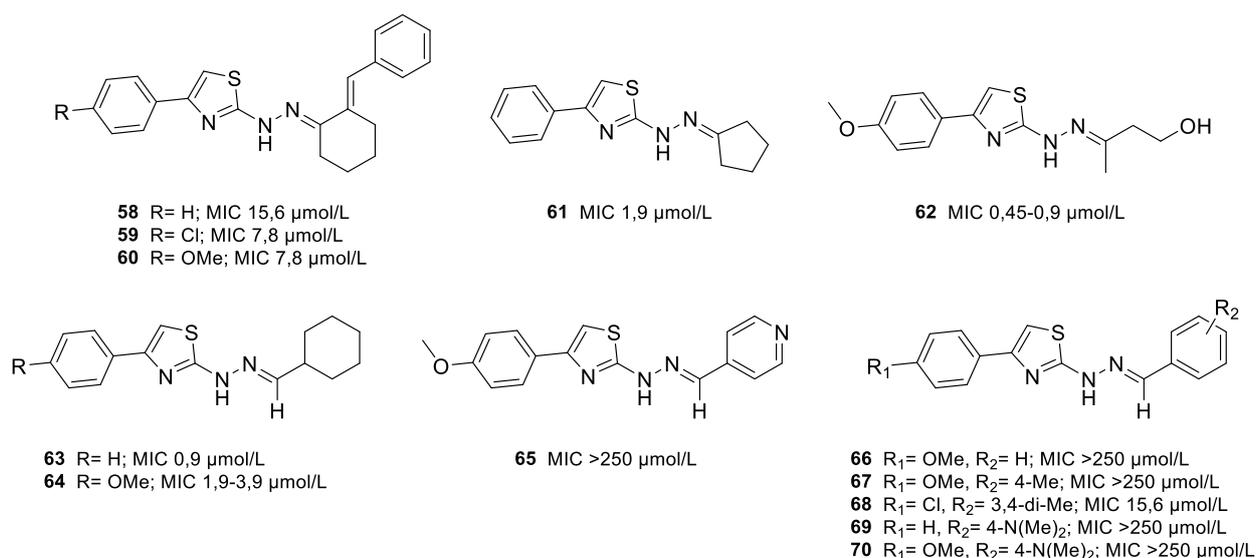
Figura 13 – Estruturas químicas dos compostos **48-57** obtidos por Łączkowski et al. (2018) e suas faixas de valores de MIC e MFC frente a cepas ATCC das espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.



Nosso grupo tem realizado um extensivo trabalho no desenvolvimento e otimização de derivados 2-tiazolilhidrazonas na descoberta de potenciais antifúngicos, em que salientamos abaixo alguns exemplos. Sá et al. (2015) sintetizaram e avaliaram a atividade anti-*Cryptococcus* de treze 2-tiazolilhidrazonas contendo grupos alifáticos ou aromáticos conectados à porção hidrazona (**58-70**) (Figura 14, p. 46). Os compostos foram avaliados contra *C. gattii* (ATCC 24065) e *C. neoformans* (ATCC 24067), sendo que os derivados contendo um ligante alifático no grupo hidrazona (**61-64**) foram os mais potentes contra ambos os fungos, com MIC < 4 µmol/L. Destacam-se as substâncias **61-63**, que apresentaram potência próxima ou maior que o controle positivo anfotericina B (MIC = 0,486 µmol/L), com MIC na faixa do baixo micromolar (MIC < 1 µmol/L). Esses quatro compostos também tiveram seus valores de MIC e MFC determinados contra as mesmas cepas de outros 24 isolados clínicos (doze para cada espécie), em que todos foram mais ativos e fungicidas que o controle positivo fluconazol para todas as cepas avaliadas. Os derivados **58-60**, obtidos a partir da mesma tiossemicarbazona, tiveram atividade moderada (MIC = 7,8-15,6 µmol/L). Os outros, contendo hidrazonas com substituintes aromáticos, foram inativos em todas as concentrações testadas (MIC > 250 µmol/L). Os treze tiazóis apresentaram baixa

citotoxicidade frente a células Vero e macrófagos murinos ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$) (PEREIRA DE SÁ et al., 2015).

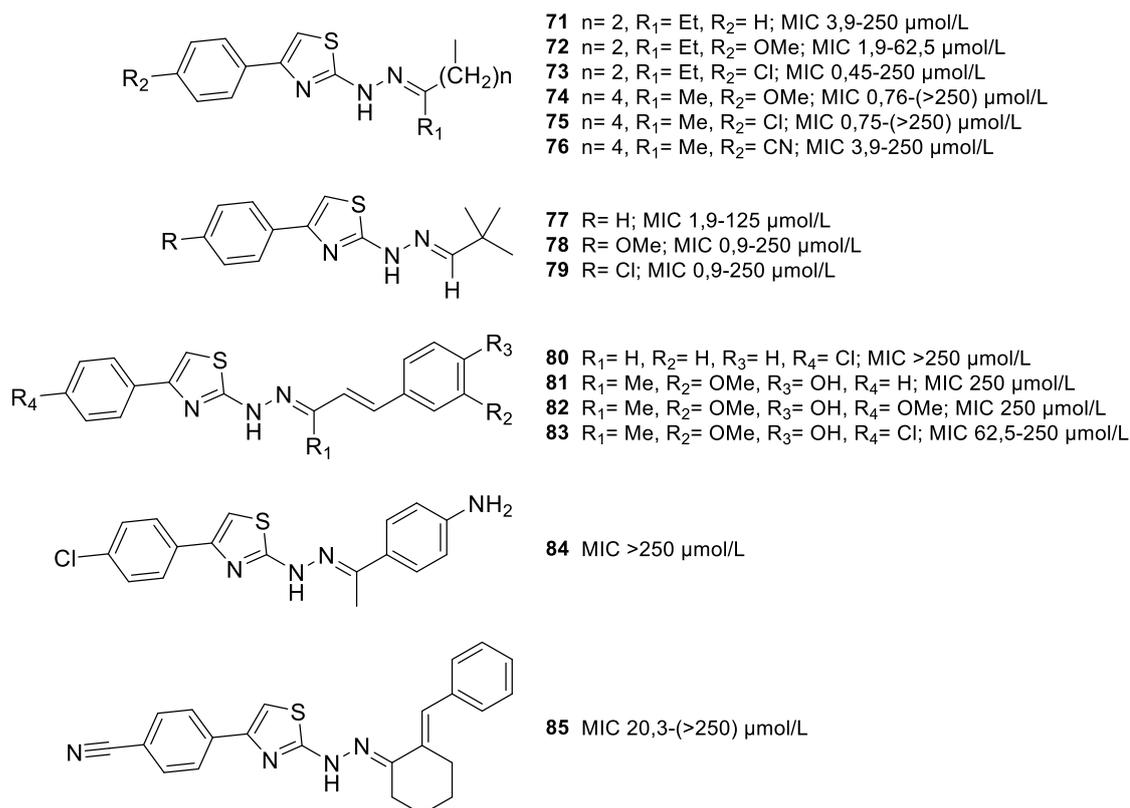
Figura 14 – Estruturas químicas das substâncias **58-70** obtidas por Sá et al. (2015) e suas faixas de valores de MIC frente a *C. gattii* e *C. neoformans*. Os compostos também apresentaram baixa citotoxicidade frente a células Vero e macrófagos murinos.



Lino et al. (2018), em continuação ao trabalho anterior, obtiveram 15 derivados tiazólicos (**71-85**) (Figura 15, p. 47) contendo hidrazonas alifáticas e aromáticas, que tiveram suas atividades antifúngicas avaliadas *in vitro* frente à sete espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Paracoccidioides*. Nenhum dos compostos foi mais ativo contra a espécie *Paracoccidioides brasiliensis* do que os controles positivos, sendo **72** o mais ativo contra essa espécie com valor de MIC = 62,5 $\mu\text{mol/L}$. Os produtos **71-73** e **77-79** se mostraram potentes antifúngicos de amplo espectro contra *Candida* e *Cryptococcus* spp., com valores de MIC comparáveis ou menores que o do controle fluconazol (MIC = 1,6-104,4 $\mu\text{mol/L}$), mas não tão potentes quanto a anfotericina B (MIC = 0,06-1,2 $\mu\text{mol/L}$) e o itraconazol (MIC = 0,04-0,18 $\mu\text{mol/L}$). O composto **73** foi o mais ativo dentre todos (MIC = 0,45-3,9 $\mu\text{mol/L}$) para essas cepas. O tiazol **74** mostrou potência comparável com o fluconazol contra *C. gattii* e *C. neoformans* (MIC = 0,76-1,5 $\mu\text{mol/L}$), enquanto **81-83** (MIC = 125 a >250 $\mu\text{mol/L}$) e **80** e **84-85** (MIC = 20,3 a >250 $\mu\text{mol/L}$) foram moderadamente ativos ou inativos. Esses resultados reiteram que as 2-tiazolilhidrazonas que apresentam hidrazonas alifáticas

em suas estruturas tendem a apresentar atividades biológicas mais potentes, especialmente as acíclicas (LINO et al., 2018).

Figura 15 – Estruturas químicas das substâncias **71-85** obtidos por Lino *et al.* (2018) e suas faixas de valores de MIC contra várias espécies dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, e a espécie *Paracoccidioides brasiliensis*.



O tiazol **63** se mostrou promissor como substância líder no desenvolvimento de novos antifúngicos. O tiazol foi capaz de reduzir a formação de biofilmes de *C. albicans* (cepa SC5314) (73,8%), *C. gattii* (cepa L27/01) (44,2%) e *C. neoformans* (cepa ATCC 24067) (30,8%), além de também reduzir a capacidade de adesão de leveduras de *C. albicans* em células do epitélio bucal humano. A substância promoveu uma sobrevivência maior que 70% em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida* sp. (5 mg/kg). Em modelo murino (camundongos C57BL/6 machos), esta mesma substância reduziu o valor de unidades formadoras de colônia e prolongou a sobrevivência por mais de 37 dias de tratamento em animais infectados com criptococose pulmonar sistêmica por *C. gattii*, um período maior do que o controle

positivo fluconazol (28 dias). Não houve diferença significativa entre as concentrações de 10 e 50 mg/kg/dia avaliadas (SÁ et al., 2018).

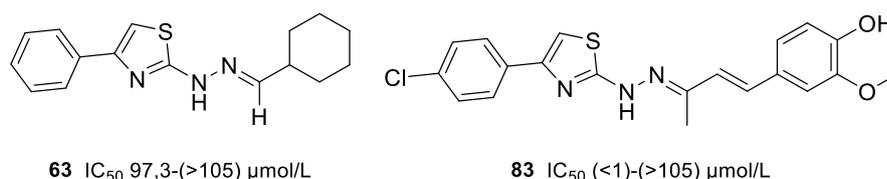
Em estudos posteriores realizados por Sá e colaboradores (2019), os tiazóis **61**, **62** e **64** também reduziram a formação de biofilmes de *C. gattii* e *C. neoformans* em modelo *in vitro* (redução de 43-50% e 26-42%, respectivamente). As substâncias apresentaram um efeito positivo no aumento do processo de fagocitose por macrófagos murinos em ensaio *in vitro*. Apenas o derivado **64**, na concentração de 5 mg/kg, aumentou a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. gattii* e *C. neoformans*. Sua potência foi similar ao controle positivo fluconazol (10 mg/kg) (SÁ et al., 2019). Por isso, em um trabalho posterior, o derivado **64** foi avaliado em vários ensaios de atividade antifúngica, com uma atividade *in vitro* mais promissora (MIC = 0,5-2 $\mu\text{mol/L}$) do que o fluconazol (MIC = 1 a > 64 $\mu\text{mol/L}$) frente a doze isolados clínicos de *C. albicans*. Além disso, também apresentou um efeito positivo no tratamento por via tópica de candidíase oral em modelo murino (camundongos C57BL/6 fêmeas), sem diferença significativa em comparação com o fármaco de referência nistatina (SÁ et al., 2021).

Tonholo e colaboradores (2020) conduziram um estudo toxicológico com os tiazóis **63** e **83** (Figura 16, p. 49), descrevendo sua citotoxicidade frente a cinco linhagens de células: A549 (células epiteliais basais de carcinoma pulmonar humano), H9C2 (mioblastos de coração de rato), HepG2 (células epiteliais de carcinoma hepático humano), LLC-PK₁ (células epiteliais de rins de porco) e Neuro-2a (neuroblastos de cérebro de camundongo). A atividade biológica de cada substância foi determinada a partir dos valores de concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (IC₅₀), obtida por meio do ensaio colorimétrico de viabilidade celular com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazônio (MTT). De acordo com o trabalho, a substância **63** apresentou baixa citotoxicidade em todas as linhagens (IC₅₀ = 97,3 a >105 $\mu\text{mol/L}$), enquanto **83** foi pouco tóxico para quatro das linhagens estudadas (IC₅₀ = 70,3 a >105 $\mu\text{mol/L}$), exceto frente às células LLC-PK₁ (IC₅₀ <1 $\mu\text{mol/L}$) (TONHOLO et al., 2020).

Estudos de toxicidade aguda oral do tiazol **63** em modelo murino (*Mus musculus*) também foram conduzidos e nenhum sinal de toxicidade ou morte foi visto para os animais tratados na concentração de 300 mg/kg. Para os camundongos tratados na dose de 2000 mg/kg, apenas duas mortes foram identificadas nos dois primeiros dias de experimento (de um total de quatorze dias). Em adição, não foram

vistos, para os animais sobreviventes, sinais de toxicidade nem alteração microscópica considerável nos estudos histopatológicos, realizados durante a necropsia dos animais após o fim do tratamento (TONHOLO et al., 2020).

Figura 16 – Estruturas químicas dos derivados **63** e **83** estudados por Tonholo e colaboradores (2020) em seu ensaio toxicológico e suas faixas de valores de IC₅₀ frente às linhagens de células A549, H9C2, HepG2, LLC-PK₁ e Neuro-2a.



Outros trabalhos envolvendo estudos de farmacocinética, pré-formulação e estudos de estabilidade foram destacados ao longo do presente trabalho, onde seriam mais bem alocados para compor a discussão de cada capítulo. Esses resultados ressaltam o expressivo potencial das 2-tiazolilhidrazonas enquanto uma potencial nova classe de antifúngicos no tratamento de infecções provocadas por *Candida* e *Cryptococcus* spp.

Planejamento de fármacos auxiliado por computador

O ciclo de descoberta e desenvolvimento de fármacos ainda é bem desafiador e possui muitos “calcanhares de Aquiles” a serem solucionados. É um processo muito custoso, demorado e com uma taxa baixíssima de sucesso na obtenção de potenciais fármacos em estudos clínicos (BHAGAT; BUTLE, 2021; KANTARJIAN et al., 2018; NOSENGO, 2016). Mullard (2016) reportou que o setor farmacêutico investiu quase 60 bilhões de dólares americanos em 2015 na descoberta de candidatos a fármacos, um aumento de quase 25% para o valor gasto em 2006, com um preço médio de 2 a 3 bilhões de dólares americanos por fármaco. Esses gastos levam a uma tímida taxa de sucesso de pouco menos de 10% para projetos que entram em estudos clínicos de fase I até a aprovação pelas agências reguladoras, processo tal que dura, em média, de 10 a 15 anos (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016; MULLARD, 2016; SCANNELL et al., 2012).

Com o intuito de acelerar e otimizar esse processo, a aplicação da quimioinformática no planejamento de substâncias bioativas vem ganhando cada vez mais destaque dentro da química medicinal. As diferentes técnicas computacionais existentes são utilizadas na seleção e otimização de estruturas químicas com propriedades físico-químicas e biológicas potencialmente adequadas visando bons desempenhos farmacodinâmico e farmacocinético dos prováveis fármacos. Com isso, têm-se um processo mais racional, sendo menos custoso e mais eficiente (MACALINO et al., 2015). Diversos métodos e técnicas se encaixam dentro da quimioinformática e modelagem molecular e são aplicadas no planejamento de substâncias bioativas, como o acoplamento molecular (*molecular docking*), construção de modelos de relação entre estrutura química e atividade biológica (SAR, do inglês, *structure-activity relationships*), dinâmica molecular, similaridade molecular, entre outras (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2018).

A escolha do método mais adequado depende das informações disponíveis a respeito do modelo fisiopatológico de interesse e de substâncias com atividade biológica descritas na literatura. São duas as principais abordagens de planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD, do inglês, *computer-aided drug design*). Quando se conhece bem o alvo macromolecular de interesse, tendo em mãos dados consistentes quanto à sua estrutura tridimensional e de complexos ligante-receptor cristalizados e elucidados, pode-se aplicar o desenvolvimento de fármacos baseados na estrutura do alvo molecular (SBDD, do inglês, *structure-based drug design*), explorando cavidades na estrutura do alvo que podem atuar como sítios de ligação e realizando a predição de interações com potenciais ligantes. Técnicas como o acoplamento molecular e a dinâmica molecular se enquadram nessa estratégia (GURUNG et al., 2021; MACALINO et al., 2015; SHEN et al., 2020).

Uma outra abordagem no planejamento de fármacos é o desenvolvimento de substâncias bioativas baseadas na estrutura do ligante (LBDD, do inglês, *ligand-based drug design*). Aqui, o planejamento se baseia em propriedades estruturais, físico-químicas e moleculares de compostos com atividade biológica validada experimentalmente, sem necessariamente terem um alvo molecular elucidado. Estudos de QSAR e de similaridade química são exemplos de técnicas que se enquadram como LBDD. Essa estratégia se mostra promissora quando um determinado grupo de substâncias não possui um alvo molecular definido, mas que possuem um potencial biológico significativo, ou quando há poucas informações

estruturais a respeito da macromolécula correspondente à esse alvo (GURUNG et al., 2021; MACALINO et al., 2015; SURABHI; SINGH, 2018; VERÍSSIMO et al., 2022).

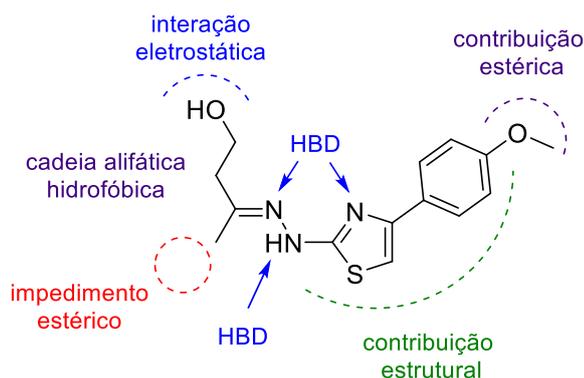
Existem algumas propostas de mecanismo de ação para 2-tiazolilhidrazonas com potencial atividade antifúngica. Entretanto, nenhum estudo foi muito conclusivo em definir um alvo macromolecular para essas substâncias. Por conseguinte, utilizar técnicas baseadas no LBDD para o planejamento racional de novos derivados se mostra a tática de CADD mais propícia. Trabalhos anteriores do nosso grupo relatam o uso dessa estratégia na construção e validação de modelos de relação estrutura-atividade para a predição de possíveis compostos líderes na descoberta de antimicrobianos, por exemplo (ASSE JUNIOR et al., 2019; KRONENBERGER et al., 2017; VERÍSSIMO et al., 2019), reafirmando a aplicabilidade da LBDD.

Destacam-se dois exemplos de trabalhos que envolvem a construção e validação de modelos de QSAR na predição da atividade antifúngica. Lino e colaboradores (2018) aplicaram técnicas de 2D (HQSAR) e 3D-QSAR (CoMFA e CoMSIA) e de similaridade química 3D com 22 derivados 2-tiazolilhidrazonas com potencial atividade anti-*C. neoformans*. Os modelos de regressão selecionados mostraram boa robustez ($q^2 > 0,74$ e $r^2 > 0,94$), em que os modelos de HQSAR tiveram uma performance melhor que os modelos de 3D-QSAR. Um consenso na relação estrutura-atividade dos modelos foi proposto, representado graficamente na **Figura 17** (p. 52), com o tiazol **72** como exemplo. Os modelos verificaram a importância estrutural do núcleo 2-tiazolilhidrazona enquanto esqueleto estrutural. Os nitrogênios do heterociclo e da hidrazona podem realizar interações moleculares do tipo ligação de hidrogênio, ora como doadores (HBD) ou aceptores (HBA). Também, verifica-se que a presença de grupos aromáticos na porção hidrazona desfavorece a atividade biológica, sendo que grupos alifáticos contribuem mais positivamente, com um impedimento estérico na posição *sin* à cadeia do heterociclo. Por fim, contribuições de possíveis interações eletrostáticas são previstas para grupos polares no fim da cadeia alifática da porção hidrazona, indicando que a variação do tamanho da cadeia pode influenciar na atividade biológica de acordo com o provável sítio de ligação dos derivados tiazólicos com seu alvo molecular (LINO et al., 2018).

Oliveira e colaboradores (2022) também construíram modelos de regressão de HQSAR, CoMFA e CoMSIA para a atividade anti-*C. albicans*, *C. gattii* e *C. neoformans* com 52 derivados 2-tiazolilhidrazonas no conjunto de dados de entrada. Os modelos de 3D-QSAR mostraram pouca confiabilidade, muito por causa dos

valores altos de informações perdidas que os modelos apresentaram (> 40%). Os autores, então, focaram em avaliar os modelos de HQSAR apenas, selecionando os três modelos mais robustos ($q^2 > 0,65$). Os dados de relação estrutura-atividade foram consonantes com aqueles obtidos por Lino *et al.* (2018), reforçando, especialmente, a importância de uma cadeia alifática na porção hidrazona. Outro ponto importante desse trabalho foi a avaliação de outros esqueletos bioisotéricos ao tiazol, como arilfurano, triazol, tetrazol e tiadiazolina. Nenhum dos derivados contendo esses heterociclos foi mais ativo que aqueles contendo o esqueleto 2-tiazolilhidrazona, indicando que ele é essencial para a atividade antifúngica (OLIVEIRA *et al.*, 2022).

Figura 17 – Consenso de propriedades físico-químicas e estruturas importantes para a atividade antifúngica prevista pelos modelos de QSAR e similaridade molecular construídos por Lino *et al.* (2018).



A inteligência artificial na descoberta de substâncias bioativas

Dentre os métodos com maior tendência em aplicações no processo de desenvolvimento de novas substâncias bioativas, pode-se destacar os algoritmos de inteligência artificial (AI, do inglês, *artificial intelligence*). A inteligência artificial é definida como um conjunto de ferramentas e mecanismos computacionais que buscam simular comportamentos humanos na execução de tarefas e solução de problemas (CHAN *et al.*, 2019). O primeiro relato do uso de inteligência artificial em estudos de relação estrutura-atividade data da década de 1960 (HANSCH; FUJITA, 1964) e, desde então, suas técnicas e aplicações foram se aperfeiçoando, com uso nas mais diversas etapas do processo de desenvolvimento *de novo* de fármacos.

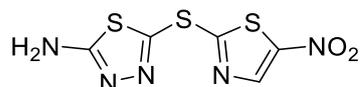
Um dos ramos da AI que a engloba o aprendizado de máquina (ML, do inglês, *machine learning*). ML é um termo que engloba algoritmos estatísticos que podem ser treinados a partir de dados de entrada sem necessitar de instruções programadas ou grande influência humana, melhorando sua performance quanto maior o número de dados e da qualidade deles. Esses algoritmos podem gerar modelos de classificação, regressão ou clusterização na inferência de padrões entre os dados de treinamento, podendo ser empregados em tomadas de decisão. Isso leva a uma série de funcionalidades no processo farmacêutico, como: atividade biológica, identificação e validação de alvos moleculares, predição de perfis farmacocinéticos e de toxicidade, entre outros (CHAN et al., 2019; JIMÉNEZ-LUNA et al., 2021; SERAFIM et al., 2020; VAMATHEVAN et al., 2019). No **Capítulo 1** (p. 57) são discutidos alguns exemplos de aplicações da ML no planejamento de fármacos, incluindo antifúngicos.

Os algoritmos de ML podem ser divididos em dois grandes grupos: técnicas supervisionadas e não supervisionadas. As técnicas supervisionadas de aprendizado geram modelos baseados nos dados de entrada que o algoritmo utilizou para ser treinado, a partir das relações feitas entre as entradas. São, então, empregados na predição de classes para conjuntos de dados que o modelo não teve contato antes. As técnicas de ML não supervisionadas são aplicadas na análise exploratória dos dados, treinando modelos que buscam agrupar os dados do conjunto de entrada a partir de padrões ocultos ou informações intrínsecas, sem precisar do usuário definir parâmetros específicos de como o agrupamento deve ser feito (VAMATHEVAN et al., 2019). Modelos de árvores de decisão, florestas aleatórias e redes neurais artificiais são os mais comuns entre aqueles gerados por técnicas de aprendizado de máquina.

Um outro agrupamento de algoritmos relacionado ao ML envolve as técnicas de aprendizado profundo (DL, do inglês, *deep learning*). Esses algoritmos fazem uso de redes neurais artificiais de múltiplas camadas, que são baseados no funcionamento dos neurônios, também para o reconhecimento de padrões nos dados de entrada (CHEN et al., 2018; ELTON et al., 2019; JIMÉNEZ-LUNA; GRISONI; SCHNEIDER, 2020; SERAFIM et al., 2021). Um exemplo de destaque desse tipo de algoritmo no CADD é o trabalho de Stokes e colaboradores (2020). Os autores aplicaram a técnica de redes neurais convolucionais em dois protocolos. No primeiro deles, o modelo construído foi aplicado em um repositório de dados químicos para o reposicionamento de fármacos, em que eles selecionaram a halicina (**Figura 18**, p. 54), derivado tiazólico que foi testado em ensaios pré-clínicos para o tratamento de diabetes, que apresentou

uma atividade antibacteriana de amplo espectro tanto em modelos *in vitro* quanto em murinos contra cepas de referência e isolados clínicos, com destaque para as espécies *Clostridiodes difficile*, *Acinetobacter baumannii* e *Mycobacterium tuberculosis* (DE et al., 2009; STOKES et al., 2020).

Figura 18 – Estrutura química da halicina, uma substância com amplo espectro de atividade antibacteriana, identificada após triagem utilizando um modelo de aprendizado profundo construído por Stokes *et al.* (2020).



Em sequência, no segundo protocolo, o modelo foi empregado em uma triagem virtual com o banco de dados ZINC15, contendo mais de 107 milhões de moléculas depositadas. Dessas, vinte e três foram selecionadas para ensaios *in vitro*, em que oito inibiram o crescimento microbiano de cepas de referência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Após a leitura dessa longa introdução, vê-se, por fim, que a emergência das infecções fúngicas é mais preocupante do que nunca e a necessidade de se desenvolver novas substâncias biotivas enquanto compostos líderes na obtenção de fármacos é, provavelmente, a melhor alternativa disponível para buscar soluções a este problema. Com o grande potencial dos derivados 2-tiazolilhidrazonas como candidatos à antifúngicos em mãos, este trabalho busca alinhar a inteligência artificial com o planejamento racional de fármacos, trazendo uma estratégia singular no desenho e síntese de 2-tiazolilhidrazonas com atividade antifúngica em potencial contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus*, além de modular suas propriedades físico-químicas já visando uma possível administração por via oral dessas substâncias.

OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho compreenderam:

1 – OBJETIVO GERAL

Planejar por métodos computacionais, sintetizar, e avaliar experimentalmente o potencial de novos derivados 2-tiazolilhidrazonas como compostos líderes no desenvolvimento de novos antifúngicos contra espécies dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desde trabalho são:

- (i) construir e validar modelos supervisionados de classificação da atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. neoformans* utilizando técnicas de aprendizado de máquina baseados nas estruturas químicas de substâncias contendo os núcleos tiazol e hidrazona;
- (ii) aplicar um protocolo de triagem virtual em quimiotecas virtuais *in-house* baseando-se nos modelos construídos mais robustos do item (i) e nos valores preditos de propriedades físico-químicas relacionadas à hidrossolubilidade e lipofilia, a fim de selecionar 2-tiazolilhidrazonas com maior potencial biológico e caráter *drug-like*;
- (iii) calcular, por meio de métodos quânticos, propriedades eletrônicas e moleculares de derivados 2-tiazolilhidrazonas bioativos para estabelecer uma relação entre elas e suas estabilidades frente à hidrólise do grupo hidrazona, em comparação com dados experimentais;
- (iv) sintetizar os derivados 2-tiazolilhidrazonas propostos na etapa (ii) e caracterizá-los a partir de suas propriedades físico-químicas e dados espectroscópicos;

(v) sintetizar e caracterizar os derivados 2-tiazolilhidrazinas como prováveis produtos de degradação de suas 2-tiazolilhidrazonas correspondentes e que foram estudadas no item (iii), a fim de embasar os estudos de hidrólise discutidos no item anterior;

(vi) avaliar a atividade biológica *in vitro* dos compostos sintetizados contra fungos do gênero *Candida*.

CAPÍTULO 1: PLANEJAMENTO BASEADO EM APRENDIZADO DE MÁQUINA, SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE 2-TIAZOLILHIDRAZONAS COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

1 – CONTEXTUALIZAÇÃO

Como discutido na **Introdução Geral** deste trabalho (p. 49), a aplicação de modelos de QSAR no desenvolvimento de fármacos tem sido muito promissora na correlação de estruturas químicas com suas atividades biológicas. Assim, esses modelos auxiliam na compreensão de seu modo de ação e quais são as características moleculares relacionadas e, com isso, serem aplicados em protocolos na seleção de moléculas com potencial biológico (KRONENBERGER et al., 2017; SERAFIM et al., 2021; SOUFAN et al., 2018; VERÍSSIMO et al., 2022).

Muitas são as técnicas de aprendizado de máquina (aplicadas em estudos envolvendo o planejamento de substâncias bioativas, produzindo modelos de regressão, classificação e clusterização para buscar padrões implícitos em dados químicos para aplicações farmacêuticas, incluindo na busca de possíveis fármacos antimicrobianos (DURRANT; AMARO, 2015; PATEL et al., 2020; SERAFIM et al., 2020, 2021).

Esses algoritmos não só são aplicados na predição da atividade biológica, mas também de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas (CHEN; BONDI; MICHALSKI, 2021; GÖLLER et al., 2020; MILJKOVIĆ et al., 2021), toxicidade (JAIN et al., 2021; MINERALI et al., 2020), retróssíntese de compostos com potencial biológico (ISHIDA et al., 2022; THAKKAR et al., 2021; YU et al., 2022), formulações (NARAYANAN et al., 2021), possíveis alvos moleculares (KAITOH; YAMANISHI, 2021; RODRIGUES; BERNARDES, 2020; SÁNCHEZ-CRUZ; MEDINA-FRANCO, 2021; SHEN et al., 2021), entre outros.

Por exemplo, Maltarollo (2019) aplicou uma série de algoritmos de ML na construção de modelos de classificação de inibidores da enzima enoil-ACP redutase (FabI) de *S. aureus*, um alvo molecular promissor no desenvolvimento de novos antibacterianos. O autor compilou 166 substâncias com atividade avaliada contra a enzima e aplicou em diversos algoritmos de ML, gerando 4.362 modelos. De acordo com as métricas avaliadas, os modelos mais robustos foram gerados utilizando as técnicas de árvores de decisão, floresta aleatória e máquinas de vetores de suporte.

A interpretação dos modelos também está de acordo com estudos de acoplamento molecular envolvendo a FabI (MALTAROLLO, 2019).

No caso de compostos com potencial antifúngico, Fernandes e colaboradores (2021) construíram modelos de classificação baseados em florestas aleatórias para a predição de 2-tiazolilhidrazonas com atividade contra *C. neoformans*. Os autores trabalharam com um conjunto de dados de 28 derivados e obtiveram 25 modelos de florestas aleatórias, variando o número de árvores de decisão e de modelos para cada nível. O modelo mais robusto apresentou valores de coeficiente de correlação de Matthews (MCC) com boa capacidade preditiva, sendo 1,00 e 0,62 para as validações interna e externa, respectivamente. A interpretação físico-química do modelo descrito no trabalho de Fernandes *et al.* (2021) foi concordante com os modelos de regressão obtidos por Lino *et al.* (2018) e Oliveira *et al.* (2022), que destacaram que a presença de hidrazonas alifáticas era positivamente importante para a atividade biológica. Os três trabalhos constataram que as hidrazonas ligadas diretamente a grupos aromáticos não estavam presentes em nenhuma das moléculas classificadas como ativas ($MIC \leq 10 \mu\text{mol/L}$). Por outro lado, grupos alifáticos ligados ao nitrogênio imínico estavam presentes em 100% dos compostos ativos. (FERNANDES *et al.*, 2021).

Outras considerações importantes propostas por Fernandes e colaboradores foram que a massa molar e a fração de carbonos sp^3 estavam muito correlacionadas com a atividade biológica, após uma análise exploratória utilizando mapas de Kohonen (SOM), um tipo de algoritmo não supervisionado baseado em redes neurais. Com base nesta análise, verificou-se que compostos com massa molecular menor que 320 Da, número de carbonos sp^3 maior ou igual a 4, e o menor número possível de anéis aromáticos tem maior potencial antifúngico. A lipofilia das moléculas, representada pelos valores de logaritmo do coeficiente de partição em *n*-octanol/água ($\log P$), mostrou ter pouca influência para a atividade (FERNANDES *et al.*, 2021; LINO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022).

Apesar de o mecanismo de ação das 2-tiazolilhidrazonas ainda não ter sido elucidado, alguns estudos discutem possíveis mecanismos que essas substâncias podem atuar: bioprodução de ergosterol em modelo *in vitro*; inibição da queratinase (enzima envolvida em fatores de virulência de alguns fungos) (OUF *et al.*, 2018); inibição da lanosterol 14α -desmetilase; e inibição da topoisomerase II (FARGHALY *et al.*, 2017). Em adição, Carradori *et al.* (2014) realizaram uma triagem de mais de 70 derivados tiazólicos frente a enzima histona acetiltransferase. Esse é um alvo bastante

estudado na descoberta de agentes antitumorais, mas que também possui grande aplicação no desenvolvimento de agentes antifúngicos (CARRADORI et al., 2014; KUCHLER et al., 2016).

Com a falta de um consenso a respeito do alvo molecular que as 2-tiazolilhidrazonas atuam, foi selecionada a estratégia de LBDD para o planejamento de substâncias bioativas frente a fungos patogênicos para este primeiro capítulo. Para tanto, modelos de classificação por ML foram construídos e validados buscando selecionar aqueles mais robustos para uma posterior triagem virtual de moléculas com grande potencial. Por fim, análogos a essas moléculas triadas foram sintetizados e avaliados quanto à sua atividade biológica contra *Candida* sp., para, enfim, validar experimentalmente os resultados teóricos obtidos pelos modelos de ML.

2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 – Modelos preditivos de aprendizado de máquina

Ao todo, foram obtidos 1.410 modelos de aprendizado de máquina para cada fungo, resultantes da combinação dos dez conjuntos de *fingerprints* moleculares com os hiperparâmetros intrínsecos de cada técnica avaliados no rastreamento heurístico. Foram treinados 110 modelos por DT, 250 por RF e MLP, 150 para kNN e kNNw, e 500 modelos por NB. As três funções de kernel aplicadas nas máquinas de vetores de suporte não geraram modelos, indicando que essas arquiteturas não são adequadas para o conjunto de dados deste trabalho.

Os modelos gerados por cada técnica foram ranqueados de acordo com os valores de extMCC e cvMCC (nesta ordem), selecionando os que apresentaram os maiores valores (um por algoritmo). O coeficiente de correlação de Matthews, utilizado nessa seleção, é uma métrica aplicada no aprendizado de máquina para avaliar a qualidade de um modelo a partir dos dados da matriz de confusão. Esse parâmetro aparenta ser o mais vantajoso na comparação de modelos binários.

Segundo a discussão apresentada por Chicco, Warrens e Jurman (2021), a fórmula leva em conta todos os parâmetros da matriz de confusão (**Equação 1**, p. **105**), e os modelos só apresentam valores altos de MCC caso a maior parte dos dados positivos (1) e negativos (0) preditos estejam corretos, sendo então mais pertinente que outros parâmetros. O F1-Score, a média harmônica baseada na taxa de acertos

(TPR) e de previsão dos verdadeiros positivos, não leva em conta o número de verdadeiros negativos em seu cálculo (**Equação 2**, p. 106). Portanto, a análise do MCC permite avaliar se o modelo é robusto de uma forma mais ampla, sendo confiável mesmo para conjuntos de dados muito desproporcionais (CHICCO; JURMAN, 2020; CHICCO; WARRENS; JURMAN, 2021; ZHU, 2020). Os outros parâmetros foram também avaliados a fim de verificar a robustez e a capacidade preditiva dos modelos, a fim de aplicá-los na predição em consenso dos dois fungos na etapa de triagem virtual.

2.1.1 – Modelos de classificação para *Candida albicans*

Inicialmente, de acordo com o critério acima, selecionou-se o modelo obtido com as melhores métricas para cada técnica, indicando seus respectivos parâmetros e conjunto de *fingerprints* utilizado no reconhecimento de padrões (**Tabela 2**, p. 60).

Tabela 2 – Dados sobre os conjuntos de *fingerprints* moleculares, parâmetros, e coeficientes de correlação de Matthews (MCC) das validações dos modelos de classificação selecionados para *C. albicans*. Os três modelos mais robustos estão destacados em negrito e em cinza.

Número	Técnica	Conjunto de <i>fingerprints</i>	Hiperparâmetros	cvMCC	extMCC
1	DT	<i>Extended FP</i>	min_Nrec = 2	0,646	0,715
2	RF	<i>Fingerprinter</i>	max_trees = 30; n_models = 20.000	0,729	0,752
3	MLP	<i>PubChem</i>	n_layers = 5; n_neurons = 80	0,615	0,769
4	kNN	<i>Fingerprinter</i>	k = 7	0,663	0,752
5	kNN_w	<i>Klekota</i>	k = 11	0,609	0,769
6	NB	<i>Atom Pair</i>	prob = 0,8	0,187	0,444
7	SVM-RBF	ND	ND	ND	ND
8	SVM-HT	ND	ND	ND	ND
9	SVM-Pol	ND	ND	ND	ND

ND: não determinado.

Os modelos obtidos por DT (modelo 1), RF (modelo 2), MLP (modelo 3) e kNN (modelos 4 e 5) apresentaram boas capacidades preditivas, em que os valores de MCC foram maiores que 0,710 para a validação externa, e maiores que 0,600 para a validação interna. Isso indica que os modelos treinados foram consistentes em suas

predições tanto para o conjunto treino quanto para o teste. Os modelos de *perceptron* de múltiplas camadas ($n_layers = 5$ e $n_neurons = 80$) e número de vizinhos próximos “k” (com peso para a distância) ($k = 11$) mostraram os maiores valores de MCC para a validação externa ($extMCC = 0,769$), enquanto o modelo de floresta aleatória ($max_trees = 30$ e $n_models = 20.000$) foi o mais robusto para a validação interna ($cvMCC = 0,729$). Nota-se que a técnica de kNN_w apresentou um modelo mais robusto na validação externa que kNN ($k = 7$) ($extMCC = 0,752$), mas menos robusto para a validação interna ($cvMCC = 0,663$ para kNN , e $cvMCC = 0,609$). O melhor modelo selecionado para a técnica de *naïve Bayes* (modelo **6**) ($prob = 0,8$) não foi tão robusto quanto os demais ($cvMCC = 0,187$, e $extMCC = 0,444$).

Os modelos **2**, **3** e **5** foram selecionados para o protocolo de triagem virtual, pois apresentaram as maiores capacidades preditivas. Apesar do modelo **4** ser bem preditivo, deu-se preferência pelos modelos **3** e **5**, por terem os maiores valores de $extMCC$, logo possuem maior poder preditivo para conjuntos de dados externos; e pelo modelo **2**, para se ter uma variedade maior de arquiteturas no modelo consenso, embora os dois modelos apresentem o mesmo valor de $extMCC$. A **Tabela 3** (p. **61**) traz as matrizes de confusão dos modelos **2**, **3** e **5** para o conjunto teste. A matriz de confusão é uma métrica que compila os resultados das predições feitas pelo modelo de classificação, em que seus dados são utilizados no cálculo das métricas estatísticas de cada modelo preditivo.

Tabela 3 – Matriz de confusão da validação externa para os modelos **2**, **3** e **5**, selecionados para o protocolo de triagem virtual de compostos potencialmente bioativos contra *C. albicans*.

n = 253	Ativos e inativos observados					
	Modelo 2 (RF)		Modelo 3 (MLP)		Modelo 5 (kNN_w)	
	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos
Inativos preditos	204	6	204	6	204	6
Ativos preditos	11	32	15	28	10	33

Do conjunto teste para *C. albicans*, 210 moléculas são inativas e 43 são ativas. Os três modelos apresentaram a mesma taxa de erro na predição dos compostos inativos (2,9%). Para os compostos ativos, os erros foram maiores (34,4% para o

modelo **2**, 53,6% para o modelo **3**, e 30,3% para o modelo **5**), indicando que os modelos tendem a prever melhor os compostos inativos.

As outras métricas foram também avaliadas para constatar a qualidade dos modelos para prosseguir com os protocolos de triagem virtual (**Tabela 4**, p. **62**). Os modelos mostraram excelentes acurácias (cvACC > 0,89, e extACC > 0,93) e performances (cvAUC-ROC > 0,81, e extAUC-ROC > 0,85), indicando que quase todas as entradas foram corretamente preditas quanto à sua classe, denotando boas capacidades preditivas.

Os valores de F1-Score também indicaram uma boa qualidade dos modelos, em que os valores foram maiores que 0,66 para a validação interna e 0,77 para a validação externa, em concordância com os valores de MCC. Por fim, os classificadores possuem uma boa acurácia na predição dos compostos ativos (cvTPR > 0,59, e extTPR > 0,74). Interessante notar que o modelo **2** foi o único em que a taxa de verdadeiros positivos da validação externa (0,744) foi menor que o da validação interna (0,777), o que impactou nos valores de AUC-ROC, que seguiram o mesmo padrão (cvAUC-ROC = 0,962, e extAUC-ROC = 0,946). Numa análise conjunta das métricas, o modelo **2** foi o que apresentou a melhor performance na predição dos dados do conjunto treino, e o modelo **5** foi o mais satisfatório na predição externa (desempatado do modelo **3** ao comparar os valores de extAUC-ROC).

Tabela 4 – Métricas calculadas para as validações interna e externa dos modelos **2**, **3** e **5**, selecionados para o protocolo de triagem virtual de compostos potencialmente bioativos contra *C. albicans*.

Modelo	Validação	TPR	MCC	F1-Score	ACC	AUC-ROC
Modelo 2 (RF)	Interna	0,777	0,729	0,771	0,927	0,962
	Externa	0,744	0,752	0,790	0,933	0,946
Modelo 3 (MLP)	Interna	0,598	0,615	0,664	0,900	0,818
	Externa	0,767	0,769	0,805	0,937	0,857
Modelo 5 (kNN_w)	Interna	0,611	0,609	0,663	0,894	0,930
	Externa	0,767	0,769	0,805	0,937	0,954

2.1.2 – Modelos de classificação para *Cryptococcus neoformans*

Seguindo os mesmos critérios para *C. albicans*, selecionou-se o melhor modelo para cada técnica aplicada para *C. neoformans*, compilando o conjunto de

fingerprints e os hiperparâmetros computados (Tabela 5, p. 63). Os modelos 10-14 mostraram boas capacidades preditivas para o conjunto teste (extMCC > 0,65), mas o modelo de árvores de decisão (modelo 10) (min_Nrec = 40) foi pouco robusto na validação interna (cvMCC = 0,239). Aqui, também, o modelo baseado em *naïve Bayes* (modelo 15) (prob = 0,1) foi menos preditivo na validação externa (extMCC = 0,595), e o segundo menos preditivo na validação interna (cvMCC = 0,368). Curiosamente, os modelos mais robustos para *C. neoformans* foram obtidos pelos algoritmos de *C. albicans*. Como os conjuntos de dados de entrada para os dois fungos continham substâncias contendo os grupos tiazol e hidrazona, faz sentido que os mesmos algoritmos fossem os mais eficientes na classificação de ambos os conjuntos.

Tabela 5 – Dados sobre os conjuntos de *fingerprints* moleculares, parâmetros, e coeficientes de correlação de Matthews (MCC) das validações dos modelos de classificação selecionados para *C. neoformans*. Os três modelos mais robustos estão destacados em negrito e em cinza.

Número	Técnica	Conjunto de <i>fingerprints</i>	Hiperparâmetros	cvMCC	extMCC
10	DT	<i>Atom Pairs Count</i>	min_Nrec = 40	0,239	0,656
11	RF	<i>Fingerprinter</i>	max_levels = 10; n_models = 10000	0,596	0,702
12	MLP	<i>Fingerprinter</i>	n_layers = 5; n_neurons = 40	0,524	0,743
13	kNN	<i>Fingerprinter</i>	k = 1	0,530	0,712
14	kNN_w	<i>Extended FP</i>	k = 1	0,552	0,712
15	NB	<i>Extended FP</i>	prob = 0,1	0,368	0,595
16	SVM-RBF	ND	ND	ND	ND
17	SVM-HT	ND	ND	ND	ND
18	SVM-Pol	ND	ND	ND	ND

ND: não determinado.

O modelo de *perceptron* de múltiplas camadas (modelo 12) (n_layers = 5 e n_neurons = 40) apresentou o maior valor de extMCC (0,743), e o modelo de florestas aleatórias foi o mais robusto na validação interna (modelo 11) (max_levels = 10 e n_models = 10000) (cvMCC = 0,596). Os modelos 11, 12 e 14 foram selecionados para o protocolo de triagem virtual. Ainda que os dois modelos baseados em número de vizinhos “k” (k = 1) mostraram a mesma robustez na validação externa (extMCC = 0,712), o modelo 14 foi mais robusto na validação interna (cvMCC = 0,530 para kNN,

e $cvMCC = 0,552$ para kNN_w), dando preferência para um modelo mais consistente nas duas predições para o protocolo de triagem virtual.

As matrizes de confusão dos modelos **11**, **12** e **14** estão compiladas na **Tabela 6** (p. **64**). Do conjunto teste para *C. neoformans*, 41 moléculas são inativas e 20 são ativas. O modelo **11** apresentou taxa de erro de 10,8% para os compostos inativos, enquanto os modelos **12** e **14** apresentaram a mesma taxa de erro para essa classe (13,8%). Quanto aos compostos ativos, os erros foram um pouco maiores (25% para o modelo **11**, 11,1% para o modelo **12**, e 17,6% para o modelo **14**), indicando que, assim como para *C. albicans*, os modelos aqui também tendem a prever melhor os compostos inativos.

Tabela 6 – Matriz de confusão da validação externa para os modelos **11**, **12** e **14**, selecionados para o protocolo de triagem virtual de compostos potencialmente bioativos contra *C. neoformans*.

n = 61	Ativos e inativos observados					
	Modelo 11 (RF)		Modelo 12 (MLP)		Modelo 14 (kNN_w)	
	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos
Inativos preditos	37	4	36	5	36	5
Ativos preditos	4	16	2	18	3	17

Por fim, as métricas adicionais foram analisadas para avaliar as performances dos modelos selecionados (**Tabela 7**, p. **65**). Os modelos mostraram boas acurácias ($cvACC > 0,77$, e $extACC > 0,86$) e performances ($cvAUC-ROC > 0,77$, e $extAUC-ROC > 0,85$), mas os valores foram menores do que os calculados para *C. albicans*. Os valores de F1-Score sugerem uma boa qualidade e acurácia dos modelos, visto que os valores obtidos foram até maiores que os valores de MCC tanto na validação interna ($cvF1-Score > 0,66$) quanto na externa ($extF1-Score > 0,80$). Os três modelos mostraram maior acurácia na predição dos compostos ativos ($cvTPR > 0,62$, e $extTPR > 0,80$) do que os classificadores para *C. albicans*. Esses resultados indicam que os modelos para *C. neoformans* são um pouco menos robustos em questão de performance do que os modelos para *C. albicans*, mas mais assertivos na predição de compostos positivos. O modelo **11** obteve a maior robustez na validação interna. O modelo **12** apresentou maior capacidade preditiva na validação externa, de acordo com os valores de $extMCC$, $extF1-Score$, $extACC$ e $extTPR$ (esse igual ao modelo

14), mas o modelo 11 teve a melhor performance, de acordo com o valor de extAUC-ROC. Os modelos se mostraram robustos em comparação com trabalhos anteriores envolvendo a construção de modelos de aprendizado de máquina para predição de compostos bioativos.

Tabela 7 – Métricas calculadas para as validações interna e externa dos modelos 11, 12 e 14, selecionados para o protocolo de triagem virtual de compostos potencialmente bioativos contra *C. neoformans*.

Modelo	Validação	TPR	MCC	F1-Score	ACC	AUC
Modelo 11 (RF)	Interna	0,627	0,596	0,715	0,816	0,856
	Externa	0,800	0,702	0,800	0,869	0,917
Modelo 12 (MLP)	Interna	0,633	0,524	0,667	0,776	0,794
	Externa	0,850	0,743	0,829	0,885	0,891
Modelo 14 (kNN_w)	Interna	0,677	0,552	0,690	0,800	0,772
	Externa	0,850	0,712	0,810	0,869	0,856

2.2 – Triagem virtual de 2-tiazolilhidrazonas

2.2.1 – Classificação das substâncias presentes nas quimiotecas

Os três modelos de classificação para *C. albicans* (modelos 2, 3 e 5) e *C. neoformans* (modelos 11, 12 e 14) foram aplicados nas duas quimiotecas virtuais *in-house* (175.797 substâncias ao todo) para a seleção de derivados 2-tiazolilhidrazonas bioativas. Os modelos foram novamente treinados de acordo com os hiperparâmetros intrínsecos de cada um, e, então, os mais de 175 mil derivados foram classificados com suas probabilidades respectivas. Ao todo, 2.572 moléculas tiveram predição positiva para os três modelos de *C. albicans*, e 28.027 tiveram consenso entre os três modelos de *C. neoformans*. Depois, foi feita a remoção de duplicatas em comparação com o conjunto de dados de entrada e entre si, em que restaram 1.968 moléculas. Por fim, selecionou-se as moléculas com classificação positiva em consenso entre os seis modelos e com probabilidade média maior que 90%, obtendo-se um conjunto final de 486 derivados de 2-tiazolilhidrazonas.

2.2.2 – Caracterização quimiinformática

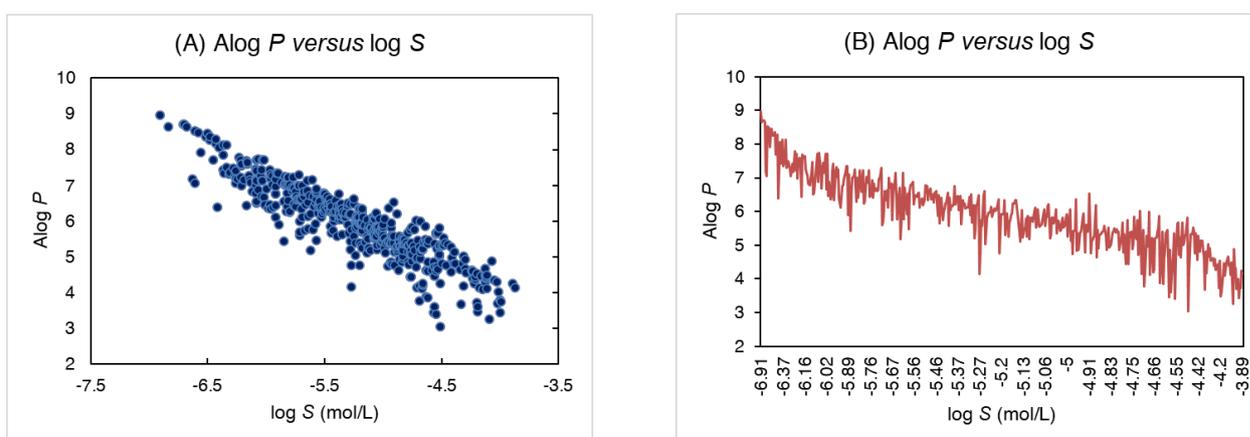
Algumas propriedades físico-químicas e moleculares de caráter *drug-like* foram calculadas a fim de selecionar, dentre as 486 moléculas triadas, aquelas com menor caráter lipofílico e, conseqüentemente, maior hidrossolubilidade. Para definir as moléculas com os melhores perfis farmacocinéticos teóricos, calculou-se uma série de propriedades físico-químicas e moleculares a fim de, baseando-se nessas predições, selecionar análogos com maior hidrossolubilidade e menor lipofilia para serem sintetizados, visando uma otimização conjunta dos parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos das substâncias.

Um estudo farmacocinético da 2-tiazolilhidrazona **63** realizado por Silva e colaboradores (2020 e 2021) ilustra bem a importância de selecionar substâncias com um perfil farmacocinético mais adequado. Os autores quantificaram a concentração da substância em plasma de camundongo Swiss por meio de um método bioanalítico validado por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM). A concentração plasmática (C_{max}) de **63** foi de 62,4 ng/mL para administração oral (dose de 50 mg/kg) e de 26,8 ng/mL para administração por via intraperitoneal (dose de 10 mg/kg). Ambos apresentaram um valor de t_{max} de 20 min, indicando rápida absorção. Entretanto, a biodisponibilidade relativa de **63** pela via oral foi modesta, sendo de 38,6% em relação à via intraperitoneal. Justifica-se esse valor principalmente devido à baixa solubilidade de **63** em água. Para tanto, vários complexos de inclusão utilizando diferentes ciclodextrinas e **63** foram preparados a fim de verificar o impacto na solubilidade. O complexo com a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina foi o que apresentou melhores resultados, com um aumento de 25,9% (18 vezes mais) na solubilidade em comparação com a substância livre. A maior afinidade da substância pela 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, com a formação favorável do complexo de inclusão, foi corroborada por estudos computacionais a partir de cálculos semi-empíricos e de acoplamento molecular. Entretanto, estudos de farmacocinética com o complexo não resultou em nenhuma vantagem em comparação com a administração da substância isoladamente, “voltando à estaca zero” (SILVA, 2019; SILVA et al., 2020, 2021).

Inicialmente, avaliou-se o $Alog P$ e $\log S$ das 486 moléculas selecionadas pela triagem virtual. Essas propriedades foram analisadas conjuntamente por terem sido calculadas pelo mesmo servidor. Os compostos apresentaram valores de $Alog P$

variando entre 3 e 9, enquanto os valores de $\log S$ estavam no intervalo entre $-3,8$ e -7 mol/L. Na **Figura 19** (p. 67), tem-se um gráfico comparando os valores de $\text{Alog } P$ versus $\log S$. Observa-se uma correlação entre os dois parâmetros, indicando que moléculas mais lipofílicas (maiores valores de $\text{Alog } P$) tendem a apresentar menor solubilidade em água (menores valores de $\log S$), como esperado.

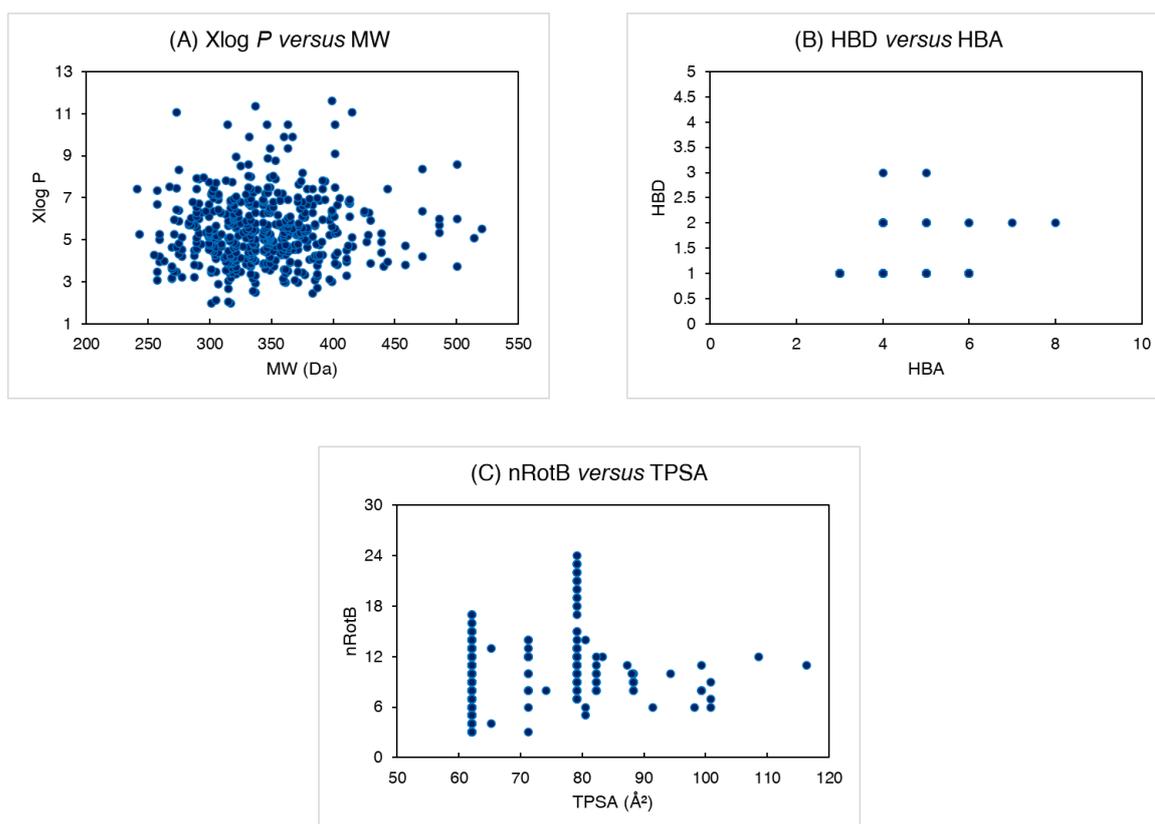
Figura 19 – (A) Gráfico de dispersão e (B) de linha correlacionando os valores de $\text{Alog } P$ e $\log S$ (em mol/L) para as 2-tiazolilhidrazonas selecionadas pelo protocolo de triagem virtual.



As propriedades físico-químicas e moleculares calculadas foram analisadas para traçar o caráter *drug-like* das moléculas selecionadas, comparando-se com as regras de Lipinski (Ro5) e de Veber. Essas regras empíricas são interessantes na previsão da biodisponibilidade oral das moléculas estudadas, comparando os valores calculados com os intervalos permitidos para cada propriedade, segundo a descrição de cada regra. Para Ro5, verifica-se que 202 compostos (41,56%) se enquadraram na faixa prevista para $X\log P$, em que os valores variaram entre 1,99 e 11,61, compreendendo moléculas pouco e muito lipofílicas, indo ao encontro com os resultados obtidos para $\log S$. Compararam-se esses dados com os seus respectivos valores de MW, onde se observa uma correlação entre as duas propriedades para a maioria dos compostos, indicando que compostos com maior massa molecular tendem a ser mais lipofílicos (**Figura 20**, p. 68). Um total de 481 moléculas (98,97%) possuem MW menor que 500 Da. Os valores médios dessas propriedades para todo o conjunto foram 5,92 para $X\log P$, indicando uma presença maior que moléculas mais lipofílicas e acima do limite estabelecido pela Ro5, e 343,92 Da para MW. Todas as

moléculas analisadas apresentaram menos que 10 HBA e 5 HBD, com médias de 3,54 e 1,05, respectivamente. Dentre as substâncias analisadas, 88 (18,1%) não tiveram violações para as regras de Lipinski, 394 (81,1%) tiveram uma violação, e 4 (0,8%) tiveram duas violações. Para as regras de Veber, vê-se que 300 substâncias (61,72%) apresentaram menos que ou igual a 10 ligações rotacionáveis, e todas as moléculas se enquadraram dentro do limite estabelecido para a área topológica. As médias das propriedades foram 9,69 e 66,65 Å², respectivamente. Ao fim, 299 moléculas (ou 61,52% do conjunto) foram preditas positivamente para os dois modelos.

Figura 20 – Gráficos de dispersão correlacionando as propriedades físico-químicas (A) Xlog P e MW, (B) HBD e HBA, e (C) nRotB e TPSA, calculadas para as 2-tiazolilhidrazonas selecionadas pelo protocolo de triagem virtual.



Por fim, segundo os critérios estabelecidos por Fernandes *et al.* (2021), 2-tiazolilhidrazonas com MW \leq 320 Da e mais que 4 carbonos sp³ tem maior potencial de serem bioativos. 163 compostos (34,8%) possuem menos que 320 Da de massa molecular, enquanto 392 (%) possuem 4 ou mais carbonos sp³ em sua estrutura. Entretanto, como alguns dos derivados podem apresentar cadeias alifáticas longas

ligadas ao grupo hidrazona, logo possuindo um caráter lipofílico mais pronunciado, filtrou-se também aqueles compostos que tinham mais que 4 e menos que 10 carbonos sp^3 , obtendo 350 entradas (74,8%). 109 moléculas (23,3%) cumpriram os dois critérios.

2.2.3 – Proposição de novos derivados 2-tiazolilhidrazonas

Tomando como base os critérios estabelecidos para a seleção no protocolo de triagem virtual e nos perfis farmacocinéticos preditos para o conjunto de 486 moléculas, selecionamos algumas moléculas representativas visando a proposição de análogos a serem sintetizados, de acordo com a disponibilidade dos reagentes no laboratório ou para aquisição.

A seguir encontram-se listadas algumas das moléculas contidas no conjunto de substâncias filtrado pela triagem virtual (**Tabela 8**, p. **70**). Selecionou-se moléculas contendo grupo ionizáveis (como ácido carboxílico) ou capazes de fazer interações intermoleculares que interfiram positivamente na hidrossolubilidade (como grupo álcool), e moléculas com baixos valores de $\log P$. Das substâncias selecionadas, vê-se que todas apresentaram valores de $\log P$ menores que 5, em concordância com a Ro5.

Baseando-se nessas moléculas, foram propostas cinco séries de análogos, de acordo com as tiossemicarbazonas correspondentes (**Figura 21**, p. **70**). A primeira série (**TH1**) foi proposta a partir das substâncias **86-87**, contendo um grupo alcino ligado à hidrazona. Propôs-se os análogos das séries **TH4** e **TH5**, pela presença do grupo ácido carboxílico, indicando uma maior hidrossolubilidade, assim como os derivados **88-92**. Alguns análogos das séries **TH3** e **TH5** foram sintetizados e avaliados quanto à sua atividade biológica, e suas estruturas estão demonstradas posteriormente neste trabalho (OLIVEIRA, 2021). A série **TH2**, apesar de não estar presente no conjunto derivado da triagem virtual, foi sintetizada para validação experimental das substâncias enquanto predição negativa e pela disponibilidade dos reagentes de partida no laboratório.

Tabela 8 – Estruturas químicas de algumas das substâncias selecionadas pelos modelos de classificação no protocolo de triagem virtual. Estão listadas também as probabilidades médias do consenso dos modelos e os seus valores de Alog *P* e log *S* (em mol/L) respectivos.

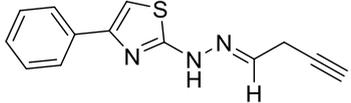
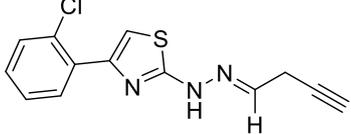
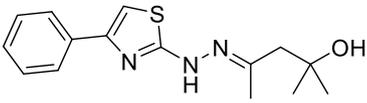
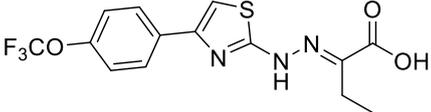
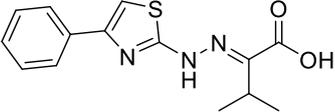
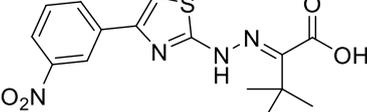
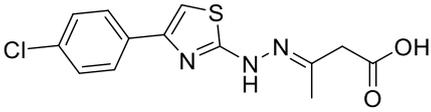
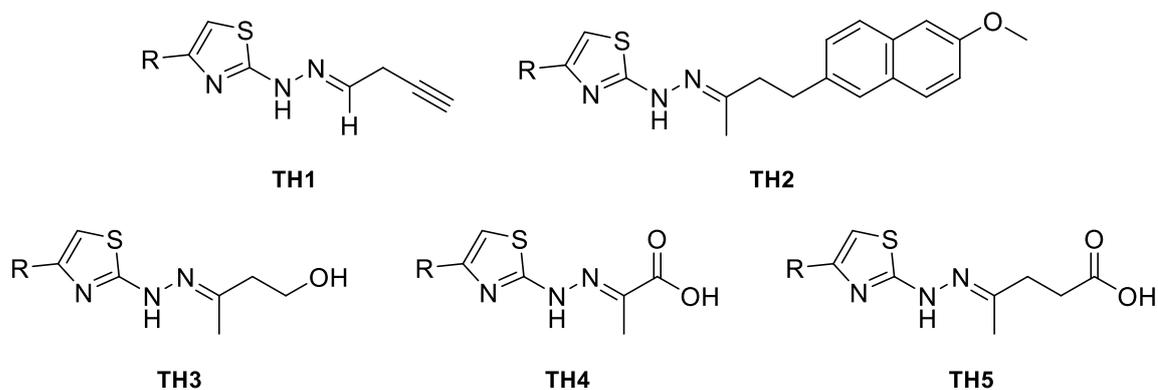
Código	Estrutura química	Probabilidade média (%)	Alog <i>P</i>	log <i>S</i> (mol/L)
86		91,11	3,74	-3,99
87		92,83	4,26	-4,22
88		91,29	3,61	-4,19
89		91,29	4,15	-5,27
90		91,48	3,47	-4,19
91		95,52	3,77	-4,69
92		93,43	3,05	-4,51

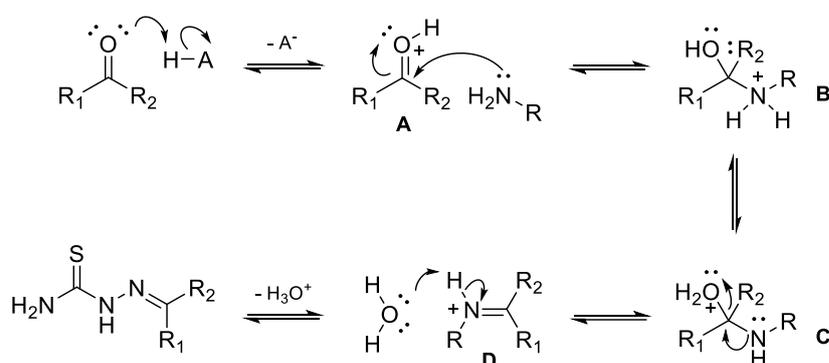
Figura 21 – Derivados 2-tiazolilhidrazonas propostos para síntese.



2.3 – Obtenção e caracterização das tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas são obtidas a partir de uma reação de condensação entre a tiossemicarbazida com alguma cetona ou aldeído, conforme discutido na seção sobre a síntese de tiazóis na **Introdução Geral** deste trabalho (p. 39). Como destacado no **Esquema 2** (p. 41), as metodologias geralmente utilizam um meio prótico com adição de um catalisador ácido (HUSSEIN; TURAN-ZITOUNI, 2018). O mecanismo de formação da hidrazona (**Esquema 4**, p. 71) seria o inverso do proposto para a hidrólise (**Esquema 15**, p. 140).

Esquema 4 – Mecanismo proposto para a formação de uma tiossemicarbazona em meio ácido.



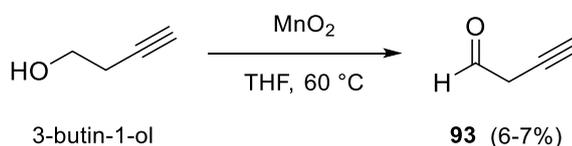
Quando em meio ácido, a reação inicia com a protonação do oxigênio do grupo carbonila de um aldeído ou cetona (**A**), com posterior ataque nucleofílico à carbonila protonada pelo nitrogênio da porção hidrazina, originando o intermediário tetraédrico heminal protonado (**B**). A adição do catalisador ácido é essencial para essa etapa ocorrer, visto que a protonação da carbonila aumenta o caráter eletrofílico do carbono carbonílico. Com isso, o ataque nucleofílico é mais favorável caso ocorresse com o oxigênio desprotonado. Segundo a literatura, a faixa de valores de pH que melhor favorece a reação é entre 4 e 5. Valores maiores que 5 não promovem a protonação da carbonila, tal como valores menores que 4 tem uma maior concentração do ácido conjugado da tiossemicarbazida, o que impede sua ação como nucleófilo. Na terceira etapa ocorre uma transferência de próton intramolecular, em que o oxigênio agora se encontra protonado (**C**). Na quarta etapa, a molécula de água é eliminada e o nitrogênio estabelece uma ligação π com o carbono, formando um

cátion imínico (**D**). Uma última reação ácido-base de Brønsted-Lowry leva à tiossemicarbazona, formando um íon hidrônio catalítico que pode promover a protonação do oxigênio carbonílico novamente (OLIVEIRA, 2021; SAYER; JENCKS, 1969; SINGH et al., 2016).

2.3.1 – Tentativa de obtenção da tiossemicarbazona **TS1**

Diferentemente das outras tiossemicarbazonas, em que os reagentes estavam disponíveis comercialmente ou no laboratório, a síntese de **TS1** demandou a execução de duas etapas: (i) reação de oxidação do 3-butin-1-ol para obter o 3-butin-1-al (**93**); e (ii) reação de condensação do aldeído com a tiossemicarbazida para, enfim, obter a tiossemicarbazona **TS1**. Duas metodologias foram aplicadas para a obtenção de **93**. A primeira tentativa empregou o óxido de manganês (IV) como agente oxidante para a conversão do álcool no aldeído, de acordo com a metodologia descrita por Gore e colaboradores (2013) (**Esquema 5**, p. 72).

Esquema 5 – Reação para a síntese do 3-butin-1-al (**93**), de acordo com a metodologia proposta Gore *et al.* (2013).



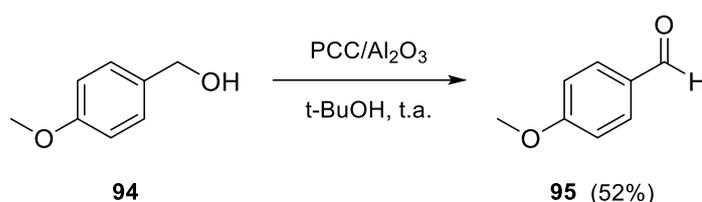
Nessa reação de oxidação branda, o álcool é oxidado e obtêm-se um resíduo de óxido de manganês (II) (GORE et al., 2013). Essa metodologia foi aplicada em três experimentos, obtendo valores de rendimento de 6 (uma vez) e 7% (duas vezes). De acordo com a análise qualitativa por CCD, utilizando como revelador a solução de 2,4-DNFH, uma mancha foi vista para o ponto do meio reacional, indicando que houve conversão parcial ou total do álcool em aldeído. Entretanto, não foi possível recolher uma quantidade considerável do produto para caracterizá-lo. Acredita-se que o aldeído **93** ficou retido na terra diatomácea durante a filtração, por isso teve-se uma baixa recuperação do produto.

Na segunda tentativa, foi tentada a oxidação utilizando clorocromato de piridina (PCC). O PCC é um complexo inorgânico contendo Cr(VI), em que tal íon

metálico é um agente oxidante muito bem estabelecido na literatura na oxidação de álcoois primários a aldeídos, segundo metodologia proposta por Niknam (2005). A reação foi realizada utilizando-se alumina como suporte sólido e mantendo-se o contato dos reagentes por meio do processo de maceração em almofariz de porcelana. O autor também destaca a quimiosseletividade do reagente, visto que o PCC não reage com ligações duplas ou triplas (NIKNAM, 2005).

Inicialmente, a metodologia descrita na **Seção 3.7.1** deste **Capítulo 1** (p. 110) foi testada com um reagente disponível em maior quantidade antes de trabalhar com o 3-butin-1-ol. No caso, o álcool 4-metoxibenzílico (**94**) foi escolhido. Fez-se então a oxidação de 138,16 mg de **94** (126,6 μ L, 1 mmol, 1 eq.) em 4-metoxibenzaldeído (**95**), utilizando 439,7 mg de PCC (2 mmol, 2 eq.) em 2,2 g de alumina e dez gotas de *tert*-butanol. O aldeído **95** foi obtido como um óleo escuro com 52% de rendimento (70,9 mg) (**Esquema 6**, p. 73). A reação foi acompanhada por análise qualitativa por CCD, utilizando como revelador a solução de 2,4-DNFH, em que uma mancha foi vista para o ponto do meio reacional, indicando que houve conversão parcial ou total do álcool em aldeído.

Esquema 6 – Reação para síntese do 4-metoxibenzaldeído (**95**), de acordo com a metodologia proposta por Niknam (2005).

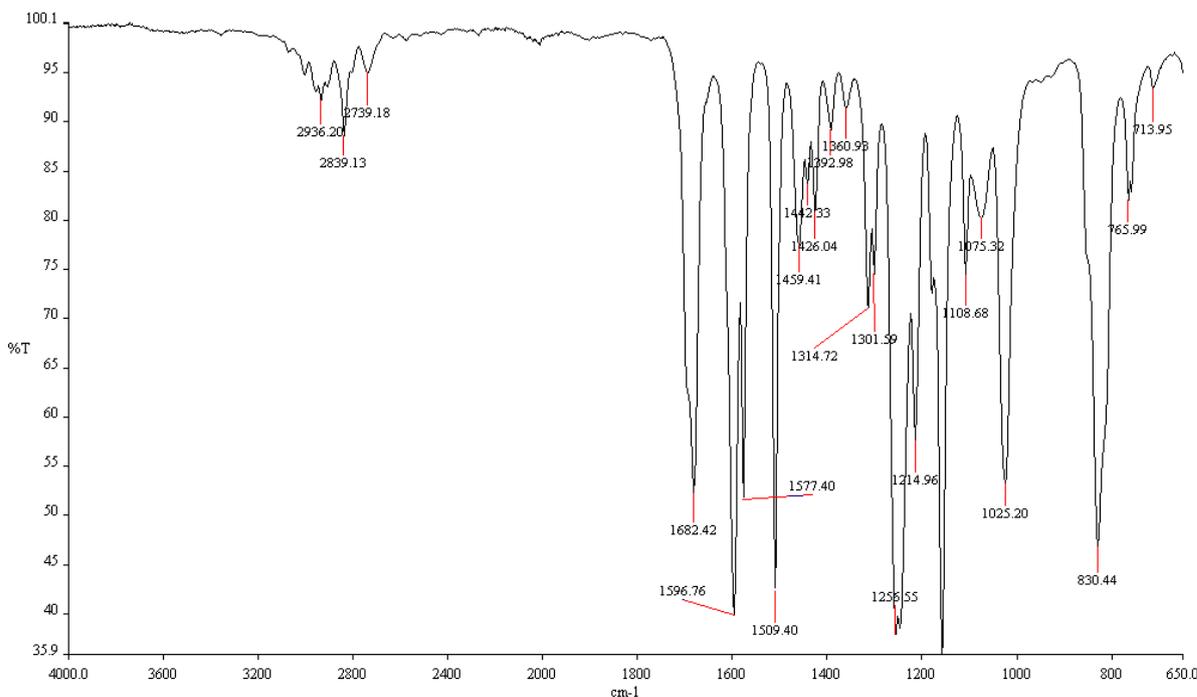


A obtenção do aldeído **95** foi, enfim, confirmada após a caracterização do seu espectro no infravermelho (IV) (**Figura 22**, p. 74). O espectro foi registrado no espectrofotômetro PerkinElmer Spectrum One acoplado ao módulo de refletância total atenuada (ATR) do Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico (CEDAFAR) (Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG). O espectro foi adquirido na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

Ao analisar o espectro no IV de **95** vê-se que não há a presença da banda característica de estiramento simétrico da ligação O–H na faixa de 3200-3000 cm^{-1} , indicando que, provavelmente, não houve recuperação do álcool em mistura com o

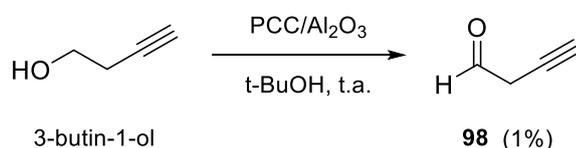
aldeído. Além disso, observa-se uma banda em 1682 cm^{-1} característica de estiramento simétrico de ligação C=O de carbonila, denotando a formação do aldeído.

Figura 22 – Espectro na região do infravermelho (ATR) do 4-metoxibenzaldeído (**95**), produto de oxidação do álcool 4-metoxibenzílico (**94**).



Entretanto, ao reproduzir a reação para o 3-butin-1-ol, obteve-se um rendimento de 1% na obtenção de **93** (Esquema 7, p. 74).

Esquema 7 – Reação para síntese do 3-butin-1-al (**93**), de acordo com a metodologia proposta por Niknam (2005).

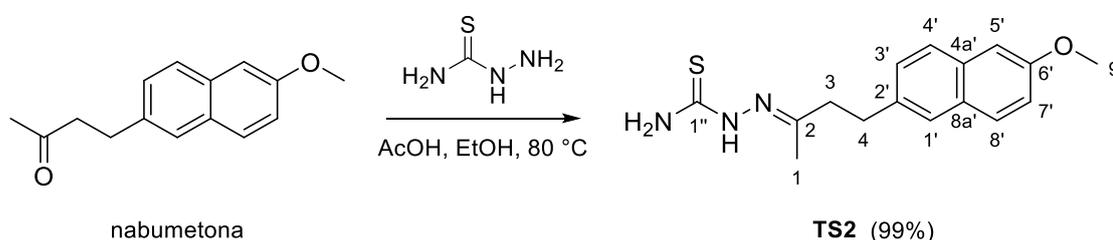


Novamente, acredita-se que ou não ocorreu a conversão total do reagente, ou produto tenha ficado retido na terra diatomácea durante a filtração. Por fim, visando obter o aldeído **93**, é necessário adaptar a metodologia para encontrar um protocolo de elaboração mais eficiente na recuperação desse produto.

2.3.2 – Obtenção das tiossemicarbazonas TS2-5

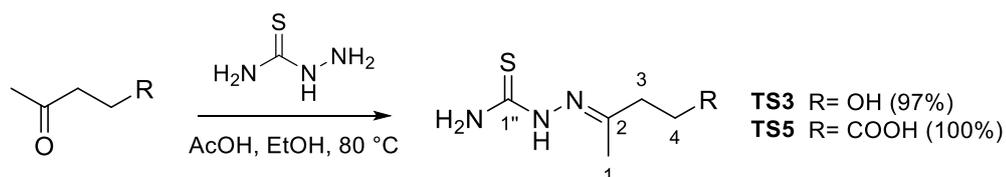
As tiossemicarbazonas **TS2-3** e **TS5** foram obtidas a partir do método aplicado por Lino *et al.* (2018), utilizando etanol absoluto como solvente e ácido acético como catalisador, com rendimentos de 97 a 100%. O produto **TS2** é derivado da nabumetona, um pró-fármaco da classe dos anti-inflamatórios não esteroidais. Seu metabólito ativo atua inibindo a enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e é aplicado na terapia de osteoartrite (artrose) e artrite reumatoide (HEDNER *et al.*, 2004). A obtenção de **TS2** foi previamente descrita por Taha *et al.* (2019), em que os autores realizaram a síntese entre a tiossemicarbazida e a nabumetona, em uma mistura de metanol e éter etílico como solvente do meio reacional, a temperatura ambiente por 72 horas. O produto foi obtido com 85% de rendimento, mas os dados de caracterização completos da substância não foram descritos. Com o método de Lino *et al.* (2018), **TS2** foi obtida com rendimento de 99% (**Esquema 8**, p. 75).

Esquema 8 – Reação para síntese da tiossemicarbazona **TS2**.



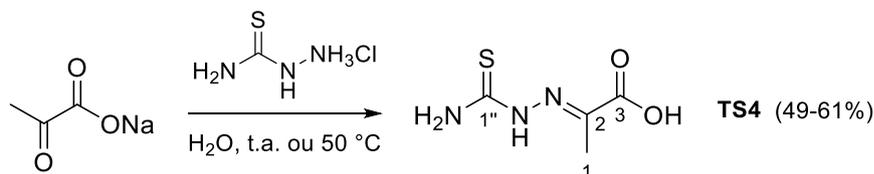
As tiossemicarbazonas **TS3** e **TS5** também foram relatadas previamente na literatura, sendo sintetizadas por Sá *et al.* (2015) e Oliveira (2021), a partir do mesmo método similar ao de Lino *et al.* (2018). Os produtos foram obtidos com rendimentos de 93 e 96%, respectivamente (**Esquema 9**, p. 75).

Esquema 9 – Reação para síntese das tiossemicarbazonas **TS3** e **TS5**.



A tiossemicarbazona **TS4** foi obtida aplicando a metodologia proposta por Timken e colaboradores (1985), em que o produto é obtido pela reação entre a cetona e a tiossemicarbazona em meio aquoso ácido. Como havia disponível no laboratório apenas o piruvato de sódio, deu-se preferência por este método em água, evitando uma metodologia com algum solvente orgânico. Para aumentar a solubilidade da tiossemicarbazida em água, produziu-se o cloridrato correspondente. A metodologia foi aplicada em duas tentativas. Primeiramente, a reação foi realizada a temperatura ambiente, com um rendimento de 49%, bem menor do que o obtido por Wiecek *et al.* (2009), que foi de 85% para **TS4**. Com isso, uma segunda tentativa foi apontada, mantendo as condições reacionais, mas aquecendo o meio a 50 °C, como feito por Affan *et al.* (2009). O rendimento da segunda reação foi de 61% (**Esquema 10**, p. 76), o que não representou uma diferença considerável, mas, como a massa obtida era mais que a suficiente para a síntese dos derivados 2-tiazolilhidrazonas correspondentes, seguiu-se mesmo assim sem testar uma nova metodologia ou outras alterações nas condições reacionais aplicadas (AFFAN *et al.*, 2009; TIMKEN; WILSON; HENDRICKSON, 1985; WIECEK *et al.*, 2009).

Esquema 10 – Reação para a síntese da tiossemicarbazona **TS4**.



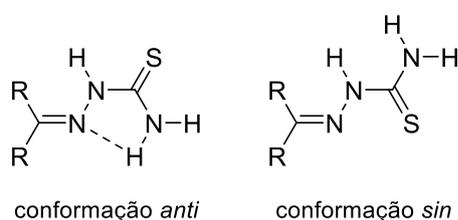
A caracterização das tiossemicarbazonas se deu por meio de suas faixas ou pontos de fusão e dados espectroscópicos de RMN. Para **TS2**, foram analisados ambos os espectros 1D e 2D para atribuir corretamente os sinais de ^1H e ^{13}C correspondentes aos átomos da porção aromática. Observando-se os espectros de RMN 1D das substâncias (**Apêndice A**, p. 172), vê-se que há uma mistura de diastereoisômeros apenas para **TS3**.

Nos espectros de RMN de ^1H das quatro tiossemicarbazonas (**Apêndice A**, p. 172), vê-se um simpleto integrado para três hidrogênios com deslocamento químico entre 1,90 e 2,10 ppm, atribuído para os hidrogênios Me-1. Os sinais dos hidrogênios amínicos também confirmam a formação do produto. Para o hidrogênio amínico da hidrazona (C=N-NH-) atribuiu-se os simpletos deslocados entre 9,90 e 10,70 ppm

(1H). Mas, para os hidrogênios de amina primária ($-\text{NH}_2$), os sinais apareceram ou como dois simpletos (um associado a cada hidrogênio), ou como um simpleto apenas, e isso se deve a uma interação intramolecular na tiossemicarbazona.

Tenório *et al.* (2005) discutiu que o nitrogênio não-imínico do grupo carbotioamida ($\text{NH}_2\text{-(C=S)-NH-}$) apresenta um maior caráter sp^2 do que o nitrogênio da amina primária da tiossemicarbazida, devido à ressonância com a ligação C=S , tornando a molécula mais planar. Também, devido à ligação imínica formada, a substância pode adotar uma conformação *anti* ou *sin* em relação ao grupo carbotioamida e o nitrogênio imínico (**Figura 23**, p. 77). Na conformação *anti* é possível a formação de uma interação intramolecular do tipo ligação de hidrogênio que ocasiona na formação de um pseudociclo de cinco membros. Com isso, esse hidrogênio amínico tem um ambiente químico diferente e, portanto, os dois hidrogênios ($-\text{NH}_2$) se apresentam com diferentes deslocamentos químicos (TENÓRIO *et al.*, 2005).

Figura 23 – Representação das conformações *anti* e *sin* das tiossemicarbazonas, tomando como referência o nitrogênio imínico e o enxofre da ligação tiocarbonila.



Na **Tabela 9** (p. 78) têm-se representados os deslocamentos químicos para os hidrogênios H-1, ($-\text{NH-}$) e ($-\text{NH}_2$). Vê-se que apenas o produto **TS3** foi formado como uma mistura dos dois diastereoisômeros (*Z* e *E*), com três sinais para os hidrogênios amínicos (um sinal para o isômero *Z* e dois sinais para o isômero *E*). Nos espectros de RMN de ^{13}C de **TS2-5**, vê-se dois sinais principais que confirmam a formação da tiossemicarbazona. O carbono imínico C-2 de cada produto foi atribuído aos sinais presentes na faixa entre 140 e 154 ppm (C), denotando a formação do grupo hidrazona. Também, os sinais presentes nos espectros na região acima de 178 ppm (C) foram associados ao carbono tiocarbonílico (C=S). Na **Tabela 10** (p. 78), têm-se os deslocamentos químicos desses dois átomos para as tiossemicarbazonas.

Tabela 9 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) para as tiossemicarbazonas **TS2-5**.

Produto	δ_{H} H-1 (ppm)	δ_{H} –NH– (ppm)	δ_{H} –NH ₂ (ppm)	
TS2	1,94 (s; 3H)	9,96 (s; 1H)	7,48 (s; 1H)	8,04 (s; 1H)
(E)-TS3	1,90 (s; 3H)	9,91 (s; 1H)	7,50 (s; 1H)	7,50 (s; 1H)
(Z)-TS3	1,96 (s; 3H)	10,81 (s; 1H)	7,53 (s; 1H)	
TS4	2,06 (s; 3H)	10,67 (s; 1H)	8,61 (s; 1H)	8,69 (s; 1H)
TS5	1,93 (s; 3H)	10,71 (s; 1H)	7,37 (s; 1H)	8,14 (s; 1H)

Tabela 10 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) para as tiossemicarbazonas **TS2-T5**.

Produto	δ_{C} C-2 (ppm)	δ_{C} C=S (ppm)
TS2	153,6 (C)	178,6 (C)
(E)-TS3	152,9 (C)	178,5 (C)
(Z)-TS3	153,9 (C)	
TS4	138,7 (C)	179,9 (C)
TS5	152,5 (C)	178,8 (C)

Como **TS2** foi previamente sintetizado por Taha, Raauf e Ali (2019), mas seus dados de RMN de ^1H e ^{13}C completos não foram totalmente descritos. Portanto, aqui traz-se a discussão de sua caracterização por RMN como exemplo para as tiossemicarbazonas (TAHA; RAAUF; ALI, 2019). Os dados espectroscópicos de RMN 1D (^1H , ^{13}C e DEPT-135) e 2D (COSY, HSQC e HMBC) (**Apêndice A.1**, p. 172) confirmaram a obtenção de um único isômero para **TS2**. Na expansão do espectro de RMN de ^1H na região entre 1,50 e 4,00 ppm (**Figura 24**, p. 79), foram observados quatro sinais referentes aos hidrogênios alifáticos de **TS2**. Primeiramente, dois simpletos presentes em 1,94 ppm (3H) e 3,85 ppm (3H) foram atribuídos às metilas Me-1 e Me-9', respectivamente. Observam-se também outros dois sinais presentes em 2,61 ppm (dd; $J = 9,1$ e $6,6$ Hz; 2H) e 2,97 ppm (dd; $J = 9,1$ e $6,6$ Hz; 2H), referentes aos hidrogênios metilênicos nas posições 3 e 4, respectivamente.

A análise conjunta dos espectros 1D e dos mapas de contornos 2D permitiram a atribuição inequívoca dos sinais de hidrogênio-1 relativos aos hidrogênios do grupo 6-metoxinaftalen-2-ila, presentes na faixa entre 7,00 e 7,80 ppm (**Figura 25**, p. 79). De início, um duplete duplo em 7,12 ppm ($J = 8,9$ e $2,5$ Hz; 1H) foi atribuído ao H-7', em que se observou uma correlação deste sinal com H-5' ($^4J_{\text{HH}}$) e H-8' ($^3J_{\text{HH}}$) no mapa

de contornos ^1H - ^1H -COSY (**Figura 26**, p. 80). Por conseguinte, o sinal em 7,26 (d; $J = 2,5$ Hz; 1H) foi atribuído ao H-5', de acordo com a correlação anterior. Outro duplete duplo foi observado em 7,37 ppm ($J = 8,4$ e 1,7 Hz; 1H), sendo atribuído ao H-3'. Este sinal apresentou correlação com os sinais relativos aos hidrogênios H-1' ($^4J_{\text{HH}}$) ($\delta_{\text{H}} = 7,64$ ppm; d; $J = 1,7$ Hz; 1H) e H-4' ($\delta_{\text{H}} = 7,73$ ppm; d; $J = 8,4$ Hz; 2H) ($^3J_{\text{HH}}$). Este último sinal também foi associado ao hidrogênio H-8'.

Figura 24 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) (δ_{H} 1,50-4,00 ppm) de **TS2**.

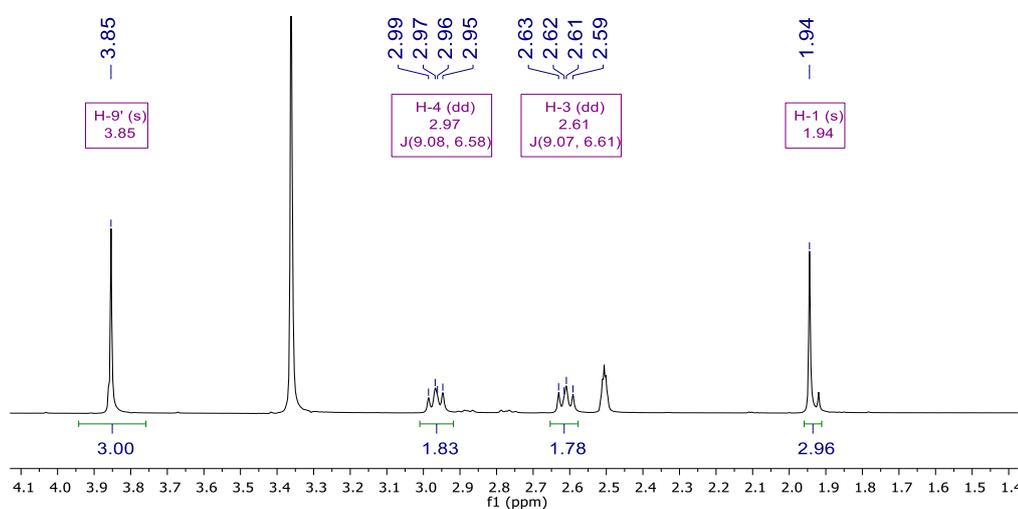
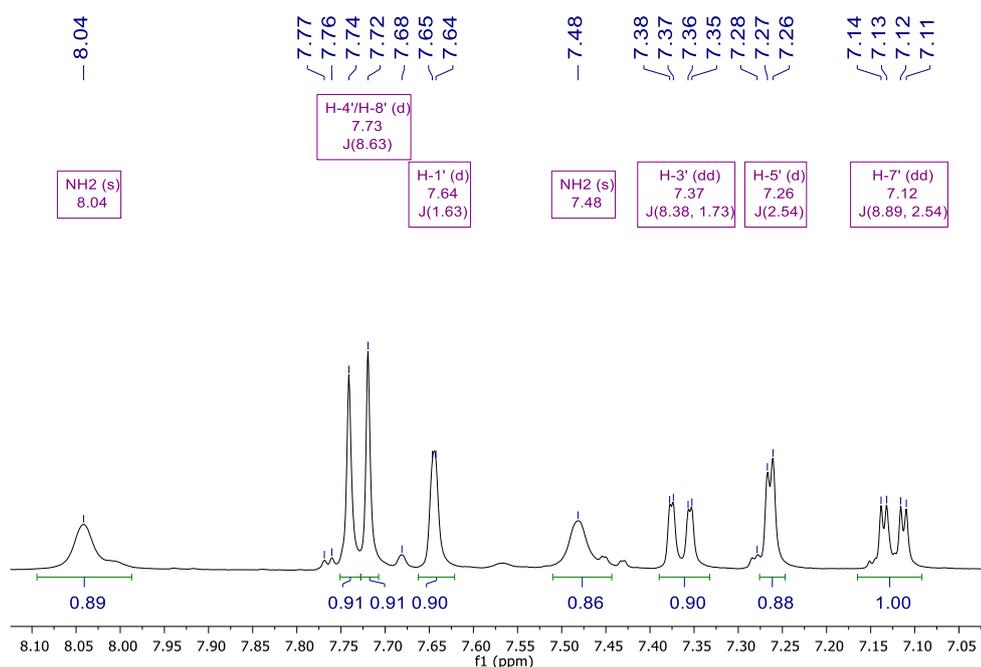
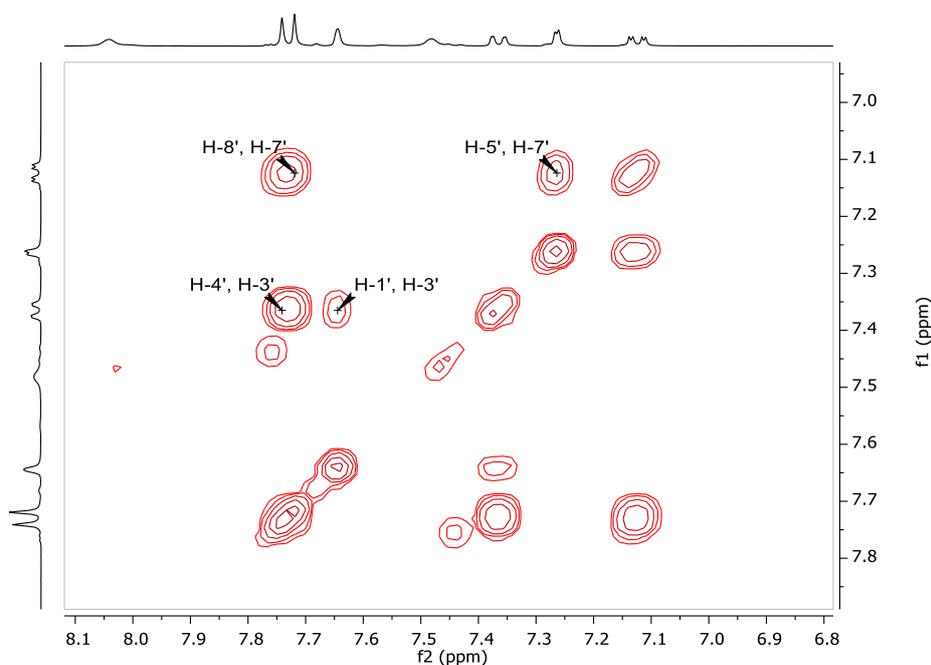


Figura 25 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) (δ_{H} 7,00-8,15 ppm) de **TS2**.



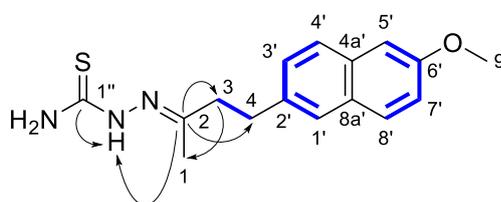
Os sinais de hidrogênio-1 foram devidamente correlacionados aos sinais de carbono-13 no mapa de contornos ^1H - ^{13}C -HQSC (**Apêndice A.1**, p. **174**): dois sinais de carbonos metílicos em 16,7 e 55,1 ppm, referentes aos carbonos C-1 e C-9', respectivamente; dois sinais de carbonos metilênicos em 31,5 e 39,7 ppm, relativos aos carbonos C-4 e C-3, nessa ordem; e, por fim, seis sinais entre 105 e 129 ppm, referentes a carbonos metínicos correspondentes ao anel naftaleno. Analisando o mapa de contornos ^1H - ^{13}C -HMBC (**Apêndice A.1**, p. **174**), algumas correlações foram importantes para a caracterização de **TS2**. Para a porção hidrazona, têm-se o hidrogênio amínico ($\delta_{\text{H}} = 10,09$ ppm) correlacionando com o carbono C-2 ($\delta_{\text{C}} = 153,6$ ppm) e C-1'' ($\delta_{\text{C}} = 178,6$ ppm). Os hidrogênios Me-1 ($\delta_{\text{H}} = 1,94$ ppm), H-3 ($\delta_{\text{H}} = 2,61$ ppm) e H-4 ($\delta_{\text{H}} = 2,97$ ppm) também correlacionaram com o carbono imínico C-2. Vê-se também uma correlação entre os hidrogênios Me-1 com o carbono C-3 ($\delta_{\text{C}} = 39,7$ ppm). As correlações homo e heteronucleares atribuídas para **TS2** estão destacadas na **Figura 27** (p. **81**), de acordo com os mapas de contornos 2D ^1H - ^{13}C -HQSC e ^1H - ^{13}C -HMBC registrados para esta substância.

Figura 26 – Seção expandida do mapa de contornos ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, DMSO- d_6) de **TS2**.



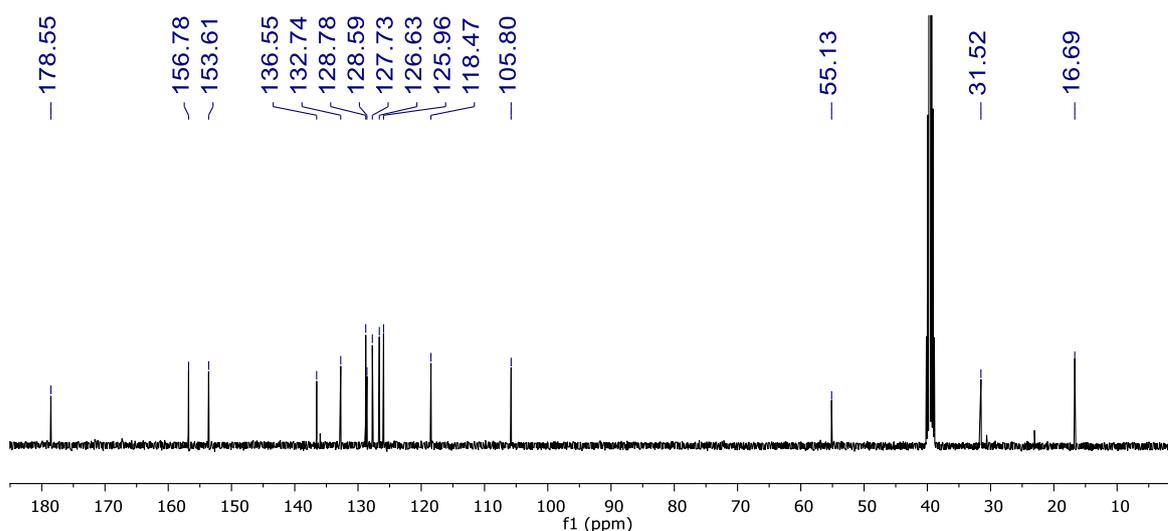
Por fim, três sinais registrados no espectro de RMN de ^1H foram atribuídos aos hidrogênios ligados a átomos de nitrogênio (**Figura 25**, p. 79). Um simpleto em 9,96 ppm (1H), atribuído ao hidrogênio do grupo hidrazona (N–H), além de outros dois simpletos em 7,48 (1H) e 8,04 ppm (1H), atribuídos aos nitrogênios do grupo carbotoioamida.

Figura 27 – Correlações observadas para os mapas de contornos ^1H - ^1H -COSY (–) e ^1H - ^{13}C -HMBC (→) de **TS2**, destacando as correlações mais relevantes para a caracterização com base no espectro 2D heteronuclear.



No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 28**, p. 81), a ausência de um sinal na faixa de 200 ppm, região característica de carbonilas de cetonas, indicou que o produto não foi obtido em mistura com a nabumetona. Os sinais em 153,6 e 178,6 ppm foram atribuídos aos carbonos imínico (C-2) e tiocarbonílico (C-1''), confirmando a formação da tiossemicarbazona.

Figura 28 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **TS2**.



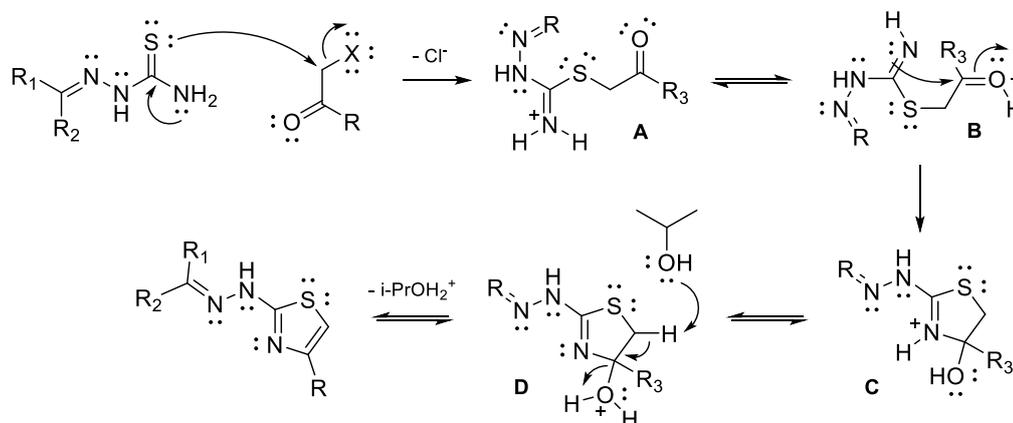
A caracterização das demais tiossemicarbazonas (**TS3-5**) seguiu a mesma estratégia de interpretação, mas não foram registrados os espectros de RMN 2D para

esses produtos, visto que os espectros 1D foram suficientes para confirmar as estruturas. Os dados espectrais de ^1H e ^{13}C de **TS2-5** e respectivas atribuições se encontram descritos na **Seção 3.7** deste **Capítulo 1** (p. 110). Os espectros de RMN 1D e 2D podem ser visualizados no **Apêndice A** (p. 172).

2.4 – Obtenção e caracterização das 2-tiazolilhidrazonas

O método mais clássico para formação de um heterociclo tiazólico é a partir da condensação de Hantzsch entre uma α -haloacetona – geralmente cloretos ou brometos – e uma carbotioamida (HANTZSCH, 1889). No caso das 2-tiazolilhidrazonas, a carbotioamida é conectada a um grupo hidrazona, dando uma tiossemicarbazona (HUSSEIN; TURAN-ZITOUNI, 2018). O mecanismo proposto para formação dos tiazóis é mostrado no **Esquema 11** (p. 82).

Esquema 11 – Mecanismo proposto para a formação de uma 2-tiazolilhidrazona.



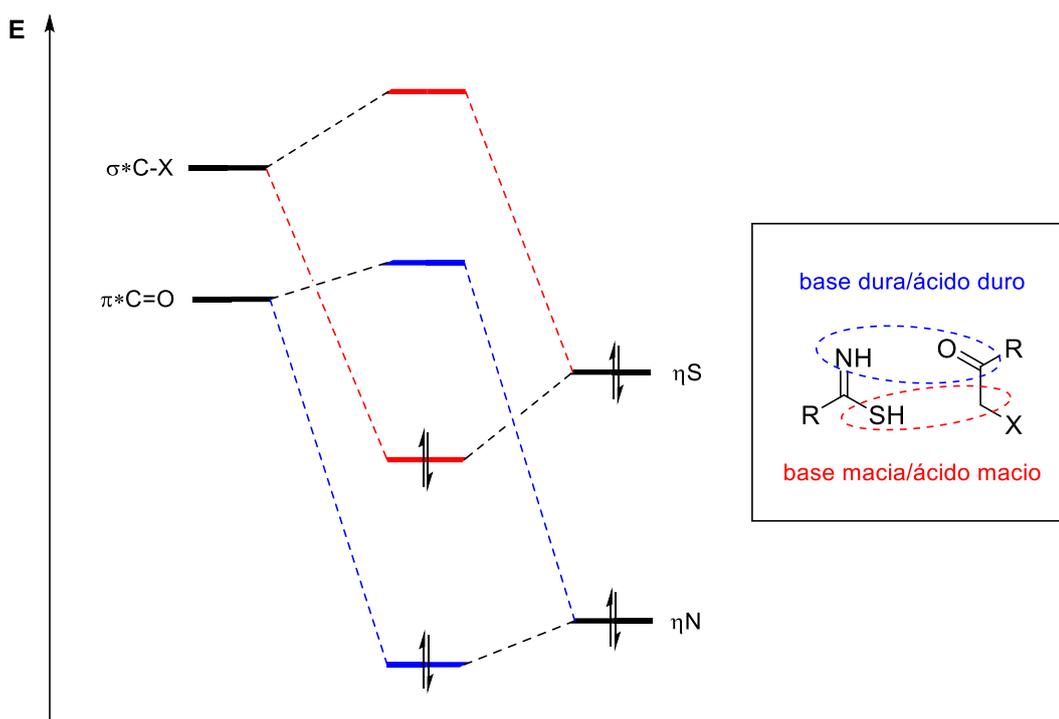
A primeira etapa do mecanismo envolve o ataque nucleofílico pelo átomo de enxofre da tiossemicarbazona no carbono ligado ao halogênio, num mecanismo de substituição nucleofílica, com formação de uma ligação imina pelo nitrogênio do grupo tioamida (**A**). Em sequência, ocorre uma transferência de próton intramolecular para o oxigênio carbonílico (**B**), o que torna o carbono sp^2 mais eletrofílico e favorece um segundo ataque nucleofílico pelo nitrogênio imínico, ocorrendo a ciclização intramolecular e formação do intermediário **C**. Após um segundo prototropismo, o próprio solvente remove um próton do intermediário **D**, favorecendo a eliminação de uma molécula de água e a formação do sistema aromático. Como resultado têm-se o

heterociclo tiazólico conectado ao grupo hidrazona (BREDEKAMP et al., 1992; HANTZSCH; WEBER, 1887; QIAO; SO; GOODNOW, 2001).

Como a tiossemicarbazona é um nucleófilo ambidentado, vê-se uma regioselectividade do enxofre preferencialmente atacar o carbono halogenado e do nitrogênio atacar o carbono carbonílico. A explicação deriva da teoria ácido-base de Pearson (ou teoria HSAB, do inglês, *hard and soft acids and bases*). Os carbonos carbonílicos são eletrófilos (ácidos de Lewis) de caráter duro, tendo preferência em reagir com uma base dura com o nitrogênio da porção carbotioamida, visto que a diferença de energia dos orbitais de fronteira (η_N como HOMO e $\pi^*_{C=O}$ como LUMO) é muito grande. Com isso, a reatividade da carbonila com o nitrogênio depende mais de fatores eletrostáticos (PEARSON, 1963).

O contrário é visto para o enxofre e o carbono halogenado sp^3 . O enxofre é um nucleófilo mais macio, por ser menos eletronegativo e ter um raio atômico maior, possui maior polarizabilidade. Com isso, tem preferência em reagir com o carbono halogenado, que tem características mais próximas. Isso leva a uma diferença menor entre os orbitais de fronteira (η_S como HOMO e σ^*_{C-X} como LUMO), logo, a reatividade depende mais de fatores orbitales (**Figura 29**, p. 83) (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; KLOPMAN, 1968; PEARSON, 1963).

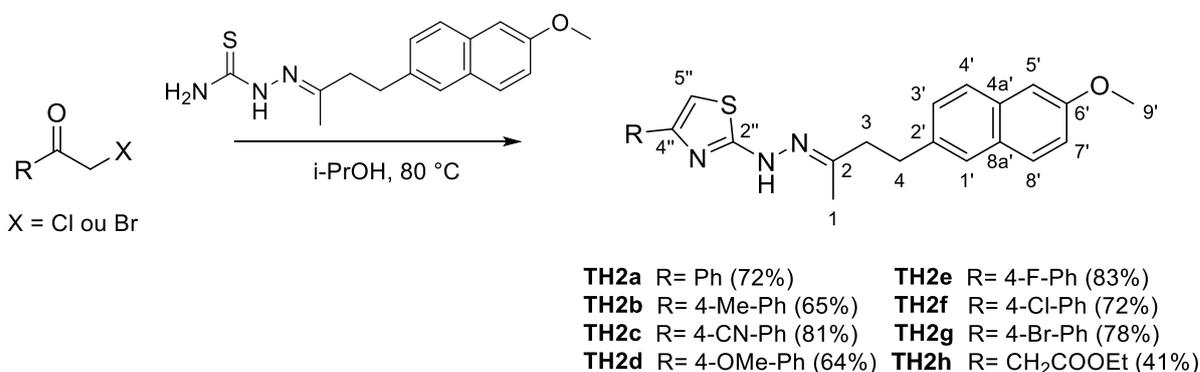
Figura 29 – Interações orbitales associadas à formação do heterociclo tiazólico.



2.4.1 – Obtenção das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo aromático

Oito 2-tiazolilhidrazonas (**TH2a-h**) derivadas da nabumetona foram obtidas a partir do método proposto por Lino *et al.* (2018), com rendimentos de 41 a 83%. Os produtos **TH2a-g** foram sintetizados a partir da reação de condensação entre a tiossemicarbazona **TS2** e diferentes bromoacetofenonas, em 2-propanol como solvente do meio reacional e sob aquecimento. Diferentemente da metodologia para a síntese das tiossemicarbazonas, esta reação não demanda a adição de catalisador ácido. O substituinte ligado ao heterociclo tiazólico na posição 4 foi variado: 4-fenila (**2a**), 4-metilfenila (**2b**), 4-cianofenila (**2c**), 4-metoxifenila (**2d**), 4-fluorofenila (**2e**), 4-clorofenila (**2f**) e 4-bromofenila (**2g**). O produto **TH2h** foi sintetizado a partir de **TS2** e 4-cloroacetoacetato de etila, em que este derivado tiazólico possui o grupo alifático 2-etoxi-2-oxoetila conectado à posição 4 do anel tiazol (**Esquema 12**, p. 84). Essa mudança busca comparar as atividades biológicas desses compostos e entender se a mudança do substituinte ligado ao heterociclo tiazólico (sendo ele alifático ou aromático) traz uma alteração significativa para a atividade biológica.

Esquema 12 – Reação para a síntese das 2-tiazolilhidrazonas **TH2a-h**.



Os produtos foram caracterizados a partir de seus pontos ou faixas de fusão assim como pelos seus espectros de RMN 1D e 2D. Os mapas de contornos ¹H-¹³C-HSQC e ¹H-¹³C-HMBC foram consultados a fim de atribuir inequivocadamente os sinais dos átomos das porções aromáticas. Ao analisar os espectros de RMN 1D, vê-se que há a manutenção da orientação *E* no grupo hidrazona para todos os derivados. Apesar da tiossemicarbazona **TS2** utilizada para a obtenção das tiazolilhidrazonas **TH2a-h** apresentar isomeria *E*, ainda poderia ocorrer uma conversão de isômeros

durante a reação de formação dos tiazóis (o que não foi visto nesse caso, em que os sinais de RMN de ^1H foram integrados para apenas um isômero, além dos sinais não aparecerem dobrados).

Ao analisar os espectros de RMN de ^1H (**Apêndice B.1 a Apêndice B.8**, p. **177-194**), as substâncias apresentaram alguns sinais característicos que confirmam a sua síntese. Em todos os espectros viu-se um simpleto entre 10,50 e 10,80 ppm (1H), correspondente ao hidrogênio do grupo hidrazona ($-\text{NH}-\text{N}=\text{C}$). Na região entre 1,00 e 4,00 ppm, alguns sinais correspondentes ao grupo 6-metoxinaftalen-2-ila são relevantes para confirmar a conexão da hidrazona com o anel tiazólico. Dois simpletos em 1,90-2,00 ppm (3H) e outro em 3,85 ppm (3H) foram atribuídos às metilas nas posições 1 e 9', respectivamente. Dois multipletos em 2,60-2,65 (2H) e 2,95-3,00 ppm (2H) foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-4, respectivamente.

Outro sinal de hidrogênio-1 importante para confirmar a formação do heterociclo é o H-5''. Os produtos apresentaram um simpleto entre 6,50 e 7,60 ppm (1H) para este nuclídeo, em que **TH2c** apresentou o maior valor (7,55 ppm). Por apresentar o grupo ciano em sua estrutura, que é fortemente elétron-retirador, esperava-se um valor de δ_{H} maior. **TH2h** apresentou o menor valor de deslocamento químico (6,54 ppm), visto que o grupo éster tem um efeito elétron-retirador por efeito indutivo menos pronunciado que os demais substituintes. Abaixo na **Tabela 11** (p. **85**) têm-se os deslocamentos químicos dos hidrogênios H-5'' e amínico para os produtos derivados da nabumetona.

Tabela 11 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) para os derivados 2-tiazolilhidrazinas **TH2a-h**.

Produto	δ_{H} H-5'' (ppm)	δ_{H} -NH- (ppm)
TH2a	7,23 (s; 1H)	10,70 (s; 1H)
TH2b	7,14 (s; 1H)	10,66 (s; 1H)
TH2c	7,55 (s; 1H)	10,81 (s; 1H)
TH2d	-	-
TH2e	7,22 (m; 3H)	10,71 (s; 1H)
TH2f	7,30 (s; 1H)	10,72 (s; 1H)
TH2g	7,31 (s; 1H)	10,72 (s; 1H)
TH2h	6,54 (s; 1H)	10,58 (s; 1H)

Quanto aos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (**Apêndice B.1 a Apêndice B.8**, p. 177-194), três sinais característicos do anel tiazólico confirmam a formação dos produtos. Dois sinais nas faixas de 170-171 ppm (C) e 144-151 ppm (C) são atribuídos aos carbonos C-2'' e C-4'', sequencialmente. O sinal do carbono C-5'' variou bastante, a depender dos substituintes ligados ao anel, dentro do intervalo de deslocamento químico de 102 a 108 ppm (CH). Outro sinal entre 151 e 153 ppm (C) foi atribuído ao carbono imínico C-2, indicando que não houve quebra do grupo hidrazona. Esses sinais não foram vistos nos espectros do derivado **TH2d**, mas os outros sinais indicam a formação do derivado. Portanto, essas informações confirmam a formação de todos os produtos. Na **Tabela 12** (p. 86) são mostrados os deslocamentos químicos de RMN de carbono-13 para C-2, C-2'', C-4'' e C-5'' para os derivados da nabumetona.

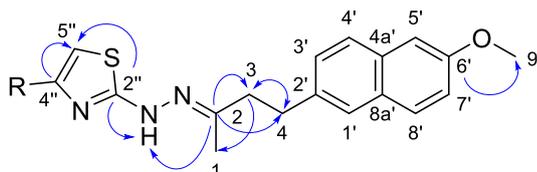
Tabela 12 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para os derivados 2-tiazolilhidrazonas **Th2a-h**.

Produto	δ_c C-2 (ppm)	δ_c C-2'' (ppm)	δ_c C-4'' (ppm)	δ_c C-5'' (ppm)
TH2a	151,6 (C)	170,1 (C)	150,3 (C)	103,4 (CH)
TH2b	151,4 (C)	170,0 (C)	150,5 (C)	102,5 (CH)
TH2c	152,1 (C)	170,4 (C)	148,8 (C)	107,4 (CH)
TH2d	-	-	-	-
TH2e	151,6 (C)	170,2 (C)	149,4 (C)	103,2 (CH)
TH2f	151,7 (C)	170,2 (C)	149,2 (C)	104,2 (CH)
TH2g	151,8 (C)	170,3 (C)	149,3 (C)	104,3 (CH)
TH2h	151,2 (C)	170,1 (C)	144,9 (C)	105,1 (CH)

Nos mapas de contornos $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -HMBC de **TH2a-h** vê-se algumas correlações importantes para a caracterização dos produtos, especialmente quando ao grupo hidrazona e o anel tiazólico. Dentre os átomos do grupo hidrazona, têm-se o hidrogênio amínico (–NH–) ($\delta_{\text{H}} = 10,50\text{-}10,80$ ppm) correlacionando com os carbonos C-2 ($\delta_{\text{C}} = 151\text{-}153$ ppm) e C-2'' ($\delta_{\text{H}} = 170\text{-}171$ ppm). Os sinais dos hidrogênios H-1 ($\delta_{\text{H}} = 1,91\text{-}1,96$ ppm), H-3 ($\delta_{\text{H}} = 2,60\text{-}2,65$ ppm) e H-4 ($\delta_{\text{H}} = 2,60\text{-}2,65$ ppm) também correlacionaram com o sinal do carbono imínico C-2. Têm-se também a correlação entre os átomos das posições 3 e 4 entre si. Para os átomos do anel tiazólico, vê-se que o hidrogênio H-5'' correlacionou com os carbonos C-2'' e C-4'' ($\delta_{\text{C}} = 144\text{-}151$ ppm).

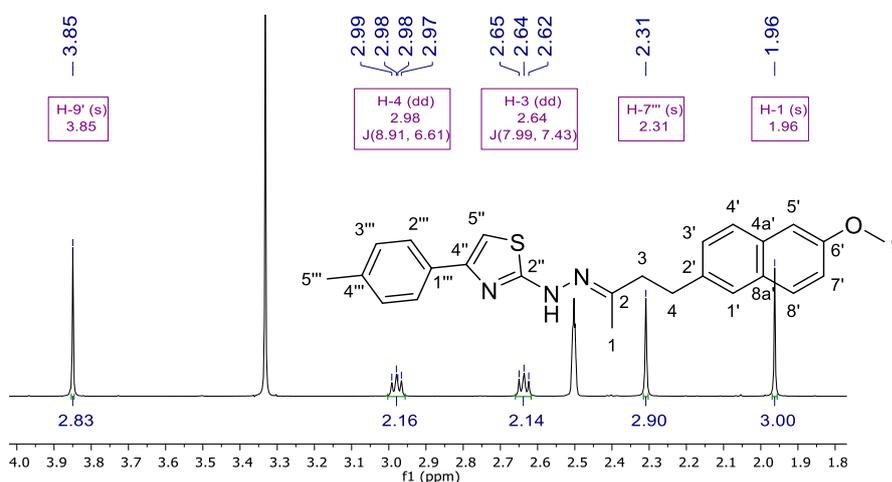
Na **Figura 30** (p. 87) estão destacadas essas correlações heteronucleares na estrutura química geral dos derivados **TH2a-h**.

Figura 30 – Correlações observadas (\rightarrow) para o mapa de contornos ^1H - ^{13}C -HMBC dos derivados 2-tiazolilhidrazonas **TH2a-h**, destacando as correlações mais relevantes para a caracterização com base no espectro 2D heteronuclear.



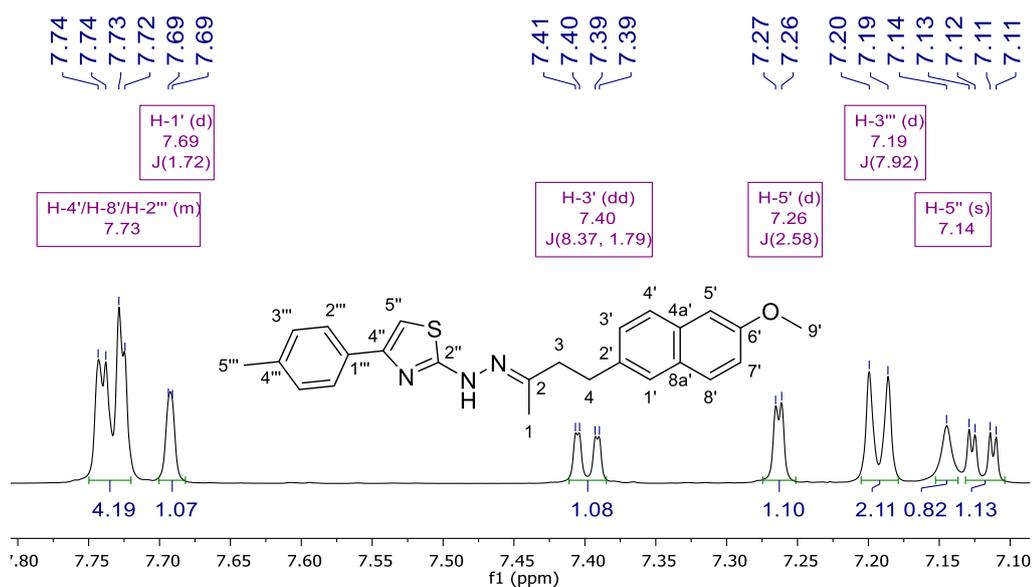
Como exemplo da série, discutir-se-á a caracterização por RMN da substância **TH2b**, que possui um grupo 4-metilfenila em sua estrutura. No espectro de RMN de ^1H de **TH2b** (**Apêndice B.2**, p. 180), três simpletos em 1,96 (3H), 2,31 (3H) e 3,85 (3H) ppm, atribuídos às metilas Me-1, Me-5''' e Me-9', respectivamente. Dois dupletos duplos em 2,64 (2H) e 2,98 ppm (2H) foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-3 e H-4, respectivamente, que acoplaram entre si com uma constante de acoplamento (J) de 8,5 e 7,0 Hz. O desdobramento dos sinais nessa multiplicidade indica que os hidrogênios sejam diastereotópicos entre si, o que justifica os sinais apresentarem mais de uma constante de acoplamento. Na **Figura 31** (p. 87) estão destacados os sinais de RMN de hidrogênio-1 relativos aos hidrogênios saturados de **TH2b**. Um simpleto em 10,66 ppm (1H) foi associado ao hidrogênio imínico do grupo hidrazona.

Figura 31 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ_{H} 1,80-4,00 ppm) de **TH2b**.



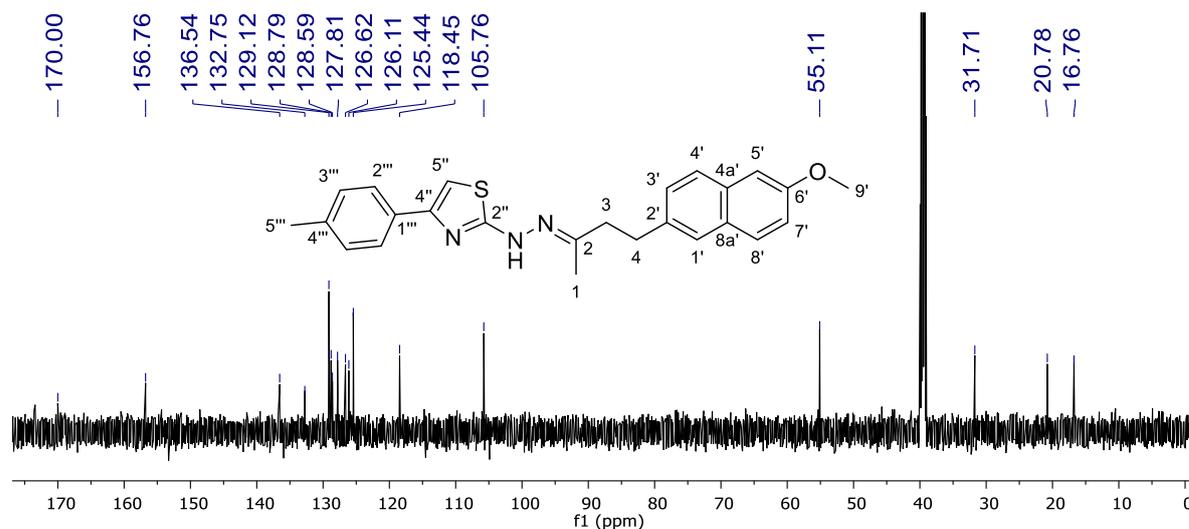
Ainda quanto ao espectro de RMN de ^1H de **TH2b**, têm-se seis sinais na região característica de hidrogênios aromáticos (7,00-8,00 ppm) (**Figura 32**, p. 88). Um simpleto em 7,14 ppm (1H) foi associado ao hidrogênio H-5". Quatro sinais relativos foram atribuídos ao grupo 6-metoxinaftalen-2-ila: dois dupletos duplos em 7,12 ($J = 8,9$ e $2,6$ Hz; 1H) e 7,40 ppm ($J = 8,4$ e $1,7$ Hz; 1H) foram associados aos hidrogênios H-7' e H-3', respectivamente; e dois dupletos em 7,26 ($J = 2,6$ Hz; 1H) e 7,69 ppm ($J = 1,7$ Hz; 1H), correspondentes a H-5' e H-1', respectivamente. Outro duplete em 7,19 ppm ($J = 7,9$ Hz; 2H) foi atribuído ao hidrogênio H-3''' do grupo 4-metilfenila. Um último sinal em 7,73 ppm (m; 4H) foi atribuído aos hidrogênios H-4', H-8' e H-2'''.

Figura 32 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) (δ_{H} 7,10-7,80 ppm) de **TH2b**.



No espectro de RMN de ^{13}C de **TH2b** (**Figura 33**, p. 89) foram vistos vários sinais na região entre 100 e 140 ppm, característicos de carbonos aromáticos. Um sinal em 20,8 ppm (CH_3) foi atribuído à metila C-5'''. Dois sinais de carbonos hidrogenados em 125,4 (CH) e 129,1 (CH) foram associados aos carbonos C-2''' e C-3''', respectivamente. Dois sinais mais desblindados em 132,4 (C) e 170,0 (C) foram associados aos carbonos C-2'' e C-1''', nesta ordem.

Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **TH2b**.



A caracterização dos demais produtos da série (**TH2a** e **TH2c-h**) seguiu a mesma estratégia de interpretação. Seus dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C e respectivas atribuições se encontram descritos na **Seção 3.8** deste **Capítulo 1** (p. **116**), assim como seus respectivos espectros de RMN 1D e 2D podem ser visualizados no **Apêndice B** (p. **177**).

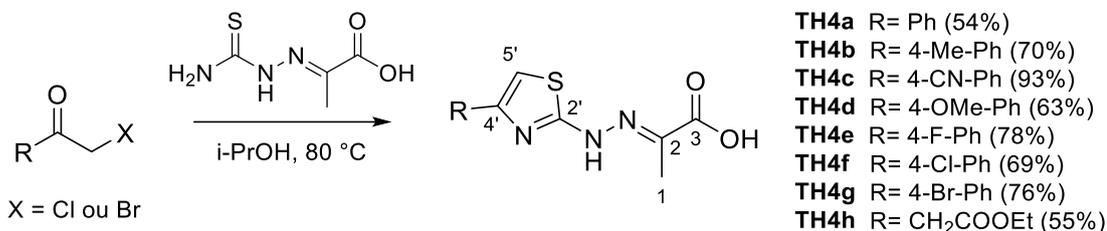
2.4.2 – Obtenção das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo álcool ou ácido carboxílico

Outras oito 2-tiazolilhidrazonas (**TH4a-h**), derivadas do ácido pirúvico, foram sintetizadas reagindo a tiossemicarbazona **TS4** com oito α -halocetonas diferentes, sendo elas sete bromoacetofenonas e o éster 4-cloroacetoacetato de etila, também utilizando o método de Lino *et al.* (2018). Com isso, os produtos continuam os mesmos substituintes ligados ao heterociclo na posição 4 que a série **TH2a-h**: 4-fenila (**2a**), 4-metilfenila (**2b**), 4-cianofenila (**2c**), 4-metoxifenila (**2d**), 4-fluorofenila (**2e**), 4-clorofenila (**2f**), 4-bromofenila (**2g**) e 2-etoxi-2-oxoetila (**2h**). As substâncias **TH4a-h** foram obtidas com rendimentos de 54 a 93% (**Esquema 13**, p. **90**).

Por fim, outras duas 2-tiazolilhidrazonas (**TH3a** e **TH5a**) foram sintetizadas a partir das tiossemicarbazonas **TS3** e **TS5**, respectivamente, em reação com a 2-bromo-4'-metilacetofenona (LINO *et al.*, 2018). **TH3a** foi obtida com rendimento de 80%, enquanto **TH5a** foi obtida com 67% (**Esquema 14**, p. **90**). Oliveira (2021) sintetizou análogos de **TH3a** e **TH5a**, que apresentaram uma potência de amplo

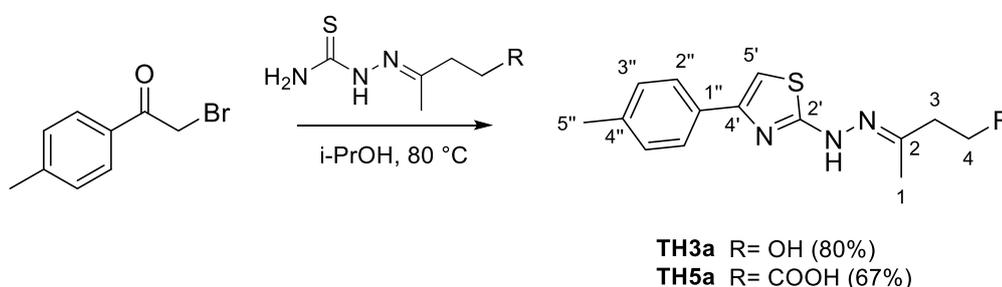
espectro considerável contra espécies dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. Entretanto, o autor não obteve os tiazóis contendo o grupo 4-metilfenila.

Esquema 13 – Reação para a síntese das 2-tiazolilhidrazonas TH4a-h.



Esses dez derivados foram sintetizados em reflexo da proposição inicial de se obter análogos mais polares e, potencialmente, mais hidrossolúveis. Os derivados **TH4a-h** foram baseados nas substâncias selecionadas pelo protocolo de triagem virtual e caracterização quimioinformática (**88-92**), a partir dos resultados discutidos na **Seção 2.2.3** deste **Capítulo 1** (p. **69**). Substâncias contendo um grupo ácido carboxílico geralmente são menos lipofílicas do que substâncias contendo outros grupos funcionais orgânicos, como álcoois e fenóis. Além disso, os ácidos carboxílicos são facilmente ionizados em meio aquoso, em que a formação de sais derivados dessas substâncias é viável, podendo aumentar ainda mais a sua solubilidade. À vista disso, há uma implicação considerável na estratégia terapêutica enquanto candidatos a fármacos antifúngicos, impactando no meio de administração, biodisponibilidade e potência na farmacodinâmica dos compostos.

Esquema 14 – Reação para a síntese das 2-tiazolilhidrazonas TH3a e TH5a.



As estruturas químicas dos análogos de **TH3a** e **TH5a** sintetizados por Oliveira (2021), tal como suas atividades biológicas expressas pelos valores de MIC, são apresentadas na **Seção 2.5** deste **Capítulo 1** (p. **95**). Portanto, pode-se comparar

o efeito do substituinte metila na posição *para* do anel benzênico para a atividade biológica. Consequentemente, complementar-se-á os resultados de Oliveira (2021) para compará-los com a série **TH4a-h** e entender se um grupo álcool ou ácido carboxílico é significativamente mais positivo para a atividade biológica, bem como se o tamanho da cadeia da subunidade hidrazona possui influência no potencial antifúngico (OLIVEIRA, 2021).

Os produtos foram caracterizados a partir de seus pontos ou faixas de fusão e pelos dados espectroscópicos de RMN 1D. Ao analisar os espectros, vê-se que houve a formação de mistura de isômeros para os produtos **TH4c**, **TH4g** e **TH4h**.

Ao analisar os espectros de RMN de ^1H (**Apêndice C**, p. 197), apenas o produto **TH4h** apresentou um sinal relativo ao hidrogênio amínico do grupo hidrazona, visto como um simpleto em 10,67 ppm (1H). Nenhum dos derivados apresentou um sinal referente ao hidrogênio do grupo hidroxila. A formação dos produtos pode ser confirmada observando os sinais relativos aos hidrogênios nas posições 1 (porção hidrazona) e 5' (anel tiazólico), comuns aos dez derivados. Um simpleto entre 1,90 e 2,10 ppm, integrado para três hidrogênios, foi atribuído à metila Me-1. Para H-5', os sinais apareceram ora como um simpleto ora como um multipeto (em sobreposição com outros hidrogênios), na faixa de deslocamento químico entre 6,70 e 7,50 ppm. Portanto, esses sinais confirmam tanto a formação do heterociclo bem como a conexão com os diferentes grupos hidrazona. Na **Tabela 13** (p. 92) têm-se os deslocamentos químicos dos hidrogênios H-1 e H-5' para os dez produtos. Vê-se que, para os tiazóis da série **TH4a-h**, que possui um grupo $-\text{COOH}$ diretamente ligado ao carbono imínico 2, os deslocamentos químicos das metilas 1 foram ligeiramente maiores ($\Delta\delta_{\text{H}}$ 0,10-0,15 ppm) que para **TH3a** e **TH5a**, devido ao efeito indutivo retirador de elétrons que esse grupo causa sobre o ligante metila.

Quanto aos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e DEPT-135 (**Apêndice C**, p. 197), os sinais dos três carbonos do anel tiazólico confirmam sua formação (quando disponíveis no espectro). O carbono C-2' apresentou sinais com deslocamento na faixa entre 168-171 ppm (C), com valores menores para os derivados do ácido pirúvico (168,5-169,0 ppm) em comparação com **TH5a** (170,2 ppm). O carbono C-4' foi atribuído aos sinais com valores de deslocamento químico entre 148 e 151 ppm (C). Por fim, os sinais atribuídos ao carbono hidrogenado C-5' se apresentaram em valores de deslocamento químico menores que os anteriores (102-110 ppm).

Tabela 13 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) para os derivados 2-tiazolilhidrazinas **TH3a**, **TH4a-h** e **TH5a**.

Produto	δ_{H} H-1 (ppm)	δ_{H} H-5' (ppm)	Produto	δ_{H} H-1 (ppm)	δ_{H} H-5' (ppm)
TH3a	1,96 (s; 3H)	7,21 (m; 1H)	TH4e	2,09 (s; 3H)	7,39 (s; 1H)
TH4a	2,09 (s; 3H)	7,41 (m; 1H)	TH4f	2,09 (s; 3H)	7,47 (m; 1H)
TH4b	2,10 (s; 3H)	7,33 (s; 1H)	TH4g	2,09 (s; 3H)	7,49 e 7,51 (s; 1H)
TH4c	2,09 (s; 3H)	7,72 e 7,73 (s; 1H)	TH4h	2,04 e 2,07 (s; 3H)	6,75 (s; 1H)
TH4d	2,09 (s; 3H)	7,23 (s; 1H)	TH5a	1,94 (s; 3H)	7,16 (s; 1H)

Observa-se que o tipo de substituinte na posição 4 do anel afeta consideravelmente no deslocamento químico desse carbono, em que grupos doadores de elétrons (metila e metoxila) levaram aos menores valores de δ_{C} (102-104 ppm), enquanto os grupos retiradores de elétrons (halogênios e nitrila) levamos a sinais mais desblindados (105-110 ppm). O produto **TH3a** não apresentou nenhum desses sinais no espectro, mas com o sinal do H-5'' no espectro de RMN de ^1H , tem-se certeza da formação do heterociclo.

Confirmada a formação do tiazol, analisou-se também os sinais relativos à porção hidrazona. O carbono metilênico C-1 apresentou valores de deslocamento químico no intervalo entre 12 e 17 ppm (CH_3), em que os produtos **TH4a-h** apresentaram valores de δ_{C} muito próximos (12,7-12,9 ppm) e menores que aqueles para **TH3a** e **TH5a** (16,9 e 17,1 ppm, respectivamente). O sinal associado ao carbono imínico C-2 foi visto apenas para os derivados do ácido pirúvico, com deslocamentos químicos entre 138 e 139 ppm (C). Ainda para os produtos **TH4a-h**, foram observados nos espectros de RMN de ^{13}C sinais com deslocamentos entre 165,6 e 165,8 ppm (C) relativos aos carbonos carbonílicos C-3 do ácido carboxílico. Para **TH5a** o sinal relativo a este carbono (C-5) apresentou deslocamento químico de 173,9 ppm (C). Na **Tabela 14** (p. 93) estão apresentados os deslocamentos químicos de RMN de carbono-13 para C-1, C-2, C-2', C-4' e C-5' para produtos discutidos nesta seção.

Para exemplificar a estratégia de caracterização das séries, serão discutidos os dados espectroscópicos para o produto **TH4e**. No espectro de RMN de ^1H (**Figura 34**, p. 94) observa-se dois simpletos em 2,09 (3H) e 7,39 ppm (1H) atribuídos aos hidrogênios H-1 e H-5', respectivamente. Um tripleto centrado em 7,24 ppm ($J = 8,5$ ppm; 2H) foi atribuído aos hidrogênios aromáticos H-3'''. O desdobramento é relativo ao acoplamento escalar desses átomos com os hidrogênios H-2''' ($^3J_{\text{HH}}$) e com flúor-

19 conectado ao C-4''' ($^3J_{HF}$). Um último sinal em 7,90 ppm (dd; $J = 8,5$ e $5,4$ ppm; 2H) foi associado aos hidrogênios H-2'''. O sinal apareceu como um duplete duplo, em que essa multiplicidade se deve aos acoplamentos com os hidrogênios H-3''' ($^3J_{HH}$) e também com o flúor-19 ($^4J_{HF}$).

Tabela 14 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) para os derivados 2-tiazolilhidrazonas **TH3a**, **TH4a-h** e **TH5a**.

Produto	δ_c C-1 (ppm)	δ_c C-2 (ppm)	δ_c C-2' (ppm)	δ_c C-4' (ppm)	δ_c C-5' (ppm)
TH3a	16,9 (CH ₃)	-	-	-	-
TH4a	12,8 (CH ₃)	138,7 (C)	168,6 (C)	-	105,6 (CH)
TH4b	12,8 (CH ₃)	138,5 (C)	168,5 (C)	150,6 (C)	104,6 (CH)
TH4c	12,9 (CH ₃)	138,7 (C)	170,0 (C)	148,9 (C)	109,4 (CH)
TH4d	12,8 (CH ₃)	138,5 (C)	168,5 (C)	150,4 (C)	103,4 (CH)
TH4e	12,8 (CH ₃)	138,8 (C)	168,7 (C)	149,6 (C)	105,4 (CH)
TH4f	12,8 (CH ₃)	138,8 (C)	168,8 (C)	149,4 (C)	106,4 (CH)
TH4g	12,8 (CH ₃)	138,8 (C)	168,8 (C)	149,4 (C)	106,5 (CH)
TH4h	12,7 (CH ₃)	138,7 (C)	168,5 (C)	-	107,6 (CH)
TH5a	17,1 (CH ₃)	-	170,2 (C)	149,8 (C)	102,6 (CH)

Nos espectros de RMN de ^{13}C de **TH4e** (Figura 35, p. 94) e de DEPT-135, há a presença de vários sinais com deslocamentos químicos acima de 100 ppm, região típica de sinais de carbonos aromáticos, o que é um forte indício da formação do produto. O sinal em 12,8 ppm (CH₃) foi atribuído ao carbono metílico C-1, e outro em 138,8 ppm (C) foi associado ao carbono imínico C-2, indicando a presença da porção hidrazona. Os três dupletos em 115,6 ($J = 22$ Hz; CH), 127,6 ($J = 8$ Hz; CH) e 161,7 ($J = 224$ Hz; C) foram atribuídos aos carbonos aromáticos C-3'', C-2'' e C-4'', respectivamente. Os sinais se desdobraram dessa forma devido ao acoplamento heteronuclear entre os núclídeos de carbono-13 e flúor-19. O carbono C-4'', por estar diretamente conectado ao halogênio, apresenta maiores deslocamento químico e constante de acoplamento ($^1J_{CF}$). O carbono C-2'', por estar mais distante, obviamente apresenta o menor valor de constante de acoplamento ($^3J_{CF}$). Esse acoplamento heteronuclear também foi identificado para os produtos **TH2e** e **TH6d**, que também possuem o grupo 4-fluorofenila.

Figura 34 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ_{H} 1,50-8,00 ppm) de **TH4e**.

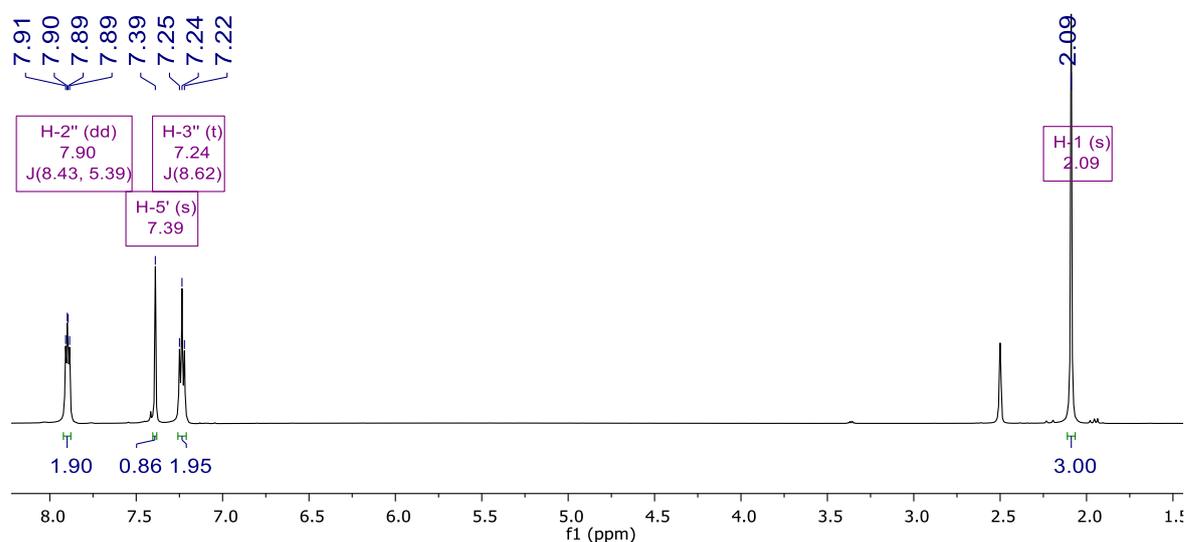
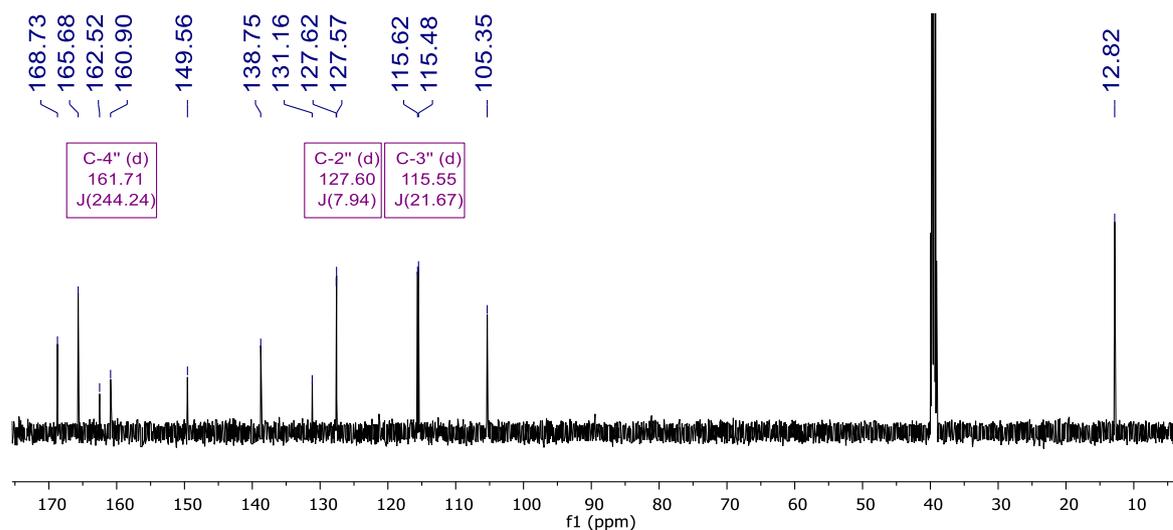


Figura 35 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **TH4e**.



Os sinais deslocados em 105,4 (CH), 149,6 (C) e 168,7 ppm (C), anteriormente discutidos e apresentados na **Tabela 14** (p. 93), foram atribuídos aos carbonos C-5'', C-4'' e C-2'', sequencialmente, do anel tiazólico. Por fim, o carbono carbonílico C-3 foi associado ao sinal em 165,7 ppm (C). A mesma estratégia de interpretação dos dados espectroscópicos foi aplicada aos derivados **TH3a**, **TH4a-d**, **TH4f-h** e **TH5a**. Os dados e atribuições dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C dos dez derivados estão descritos na **Seção 3.9** deste **Capítulo 1** (p. 124), e os seus espectros se encontram no (**Apêndice C**, p. 197).

2.5 – Atividade antifúngica de 2-tiazolilhidrazonas contra *Candida* spp.

O potencial antifúngico dos dezoito derivados 2-tiazolilhidrazonas (**TH2a-h**, **TH3a**, **TH4a-h** e **TH5a**) foi estudado pelo ensaio *in vitro* de microdiluição em caldo (em microplaca de 96 poços). A atividade biológica de cada composto foi determinada a partir dos valores de concentração inibitória mínima (MIC) frente a quatro espécies do gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. auris*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Para tanto, o método de microdiluição em caldo foi o escolhido para determinar os valores de MIC.

O ensaio de microdiluição em caldo, segundo o protocolo padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), consiste em avaliar qual a menor concentração do composto avaliado que leva a uma inibição total da proliferação microbiana, sendo esta concentração definida como concentração inibitória mínima (MIC). O método utiliza a microplaca de 96 poços, trabalhando com volumes na escala de microlitros. Experimentalmente, é a concentração do composto no poço em que o caldo presente nele se encontra visualmente límpido, indicando um crescimento reduzido ou inexistente de células fúngicas. Os poços contendo um caldo de aparência turva ou com a presença de colônias no fundo apresentam crescimento fúngico, portanto não ocorreu susceptibilidade dos fungos pelo composto avaliado (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015).

Trata-se de um ensaio eficiente, comum e com boa reprodutibilidade para a triagem inicial de substâncias com potencial clínico como antimicrobianas. Com isso, pode-se selecionar compostos líderes para futuros ensaios em modelos *in vivo* e determinar seus mecanismos de ação – no caso de fungos, se a ação é fungistática ou fungicida, além de elucidar seus prováveis alvos moleculares (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Os resultados do ensaio biológico para as 2-tiazolilhidrazonas estão expressos na **Tabela 15** (p. **96**). Foram considerados ativos os compostos que apresentaram valores de MIC menores que 10 µmol/L, em consonância com os critérios aplicados no **Capítulo 1** (p. **102**) deste trabalho. São apresentados, ao longo da discussão dos resultados, as estruturas químicas e os intervalos de valores de MIC dos produtos testados.

Tabela 15 – Atividades antifúngicas dos derivados 2-tiazolilhidrazonas (**TH2a-h**, **TH3a**, **TH4a-h** e **TH5a**), além dos fármacos de referência Anfotericina B, Caspofungina, Fluconazol e Itraconazol, representadas pelos seus respectivos valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em $\mu\text{mol/L}$ frente à diferentes espécies dos gêneros *Candida*. Destacou-se em negrito os valores de MIC menores que $10 \mu\text{mol/L}$.

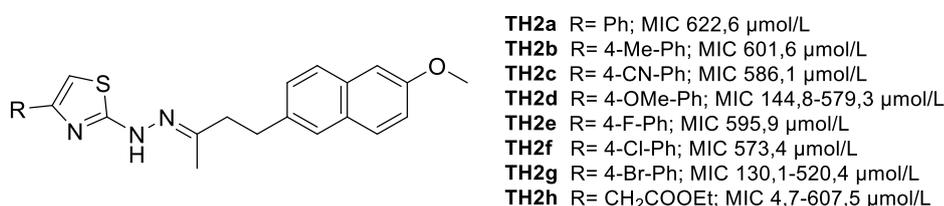
Composto	MIC em $\mu\text{mol/L}$			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. auris</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
TH2a	622,6	622,6	622,6	622,6
TH2b	601,6	601,6	601,6	601,6
TH2c	586,1	586,1	586,1	586,1
TH2d	144,8	144,8	579,3	579,3
TH2e	595,9	595,9	595,9	595,9
TH2f	573,4	573,4	573,4	573,4
TH2g	130,1	130,1	520,4	520,4
TH2h	4,7	9,3	607,5	607,5
TH3a	7,1	7,1	14,2	14,2
TH4a	29,9	29,9	29,9	59,8
TH4b	14,2	14,2	28,4	113,5
TH4c	109,2	13,7	109,2	873,2
TH4d	26,8	13,4	53,6	53,6
TH4e	28,0	7,0	28,0	111,9
TH4f	26,4	6,6	26,4	105,7
TH4g	23,0	23,0	23,0	91,9
TH4h	57,6	57,6	28,8	460,8
TH5a	6,4	3,2	6,4	51,5
Anfotericina B	2,2	4,3	4,3	0,5
Caspofungina	ND	0,1	ND	ND
Fluconazol	1,6	26,1	104,5	0,8
Itraconazol	0,7	0,4	2,8	0,2

ND: não determinado.

Em uma análise conjunta para todos os fungos, os tiazóis derivados da nabumetona (**TH2a-g**) apresentaram as maiores faixas de valores de MIC dentre todas as séries (**Figura 36**, p. 97). Os compostos **TH2a-c** e **TH2e-f** foram inativos frente a todos os fungos, apresentando valores de MIC maiores que $500 \mu\text{mol/L}$. O produto **TH2d** apresentou potência moderada para todas as espécies, com valores de MIC = $114,8 \mu\text{mol/L}$ contra *C. albicans* e *C. auris*. O derivado **TH2h** foi o mais ativo

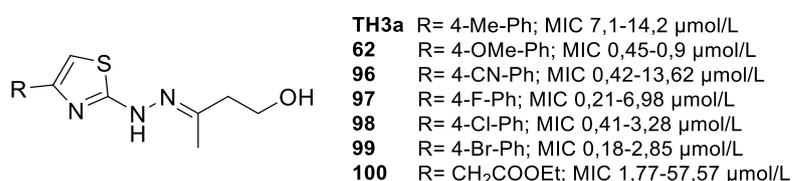
dessa série para as espécies *C. albicans* (MIC = 4,7 $\mu\text{mol/L}$) e *C. auris* (MIC = 9,3 $\mu\text{mol/L}$). Os resultados mostram que apenas o derivado contendo um grupo não aromático ligado ao carbono 4 do anel tiazólico apresentou uma maior potência biológica de amplo espectro, indicando uma influência positiva do grupo alifático para a atividade biológica, em comparação aos compostos derivados da nabumetona contendo um grupo fenila *p*-substituído.

Figura 36 – Estruturas químicas dos produtos **TH2a-h** e suas faixas de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies de *Candida* spp. testadas.



O tiazol **TH3a** apresentou uma alta potência frente à *C. albicans* e *C. auris* (MIC = 7,1 $\mu\text{mol/L}$), enquanto os valores de MIC para *C. krusei* e *C. tropicalis* foram ligeiramente maiores (MIC = 14,2 $\mu\text{mol/L}$). **TH3a** foi também o mais ativo, dentre todas os derivados 2-tiazolilhidrazonas obtidos neste trabalho, frente à *C. tropicalis*. O composto apresentou potência similar a outros tiazóis também derivados da 4-hidroxitubano-2-ona contra os mesmos fungos. Oliveira (2021), em sua dissertação de mestrado, descreveu a obtenção de cinco análogos de **TH3a**, esses contendo os seguintes substituintes ligados ao heterociclo tiazólico na posição 4: 4-cianofenila (**96**), 4-fluorofenila (**97**), 4-clorofenila (**98**), 4-bromofenila (**99**) e 2-etoxi-2-oxoetila (**100**). Além dessas, temos também o derivado **62**, sintetizado por Sá *et al.* (2015) (**Figura 37**, p. 97).

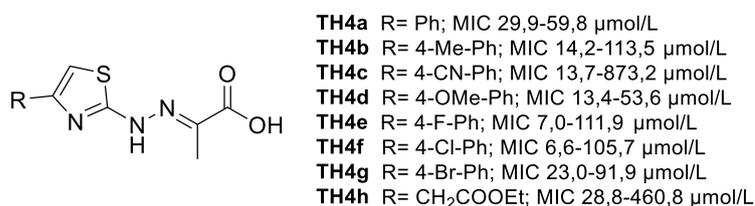
Figura 37 – Estruturas químicas do produto **TH3a** e de seus análogos (**62** e **96-100**), obtidos por Sá *et al.* (2015) e Oliveira (2021), e suas faixas de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies de *Candida* spp. testadas.



O produto **TH3a** apresentou valores de MIC maiores que dos análogos **62** e **96-99** frente a todos os fungos, mas todos foram considerados ativos contra *C. albicans* e *C. auris*. O derivado **TH3a** foi bem menos potente que os análogos citados contra *C. krusei* (o análogo **98** foi o mais ativo, com MIC = 0,41 $\mu\text{mol/L}$) e *C. tropicalis* (o análogo). O tiazol **100** foi bem menos potente que todos os outros análogos ao **TH3a**, indicando que a presença de dois grupos alifáticos em sua estrutura (um ligado ao anel tiazólico em conjunto com uma hidrazona derivada da 4-hidroxiutan-2-ona) favorece menos a atividade biológica em comparação com os derivados benzênicos. Esse resultado se mostrou contrário ao que foi visto para os derivados da nabumetona, em que a presença de um grupo alifático ligado ao heterociclo favoreceu mais a atividade antifúngica (OLIVEIRA, 2021; PEREIRA DE SÁ et al., 2015).

Os derivados do ácido pirúvico (**TH4a-h**) apresentaram uma maior potência do que os derivados da nabumetona (**TH2a-h**), em que a maioria dos valores de MIC foram menores que 100 $\mu\text{mol/L}$ frente à, pelo menos, uma espécie testada (**Figura 38**, p. **98**).

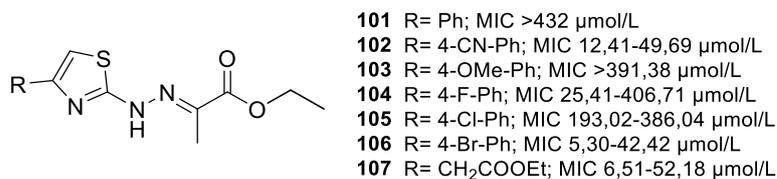
Figura 38 – Estruturas químicas dos produtos **TH4a-h** e suas faixas de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies de *Candida* spp. testadas.



Os tiazóis **TH4e-f** mostraram atividade significativa contra *C. auris*, com valores de MIC menores que 7 $\mu\text{mol/L}$, sendo mais potentes que o fármaco fluconazol (MIC = 26,1 $\mu\text{mol/L}$). Coincidentemente, esses dois derivados contêm um grupo 4-halofenila em sua estrutura. Isso indica que a presença de halogênios ligados a um anel benzênico em combinação com a hidrazona conectada ao grupo ácido carboxílico levou à uma contribuição mais positiva para a atividade biológica. Com exceção do derivado **TH4c**, todos as substâncias dessa série foram mais potentes que o fluconazol contra *C. krusei* (MIC = 104,5 $\mu\text{mol/L}$), mas nenhum valor de MIC foi menor que 10 $\mu\text{mol/L}$.

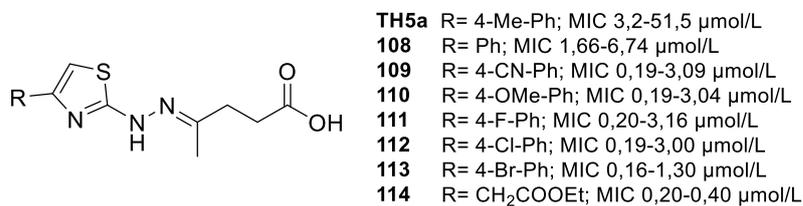
Oliveira (2021) obteve análogos (**101-107**) dessa série a partir do piruvato de etila, um éster correspondente do ácido pirúvico (**Figura 39**, p. **99**). Ao comparar os valores de MIC, nota-se que os produtos **TH4a-h** foram mais ativos que os análogos **101** e **103-105** esterificados frente aos mesmos fungos. Esses resultados destacam que a mudança do substituinte hidrofóbico por um hidrofílico representou uma aparente contribuição positiva para a atividade biológica, mostrando que a estratégia em selecionar substâncias mais polares foi pertinente. Considerando os demais derivados do piruvato de sódio, o produto **106** foi consideravelmente mais ativo contra *C. krusei* (MIC = 5,30 µmol/L) que os análogos TH4a-h, bem como **107** contra *C. tropicalis* (MIC = 10,59 µmol/L) (OLIVEIRA, 2021).

Figura 39 – Estruturas químicas dos produtos **101-107** obtidos por Oliveira (2021) e seus intervalos de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies *C. albicans* (ATCC 18804), *C. auris* (CBS 10913), *C. krusei* (ATCC 202298) e *C. tropicalis* (ATCC 750).



Por fim, o tiazol **TH5a**, derivado do ácido levulínico, foi ativo contra *C. albicans*, *C. auris* e *C. krusei* (MIC = 3,2-6,4 µmol/L), apresentando uma potência maior que os fármacos anfotericina B (contra *C. auris*) e fluconazol (contra *C. auris* e *C. krusei*). Os resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Oliveira (2021). O autor sintetizou e avaliou sete análogos de **TH5a**, contendo os substituintes fenila (**108**), 4-cianofenila (**109**), 4-metoxifenila (**110**), 4-fluorofenila (**111**), 4-clorofenila (**112**), 4-bromofenila (**113**) e 2-etoxi-2-oxoetila (**114**) ligados ao heterociclo na posição 4 (**Figura 40**, p. **100**). Diferentemente do que foi visto para os tiazóis contendo grupo álcool, a presença do grupo alifático ligado ao heterociclo (**114**) levou a uma contribuição muito positiva para a atividade biológica, apesar dos compostos **112** e **113** terem apresentados valores de MIC menores que **114** para alguns fungos, o derivado mostrou amplo espectro e potente atividade para todas as cepas avaliadas (MIC = 0,20-0,40 µmol/L) (OLIVEIRA, 2021).

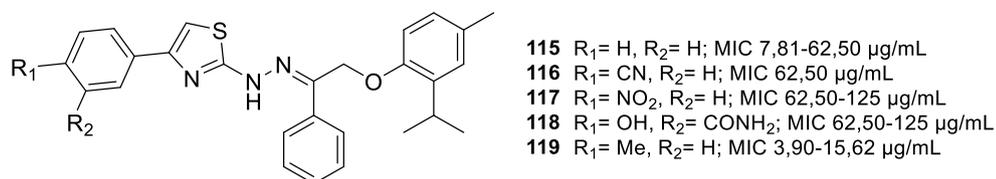
Figura 40 – Estruturas químicas do produto **TH5a** e de seus análogos (**108-114**), obtidos por Oliveira (2021), e seus intervalos de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies de *Candida* spp. testadas.



Em uma análise e discussão geral dos resultados, vê-se que os fungos avaliados foram consideravelmente mais susceptíveis aos tiazóis contendo hidrazonas alifáticas (**TH3a**, **TH4a-h** e **TH5a**) do que os derivados da nabumetona (**TH2a-h**). Esses resultados corroboram as conclusões propostas por Lino *et al.* (2018), Fernandes *et al.* (2022) e Oliveira *et al.* (2022) que, em seus estudos computacionais de relação estrutura-atividade, mostraram que a presença de grupos aromáticos ligados à hidrazona não contribui positivamente para a atividade biológica de derivados tiazólicos, mas sim um grupo alifático e pouco volumoso, devido a restrições estéricas nessa região (FERNANDES *et al.*, 2021; LINO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022). Apesar disso, o derivado **TH2h** apresentou potência similar aos derivados das outras séries para *C. albicans* e *C. auris*, indicando que se ter dois grupos aromáticos conectados ao esqueleto 2-tiazolilhidrazona (um ligado ao heterociclo e outro à hidrazona) também não favorece a atividade biológica, mas que, possivelmente, um grupo aromático e outro alifático contribui de forma positiva, não importando a posição.

O trabalho de Pricopie e colaboradores (2019) ilustra bem essa relação. Os derivados **115-119** (**Figura 41**, p. 101) obtidos pelos autores apresentam duas porções aromáticas ligadas ao esqueleto principal, sendo o grupo hidrazona derivado de uma cetona obtida pela reação de O-alkilação entre o timol e a 2-bromoacetofenona. Os compostos mostraram potência moderada a baixa frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Candida zeylanoides*. Para o derivado **119**, que apresentou os menores valores de MIC da série (3,90-15,62 µg/mL), isso representa um intervalo de 8,56 a 34,94 em µmol/L, sendo quase duas vezes menos ativo que o derivado **TH2h**, o mais ativo deste trabalho contra *C. albicans* (MIC = 4,7 µmol/L) (PRICOPIE *et al.*, 2019).

Figura 41 – Estruturas químicas dos produtos **115-119**, obtidos por Pricopie *et al.* (2019), e seus intervalos de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies *C. albicans* (ATCC 10231), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. zeylanoides* (ATCC 201082).



Verifica-se também que, entre compostos da mesma série, a variação dos substituintes no anel aromático não pareceu ser muito significativa para a atividade biológica. Essa variação foi muito mais expressiva ao comparar a mudança do ligante conectado ao grupo hidrazona, indicando que essa porção da molécula tem uma maior contribuição para modular a atividade biológica dos derivados, conforme discutido anteriormente.

Um outro ponto importante a se ressaltar é que os tiazóis com menor lipofilia e maior solubilidade em água preditas apresentaram as atividades mais potentes contra as espécies avaliadas, indicando que a estratégia aplicada na etapa de planejamento deste trabalho foi eficiente para a atividade anti-*Candida*. Destacam-se os derivados **TH3a** (contendo grupo álcool), **TH4e-f** e **TH5a** (contendo grupo ácido carboxílico), que foram os mais potentes dentre todas as séries sintetizadas. Os estudos de QSAR citados acima destacam a importância positiva de ligantes alifáticos contendo um grupo capaz de realizar interações eletrostáticas para a atividade antifúngica de 2-tiazolilhidrazonas. Os tiazóis contendo um grupo ácido carboxílico são interessantes enquanto compostos líderes, visto que são potencialmente mais solúveis em água, além de poderem formar sais, o que facilita a administração por via oral ou endovenosa.

Por fim, a maioria dos derivados se mostrou potente contra o patógeno emergente *C. auris*, com valores de MIC entre 3,2 e 9,3 µmol/L para os compostos considerados ativos, com valores menores que os fármacos antifúngicos anfotericina B e fluconazol. Isso indica que a combinação desses ligantes se mostrou positivamente importante para a atividade biológica contra essa espécie tão preocupante para a comunidade científica e de saúde pública.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos computacionais foram executados no Laboratório de Modelagem Molecular (Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG), sob supervisão do prof. Dr. Vinícius Gonçalves Maltarollo. Os experimentos de síntese e purificação foram executados no Laboratório de Química Farmacêutica (Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG), sob supervisão da profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira. Os experimentos biológicos foram executados no Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos (Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG), sob colaboração com a profa. Dra. Susana Johann e a aluna de graduação em Farmácia, Sofia Nobre.

3.1 – Curadoria e preparo dos conjuntos de dados

Para construir os modelos de aprendizado de máquina, foram selecionados compostos de artigos da literatura e estruturas químicas indexadas do banco de dados ChEMBL (versão 27, de 20 de maio de 2020) (DAVIES et al., 2015; MENDEZ et al., 2019) com atividade biológica registrada contra as espécies *C. albicans* e *C. neoformans* (conjunto total). As espécies foram selecionadas por apresentarem os maiores números de casos de infecção de seus respectivos gêneros. Foram definidos os critérios a seguir para filtrar as estruturas químicas a serem incluídas no conjunto total: (i) as atividades biológicas dos compostos devem ter sido determinadas pelo mesmo protocolo experimental (ensaio de microdiluição em caldo); (ii) as atividades antifúngicas deverão ser expressas por meio de seus valores de concentração inibitória mínima em $\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{mol/L}$; (iii) os ensaios devem ter sido realizados utilizando cepas de referência das espécies estudadas, desconsiderando isolados clínicos; e (iv) os compostos devem apresentar os núcleos tiazol e/ou hidrazona em suas estruturas. Do ChEMBL, 26.024 entradas para *C. albicans* (ChEMBL366) e 5.169 entradas para *C. neoformans* (ChEMBL365) foram encontradas. Além do mais, foram selecionados onze artigos da literatura que descrevem a síntese e avaliação da atividade antifúngica de 2-tiazolilhidrazonas contra *C. albicans* e *C. neoformans* (ISHITA et al., 2018; KHALIL et al., 2015; ŁĄCZKOWSKI et al., 2016, 2018; LINO et al., 2018; PATIL et al., 2015; PAWAR et al., 2016; PEREIRA DE SÁ et al., 2015;

PRICOPIE et al., 2019; SINGH; BHAT; GAHTORI, 2012). Aplicando os critérios descritos acima, dois conjuntos de dados finais contendo 1.262 moléculas (117 da literatura e 1.145 do ChEMBL) e 305 moléculas (141 da literatura e 164 do ChEMBL) foram compilados para *C. albicans* e *C. neoformans*, respectivamente.

As moléculas foram classificadas de forma binária (0 ou 1) de acordo com seus valores de MIC. Aquelas com MIC > 10 µmol/L foram consideradas inativas e classificadas como dados negativos (0), enquanto as substâncias com MIC ≤ 10 µmol/L foram denominadas ativas e classificadas como dados positivos (1). As estruturas químicas tridimensionais das moléculas estudadas foram construídas no programa Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, 2020). Para fins de normalização das estruturas, definiu-se o isômero *E* como diastereoisômero de referência, visto que ele é o isômero preferencialmente formado para a maioria das 2-tiazolilhidrazonas.

Para todos os dois conjuntos de dados de entrada, uma análise conformacional foi conduzida para obter a conformação mais estável de cada molécula, utilizando o pacote computacional OMEGA 2.5.1.4 (HAWKINS et al., 2010) e o campo de força *Merck Molecular Force Field* (MMFF94) (HALGREN, 1999). Depois, os respectivos estados de ionização de cada molécula foram corrigidos tomando o valor de pH do meio fisiológico (7,4) como referência. Para tanto, aplicou-se o programa fixpka presente no pacote computacional QUACPAC 1.6.3.1 (*OpenEye Scientific Software*, 2016). A etapa anterior de obtenção da conformação mais estável foi aplicada nas estruturas do arquivo de saída após a correção dos estados de ionização.

3.2 – Seleção dos conjuntos de treinamento e de teste

Para a construção dos modelos de aprendizado de máquina, os compostos foram separados em subconjuntos de treinamento (80%) e de teste (20%) para cada conjunto total respectivo ao fungo. A separação foi feita por uma análise multivariada utilizando a técnica de análise de agrupamentos hierárquicos (HCA, do acrônimo em inglês para *hierarchical cluster analysis*), baseando em protocolos utilizados em trabalhos anteriores do grupo (FERNANDES et al., 2021; MALTAROLLO, 2019; VERÍSSIMO et al., 2019). Os dados de entrada foram agrupados de acordo com a média da distância euclidiana. Três espaços químicos foram definidos como critérios para estabelecer os dois subconjuntos da forma mais representativa possível do

conjunto total: (i) propriedades físico-químicas de caráter *drug-like* (massa molar, logaritmo do coeficiente de partição em *n*-octanol/água, número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, número de ligações rotacionáveis, fração de carbonos sp³ e área superficial topológica polar); (ii) diversidade molecular baseada no conjunto de *fingerprints* moleculares do pacote Molecular ACCess System (MACCS) (DURANT et al., 2002); e (iii) dados de atividade biológica de acordo com os valores de MIC. Cada espaço químico gerou um dendrograma de HCA, que foram utilizados como dados de entrada para gerar um dendrograma final que agrupasse aleatoriamente as moléculas nos dois subconjuntos. As análises por HCA e seleção dos conjuntos foi realizada no pacote computacional KNIME 3.4.2 (BERTHOLD et al., 2009).

3.3 – Construção e validação dos modelos de classificação por aprendizado de máquina

Foram calculados e utilizados como dados de entrada de dez conjuntos de *fingerprints* moleculares utilizando o programa PaDEL-descriptor (YAP, 2011): Atom Pair 2D, Atom Pair 2D Count, Extended Fingerprinter, Fingerprinter, Klekota Roth, Klekota Roth Count, MACCS, PubChem, Substructure, e Substructure Count. Os conjuntos de treinamento foram aplicados na construção e validação de modelos de classificação utilizando as seguintes técnicas de aprendizado de máquina (MLT, do inglês *machine learning technique*): árvore de decisão (DT), floresta aleatória (RF), *perceptron* de múltiplas camadas (MLP), número de vizinhos próximos “k” (kNN), *naïve Bayes* (NB), e máquinas de vetores de suporte (SVM). Fez-se então a combinação dos conjuntos de *fingerprints* moleculares e as seis técnicas aplicadas, variando os hiperparâmetros intrínsecos de cada técnica.

Os hiperparâmetros para cada MLT foram definidos e otimizados de acordo o trabalho feito por Maltarollo (2019). As árvores de decisão foram construídas variando a profundidade máxima, que é o número mínimo de registros feitos por cada nó (min_Nrec), de 2 a 100 (2, 4, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 75 e 100). Para as florestas aleatórias, variou-se o número de árvores de decisão em cada nível (max_trees) de 10 a 50 (em intervalos de 10) em combinação com o número de árvores de decisão utilizadas para construir cada modelo de floresta aleatória (n_models), variando de 10.000 a 50.000 (em intervalos de 10.000). Para o MLP, variou-se heurísticamente o

número de camadas (n_layers) de 1 a 5 (em intervalos de 1), e o número de neurônios ocultos por camada ($n_neurons$) de 20 a 100 (em intervalos de 20) para os *perceptrons* de múltiplas camadas. Para o kNN, fez-se a variação do número de vizinhos (k) entre 1 e 27, aplicando apenas os números primos. Para o kNN com peso para a distância entre os vizinhos (kNN_w) utilizou o mesmo conjunto de hiperparâmetros. O hiperparâmetro de probabilidade ($prob$) para *naïve Bayes* foi variado de 0,1 a 5, em intervalos de 0,1. Por fim, as máquinas de vetores de suporte aplicadas no treinamento dos modelos utilizaram três funções de kernel possíveis: gaussiano (RBF), hipertangente (HT) e polinomial (Pol). Para o kernel RBF, variou-se o parâmetro sigma de 0,5 a 300; para HT variou-se os parâmetros kappa e delta de 1 a 50; e, ao fim, fez-se a variação dos parâmetros power, bias e gamma de 1 a 5. Para todos os SVM, o parâmetro C, que diz o quão tolerante o modelo será a possíveis erros no treinamento, funcionando como uma penalização para evitar sobreajustes. C foi variado de 1 a 1.500 (MALTAROLLO, 2019).

Os modelos foram validados de acordo com quatro parâmetros estatísticos: coeficiente de correlação de Matthews (MCC) (**Equação 1**, p. 105), F1-Score (**Equação 2**, p. 106), área sob a curva (AUC) da curva característica de operação do receptor (ROC), e a taxa de verdadeiros positivos (TPR). Os parâmetros foram avaliados por protocolos de validação interna cruzada (cv , do inglês *cross validation*) em quintuplicata (5-fold), que consistiu no algoritmo separar, arbitrariamente, cinco grupos, que correspondem a 20% do conjunto de treinamento, para validação interna do modelo como conjuntos de teste, realizando então a média aritmética dos valores dos parâmetros obtidos nas cinco replicatas de validação (ROY; KAR; DAS, 2015). As métricas de validação externa (ext , do inglês *external validation*) foram obtidas a partir do conjunto de teste inicial.

Equação 1 – Fórmula para calcular o coeficiente de correlação de Mathews (MCC), em que: TP: verdadeiros positivos; FP: falsos positivos; TN: verdadeiros negativos;

FN: falsos negativos.

$$MCC = \frac{(TP \times TN) - (FP \times FN)}{\sqrt{(TP + FP)(TP + FN)(TN + FP)(TN + FN)}}$$

Equação 2 – Fórmula para calcular o parâmetro F1-Score, em que: TP: verdadeiros positivos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos.

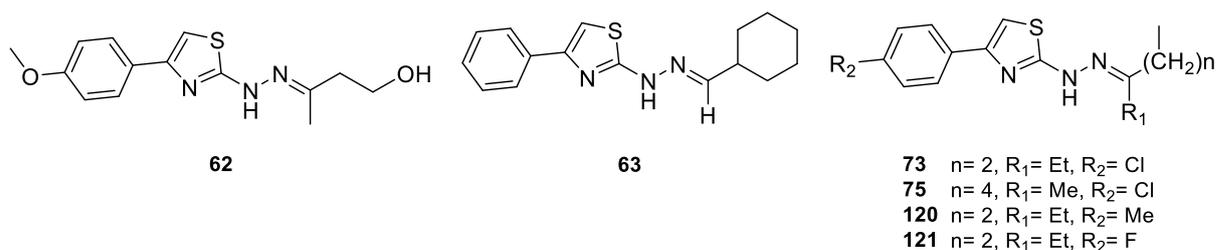
$$\text{F1-Score} = \frac{2\text{TP}}{2\text{TP} - \text{FP} - \text{FN}}$$

3.4 – Construção de quimiotecas virtuais de 2-tiazolilhidrazonas

Duas quimiotecas virtuais *in-house* foram construídas a partir de análises de química combinatória e *scaffold hopping*. A primeira quimioteca foi construída a partir da análise combinatória de reagentes que podem formar tiossemicarbazonas e α -halocetonas. Foram selecionados 802 reagentes que incluíam cetonas e aldeídos alifáticos e 191 alfa-halocetonas, que foram combinados entre si para gerarem 143.352 moléculas únicas. Os reagentes foram selecionados a partir dos bancos de dados de reagentes disponíveis nos sites da Sigma Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-services/selected-structure.html>) e Aldrich Market Select (<https://www.aldrichmarketselect.com>). Os critérios para seleção dos reagentes foram: (i) os reagentes não poderiam ter mais que 350 g/mol e estarem disponíveis para compra na Sigma Aldrich; (ii) selecionou-se álcoois primários e secundários que poderiam ser oxidados a aldeídos e cetonas que não tivessem haletos ou aminas em suas estruturas, evitando possíveis reações indesejadas; (iii) selecionou-se aldeídos e cetonas alifáticas que não tivessem hidrazinas, aminas primárias ou secundárias, ou epóxidos em suas estruturas, evitando possíveis reações indesejadas na formação da tiossemicarbazona; (iv) selecionou-se brometos de alquila que tivessem apenas um grupo aldeído ou cetona que formasse um grupo alfa-halocarbonila, e que não tivessem haletos de acila, ésteres, amidas, tio ésteres, outros grupos haletos de alquila, aminas primárias e secundárias alifáticas, evitando reações indesejadas, e também com apenas um centro quiral e três anéis no máximo. A análise combinatória foi realizada utilizando o programa DataWarrior (Idorsia Pharmaceuticals Ltda.), em colaboração com o prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga (Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto). A segunda quimioteca foi construída aplicando a técnica de *scaffold hopping* baseando-se em bioisósteros. Seis 2-tiazolilhidrazonas sintetizadas por Sá *et al.* (2015) (**62** e **63**), Lino *et al.* (2018) (**73** e **75**) e Oliveira *et al.* (2022) (**120** e **121**) foram selecionadas como representantes na proposição de análogos (**Figura 42**, p. **107**). As

substâncias foram submetidas ao software VBrod (*OpenEye Scientific Software*, 2022) e ao servidor web Xundrug que propõem os bioisósteros a partir de métodos de similaridade química. Ao final, 29.912 substâncias foram propostas pela plataforma VBrod e 12.000 pela plataforma Xundrug. Após a remoção de duplicatas, 30.635 moléculas foram obtidas. A análise por bioisosterismo foi realizada em colaboração com o farmacêutico Ícaro Ferrari Protti (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais). Ao fim, somando as duas quimiotecas, têm-se 175.797 derivados de 2-tiazolilhidrazonas.

Figura 42 – Estruturas químicas das substâncias **62-63**, obtidas por Sá *et al.* (2015), **73** e **75**, obtidas por Lino *et al.* (2018), e **120-121**, obtidas por Oliveira *et al.* (2022), aplicadas na construção da quimioteca virtual de 2-tiazolilhidrazonas por meio da técnica de *scaffold hopping*.



3.5 – Triagem virtual

Os seis modelos com as melhores métricas de validação interna e externa (três para *C. albicans* e três para *C. neoformans*) foram selecionados para a aplicação em um protocolo de triagem virtual (VS) com as duas quimiotecas construídas contendo moléculas com o núcleo 2-tiazolilhidrazona. Os modelos foram novamente treinados e validados aplicando os hiperparâmetros e conjuntos de *fingerprints* moleculares listados na **Tabela 2** (p. **60**) para *C. albicans* e na **Tabela 5** (p. **63**) para *C. neoformans*. Cada modelo classificou e gerou um valor de probabilidade para a predição para todas as substâncias. Calculou-se, para cada substância, a média aritmética das probabilidades das predições. O treinamento e validação dos modelos e aplicação do protocolo de triagem virtual foram realizados no pacote computacional KNIME 3.4.2 (BERTHOLD *et al.*, 2009).

As 2-tiazolilhidrazonas com predição positiva em consenso em todos os modelos foram selecionadas para uma segunda triagem de acordo com os seus

caráteres *drug-like*, disponibilidade de reagentes no laboratório, possibilidade de compra dos reagentes e proposição de análogos estruturais, a fim de selecionar os derivados a serem sintetizados para posterior validação experimental. A predição dos perfis farmacocinéticos das substâncias foi determinada a partir da comparação de propriedades físico-químicas e moleculares calculadas com duas regras empíricas: as regras de Lipinski (Ro5) e as regras de Veber. Utilizando o servidor web ALOGPS 2.1, calculou-se duas propriedades físico-químicas: o logaritmo do coeficiente de partição em *n*-octanol/água (Alog P) e o logaritmo do coeficiente de solubilidade em água (log S), em mol/L, a partir de métodos baseados em índices atômicos eletrotológicos (E-state) aplicados em redes neurais para a predição das propriedades (TETKO et al., 2001; TETKO; TANCHUK, 2002; TETKO; TANCHUK; VILLA, 2001). Outras seis propriedades foram calculadas utilizando o pacote computacional PaDEL-descriptor (YAP, 2011): massa molecular (MW), em Da; logaritmo do coeficiente de partição em *n*-octanol/água (Xlog P) (WANG; FU; LAI, 1997; WANG; GAO; LAI, 2000); número de aceptores (HBA) e doadores (HBD) de ligação de hidrogênio; área superficial topológica polar (TPSA), em Å²; e o número de ligações rotacionáveis (nRotB). As propriedades calculadas foram, então, comparadas com os intervalos de valores permitidos pelas regras de Lipinski (Xlog P ≤ 5, MW ≤ 500 Da, HBA ≤ 10, HBD ≤ 5), com a tolerância de uma violação (LIPINSKI et al., 2001); e de Veber (TPSA ≤ 140 Å², nRotB ≤ 10), sem violações permitidas (VEBER et al., 2002).

3.6 – Métodos gerais para a síntese de derivados 2-tiazolilhidrazonas

3.6.1 – Métodos cromatográficos

Neste trabalho, para acompanhar o prosseguimento das reações, foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas cromatográficas manualmente empacotadas com sílica gel. Para preparação das placas, foram utilizados 8 g de sílica gel G contendo sulfato de cálcio (13% m/m) própria para CCD para cada 19 mL de água destilada. A suspensão homogeneizada foi espalhada em suporte de vidro, formando um filme de 0,50 mm de espessura. Para secagem, as placas foram ativadas em estufa a 100 °C por ao menos 30 minutos. Como critério para avaliar a formação de produto, verificou-se, após a revelação das placas, a existência de uma mancha com fator de retenção diferente do padrão do

material de partida ou igual ao padrão do produto (se disponível), eluidos com solvente ou mistura de solventes adequados, indicados em cada metodologia.

Para revelação das placas, utilizou-se majoritariamente vapor de iodo ou solução metanólica ácida de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH) (1% m/v) e ácido sulfúrico (3% v/v), sem posterior aquecimento em estufa. A solução é preparada solubilizando 100 mg de 2,4-DNFH em 100 mL de MeOH, e adicionando, pouco a pouco, 1 mL de ácido clorídrico P.A. (37% m/m) e 5 mL de ácido sulfúrico P.A. (98% m/m), sob agitação magnética. A solução alcoólica ácida de 2,4-DNFH é um revelador específico para verificar a presença de aldeídos e cetonas em uma amostra.

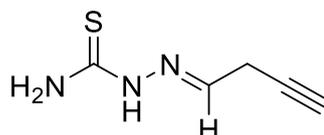
Outro revelador de CCD utilizado foi a solução aquosa de molibdato de amônio (5% m/v), ácido sulfúrico (14% v/v) e sulfato de cério (IV) (1% m/v) (CAM), com posterior aquecimento. A solução reveladora é preparada, inicialmente, solubilizando 25 g de molibdato de amônio em 450 mL de água destilada. À esta mistura, sob banho de gelo e agitação magnética, adicionaram-se 5 g de sulfato de cério (IV), formando uma suspensão turva contendo um precipitado amarelo brilhante. Ao fim, adicionaram-se 50 mL de ácido sulfúrico P.A. (98% m/m) bem lentamente durante 90 minutos, ainda sob agitação magnética.

3.6.2 – Métodos de caracterização

Os pontos ou faixas de fusão não corrigidos em graus Celsius foram determinados em aparelho Microquímica MQAPF-301 do Laboratório de Química Farmacêutica (Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG). Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio-1 e carbono-13 foram obtidos a temperatura de 278,15 K (25 °C) utilizando os espectrômetros Bruker *Avance-III* 400 NanoBay (400 MHz) e *Avance NEO* Ascend (600 MHz) do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) (Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento escalar (J) foram calculadas em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interna e, na ausência do sinal de TMS, utilizou-se o sinal residual do solvente como referência

3.7 – Preparação das tiossemicarbazonas

3.7.1 – Tentativa de síntese da 2-(but-3-in-1-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (TS1)



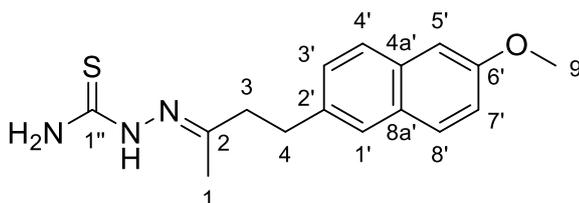
A obtenção da tiossemicarbazona **TS1** seria feita em duas etapas. Inicialmente, era necessário a obtenção do aldeído 3-butin-1-al (**93**) por meio da oxidação do 3-butin-1-ol, reagindo então o produto carbonílico com a tiossemicarbazida, obtendo **TS1**.

Tentativa 1: Em um balão de fundo redondo de 50 mL, adicionou-se uma suspensão de 2 g (0,013 mol) de sulfato de manganês (II) (MnSO_4) em 30 mL de água destilada. Em seguida, 2 g (0,013 mol) de permanganato de potássio (KMnO_4) foram adicionados ao balão. A mistura foi mantida sob aquecimento a 60 °C e agitação magnética por duas horas, em que se verificou a formação de um sólido preto, que seria o óxido de manganês (IV) (MnO_2), agente oxidante dessa síntese. O sólido foi filtrado a vácuo em funil de Büchner e lavado com água destilada até remover o excesso de KMnO_4 (o filtrado deve ficar incolor). O sólido foi secado em estufa a 90 °C por 24 horas, sendo depois triturado em almofariz de porcelana utilizando um pistilo e, então, armazenado em dessecador. Para a síntese do aldeído, 7 mL de tetraidrofurano foram transferidos para um balão de fundo redondo de 50 mL. Em seguida, 100 mg (111,2 μL , 1,427 mmol, 1 eq.) de 3-butin-1-ol e 744,4 mg (8,562 mmol, 6 eq.) de óxido de manganês (IV) também foram adicionados ao balão. A mistura reacional foi mantida sob aquecimento a 60 °C, sob agitação magnética, e acompanhada por CCD (hex:AcOEt 2:8 como eluente; vapor de iodo, CAM e 2,4-DNFH como reveladores). Não foi observada uma mancha correspondente ao álcool de partida, então manteve-se a reação por quatro horas. Fez-se uma filtração a vácuo em funil de Büchner e lavou-se com tetraidrofurano, mas uma parte do resíduo de manganês passou para o filtrado. Portanto, fez-se uma nova filtração do filtrado em uma coluna de vidro para cromatografia com cerca de 5 g de terra diatomácea (Celite

545) para retenção do resíduo de manganês, eluindo com diclorometano e acetato de etila. O segundo filtrado foi recolhido em um béquer e o conteúdo foi transferido para um balão de fundo redondo de 50 mL. O solvente foi retirado em evaporador rotatório, obtendo um óleo denso esverdeado. A análise por CCD do resíduo obtido após revelação com solução de 2,4-DNFH, confirmou a presença de aldeído. Essa reação foi realizada três vezes, obtendo-se rendimentos de 6 (6,1 mg) e 7% de rendimento (6,5 mg) (duas vezes). Para nenhuma das reações a quantidade obtida foi suficiente para caracterização.

Tentativa 2: Adicionou-se em um almofariz de porcelana 431,1 mg (4 mmol, 2 eq.) de clorocromato de piridina (PCC) e 2,2 g de óxido de alumínio (proporção de uma parte de PCC para cinco partes de Al_2O_3). A mistura sólida foi homogeneizada com o auxílio de um pistilo. Após homogeneização, 140,2 mg (154,3 μL , 2 mmol, 1 eq.) de 3-butin-1-ol foram adicionados ao almofariz e a mistura sólida foi homogeneizada por maceração ininterruptamente por dez minutos, gotejando a cada minuto cinco gotas de *tert*-butanol (totalizando 50 gotas). Ao fim da reação, 20 mL de éter etílico foram transferidos para o almofariz e a suspensão foi filtrada em coluna de vidro para cromatografia contendo 5 g de terra diatomácea (Celite 545), para retenção da alumina e PCC e lavou-se com mais 20 mL de éter etílico. O filtrado foi recolhido em um béquer e o conteúdo foi transferido para um balão de fundo redondo de 50 mL. O solvente foi reduzido em evaporador rotatório, obtendo um óleo denso esverdeado (2 mg) com 1% de rendimento. A análise por CCD do resíduo obtido após revelação com solução de 2,4-DNFH, confirmou a presença de aldeído. A quantidade obtida não foi suficiente para caracterização.

3.7.2 – Síntese da (*E*)-2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (TS2)



Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 501,5 mg (2,197 mmol, 1 eq.) de 4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ona (nabumetona) e 200,2 mg (2,197 mmol, 1 eq.) de tiossemicarbazida em 10 mL de etanol. Em seguida, foram adicionadas cinco gotas de ácido acético glacial, a fim de manter o valor de pH do meio reacional entre 4 e 5. O balão foi conectado a um condensador de bolas e a reação foi mantida sob agitação magnética e aquecimento a 80 °C. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD (AcOEt 100% e cinco gotas de AcOH como eluente; vapor de iodo como revelador). Após quatro horas, verificou-se o consumo total do material de partida. Finalizada a reação, o solvente foi removido em evaporador rotatório e 7 mL de éter etílico foram adicionados ao balão, agitando a mistura. O balão com a suspensão foi estocado na geladeira a -20 °C por uma hora até que o precipitado decantasse totalmente no fundo do balão. O sobrenadante foi recolhido em um frasco de penicilina, e o precipitado em outro. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido branco (653,0 mg), com 99% de rendimento. O produto foi posteriormente caracterizado por sua faixa de fusão e espectros de RMN.

Aspecto físico: sólido branco opaco.

Fórmula molecular: C₁₆H₁₉N₃OS.

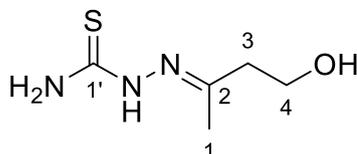
Massa molar: 301,41 g/mol.

Faixa de fusão: 186-187 °C (196-197 °C por (TAHA; RAAUF; ALI, 2019)).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 9,96 (s; 1H; C=N–NH–); 8,04 (s; 1H; –NH₂); 7,74 (m; 2H; H-4' e H-8'); 7,64 (s; 1H; H-1'); 7,37 (dd; *J*_{3',4'} = 8,4 e *J*_{3',1'} = 1,7 Hz; 1H; H-3'); 7,26 (d; *J*_{5',7'} = 2,5 Hz; 1H; H-5'); 7,12 (dd; *J*_{7',8'} = 8,9 e *J*_{7',5'} = 2,5 Hz; 1H; H-7'); 3,85 (s; 3H; Me-9'); 2,97 (dd; *J*_{4,3} = 9,1 e 6,6 Hz; 2H; H-4); 2,61 (dd; *J*_{3,4} = 9,1 e 6,6 Hz; 2H; H-3); 1,94 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 178,6 (C-1'', C=S); 156,8 (C-6', –C–OCH₃); 153,6 (C-2, C=N); 136,6 (C-2', C); 132,7 (C-4a', C); 128,8 (C-8', CH); 128,6 (C-8a', C); 127,7 (C-3', CH); 126,6 (C-4', CH); 126,0 (C-1', CH); 118,5 (C-7', CH), 105,8 (C-5', CH); 55,1 (C-9', O–CH₃); 39,7 (C-3, CH₂); 31,5 (C-4, CH₂); 16,7 (C-1, CH₃).

3.7.3 – Síntese do (*E/Z*)-2-(4-hidroxibutan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (TS3)



A preparação do produto seguiu o procedimento descrito na **Seção 3.7.2** deste **Capítulo 1** (p. 111) para a tiossemicarbazona **TS2**, em que se reagiu 700,0 mg (7,940 mmol, 1 eq.) de 4-hidroxibutan-2-ona e 723,7 mg (7,940 mmol, 1 eq.) de tiossemicarbazida. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido amarelado (1,247 g), com 97% de rendimento, como uma mistura de diastereoisômeros.

Aspecto físico: sólido amarelado opaco.

Fórmula molecular: C₅H₁₁N₃OS.

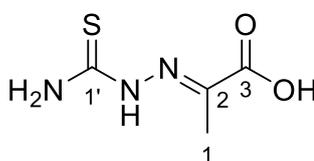
Massa molar: 161,23 g/mol.

Faixa de fusão: 95,6-99 °C (142-145 °C por PRESCOTT, 1967).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): (isômero *E*) 9,91 (s; 1H; C=N-NH-); 8,03 (s; 1H; -NH₂); 7,50 (s; 1H; -NH₂); 4,54 (t; $J_{OH,4} = 5,0$ Hz; 1H; -OH); 3,62 (q; $J_{4,3/OH} = 6,0$ Hz; 2H; H-4); 2,36 (t; $J_{3,4} = 6,5$ Hz, 2H, H-3); 1,90 (s; 3H; Me-1). (isômero *Z*) 10,09 (s; 1H; =N-NH-); 7,53 (s; 0,5H; -NH₂); 5,18 (t; $J_{OH,4} = 4,8$ Hz; 1H; -OH); 3,35 (s; 2H; H-4); 2,47 (t; $J_{3,4} = 5,8$ Hz, 2H, H-3); 1,96 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): (isômero *E*) 178,5 (C-1', C=S); 152,9 (C-2, C=N); 58,1 (C-4, CH₂); 41,6 (C-3, CH₂); 16,7 (C-1, CH₃). (isômero *Z*) 178,5 (C-1', C=S); 153,9 (C-2, C=N); 57,9 (C-4, CH₂); 34,3 (C-3, CH₂); 23,5 (C-1, CH₃).

3.7.4 – Síntese do ácido (*E*)-2-(2-carbamotioilhidrazineilideno)propanoico (TS4)



Preparo do cloridrato de tiossemicarbazida: Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 4 g (0,044 mol) de tiossemicarbazida e 80 mL de etanol absoluto, mantendo a suspensão sob agitação magnética. Em seguida, adicionou-se, gota a gota, 4 mL de ácido clorídrico P.A. (37% m/m) e a suspensão foi mantida sob agitação por 24 horas. O precipitado foi recolhido por filtração simples e lavado com etanol absoluto, obtendo 4,063 g de cloridrato de tiossemicarbazida, como um sólido branco cristalino. O composto foi caracterizado por sua faixa de fusão (171-172 °C; 190-191 °C por SUGII, 1959).

Tentativa 1: Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 580,3 mg (4,548 mmol, 1 eq.) de cloridrato de tiossemicarbazida, previamente sintetizado, solubilizados em 3 mL de água destilada, mantendo-se a solução sob agitação magnética a temperatura ambiente. Em seguida, 500,5 mg (4,548 mmol, 1 eq.) de piruvato de sódio solubilizados em 5 mL de água destilada foram adicionados, lentamente, ao balão. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD (Hex:AcOEt 2:8 e três gotas de AcOH como eluente; vapor de iodo e solução de 2,4-DNFH como reveladores). A reação foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente. Após quatro horas, verificou-se o consumo total do material de partida e formação de um precipitado no meio reacional.

Tentativa 2: Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 1,806 g (14,157 mmol, 1 eq.) de cloridrato de tiossemicarbazida, previamente sintetizado, solubilizados em 7 mL de água destilada, mantendo a solução sob agitação magnética e aquecimento a 50 °C. Em seguida, 1,558 g de piruvato de sódio (14,157 mmol, 1 eq.) solubilizados em 8 mL de água destilada foram adicionados, lentamente, ao balão. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD (Hex:AcOEt 2:8 e três gotas de AcOH como eluente; vapor de iodo e solução de 2,4-DNFH como reveladores). A reação foi mantida sob agitação magnética e aquecimento. Após três horas, verificou-se o consumo total do material de partida e formação de um precipitado no meio reacional.

Elaboração: Em ambas as tentativas, o precipitado foi recolhido por filtração a vácuo e lavado com água destilada gelada, sendo posteriormente mantido em dessecador para secagem. Por último, os sólidos obtidos nas duas reações foram transferidos

para um balão de fundo redondo de 50 mL e lavados com éter etílico (7 para o sólido da Tentativa 1 e 10 mL para o sólido da Tentativa 2), agitando a mistura. Os balões com as misturas foram estocados na geladeira a -20 °C por uma hora até que os sobrenadantes foram recolhidos. Após elaboração obteve-se um sólido bege com 49% de rendimento (398,4 mg) na primeira tentativa, e 61% de rendimento (1,532 g) na segunda tentativa. Os produtos obtidos foram posteriormente caracterizados por suas faixas de fusão e espectros de RMN.

Aspecto físico: sólido bege opaco.

Fórmula molecular: C₄H₁₆N₃O₂S.

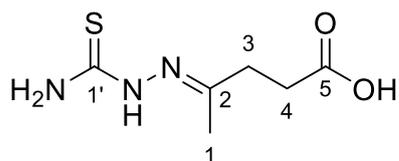
Massa molar: 178,22 g/mol.

Faixa de fusão: 190 °C (188-190 °C por WIECEK et al., 2009).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 12,09 (s; 1H; -COOH); 10,68 (s; 1H; C=N-NH-); 8,69 (1H; -NH₂); 8,61 (1H; -NH₂); 2,07 (s; 3H, -CH₃).

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 180,3 (C-1', C=S); 165,3 (C-3, -COOH); 139,1 (C-2, C=N); 12,2 (C-1, CH₃).

3.7.5 – Síntese do ácido (*E*)-4-(2-carbamotioilhidrazineilideno)pentanoico (TS5)



A preparação do produto seguiu o procedimento descrito na **Seção 3.7.2** deste **Capítulo 1** (p. 111) para a tiossemicarbazona **TS2**, em que reagiu-se 700,0 mg (6,028 mmol, 1 eq.) de ácido 2-oxopentanoico (ácido levulínico) e 549,4 mg (6,028 mmol, 1 eq.) de tiossemicarbazida. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido branco (1,174 g), com rendimento quantitativo.

Aspecto físico: sólido branco opaco.

Fórmula molecular: C₆H₁₁N₃O₂S.

Massa molar: 189,23 g/mol.

Faixa de fusão: 177,3-177,5 °C (182,5-183,4 °C por OLIVEIRA, 2021).

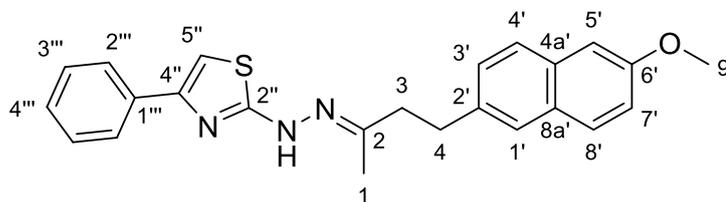
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 12,13 (s; 1H, $-\text{COOH}$); 10,09 (s; 1H; $\text{C}=\text{N}-\text{NH}-$); 8,14 (s; 1H; $-\text{NH}_2$); 7,37 (s; 1H; $-\text{NH}_2$); 2,49 (m; 4H; H-3 e H-4); 1,93 (s; 3H; H-1).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 178,8 (C-1', $\text{C}=\text{S}$); 174,6 (C-5; $-\text{COOH}$); 33,3 (C-3; CH_2); 30,1 (C-4, CH_2); 17,1 (C-1; CH_3).

3.8 – Preparação das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo aromático

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 1 equivalente molar da tiossemicarbazona correspondente e 1 equivalente molar de α -halocetona em 5 mL de 2-propanol (isopropanol). O balão foi conectado a um condensador de bolas e a reação foi mantida sob agitação e aquecimento a 80 °C. Após duas horas, verificou-se o consumo total do material de partida. Finalizada a reação, o solvente foi removido em evaporador rotatório e cerca de 20 g de gelo picado e 10 mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio 10% m/v foram adicionados ao balão. Quando o gelo derreteu totalmente, a mistura foi transferida para um funil de separação de 125 mL e extraída com acetato de etila (3 porções de 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas em erlenmeyer de 125 mL e secou-se com sulfato de sódio anidro. O conteúdo foi transferido para um balão de fundo redondo de 50 mL (em duas partes de 30 mL) e o solvente foi removido em evaporador rotatório. Finalizada a reação, o solvente foi removido em evaporador rotatório e 7 mL de éter etílico foram adicionados ao balão, agitando a mistura. O balão com a suspensão foi estocado na geladeira a -20 °C por uma hora até que o precipitado decantasse totalmente no fundo do balão. O sobrenadante foi recolhido em um frasco de penicilina, e o precipitado em outro. Análise por CCD comparando o sólido precipitado e o sobrenadante foi realizada para verificar a pureza do produto (Hex:AcOEt 1:9 e três gotas de AcOH como eluente; vapor de iodo e solução de CAM como reveladores). Por fim, os produtos obtidos foram posteriormente caracterizados por suas faixas de fusão e espectros de RMN.

3.8.1 – Síntese do (*E*)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)-4-feniltiazol (TH2a)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.8** deste **Capítulo 1** (p. **116**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,166 mmol) de (*E*)-2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (**TS2**) e 33,1 mg (0,166 mmol) de 2-bromoacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido róseo (48,3 mg), com 72% de rendimento.

Aspecto físico: sólido róseo cristalino.

Fórmula molecular: C₂₄H₂₃N₃OS.

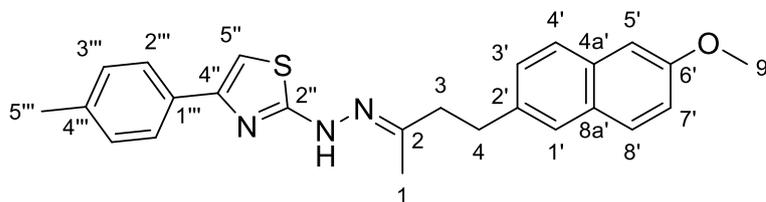
Massa molar: 401,52 g/mol.

Faixa de fusão: 190,5-191,5 °C.

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 10,70 (s; 1H; C=N-NH-); 7,85 (m; 2H; H-2''); 7,74 (m; 1H; H-4' e H-8'); 7,69 (s; 1H; H-1'); 7,40 (m; 3H; H-3', H-3'''); 7,29 (m; 1H; H-4'''); 7,26 (d; *J*_{5',7'} = 2,7 Hz; 1H; H-5'); 7,23 (s; 1H; H-5''); 7,12 (dd; *J*_{7',8'} = 8,9 Hz e *J*_{7',5'} = 2,6 Hz; 1H; H-7'); 3,85 (s; 3H; Me-9'); 2,98 (t; *J*_{4,3} = 7,8 Hz; 2H; H-4); 2,64 (t; *J*_{3,4} = 7,8 Hz; 2H; H-3); 1,97 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 170,1 (C-2'', -N=C-S-); 156,8 (C-6', C-OCH₃); 151,6 (C-2, -C=N); 150,3 (C-4'', -N=C-CH-); 136,5 (C-2', C); 135,0 (C-1''', C); 132,8 (C-4a', C); 128,8 (C-8', CH); 128,6 (C-3''', CH); 128,6 (C-8a', C); 127,8 (C-3', CH); 127,4 (C-4''', C); 126,6 (C-4', CH); 126,1 (C-1', CH); 125,5 (C-2''', CH); 118,5 (C-7', CH); 105,8 (C-5', CH); 103,4 (C-5'', -C=CH-S-); 55,1 (C-9', O-CH₃); 39,6 (C-3, CH₂); 31,7 (C-4, CH₂); 16,8 (C-1, CH₃).

3.8.2 – Síntese do (*E*)-4-(4-metilfenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2b)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.8** deste **Capítulo 1** (p. **116**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,166 mmol) de (*E*)-2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (**TS2**) e 35,4 mg (0,166 mmol) de 2-bromo-4'-metilacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido alaranjado (45,0 mg), com 65% de rendimento.

Aspecto físico: sólido alaranjado cristalino.

Fórmula molecular: C₂₅H₂₅N₃OS.

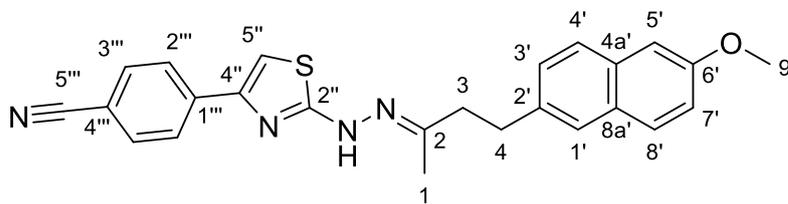
Massa molar: 415,55 g/mol.

Faixa de fusão: 204,5-206,5 °C.

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 10,66 (s; 1H; =N-NH-); 7,73 (m; 4H; H-4', H-8', H-2''' e H-6'''); 7,69 (d; *J*_{1',3'} = 1,8 Hz; 1H; H-1'); 7,40 (dd; *J*_{3',4'} = 8,4 Hz e *J*_{3',1'} = 1,8 Hz; 1H; H-3'); 7,26 (d; *J*_{5',7'} = 2,6 Hz; 1H; H-5'); 7,19 (d; *J* = 7,9 Hz; 2H; H-3''' e H-5'''); 7,14 (s; 1H; H-5''); 7,12 (dd; *J*_{7',8'} = 8,9 Hz e *J*_{7',5'} = 2,6 Hz; 1H; H-7'); 3,85 (s; 3H; Me-9'); 2,98 (dd; *J*_{4,3} = 8,5 e 7,0 Hz; 2H; H-4); 2,64 (dd; *J*_{3,4} = 8,5 e 7,0 Hz; 2H; H-3); 2,31 (s; 3H; Me-5'''); 1,96 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 170,0 (C-2'', -N=C-S-); 156,8 (C-6', C-OCH₃); 151,4 (C-2, -C=N); 150,5 (C-4'', -N-C=CH-); 136,5 (C-2', C); 132,8 (C-4a', C); 129,1 (C-3''', CH); 128,8 (C-8', CH); 128,6 (C-8a', C); 127,8 (C-3', CH); 126,6 (C-4', CH); 126,1 (C-1', CH); 125,4 (C-2''', CH); 118,5 (C-7', CH), 105,8 (C-5', CH); 102,5 (C-5'', CH); 55,1 (C-9', -O-CH₃); 39,6 (C-3, CH₂); 31,7 (C-4, CH₂); 20,8 (C-5''', CH₃); 16,8 (C-1, CH₃).

3.8.3 – Síntese do (*E*)-4-(4-cianofenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2c)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.8** deste **Capítulo 1** (p. **116**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,166 mmol) de (*E*)-2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (**TS2**) e 37,2 mg (0,166 mmol) de 2-bromo-4'-cianoacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido branco (57,5 mg), com 81% de rendimento.

Aspecto físico: sólido branco opaco.

Fórmula molecular: C₂₅H₂₂N₄OS.

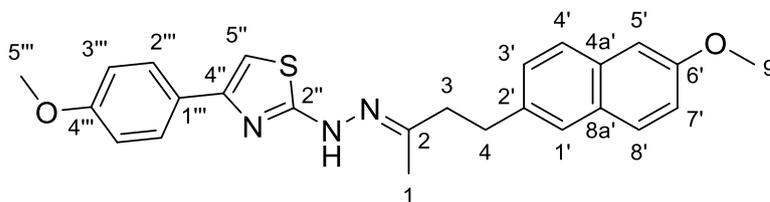
Massa molar: 426,53 g/mol.

Faixa de fusão: 197-197,5 °C.

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 10,81 (s; 1H; =N-NH-); 8,02 (d; $J_{2''',3'''} = 8,1$ Hz; 2H; H-2'''); 7,84 (d; $J_{3''',2'''} = 8,1$ Hz; 2H; H-3'''); 7,73 (m; 2H; H-4' e H-8'); 7,68 (s; 1H; H-1'); 7,55 (s; 1H; H-5''); 7,40 (d; $J_{3',4'} = 8,3$; 1H; H-3'); 7,26 (d; $J_{5',7'} = 2,5$ Hz; 1H; H-5'); 7,12 (dd; $J_{7',8'} = 8,9$ Hz e $J_{7',5'} = 2,5$ Hz; 1H; H-7'); 3,85 (s; 3H; Me-9'); 2,98 (t; $J_{4,3} = 7,8$ Hz; 2H; H-4); 2,64 (t; $J_{3,4} = 7,8$ Hz; 2H; H-3); 1,97 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 170,4 (C-2'', -N=C-S-); 156,8 (C-6', C-OCH₃); 152,1 (C-2, -C=N); 148,8 (C-4'', -N=C-CH-); 139,1 (C-1''', C); 136,5 (C-2', C); 132,7 (C-4a', C); 132,7 (C-3''', CH); 128,8 (C-8', CH); 128,6 (C-8a', C); 127,8 (C-3', CH); 126,6 (C-4', CH); 126,1 (C-1', CH); 126,1 (C-2''', CH); 119,0 (C-5''', -C≡N); 118,5 (C-7', CH); 109,4 (C-4''', C); 107,4 (C-5'', CH); 105,8 (C-5', CH); 55,1 (C-9', -O-CH₃); 39,5 (C-3, CH₂); 31,7 (C-4, CH₂); 16,9 (C-1, CH₃).

3.8.4 – Síntese do (*E*)-4-(4-metoxifenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2d)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.8** deste **Capítulo 1** (p. **116**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,166 mmol) de (*E*)-2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (**TS2**) e 38 mg (0,166 mmol) de 2-bromo-4'-metoxiacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido amarelo (45,5 mg), com 64% de rendimento.

Aspecto físico: sólido amarelo opaco.

Fórmula molecular: C₂₅H₂₅N₃O₂S.

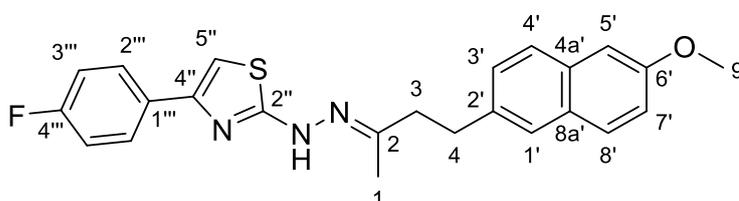
Massa molar: 431,55 g/mol.

Faixa de fusão: 146-148 °C.

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 8,11 (m; 2H; H-2'''); 3,85 (s; 6H; Me-9' e Me-5'''); 2,98 (m; 2H; H-4); 2,64 (m; 2H; H-3); 1,96 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 156,8 (C-6', C-OCH₃); 136,5 (C-2', C); 132,7 (C-4a', C); 132,1 (C-2''', CH); 128,8 (C-8', CH); 128,6 (C-8a', C); 127,8 (C-3', CH); 126,6 (C-4', CH); 126,1 (C-1', CH); 118,5 (C-7', CH), 105,8 (C-5', CH); 55,1 (C-9', -O-CH₃); 39,6 (C-3, CH₂); 31,6 (C-4, CH₂); 16,8 (C-1, CH₃).

3.8.5 – Síntese do (*E*)-4-(4-fluorofenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2e)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.8** deste **Capítulo 1** (p. 116), em que reagiu-se 50,0 mg (0,166 mmol) de (*E*)-2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (**TS2**) e 36,0 mg (0,166 mmol) de 2-bromo-4'-fluoroacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido róseo (57,5 mg), com 83% de rendimento.

Aspecto físico: sólido róseo cristalino.

Fórmula molecular: C₂₄H₂₂FN₃OS.

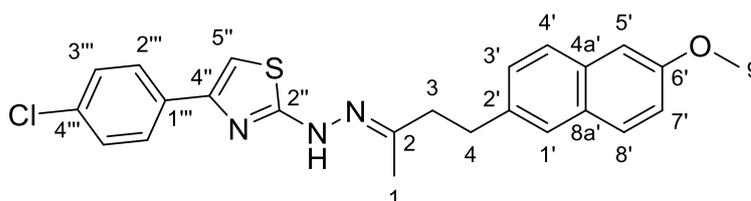
Massa molar: 419,51 g/mol.

Faixa de fusão: 189,5-190 °C.

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 10,71 (s; 1H; C=N-NH-); 7,88 (m; 2H; H-2'''); 7,74 (s; 1H; H-4'); 7,73 (s; 1H; H-8'); 7,69 (s; 1H; H-1'); 7,40 (dd; *J*_{3',4'} = 8,3 Hz e *J*_{3',1'} = 1,8 Hz; 1H; H-3'); 7,26 (d; *J* = 2,5 Hz; 1H; H-5'); 7,22 (m; 3H; H-5'' e H-3'''); 7,12 (dd; *J* = 8,9 e 2,5 Hz; 1H; H-7'); 3,85 (s; 3H; Me-9'); 2,98 (t; *J* = 7,8 Hz; 2H; H-4); 2,64 (t; *J* = 7,8 Hz; 2H; H-3); 1,97 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 170,2 (C-2'', -N=C-S-); 161,5 (d; *J*_{4''',F} = 244 Hz; C-4''', C); 156,8 (C-6', C-OCH₃); 151,6 (C-2, -C=N); 149,4 (C-4'', -N-C=CH-); 136,5 (C-2', C); 132,7 (C-4a', C); 131,6 (C-1''', C); 128,8 (C-8', CH); 128,6 (C-8a', C); 127,8 (C-3', CH); 127,4 (d; *J*_{2''',F} = 8 Hz; C-2''', CH); 126,6 (C-4', CH); 126,1 (C-1', CH); 118,4 (C-7', CH), 115,4 (d; *J*_{4''',F} = 22 Hz; C-3''', CH); 105,8 (C-5', CH); 103,2 (C-5'', -C=CH-S-); 55,1 (C-9', O-CH₃); 39,6 (C-3, CH₂); 31,7 (C-4, CH₂); 16,8 (C-1, CH₃).

3.8.6 – Síntese do (*E*)-4-(4-clorofenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2f)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.8** deste **Capítulo 1** (p. 116), em que reagiu-se 50,0 mg (0,166 mmol) de (*E*)-2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (**TS2**) e 38,8 mg (0,166

mmol) de 2-bromo-4'-cloroacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido bege (52,1 mg), com 72% de rendimento.

Aspecto físico: sólido bege opaco.

Fórmula molecular: C₂₄H₂₂ClN₃OS.

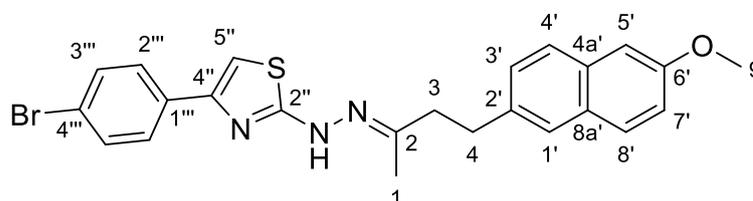
Massa molar: 435,97 g/mol.

Faixa de fusão: 213,2-213,8 °C.

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 10,72 (s; 1H; C=N-NH-); 7,86 (d; *J*_{2''',3'''} = 8,6 Hz; 2H; H-2'''); 7,73 (m; 2H; H-4' e H-8'); 7,69 (s; 1H; H-1'); 7,44 (d; *J*_{3''',2'''} = 8,6 Hz; 2H; H-2'''); 7,40 (dd; *J*_{3',4'} = 8,3 Hz e *J*_{3',1'} = 1,8 Hz; 1H; H-3'); 7,30 (s; 1H; H-5''); 7,26 (d; *J*_{5',7'} = 2,5 Hz; 1H; H-5'); 7,12 (dd; *J* = 8,9 e 2,5 Hz; 1H; H-7'); 3,85 (s; 3H; Me-9'); 2,98 (dd; *J*_{4,3} = 8,7 e 6,8 Hz; 2H; H-4); 2,64 (dd; *J*_{3,4} = 8,7 e 6,8 Hz; 2H; H-3); 1,96 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 170,2 (C-2'', -N=C-S-); 156,8 (C-6', C-OCH₃); 151,7 (C-2, -C=N); 149,2 (C-4'', -N-C=CH-); 136,5 (C-2', C); 133,8 (C-4''', C); 132,7 (C-4a', C); 131,7 (C-1''', C); 128,8 (C-8', CH); 128,6 (C-8a', C); 127,8 (C-3', CH); 127,2 (C-2''', CH); 126,6 (C-4', CH); 126,1 (C-1', CH); 118,5 (C-7', CH), 128,6 (C-3''', CH); 105,8 (C-5', CH); 104,2 (C-5'', -C=CH-S-); 55,1 (C-9', O-CH₃); 39,5 (C-3, CH₂); 31,7 (C-4, CH₂); 16,8 (C-1, CH₃).

3.8.7 – Síntese do (*E*)-4-(4-bromofenil)-2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol (TH2g)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito **Seção 3.8** deste **Capítulo 1** (p. **116**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,166 mmol) de (*E*)-2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (**TS2**) e 46,1 mg (0,166 mmol) de 2,4'-dibromoacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido branco (62,5 mg), com 78% de rendimento.

Aspecto físico: sólido branco opaco.

Fórmula molecular: C₂₄H₂₂BrN₃OS.

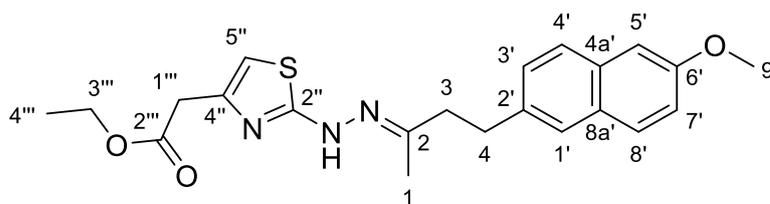
Massa molar: 480,42 g/mol.

Faixa de fusão: 217-218 °C.

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 10,72 (s; 1H; C=N-NH-); 7,79 (d; $J_{2''',3'''} = 7,0$ Hz; 2H; H-2'''); 7,73 (m; 2H; H-4' e H-8'); 7,69 (s; 1H; H-1'); 7,58 (d; $J_{3''',2'''} = 7,0$ Hz; 2H; H-2'''); 7,40 (m; 1H; H-3'); 7,31 (s; 1H; H-5''); 7,26 (s; 1H; H-5'); 7,12 (m; $J = 8,9$ e $2,5$ Hz; 1H; H-7'); 3,85 (s; 3H; Me-9'); 2,98 (m; 2H; H-4); 2,64 (m; 2H; H-3); 1,96 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 170,3 (C-2'', -N=C-S-); 156,8 (C-6', C-OCH₃); 151,8 (C-2, -C=N); 149,3 (C-4'', -N-C=CH-); 136,5 (C-2', C); 134,2 (C-1''', C); 132,8 (C-4a', C); 131,5 (C-3''', CH); 128,8 (C-8', CH); 128,6 (C-8a', C); 127,8 (C-3', CH); 127,5 (C-2''', CH); 126,6 (C-4', CH); 126,1 (C-1', CH); 120,2 (C-4''', C); 118,5 (C-7', CH), 105,8 (C-5', CH); 104,3 (C-5'', -C=CH-S-); 55,1 (C-9', O-C₂H₅); 39,5 (C-3, CH₂); 31,7 (C-4, CH₂); 16,8 (C-1, CH₃).

3.8.8 – Síntese do (*E*)-2-(2-(2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazinil)tiazol-4-il)etanoato de etila (TH2h)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.8** deste **Capítulo 1** (p. **116**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,166 mmol) de (*E*)-2-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)butan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (**TS2**) e 27,3 mg (24 μ L, 0,166 mmol) de 4-cloroacetoacetato de etila. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido amarelado (28,2 mg), com 41% de rendimento.

Aspecto físico: sólido amarelado opaco.

Fórmula molecular: C₂₂H₂₅N₃O₃S.

Massa molar: 411,52 g/mol.

Faixa de fusão: 102-103 °C.

RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 10,58 (s; 1H; C=N-NH-); 7,73 (m; 2H; H-4' e H-8'); 7,68 (s; 1H; H-1'); 7,38 (dd; $J_{3',4'} = 8,4$ Hz e $J_{3',1'} = 1,8$ Hz; 1H; H-3'); 7,26 (d; $J_{5',7'} = 2,5$ Hz; 1H; H-5'); 7,12 (dd; $J_{7',8'} = 8,9$ Hz e $J_{7',5'} = 2,5$ Hz; 1H; H-7'); 6,54 (s; 1H; H-5''); 4,07 (q; $J_{3''',4'''} = 7,1$ Hz; 2H; H-3'''); 3,85 (s; 3H; Me-9'); 3,54 (s; 2H; H-1'''); 2,95 (t; $J_{4,3} = 7,8$ Hz; 2H; H-4); 2,61 (t; $J_{3,4} = 7,8$ Hz; 2H; H-3); 1,91 (s; 3H; Me-1); 1,18 (t; $J_{4''',3'''} = 7,1$ Hz; 3H; Me-4''').

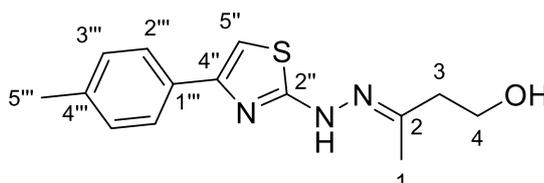
RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 170,1 (C-2'', -N=C-S-); 169,9 (C-2''', -COOEt); 156,8 (C-6', C-OCH₃); 151,2 (C-2, C=N); 144,9 (C-4'', -N=C-CH-); 136,5 (C-2', C); 132,7 (C-4a', C); 128,8 (C-8', CH); 128,6 (C-8a', C); 127,8 (C-3', CH); 126,6 (C-4', CH); 126,1 (C-1', CH); 118,4 (C-7', CH); 105,8 (C-5', CH); 105,1 (C-5'', -C=CH-S-); 60,2 (C-3''', CH₂); 55,1 (C-9', -O-CH₃); 39,5 (C-3, CH₂); 37,1 (C-1''', CH₂); 31,7 (C-4, CH₂); 16,7 (C-1, CH₃); 14,1 (C-4''', CH₃).

3.9 – Preparação das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo álcool ou ácido carboxílico

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 1 equivalente da tiossemicarbazona e 1 equivalente de α -halocetona em 5 mL de 2-propanol (isopropanol). O balão foi conectado a um condensador de bolas e a reação foi mantida sob agitação e aquecimento a 80 °C. Após duas horas, verificou-se o consumo total do material de partida. Finalizada a reação, o solvente foi removido em evaporador rotatório e adicionou-se cerca de 20 g de gelo picado. Apenas para o composto **TH3a** foram adicionados também 10 mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio 10% m/v ao balão, visto que os outros derivados contendo grupo ácido carboxílico poderiam ser deionizados e solubilizarem em água. Quando o gelo derreteu totalmente, o sólido foi filtrado a vácuo em funil de Büchner e lavado com água destilada gelada. O sólido recolhido foi transferido para um balão de fundo redondo e 5 mL de éter etílico foram adicionados ao balão, agitando a mistura. O balão com a suspensão foi estocado na geladeira a -20 °C por uma hora até que o precipitado decantasse totalmente no fundo do balão. O sobrenadante foi recolhido em um frasco de penicilina, e o precipitado em outro. Uma análise por CCD comparando o precipitado e o sobrenadante foi realizada para verificar a pureza do produto (Hex:AcOEt 1:9 e três gotas de AcOH como eluente; iodo e solução de CAM

como reveladores). Por fim, os produtos obtidos foram posteriormente caracterizados por suas faixas de fusão e espectros de RMN.

3.9.1 – Síntese do (*E*)-3-(2-(4-metilfenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)butan-1-ol (TH3a)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.9** deste **Capítulo 1** (p. **124**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,310 mmol) da (*E/Z*)-2-(4-hidroxibutan-2-ilideno)hidrazino-1-carbotioamida (**TS3**) e 66,1 mg (0,310 mmol) de 2-bromo-4'-metilacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido marrom (68,6 mg), com 80% de rendimento.

Aspecto físico: sólido marrom amorfo.

Fórmula molecular: C₁₄H₁₇N₃OS.

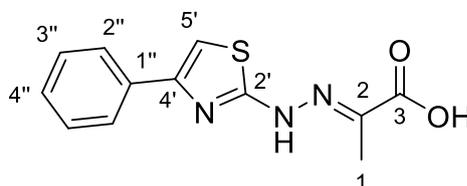
Massa molar: 275,37 g/mol.

Faixa de fusão: 177-178 °C.

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7,84 (m; 2H; H-2''); 7,21 (m; 3H; H-5' e H-3''); 3,64 (m; 1H; H-4); 2,42 (t; *J*_{3,4} = 6,7 Hz; 1H, H-3); 2,32 (s; 3H; Me-5''); 1,96 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 129,3 (C-3'', CH); 125,7 (C-2'', CH); 102,8 (C-5', -C=C-CH-S-); 58,4 (C-4, CH₂); 41,5 (C-3, CH₂); 20,8 (C-5'', CH₃); 16,9 (C-1, CH₃).

3.9.2 – Síntese do ácido (*E*)-2-(2-(4-pheniltiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4a)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.9** deste **Capítulo 1** (p. **124**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,281 mmol) do ácido (*E*)-2-(2-carbamotioilhidrazineilideno)propanoico (**TS4**) e 55,8 mg (0,281 mmol) de 2-bromoacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido bege (39,3 mg), com 54% de rendimento.

Aspecto físico: sólido bege opaco.

Fórmula molecular: C₁₂H₁₁N₃O₂S.

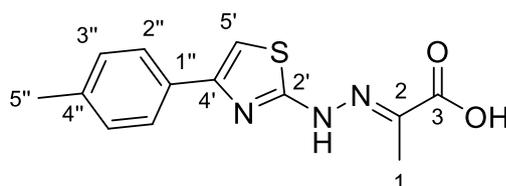
Massa molar: 261,30 g/mol.

Faixa de fusão: 197-198 °C

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7,86 (d; *J*_{2'',3''} = 7,6 Hz; 2H; H-2''); 7,41 (m; 3H; H-5', H-3''); 7,30 (t; *J*_{4'',2''/3''} = 7,5 Hz; 1H; H-4''); 2,09 (s; 3H; H-1).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 168,6 (C-2', -N=C-S-); 165,7 (C-3, COOH); 138,7 (C-2, C=N); 134,5 (C-1'', C); 128,7 (C-3'', CH); 127,7 (C-4'', CH); 125,6 (C-2'', CH); 105,6 (C-5', -C=CH-S-); 12,8 (C-1, CH₃).

3.9.3 – Síntese do ácido (*E*)-2-(2-(4-(4-metilfenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4b)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.9** deste **Capítulo 1** (p. **124**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,281 mmol) de ácido (*E*)-2-(2-carbamotioilhidrazineilideno)propanoico (**TS4**) e 59,8 mg (0,281 mmol) de 2-bromo-4'-metilacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido amarelo claro (54,3 mg), com 70% de rendimento.

Aspecto físico: sólido amarelo claro opaco.

Fórmula molecular: C₁₃H₁₃N₃O₂S.

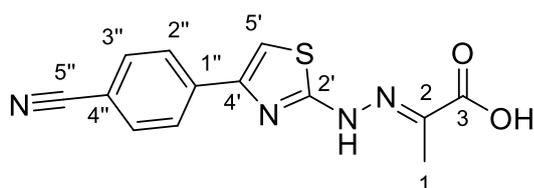
Massa molar: 275,33 g/mol.

Faixa de fusão: 196-196,5 °C

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7,76 (d; *J*_{2'',3''} = 7,9 Hz; 2H; H-2''); 7,33 (s; 1H; H-5'); 7,22 (d; *J*_{3'',2''} = 7,8 Hz; 2H; H-3''); 2,32 (s; 3H; Me-5''); 2,10 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 168,5 (C-2', -N=C-S-); 165,7 (C-3, COOH); 150,6 (C-4', -N-C=CH-); 138,5 (C-2, C=N); 137,0 (C-1'', C); 131,9 (C-4'', C); 129,2 (C-3'', CH); 125,5 (C-2'', CH); 104,6 (C-5', -C=CH-S-); 20,8 (C-5'', CH₃); 12,8 (C-1, CH₃).

3.9.4 – Síntese do ácido (*E/Z*)-2-(2-(4-(4-cianofenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (**TH4c**)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.9** deste **Capítulo 1** (p. **124**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,281 mmol) de ácido (*E*)-2-(2-carbamotioilhidrazineilideno)propanoico (**TS4**) e 63 mg (0,281 mmol) de 2-bromo-4'-cianoacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido amarelo (75 mg), com 93% de rendimento, como uma mistura de diastereoisômeros.

Aspecto físico: sólido amarelo opaco.

Fórmula molecular: C₁₃H₁₀N₄O₂S.

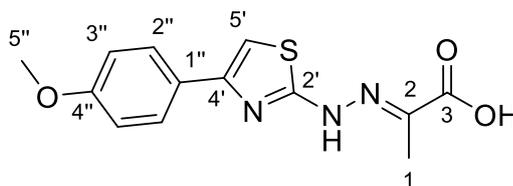
Massa molar: 286,31 g/mol.

Faixa de fusão: 198,5-199 °C.

RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): (**isômero E**) 8,04 (d; $J_{2'',3''} = 8,1$ Hz; 2H; H-2''); 7,86 (d; $J_{3'',2''} = 8,1$ Hz; 2H; H-3''); 7,72 (s; 1H; H-5'); 2,09 (s; 3H; Me-1). (**isômero Z**) 7,73 (s; 0,1H; H-5').

RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): (**isômero E**) 167,0 (C-2', $-\text{N}=\underline{\text{C}}-\text{S}-$); 165,6 (C-3, $\underline{\text{C}}\text{OOH}$); 150,6 (C-4', $-\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{CH}-$); 139,1 (C-1'', C); 138,7 (C-2, $\underline{\text{C}}=\text{N}$); 132,8 (C-3'', CH); 126,2 (C-2'', CH); 119,0 (C-5'', $-\underline{\text{C}}\equiv\text{N}$); 109,8 (C-4'', CH); 109,4 (C-5', $-\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{S}-$); 12,9 (C-1, CH_3). (**isômero Z**) 132,7 (C-3'', CH); 126,3 (C-2'', CH); 109,1 (C-5', $-\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{S}-$); 19,9 (C-1, CH_3).

3.9.5 – Síntese do ácido (*E*)-2-(2-(4-(4-metoxifenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4d)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.9** deste **Capítulo 1** (p. 124), em que reagiu-se 50,0 mg (0,281 mmol) de ácido (*E*)-2-(2-carbamotioilhidrazineilideno)-propanoico (**TS4**) e 64,4 mg (0,281 mmol) de 2-bromo-4'-metoxiacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido amarelo claro (51,8 mg), com 63% de rendimento.

Aspecto físico: sólido amarelo claro opaco.

Fórmula molecular: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$.

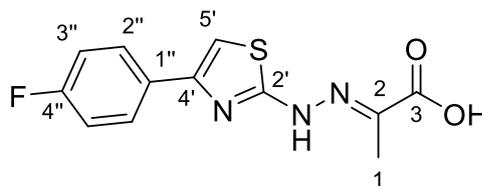
Massa molar: 291,33 g/mol.

Faixa de fusão: 190,5 °C.

RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 7,79 (d; $J_{2'',3''} = 8,3$ Hz; 2H; H-2''); 7,23 (s; 1H; H-5'); 6,97 (d; $J_{3'',2''} = 8,3$ Hz; 2H; H-3''); 3,78 (s; 3H; Me-5''); 2,09 (s; 3H; Me-1).

RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 168,5 (C-2', $-\text{N}=\underline{\text{C}}-\text{S}-$); 165,7 (C-3, $\underline{\text{C}}\text{OOH}$); 150,4 (C-4', $-\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{CH}-$); 138,5 (C-2, $\underline{\text{C}}=\text{N}$); 158,91 (C-4'', C); 127,4 (C-1'', C); 126,9 (C-2'', CH); 114,1 (C-3'', CH); 103,4 (C-5', $-\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{S}-$); 55,1 (C-5'', CH_3); 12,8 (C-1, CH_3).

3.9.6 – Síntese do ácido (*E*)-2-(2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4e)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.9** deste **Capítulo 1** (p. **124**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,281 mmol) de ácido (*E*)-2-(2-carbamotioilhidrazineilideno)-propanoico (**TS4**) e 61 mg (0,281 mmol) de 2-bromo-4'-fluoroacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido ocre (61,1 mg), com 78% de rendimento.

Aspecto físico: sólido ocre opaco.

Fórmula molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{O}_3\text{S}$.

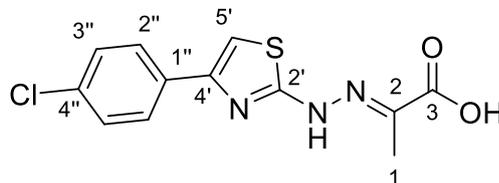
Massa molar: 279,29 g/mol.

Faixa de fusão: 188,2 °C.

RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 7,90 (dd; $J_{2'',3''} = 8,5$ Hz e $J_{2'',\text{F}} = 5,4$ Hz; 2H; H-2''); 7,39 (s; 1H; H-5'); 7,24 (t; $J_{3'',2''/\text{F}} = 8,5$ Hz; 2H; H-3''); 2,09 (s; 3H; Me-1).

RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 168,7 (C-2', $-\text{N}=\underline{\text{C}}-\text{S}-$); 165,7 (C-3, $\underline{\text{C}}\text{OOH}$); 161,7 (d; $J_{4'',\text{F}} = 244$ Hz; C-4'', C); 149,6 (C-4', $-\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{CH}-$); 138,8 (C-2, $\underline{\text{C}}=\text{N}$); 131,2 (C-1'', C); 127,6 (d; $J_{2'',\text{F}} = 8$ Hz; C-2'', CH); 115,6 (d; $J_{3'',\text{F}} = 22$ Hz; C-3'', CH); 105,4 (C-5', $-\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{S}-$); 12,8 (C-1, CH_3).

3.9.7 – Síntese do ácido (*E*)-2-(2-(4-(4-clorofenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4f)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.9** deste **Capítulo 1** (p. **124**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,281 mmol) de ácido (*E*)-2-(2-carbamotioilhidrazineilideno)-propanoico (**TS4**) e 65,6 mg (0,281 mmol) de 2-bromo-4'-cloroacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido marrom (57 mg), com 69% de rendimento.

Aspecto físico: sólido marrom opaco.

Fórmula molecular: C₁₂H₁₀ClN₃O₃S.

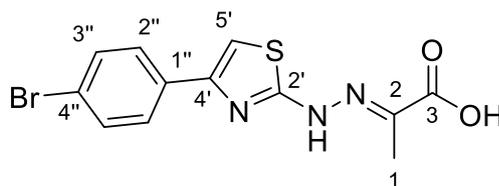
Massa molar: 295,74 g/mol.

Faixa de fusão: 193,5-194 °C

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7,88 (m; 2H; H-2''); 7,47 (m; 3H; H-5' e H-3''); 2,09 (s; 3H; Me-1).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 168,8 (C-2', -N=C-S-); 165,7 (C-3, COOH); 149,4 (C-4', -N-C=CH-); 138,8 (C-2, C=N); 133,4 (C-4'', C); 131,1 (C-1'', C); 128,7 (C-3'', CH); 127,3 (C-2'', CH); 106,4 (C-5', -C=CH-S-); 12,8 (C-1, CH₃).

3.9.8 – Síntese do ácido (*E/Z*)-2-(2-(4-(4-bromofenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (TH4g)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.9** deste **Capítulo 1** (p. **124**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,281 mmol) de ácido (*E*)-2-(2-carbamotioilhidrazineilideno)propanoico (**TS4**) e 78,1 mg (0,281 mmol) de 2,4'-dibromoacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido marrom (73,1 mg), com 76% de rendimento, como uma mistura de diastereoisômeros.

Aspecto físico: sólido marrom opaco.

Fórmula molecular: C₁₂H₁₀BrN₃O₃S.

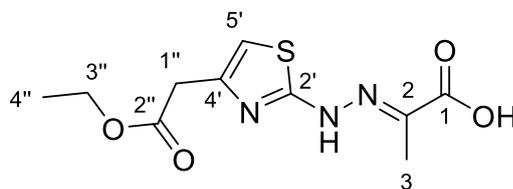
Massa molar: 340,20 g/mol.

Faixa de fusão: 194-195 °C.

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): (**isômero E**) 7,82 (d; *J*_{2'',3''} = 8,7 Hz; 2H; H-2''); 7,60 (d; *J*_{3'',2''} = 8,7 Hz; 2H; H-3''); 7,49 (s; 1H; H-5'); 2,09 (s; 3H; Me-1). (**isômero Z**) 7,82 (m; 0,1H; H-2''); 7,60 (m; 0,1H; H-3''); 7,49 (m; 0,1H; H-5').

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): (**isômero E**) 168,8 (C-2', -N=C-S-); 165,6 (C-3, C=O); 149,4 (C-4', -N-C=CH-); 138,8 (C-2, C=N); 133,8 (C-1'', C); 131,6 (C-3'', CH); 127,6 (C-2'', CH); 120,7 (C-4'', C); 106,5 (C-5', -C=CH-S-); 12,8 (C-1, CH₃). (**isômero Z**) 131,6 (C-3'', CH); 127,7 (C-2'', CH).

3.9.9 – Síntese do ácido (*E/Z*)-2-(2-(4-(2-etoxi-2-oxoetil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)propanoico (**TH4h**)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.9** deste **Capítulo 1** (p. **124**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,281 mmol) de ácido (*E*)-2-(2-carbamotioilhidrazineilideno)propanoico (**TS4**) e 46,2 mg (40 µL, 0,281 mmol) de 4-cloroacetoacetato de etila. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido amarelo (42,1 mg), com 55% de rendimento, como uma mistura de diastereoisômeros.

Aspecto físico: sólido amarelo opaco.

Fórmula molecular: C₁₀H₁₃N₃O₄S.

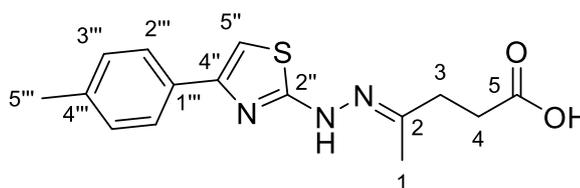
Massa molar: 271,29 g/mol.

Faixa de fusão: 169-170 °C.

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): (**isômero E**) 10,67 (s; 1H; C=N-NH-); 6,75 (s; 1H, H-5'); 4,07 (q; *J*_{3'',4''} = 7,1 Hz; 2H; H-3''); 3,61 (s; 2H; H-1''); 2,04 (s; 3H; Me-1); 1,18 (t; *J*_{4'',3''} = 7,1 Hz; 3H; Me-4''). (**isômero Z**) 2,07 (s; 1,3H; Me-1).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): (**isômero E**) 170,0 (C-2'', C=OEt); 168,5 (C-2', -N=C-S-); 165,7 (C-3, C=O); 138,7 (C-2, C=N); 107,6 (C-5', -C=C-S-); 60,4 (C-3'', CH₂); 36,8 (C-1'', CH₂); 14,1 (C-4'', CH₃); 12,7 (C-1, CH₃). (**isômero Z**) 164,9 (C-3, C=O); 19,8 (C-1, CH₃); 12,1 (C-4'', CH₃).

3.9.10 – Síntese do ácido (*E*)-4-(2-(4-(4-metilfenil)tiazol-2-il)hidrazineilideno)pentanoico (TH5a)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.9** deste **Capítulo 1** (p. **124**), em que reagiu-se 50,0 mg (0,264 mmol) do ácido (*E*)-4-(2-carbamotioilhidrazineilideno)pentanoico (**TS5**) e 56,3 mg (0,264 mmol) de 2-bromo-4'-metilacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido bege (53,4 mg), com 67% de rendimento.

Aspecto físico: sólido bege amorfo.

Fórmula molecular: C₁₅H₁₇N₃O₂S.

Massa molar: 303,38 g/mol.

Faixa de fusão: 165-166,5 °C.

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7,73 (d; *J*_{2'',3''} = 7,8 Hz; 2H; H-2''); 7,20 (d; *J*_{3'',2''} = 7,8 Hz; 2H; H-3''); 7,16 (s; 1H; H-5'); 2,50 (s; 4H; H-3 e H-4); 2,31 (s; 3H; Me-5''); 1,94 (s; 3H; Me-1).

RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 173,9 (C-5, $\text{C}=\text{O}$); 170,2 (C-2', $-\text{N}=\text{C}-\text{S}-$); 149,8 (C-4', $-\text{N}-\text{C}=\text{CH}-$); 136,7 (C-4'', C); 131,9 (C-1'', C); 129,2 (C-3'', CH); 125,5 (C-2'', CH); 102,6 (C-5', $-\text{C}=\text{CH}-\text{S}-$); 32,8 (C-3, CH_2); 29,8 (C-4, CH_2); 20,8 (C-5'', CH_3); 17,1 (C-1, CH_3).

3.10 – Micro-organismos e preparo dos inóculos

As quatro espécies do gênero *Candida* aplicadas no ensaio biológico foram: *Candida albicans* (SC5314), *Candida auris* (COLO 01), *Candida krusei* (ATCC 20298) e *Candida tropicalis* (ATCC 750). Os pré-inóculos das leveduras foram preparados a partir de colônias jovens repicadas em ágar Sabourad Dextrose (ASD). O crescimento das células se deu por 24 a 48 horas a 37 °C, que então foram ressuspensas em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina esterilizada (solução aquosa de NaCl 0,9% m/v). A ressuspensão visou o ajuste da concentração fúngica da suspensão entre 0,5 e 5×10^6 CFU/mL, determinada a partir dos valores de transmitância mensurados para cada solução em espectrofotômetro UV/Vis a 530 nm. Para tal ajuste, fez-se a leitura de 1 mL de solução salina em cubeta de quartzo, considerada como solução branco, e considerou-se como 100% de transmitância. Depois, realizou-se a leitura e ajuste dos inóculos até o valor de transmitância de 75 ± 2 %, que representa o valor de unidades formadoras de colônia necessárias para o ensaio. Ao fim, o pré-inóculo foi diluído duas vezes com meio RPMI-1640 (Meio do Instituto Roswell Park Memorial), primeiro na proporção 1:50, e depois na proporção 1:20, obtendo-se, então, o inóculo final. As diluições foram feitas em tubos de plástico do tipo *falcon* de 50 mL.

3.11 – Ensaio de microdiluição em caldo

O ensaio foi realizado em três experimentos independentes em duplicata, com 1 mg de amostra para cada experimento. Cada composto foi solubilizado em 10 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1990 μL de meio RPMI-1640, obtendo a concentração inicial de 500 $\mu\text{g/mL}$. Então, 200 μL de cada amostra foram transferidos para uma coluna de uma microplaca de 96 poços e diluídos com meio RPMI-1640 sucessivamente, até o volume de 100 μL , de forma decrescente de concentração para os valores de 250, 125, 62,50, 31,25, 15,62, 7,81, 3,91, 1,95, 0,98, 0,49 e 0,24 $\mu\text{g/mL}$.

Na sequência, foram acrescentados 100 µL da suspensão fúngica em cada um dos poços. Um poço preenchido com 100 µL de meio RPMI-1640 e 100 µL de suspensão fúngica foi utilizado como controle negativo do teste, a fim de atestar a esterilidade do meio. As placas foram encubadas em estufa a 37 °C e os resultados avaliados por leitura visual após 24 e 48 horas. A concentração inibitória mínima foi determinada como a menor concentração da substância em que não houve crescimento fúngico após análise visual dos poços (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015).

CAPÍTULO 2: ESTUDO TEÓRICO DO POTENCIAL DE HIDRÓLISE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS PROVÁVEIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE 2-TIAZOLILHIDRAZONAS

1 – CONTEXTUALIZAÇÃO

Estudos de estabilidade compreendem uma etapa crucial no processo de desenvolvimento de novos fármacos. Resultados obtidos com esse tipo de experimento podem indicar dados sobre formação de produtos de degradação e impurezas, que podem ter impacto na formulação e forma de administração da substância bioativa, na produção, no armazenamento e nos perfis farmacodinâmico e toxicológico da mesma, visto que alguns produtos de degradação podem produzir efeitos adversos (ALCÂNTARA et al., 2013; KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

Conforme descrito por Sengupta, Chatterjee e Tekade (2018), as agências reguladoras estabelecem protocolos de verificação das estabilidades física e química de compostos bioativos em meios ácido, alcalino e oxidante, bem como em diferentes níveis de umidade e exposição à luz. Como discutido anteriormente e reiterado pelos autores, realizar esses estudos nas primeiras etapas do desenvolvimento de novos fármacos auxilia em ensaios posteriores de toxicidade, de pré-formulação e pré-clínicos, visando estabelecer as formulações e vias de administração mais adequadas, a fim de estabelecer a influência desses fatores na potência, dosagem e estocagem desse potencial medicamento (CHAURASIA, 2016; SENGUPTA; CHATTERJEE; TEKADE, 2018; SMRITY; SAIFUDDIN; SULTANA, 2016).

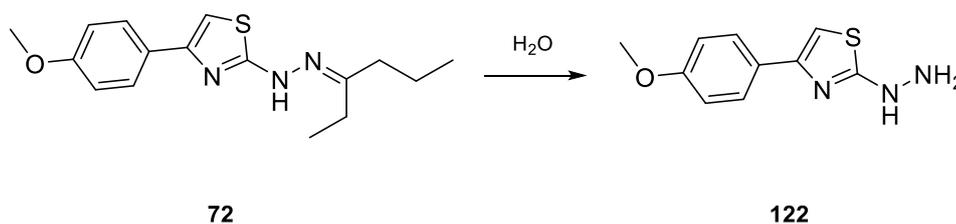
Assim, nosso grupo conduziu alguns trabalhos envolvendo estudos de estabilidade com 2-tiazolilhidrazonas com o intuito de estudar essas substâncias visando obter candidatos a fármacos em potencial com boa potência biológica, mas também com perfis de estabilidade otimizados.

Silva (2019) estudou a estabilidade do tiazol **63** em meio aquoso, calculando a taxa de degradação após 24, 48 e 72 horas. A autora caracterizou o composto por meio de um método analítico cromatográfico utilizando a técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). A substância **63** foi totalmente degradado logo após as primeiras horas de experimento em meio básico (solução aquosa de NaOH 1 mol/L), porém foi mais estável em meio ácido (solução aquosa de HCl 1 mol/L) e em meio neutro, apresentando taxas de

degradação de 46,60% e 21,98%, respectivamente, após 72 horas de experimento. Mesmo em concentrações menores (soluções aquosas de NaOH 0,1 mol/L e de HCl 0,1 mol/L), **63** foi bem menos estável, com taxas de degradação de 80,57% e 20,83%, respectivamente, após 12 horas. Por outro lado, o composto foi estável em meio neutro, mantendo sua concentração acima de 98% no mesmo período (SILVA, 2019).

Posteriormente, Franco e colaboradores (2021) estudaram a estabilidade por degradação forçada do derivado tiazólico **72**, sintetizado por Lino *et al.* (2018). Os autores também caracterizaram o derivado e os produtos de degradação por meio de um método analítico por CLAE-DAD. A substância **72** foi pouco estável em meio aquoso em todas as condições, verificando que o produto de degradação majoritário formado era a hidrazina correspondente **122**, indicando que a degradação de **72** ocorreu por hidrólise do grupo hidrazona (**Figura 43**, p. 136) (FRANCO *et al.*, 2021).

Figura 43 – Estruturas químicas da substância **72** e de seu produto de degradação por hidrólise **122**, obtido e caracterizado por Franco *et al.* (2021).



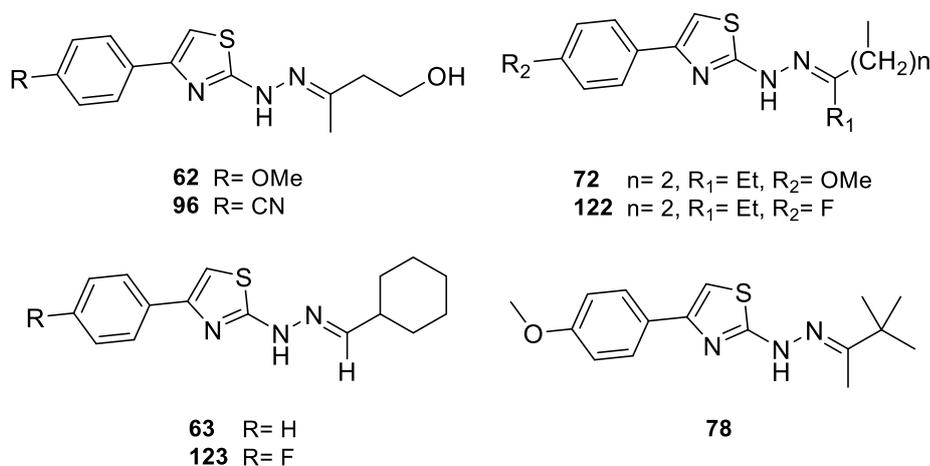
O processo de hidrólise foi favorecido em todos os meios. Após seis horas de experimento, foi visto um consumo de 90% de **72** em meio ácido (solução aquosa de HCl 0,1 mol/L), e mais de 50% em meio básico (solução aquosa de NaOH 0,01 mol/L). A hidrólise em meio neutro foi considerável (70% após 24 horas), sugerindo a hipótese de que o composto atuasse como um pró-fármaco e que **122** fosse o composto bioativo. Para investigação dessa hipótese, a atividade biológica dos dois compostos foi avaliada *in vitro* frente a cinco espécies de *Candida* spp. e duas de *Cryptococcus* spp., em que **122** apresentou atividade mais potente que **72** contra cinco das sete espécies citadas. A hidrazina **122** foi também mais ativa contra *C. albicans*, *C. neoformans* e *C. gattii* que os fármacos de referência utilizados no experimento (anfotericina B, fluconazol e itraconazol) (FRANCO *et al.*, 2021).

Tendo em vista esses estudos acerca da estabilidade de 2-tiazolilhidrazonas, duas perguntas foram levantadas: (i) Os derivados 2-tiazolilhidrazinas são

biologicamente mais potentes que seus precursores ou o caso da substância **122** foi apenas uma coincidência?; e se (i) for verdade, (ii) essas 2-tiazolilhidrazonas atuariam como “pró-fármacos”?

Para encontrar respostas para as perguntas anteriores, foi realizado neste capítulo o cálculo de propriedades eletrônicas e moleculares dos dois compostos avaliados experimentalmente (**63** e **72**), assim como de outros cinco derivados com bom potencial biológico e que serão posteriormente estudados quanto à sua estabilidade em meio aquoso (**Figura 44**, p. **137**). Adicionalmente, quatro 2-tiazolilhidrazinas como prováveis produtos de degradação desses cinco derivados foram sintetizados e avaliados quanto à suas atividades antifúngicas, visando atestar se a hipótese das hidrazonas serem “pró-fármacos” é procedente.

Figura 44 – Estruturas químicas das substâncias **62-63**, **72**, **78**, **96**, **121** e **123** estudadas neste capítulo. Os derivados **63** e **72** tiveram suas estabilidades avaliadas experimentalmente por Silva (2019) e Franco *et al.* (2021), respectivamente.



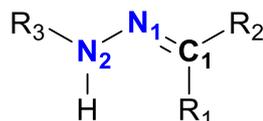
2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 – Propriedades eletrônicas e moleculares de 2-tiazolilhidrazonas

Com o objetivo de estudar os fatores físico-químicos e moleculares envolvidos na hidrólise de 2-tiazolilhidrazonas, seis propriedades foram calculadas por meio de métodos de mecânica quântica (no caso, por meio da teoria do funcional de densidade) para os três principais átomos do grupo hidrazona dos sete tiazóis representados na **Figura 44** (p. **137**): o átomo C₁ representa o carbono imínico, o

átomo N₁ representa o nitrogênio imínico e, por fim, o átomo N₂ representa o nitrogênio amínico (C₁=N₁-N₂) (**Figura 45**, p. 138).

Figura 45 – Representação do grupo hidrazona com a identificação dos três átomos principais que o compõem (C₁, N₁ e N₂).



As propriedades calculadas para as sete substâncias foram: as cargas atômicas derivadas do potencial eletrostático dos três átomos do grupo hidrazona, em unidades atômicas (u.a.); as energias dos orbitais de fronteira HOMO (orbital molecular ocupado de mais alta energia) e LUMO (orbital molecular desocupado de mais baixa energia), em elétron-volts (eV); e a diferença de energia entre os orbitais de fronteira (*gap*), também em eV (**Tabela 16**, p. 138).

Tabela 16 – Propriedades eletrônicas e moleculares calculadas utilizando a teoria do funcional de densidade para as 2-tiazolilhidrazonas **62-63**, **72**, **78**, **96**, **121** e **123**.

Destacou-se em negrito e em cinza os dados das duas substâncias **63** e **72**, previamente estudadas experimentalmente quanto à sua estabilidade.

Composto	C ₁ (u.a.)	N ₁ (u.a.)	N ₂ (u.a.)	E _{HOMO} (eV)	E _{LUMO} (eV)	<i>gap</i> (eV)
62	0,432	-0,409	-0,033	-5,33	-1,08	4,25
63	0,124	-0,328	-0,153	-5,52	-1,21	4,31
72	0,250	-0,340	-0,166	-5,27	-1,00	4,27
78	-0,102	-0,236	-0,192	-5,31	-1,08	4,23
96	0,651	-0,413	-0,217	-5,81	-1,91	3,90
121	0,159	-0,317	-0,063	-5,56	-1,22	4,34
123	0,127	-0,328	-0,193	-5,60	-1,29	4,31

Os valores calculados para as cargas eletrostáticas destacaram a distinção entre as moléculas, o que era esperado pois o potencial eletrostático em cada átomo depende dos átomos vizinhos e suas características. Os compostos **62** e **96** apresentaram os maiores valores para a carga eletrostática do átomo C₁ (C₁=N₁) (0,432-0,651 u.a.). Isso pode ser explicado pela presença do grupo hidroxila na cadeia alifática ligada à ligação imínica, que provoca um efeito retirador de elétrons sobre C₁.

Esse efeito é ainda mais pronunciado em **96**, visto que o grupo nitrila, que é um grupo retirador de elétrons por ressonância, acaba diminuindo a densidade eletrônica sobre este carbono, que fica ainda mais eletrofílico. Por outro lado, o átomo C₁ do tiazol **78** apresentou um valor negativo de carga eletrostática (-0,102 u.a.). Isso pode ser explicado pelo efeito hiperconjugativo entre os orbitais ligantes σ_{C-H} do grupo *terc*-butila e o orbital antiligante $\pi^*_{C=N}$. Como o átomo de carbono apresenta maior coeficiente orbitalar nesse orbital dentre os dois átomos, ele recebe a densidade eletrônica de forma mais pronunciada. Em comparação com outras moléculas, o átomo N₁ irá apresentar um valor de carga eletrostática maior, justamente por conta desse efeito.

As substâncias não apresentaram diferenças significativas entre os valores das energias dos orbitais de fronteira ($E_{HOMO} = -5,81$ a $-5,27$ eV, e $E_{LUMO} = -1,91$ a $-1,00$ eV) e do *gap* (3,90 a 4,34 eV). Como esperado, **96** apresentou os menores valores para os orbitais de fronteira, visto que a presença de grupos elétron-retiradores por ressonância leva a energias mais baixas dos orbitais HOMO e LUMO. **121** e **123**, que contêm um grupo fluoro ligado ao anel benzênico também apresentaram valores mais baixos, mas não tanto quanto **96**. O contrário pode ser observado para os derivados **72** e **78**. Como eles possuem um grupo metoxila ligado ao anel benzênico, o qual é um grupo ativador, os valores de seus orbitais de fronteira são maiores.

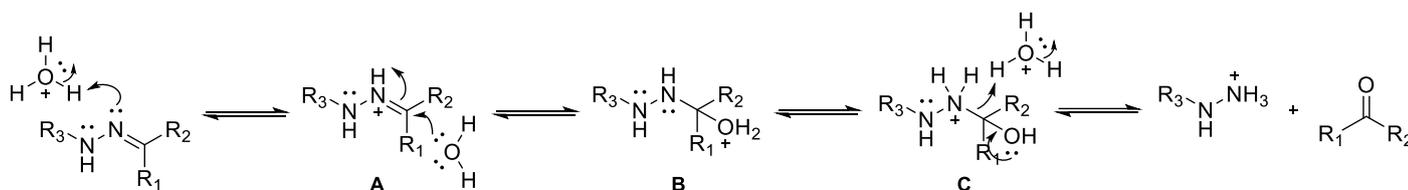
2.2 – Relação das propriedades calculadas com a hidrólise de hidrazonas em meio aquoso

Como discutido por Yildiz (2016), o entendimento dos fatores que podem afetar o mecanismo de hidrólise das hidrazonas é essencial para guiar no planejamento e aplicação dessas substâncias. Com isso, no caso das 2-tiazolilhidrazonas, pode-se compreender e otimizar a labilidade da ligação imínica e obter substâncias mais estáveis.

O mecanismo de hidrólise de hidrazonas é um processo reversível. Em meio ácido, o mecanismo inicia pela protonação do N₁ (**A**). Em seguida, há o ataque nucleofílico de uma molécula de água ao carbono imínico (C₁), em que é formado, então, o intermediário carbinolamina protonado (**B**), seguido por uma transferência de próton intramolecular (prototropismo) entre o N₁ e o íon oxônio (ou mediado pelo

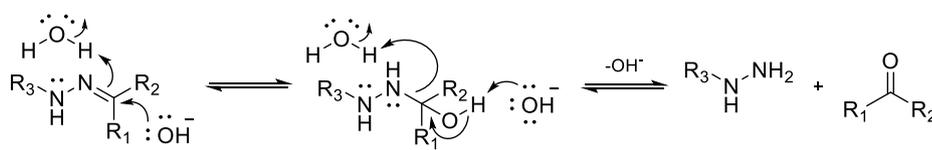
solvente em uma etapa a mais) (C). Por fim, forma-se uma ligação C=O e quebra da ligação C–N, obtendo, enfim, a hidrazina e a carbonila correspondentes (**Esquema 15**, p. 140) (FRANCO et al., 2021; KALIA; RAINES, 2008).

Esquema 15 – Mecanismo proposto por Kalia e Raines (2008) e Franco *et al.* (2021) para a hidrólise de hidrazonas em meio ácido.



Em meio básico, ocorre, na primeira etapa, um ataque nucleofílico de um íon hidróxido ao carbono C₁ concomitante com uma a captura de um próton da água pelo N₁. É formado o intermediário carbinolamina. Por fim, a carbonila é formada ao mesmo tempo em que há a eliminação da hidrazina, com captura de um próton pelo nitrogênio N₁ intermediada pelo solvente (**Esquema 16**, p. 140) (FRANCO et al., 2021).

Esquema 16 – Mecanismo proposto por Franco *et al.* (2021) para a hidrólise de hidrazonas em meio básico.



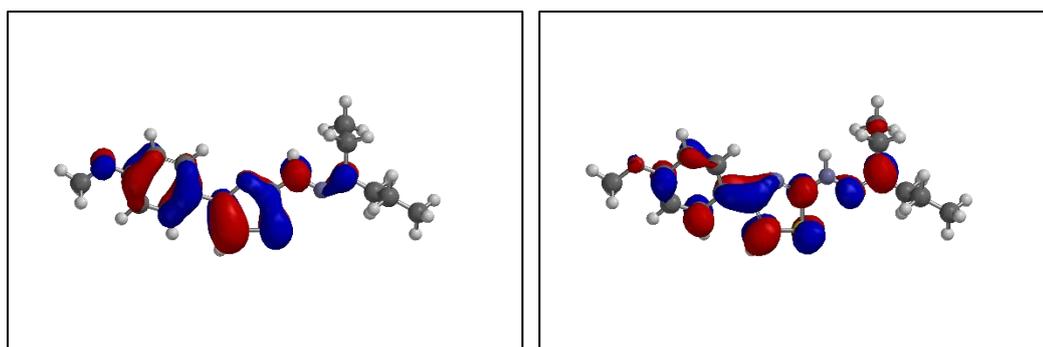
Alguns trabalhos, teóricos e experimentais, avaliaram a estabilidade e o potencial de hidrólise de hidrazonas em meio aquoso. Kalia *et al.* (2008) verificou a estabilidade de hidrazonas e oximas, acompanhando os tempos de meia-vida das reações por RMN de ¹H em pD (logaritmo decimal negativo da concentração do cátion deutério) 5-9. Os resultados confirmaram que as hidrazonas eram menos estáveis que as oximas, e que a proposta de mecanismo de hidrólise em valores mais baixos de pD indicava a protonação do N₁, com posterior ataque nucleofílico de uma molécula de água ao C₁ (KALIA; RAINES, 2008).

Yildiz (2016) realizou uma abordagem computacional acerca do mecanismo de hidrólise de diferentes hidrazonas em meio ácido utilizando a teoria do funcional de densidade. O autor calculou as barreiras de energia para cada etapa do

mecanismo. Seus resultados corroboraram com dados experimentais, indicando que a taxa de hidrólise da hidrazona depende da facilidade de protonação de N₁, visto que essa primeira etapa aumenta o caráter eletrofílico de C₁ para o ataque nucleofílico da molécula de água (YILDIZ, 2016).

O tiazol **72** apresentou um dos valores mais negativos de carga eletrostática para N₁ (-0,340 u.a.) e um dos mais positivos para C₁ (0,250 u.a.), corroborando com o mecanismo esperado, pois é necessária uma densidade eletrônica mais abundante sobre N₁ para favorecer a captura do íon H⁺. Observando o mapa dos orbitais de fronteira para **72** (**Figura 46**, p. **141**), vê-se uma maior contribuição de N₁ para o HOMO, e de C₁ para o LUMO. Os valores de E_{HOMO} e E_{LUMO} do composto é o maior de toda a série, o que também justifica sua baixa estabilidade em meio ácido e maior estabilidade nos meios básico e neutro. Como a densidade eletrônica de N₁ é maior no HOMO, é mais favorável energeticamente a captura do próton pelo composto, por ter maior caráter de doador de elétrons (base de Lewis). Mas uma energia mais alta do LUMO dá uma maior diferença de energia com o orbital não ligante do nucleófilo, dando uma taxa de hidrólise menor que no meio ácido.

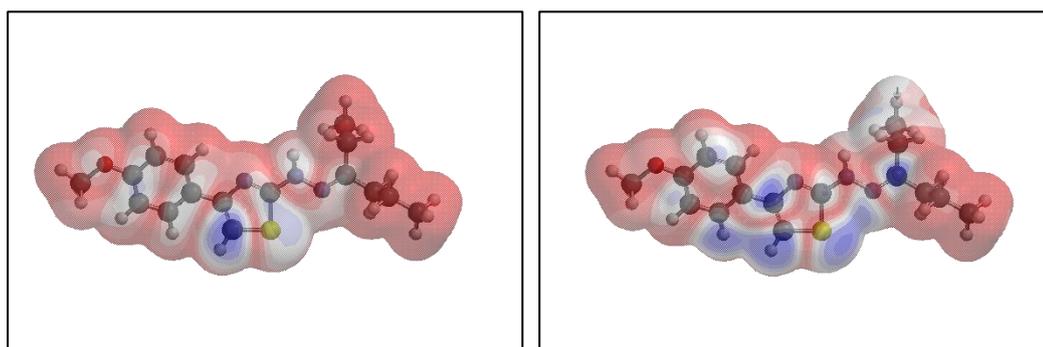
Figura 46 – Projeções dos orbitais HOMO (à esquerda) e LUMO (à direita) do derivado **72**.



Os mapas de densidades dos orbitais também reiteram os resultados, em que a densidade eletrônica positiva sobre os átomos da ligação imínica corrobora as contribuições dos dois átomos para o orbital correspondente (**Figura 47**, p. **142**). Para **63**, os orbitais HOMO e LUMO (**Figura 48**, p. **142**) foram uns dos menos energéticos de toda a série. O composto foi estável nos meios ácido e neutro, mas foi facilmente degradado em meio básico. As energias dos orbitais, em comparação com **72**, foram menores. Como na hidrólise em meio básico a primeira etapa depende do ataque

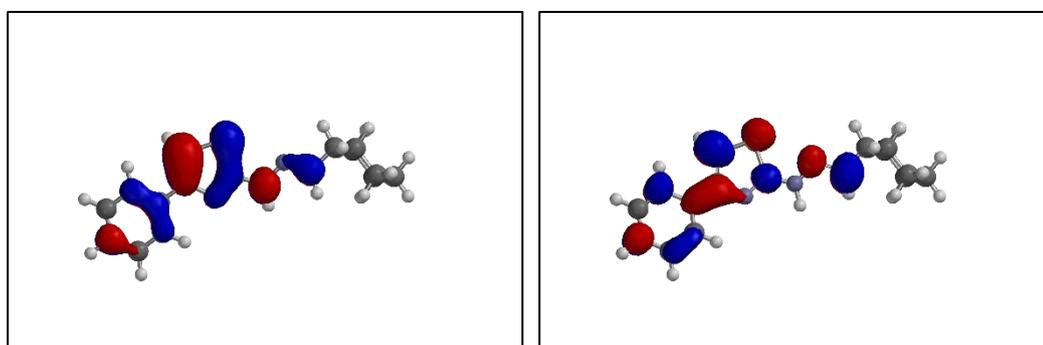
nucleofílico ao C₁, um orbital LUMO com energia menor terá uma diferença de energia menor com o orbital não ligante do nucleófilo, o que reitera a baixa estabilidade do composto em meio básico (**Figura 49**, p. 143).

Figura 47 – Projeções das densidades do HOMO (à esquerda) e LUMO (à direita) do derivado **72**. Regiões coloridas em vermelho representam contribuições nulas, em branco contribuições intermediárias, e coloridas em azul, contribuições positivas.



Fazendo uma extrapolação para os demais compostos, os derivados **62** e **78** teriam um perfil parecido com **72**, de acordo com os valores de E_{HOMO} e E_{LUMO} . Entretanto, **78** apresenta uma carga eletrostática negativa sobre o C₁, o que pode significar uma maior repulsão eletrônica aos elétrons do nucleófilo, dificultando o mecanismo de hidrólise em meio básico ou neutro.

Figura 48 – Projeções dos orbitais HOMO (à esquerda) e LUMO (à direita) do derivado **63**.

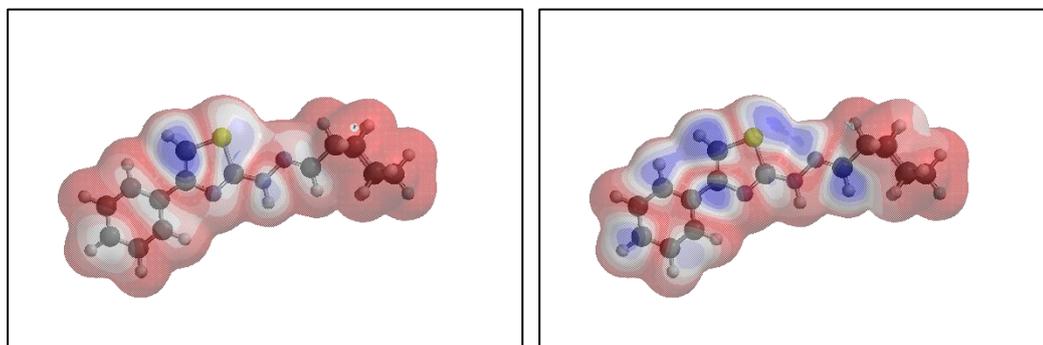


Para **62**, a hidrólise em meios ácido e básico pode ser facilitada, visto que o C₁ apresentou um valor de carga eletrostática bem positivo perante os demais, e N₁ muito negativo. Os derivados **121** e **123** apresentaram valores de energia para os

orbitais de fronteira e de cargas eletrostáticas próximos de **63**, em que podemos supor que eles apresentem um perfil experimental próximo.

O tiazol **96** apresentou os valores de E_{LUMO} e E_{HOMO} mais baixos de toda a série, e os valores de cargas mais extremos também, indicando um alto caráter eletrofílico para C_1 . Segundo Yildiz (2016), a presença de grupos retiradores de elétrons próximos a N_2 facilita a hidrólise em meio neutro, por aumentar o caráter eletrofílico do carbono imínio, facilitando o ataque nucleofílico a este átomo. Podemos, então, propor que esse composto seja facilmente degradado nos meios básico e neutro em relação às demais substâncias estudadas (YILDIZ, 2016). Com esses resultados e posterior validação experimental da estabilidade das substâncias estudadas neste capítulo, será possível estender essas propriedades como critério no planejamento de derivados 2-tiazolilhidrazonas mais estáveis frente à hidrólise.

Figura 49 – Projeções das densidades eletrônicas dos orbitais HOMO (à esquerda) e LUMO (à direita) do derivado **63**. Regiões coloridas em vermelho representam contribuições nulas, em branco contribuições intermediárias, e coloridas em azul, contribuições positivas.

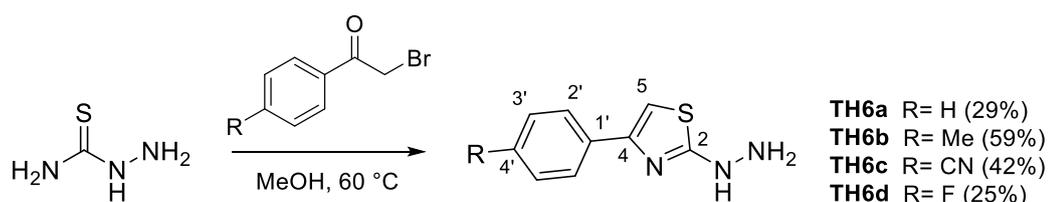


2.3 – Obtenção e caracterização das 2-tiazolilhidrazinas

As quatro 2-tiazolilhidrazinas **TH6a-b** foram obtidas a partir da metodologia adaptada de Carradori *et al.* (2014) e Franco *et al.* (2021) (**Esquema 17**, p. **144**), por meio do mesmo mecanismo de condensação proposto para as 2-tiazolilhidrazonas. Os derivados foram propostos a partir das substâncias **62-63**, **72**, **78**, **96**, **121** e **123** estudadas neste capítulo, preparando os seus prováveis produtos de hidrólise. Assim, é possível comparar a potência biológica dos derivados em comparação com as hidrazonas correspondentes e com **122** (CARRADORI *et al.*, 2014; FRANCO *et al.*,

2021). Sintetizou-se, então, os 2-hidrazino-4-aryl-tiazóis contendo os grupos fenila (**TH6a**), 4-metilfenila (**TH6b**), 4-cianofenila (**TH6c**) e 4-fluorofenila (**TH6d**). Os produtos foram obtidos com rendimentos de 25 a 59%. As 2-tiazolilhidrazonas foram caracterizadas por meio de suas faixas de fusão e espectros de RMN 1D e, por não serem produtos inéditos, tiveram seus dados comparados com a literatura.

Esquema 17 – Reação para a síntese das 2-tiazolilhidrazinas **TH6a-d**.



Ao analisar os espectros de RMN de ^1H (**Apêndice D**, p. **207**), as substâncias apresentaram simpletos entre 3,80 e 4,80 ppm (1H) correspondentes aos hidrogênios de amina primária do grupo hidrazina ($-\text{NH}-\text{NH}_2$), bem como outro simpleto no intervalo de 8,30 a 8,80 ppm (1H), referente ao hidrogênio de amina secundária ($-\text{NH}-\text{NH}_2$) (**TH6b** não apresentou sinal nessa região). Outro sinal característico neste espectro denota a formação do anel tiazólico, sendo este correspondente ao hidrogênio H-5. Os produtos **TH6a**, **TH6b** e **TH6c** apresentaram simpletos integrados para um hidrogênio entre 7,00 e 7,50 ppm, enquanto **TH6d** apresentou um multiplete que ressonou em 7,31 ppm (3H) e que foi atribuído tanto ao H-5 quanto aos hidrogênios aromáticos na posição 3'. Na **Tabela 17** (p. **145**), têm-se os deslocamentos químicos desses sinais de hidrogênio-1 discutidos para as 2-tiazolilhidrazinas.

Para os espectros de RMN de ^{13}C e subespectros DEPT-135 (**Apêndice D**, p. **207**), vê-se apenas para **TH6a** e **TH6c** um sinal na faixa dos 175 ppm (C), referente ao carbono 2. Para confirmar a formação do heterociclo em todos os produtos, observam-se nos espectros um sinal de carbono metínico entre 101 e 116 ppm, associado ao carbono C-5, e outro entre 148 e 152 ppm, correspondentes ao carbono C-4. Para os derivados obtidos, não foi identificado um sinal na faixa de 200 ppm, indicando que não isolou nenhum resquício das bromoacetofenonas em mistura com os produtos. Na **Tabela 18** (p. **145**) são mostrados os deslocamentos químicos para C-2, C-4 e C-5 para as quatro hidrazinas.

Tabela 17 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para os derivados 2-tiazolilhidrazinas **TH6a-d**.

Produto	δ_{H} H-5 (ppm)	δ_{H} –NH ₂ (ppm)	δ_{H} –NH– (ppm)
TH6a	7,09 (s; 1H)	3,87 (s; 1H)	8,58 (s; 1H)
TH6b	7,14 (s; 1H)	4,25 (s; 1H)	-
TH6c	7,43 (s; 1H)	4,67 (s; 1H)	8,77 (s; 1H)
TH6d	7,31 (m; 3H)	4,64 (s; 1H)	8,34 (s; 1H)

Tabela 18 – Atribuição e deslocamentos químicos de alguns sinais de RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para os derivados 2-tiazolilhidrazinas **TH6a-d**.

Produto	δ_{C} C-2 (ppm)	δ_{C} C-4 (ppm)	δ_{C} C-5 (ppm)
TH6a	175,9 (C)	150,6 (C)	102,0 (CH)
TH6b	-	151,1 (C)	102,4 (CH)
TH6c	175,8 (C)	148,7 (C)	106,0 (CH)
TH6d	-	150,4 (C)	115,7 (CH)

Para ilustrar a caracterização das 2-tiazolilhidrazinas, serão discutidos os dados espectroscópicos obtidos para o produto **TH6c**. No espectro de RMN de ^1H (**Figura 50**, p. 146), foi visto um simpleto em 4,67 ppm (1H) referente aos hidrogênios da amina primária ($-\text{NH}-\text{NH}_2$). Na faixa entre 7,00-8,00 ppm são vistos os sinais associados aos hidrogênios aromáticos. Um sinal em 7,43 ppm (s; 1H) foi atribuído ao H-5. Dois dupletos em 7,82 ($J = 8,1$ Hz; 2H) e 7,98 ppm ($J = 8,1$ Hz; 2H) foram atribuídos aos hidrogênios benzílicos H-3' e H-2', respectivamente. Um último simpleto em 8,77 ppm (1H) foi atribuído ao hidrogênio de amina secundária do grupo hidrazina ($-\text{NH}-\text{NH}_2$).

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 51**, p. 146) foram vistos sinais acima de 100 ppm, confirmando a formação do produto. Três sinais de carbonos hidrogenados em 106,0 (CH), 126,0 (CH) e 132,5 (CH) foram associados aos carbonos H-5, H-2' e H-3', respectivamente. Um sinal em 119,1 ppm (C) foi atribuído ao carbono do grupo nitrila (C-5'). Outros três sinais de carbono-13 mais desblindados em 139,2 (C), 148,7 (C) e 175,8 (C) são correspondentes a C-1', C-4 e C-2, respectivamente.

Foi aplicada a mesma estratégia de caracterização para as demais hidrazinas (**TH6a-b** e **TH6d**). Os dados e atribuições dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C dos dez

derivados estão descritos na **Seção 3.3** deste **Capítulo 2** (p. 150), e os seus espectros se encontram no **Apêndice D** (p. 207).

Figura 50 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **TH6c**.

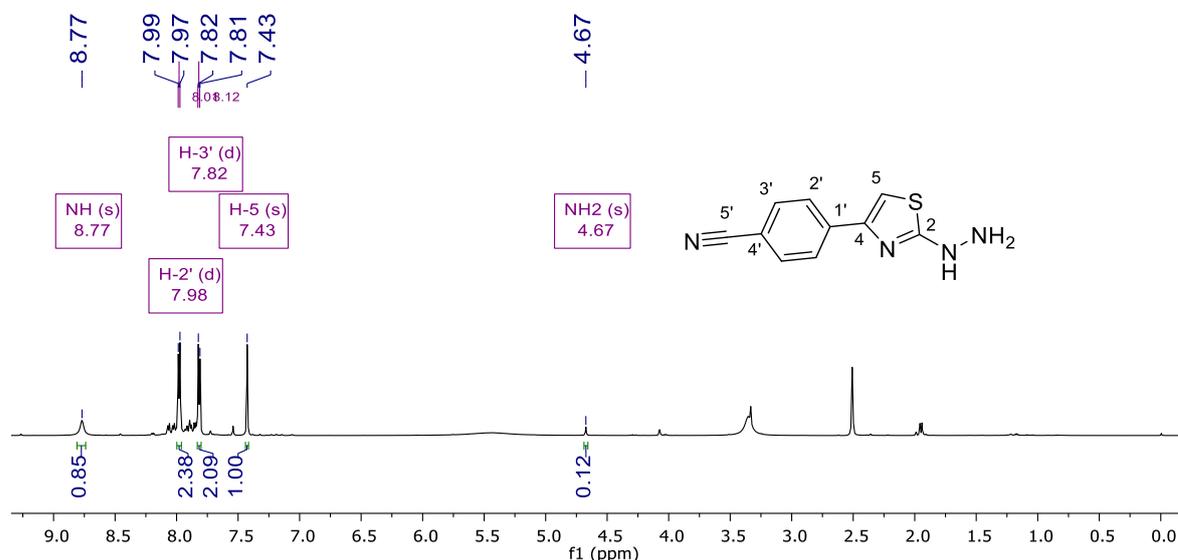
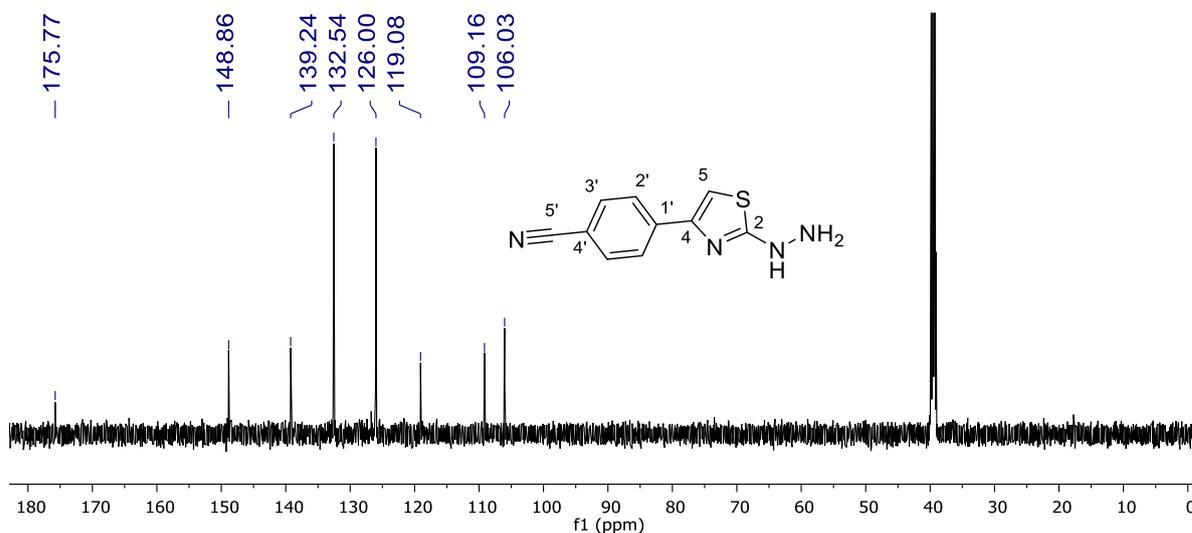


Figura 51 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **TH6c**.



2.4 – Atividade antifúngica de 2-tiazolilhidrazinas contra *Candida* spp.

A síntese e avaliação da atividade antifúngica dos derivados **TH6a-d** buscou trazer respostas à hipótese das 2-tiazolilhidrazonas atuarem como possíveis pró-fármacos, visto que esse questionamento apareceu quando o produto de degradação **122** foi mais ativo que sua respectiva hidrazona **72**, conforme discutido neste Capítulo.

Os resultados do ensaio biológico para as 2-tiazolilhidrazinas estão apresentados na **Tabela 19** (p. 147). Assim como o critério estabelecido na **Seção 2.5** do **Capítulo 1** deste trabalho (p. 102), aqui também foram considerados ativos os compostos que apresentaram valores de MIC menores que 10 µmol/L.

Tabela 19 – Atividades antifúngicas dos derivados 2-tiazolilhidrazinas (**TH6a-d**), além dos fármacos de referência Anfotericina B, Caspofungina, Fluconazol e Itraconazol, representadas pelos seus respectivos valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em µmol/L frente à diferentes espécies dos gêneros *Candida*. Destacou-se em negrito os valores de MIC menores que 10 µmol/L.

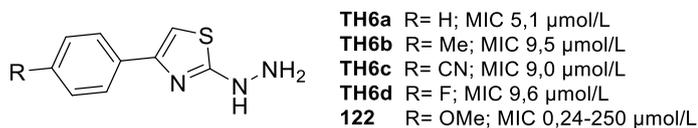
Composto	MIC (µmol/L)			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. auris</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
TH6a	5,1	5,1	5,1	5,1
TH6b	9,5	9,5	9,5	9,5
TH6c	9,0	9,0	9,0	9,0
TH6d	9,6	9,6	9,6	9,6
Anfotericina B	2,2	4,3	4,3	0,5
Caspofungina	N.D.	0,1	N.D.	N.D.
Fluconazol	1,6	26,1	104,5	0,8
Itraconazol	0,7	0,4	2,8	0,2

ND: Não determinado.

Os derivados 2-tiazolilhidrazinas (**TH6a-d**) demonstraram uma boa potência e amplo espectro, apresentando valores de MIC menores que 10 µmol/L frente a todas as espécies testadas, sendo necessário testá-los em concentrações menores para definir a MIC definitiva. Em comparação com **122**, derivado contendo o grupo 4-metoxifenila obtido por Franco *et al.* (2021), as substâncias deste trabalho foram menos ativas contra *C. albicans* (MIC = 0,24 µmol/L para **122**), mas mais ativas contra *C. krusei* (MIC = 250 µmol/L para **122**). O produto de degradação não foi avaliado contra *C. auris* (**Figura 52**, p. 148) (FRANCO *et al.*, 2021).

Os valores de MIC das 2-tiazolilhidrazinas não foram significativamente menores que aqueles apresentados pelas 2-tiazolilhidrazonas correspondentes mais ativas deste trabalho. Inclusive, os derivados como **TH3a** e **TH5a** apresentaram valores de MIC menores que as suas respectivas 2-tiazolilhidrazinas para algumas espécies.

Figura 52 – Estruturas químicas dos produtos **TH6a-d** e de seu análogo **122**, obtido e caracterizado por Franco *et al.* (2021), e seus intervalos de valores de MIC frente às cepas de referência das espécies de *Candida* spp. testadas.



Esses resultados reiteram que as 2-tiazolilhidrazonas não atuam como pró-fármacos *per se*, mas que os seus produtos de degradação são potencialmente ativos contra os fungos de interesse. Pode-se apontar que, caso a degradação das hidrazonas leve às hidrazinas como produtos majoritários, ainda há a possibilidade da atuação desses compostos no tratamento das infecções fúngicas por meio de um mecanismo de ação distinto das 2-tiazolilhidrazonas. Seria necessário realizar estudos para verificar a estabilidade das hidrazonas *in vivo* e estabelecer os perfis farmacocinéticos das hidrazinas em comparação com as hidrazonas, buscando verificar se as 2-tiazolilhidrazinas seriam potenciais agentes antifúngicos após o processo de hidrólise. Nosso grupo está dando continuidade a estes resultados avaliando a permeabilidade de derivados 2-tiazolilhidrazonas e 2-tiazolilhidrazinas em modelo *in vitro* com células Caco-2 (células epiteliais de adenocarcinoma humano).

Outra consideração que podemos tirar desses resultados é como a variação dos substituintes na posição *para* do anel benzênico parece não ter grande influência na atividade biológica, visto que as 2-tiazolilhidrazinas tiveram um mesmo perfil biológico para todas as espécies. Esse detalhe vai ao encontro dos estudos de QSAR discutidos na seção anterior. O anel benzênico conectado ao heterociclo apresenta uma contribuição estrutural importante, e a presença do grupo hidrazona e a variação do ligante pode modular mais consideravelmente, de forma positiva ou negativa, a atividade antifúngica dos tiazóis do que no grupo aromático, visto que o grupo hidrazona estabelece possíveis interações intermoleculares importantes com o alvo molecular dessas substâncias (FERNANDES *et al.*, 2021; LINO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022).

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos computacionais foram executados no Laboratório de Modelagem Molecular, sob supervisão do prof. Dr. Vinícius Gonçalves Maltarollo. Os experimentos de síntese e purificação foram executados no Laboratório de Química Farmacêutica, sob supervisão da profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira. Os experimentos biológicos foram executados no Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, sob colaboração com a profa. Dra. Susana Johann e a aluna de graduação em Farmácia Sofia Nobre.

3.1 – Curadoria e preparo das estruturas químicas

Sete derivados 2-tiazolilhidrazonas com atividade antifúngica validada experimentalmente contra *Candida* e *Cryptococcus* spp. foram selecionados para o estudo teórico a respeito de suas estabilidades frente à hidrólise do grupo hidrazona: **62-63** (PEREIRA DE SÁ et al., 2015), **72** e **78** (LINO et al., 2018), e **96**, **121** e **123** (OLIVEIRA et al., 2022) (**Figura 44**, p. **137**). As estruturas químicas tridimensionais dos compostos foram construídas no programa Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, 2020). Para todas as moléculas o isômero *E* foi definido como diastereoisômero de referência. Uma análise conformacional foi conduzida para obter a conformação mais estável de cada molécula, utilizando o pacote computacional OMEGA 2.5.1.4 (HAWKINS et al., 2010) e o campo de força MMFF94 (HALGREN, 1999). Depois, estados de ionização foram corrigidos para o meio fisiológico (pH = 7,4) aplicando o programa fixpka presente no pacote computacional QUACPAC 1.6.3.1 (OpenEye Scientific Software, 2016). A etapa anterior de correção da conformação foi aplicada nas estruturas do arquivo de saída após a correção dos estados de ionização.

3.2 – Otimização das estruturas químicas e cálculo das propriedades eletrônicas e moleculares

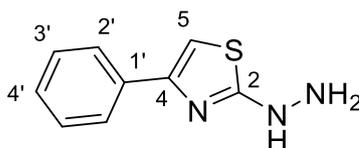
A otimização das geometrias das estruturas químicas selecionadas foi realizada por meio de cálculos quânticos aplicando o método DFT, com o funcional B3LYP e conjunto de base 6-311+G** (DITCHFIELD; HEHRE; POPLE, 1971; RASSOLOV et al., 2001; STEPHENS et al., 1994). Calculou-se também as

frequências das estruturas no infravermelho como critério para garantir que as estruturas otimizadas representavam os mínimos locais ou globais de energia potencial. A ausência de frequências imaginárias (valores negativos) denotou que as estruturas otimizadas eram adequadas. Por fim, após o processo de otimização, foram calculadas diversas propriedades eletrônicas e moleculares (energias dos orbitais de fronteira, dureza e maciez, eletronegatividade, cargas atômicas derivadas do potencial eletrostático, entre outras) a fim de relacioná-las com o potencial de hidrólise dos compostos em comparação com os dados experimentais de **63** e **72**. Todos os cálculos descritos foram executados no programa Spartan 20 (versão 1.1.4 Wavefunction Inc., 2022, licença nº 165980162423349708).

3.3 – Preparação das 2-tiazolilhidrazinas

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 1 equivalente molar de tiossemicarbazida e 1 equivalente molar de α -halocetona em 5 mL de metanol. O balão foi conectado a um condensador de bolas e a reação foi mantida sob agitação magnética e aquecimento a 60 °C. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD (Hex:AcOEt 3:7 como eluente; vapor de iodo como revelador). Após quarenta minutos, verificou-se o consumo total do material de partida. Finalizada a reação, o solvente foi removido em evaporador rotatório e cerca de 10 g de gelo picado foram adicionados ao balão, formando um precipitado. Esperou-se que o gelo derretesse a temperatura ambiente e o sólido foi filtrado a vácuo com funil de Büchner e lavado com água destilada gelada. Após secagem, os produtos obtidos foram posteriormente caracterizados por suas faixas de fusão e espectros de RMN.

3.3.1 – Síntese do 2-hidrazineil-4-feniltiazol (TH6a)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.3** deste **Capítulo 2** (p. **150**), em que se reagiu 50,0 mg (0,549 mmol) de

tiossemicarbazida e 109,2 mg (0,549 mmol) de 2-bromoacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido bege (30,6 mg), com 29% de rendimento.

Aspecto físico: sólido bege amorfo.

Fórmula molecular: C₉H₉N₃S.

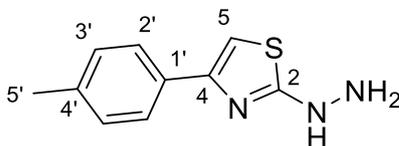
Massa molar: 191,25 g/mol.

Faixa de fusão: 130,5-132,5 °C (129 °C por YEFIDOFF-FREEDMAN et al., 2014).

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 8,58 (s; 1H; -NH-NH₂); 7,79 (d; *J*_{2',3'} = 7,7 Hz; 2H; H-2'); 7,35 (t; *J*_{3',2'} = 7,5 Hz; 2H; H-3'); 7,24 (t; *J*_{4',2'/3'} = 7,4 Hz; 1H; H-4'); 7,09 (s; 1H; H-5); 3,87 (s; 1H; -NH₂).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 175,9 (C-2, -N=C-S-); 150,6 (C-4, -N-C=CH-); 135,2 (C-1', C); 128,4 (C-3' e C-5', CH); 127,1 (C-4', CH); 125,4 (C-2' e C-6', CH); 102,0 (C-5, -C=CH-S-).

3.3.2 – Síntese do 2-hidrazineil-4-(4-metilfenil)tiazol (TH6b)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.3** deste **Capítulo 2** (p. 150), em que se reagiu 50,0 mg (0,549 mmol) de tiossemicarbazida e 116,9 mg (0,549 mmol) de 2-bromo-4'-metilacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido vermelho (66,8 mg), com 59% de rendimento.

Aspecto físico: sólido vermelho amorfo.

Fórmula molecular: C₁₀H₁₁N₃S.

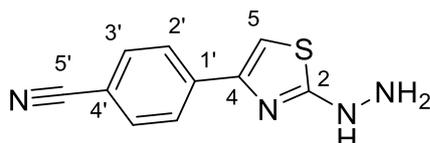
Massa molar: 205,28 g/mol.

Faixa de fusão: 120-122 °C (176-177 °C por MAHAJAN; SONDHI; RALHAN, 1977).

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7,72 (d; *J*_{2',3'} = 8,1 Hz; 2H; H-2'); 7,18 (d; *J*_{3',2'} = 7,8 Hz; 2H; H-3'); 7,14 (s; 1H; H-5); 4,25 (s; 1H; -NH₂); 2,30 (s; 3H; Me-5').

RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 151,1 (C-4, $-\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{CH}-$); 136,7 (C-1', C); 132,0 (C-4', CH); 129,1 (C-3', CH); 125,5 (C-2', CH); 102,4 (C-5, $-\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{S}-$); 20,8 (C-5', CH_3).

3.3.3 – Síntese do 2-hidrazineil-4-(4-cianofenil)tiazol (TH6c)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.3** deste **Capítulo 2** (p. **150**), em que se reagiu 50,0 mg (0,549 mmol) de tiossemicarbazida e 122,9 mg (0,549 mmol) de 2-bromo-4'-cianoacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido amarelo claro (50,3 mg), com 42% de rendimento.

Aspecto físico: sólido amarelo claro amorfo.

Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{S}$.

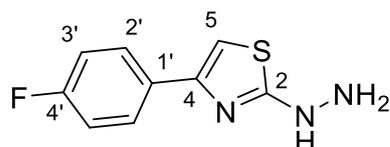
Massa molar: 216,26 g/mol.

Faixa de fusão: 148-150 °C.

RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 8,77 (s; 1H; $-\text{NH}-\text{NH}_2$); 7,97 (d; $J_{2',3'} = 8,0$ Hz; 2H; H-2'); 7,82 (t; $J_{3',2'} = 8,1$ Hz; 2H; H-3'); 7,43 (s; 1H; H-5); 4,67 (s; 1H; $-\text{NH}_2$).

RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 175,8 (C-2, $-\text{N}=\underline{\text{C}}-\text{S}-$); 148,7 (C-4, $-\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{CH}-$); 132,5 (C-3', CH); 127,1 (C-4', CH); 126,0 (C-2', CH); 119,1 (C-5', $-\underline{\text{C}}\equiv\text{N}$); 109,2 (C-1', C); 106,0 (C-5, $-\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{S}-$).

3.3.4 – Síntese do 2-hidrazineil-4-(4-fluorofenil)tiazol (TH6d)



A preparação do produto seguiu o procedimento geral descrito na **Seção 3.3** deste **Capítulo 2** (p. 150), em que se reagiu 50,0 mg (0,549 mmol) de tiossemicarbazida e 119,2 mg (0,549 mmol) de 2-bromo-4'-fluoroacetofenona. Ao fim da elaboração obteve-se um sólido avermelhado (28,1 mg), com 25% de rendimento.

Aspecto físico: sólido avermelhado amorfo.

Fórmula molecular: C₁₀H₈N₄S.

Massa molar: 209,24 g/mol.

Faixa de fusão: 122-124 °C (108 °C por YEFIDOFF-FREEDMAN et al., 2014).

RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 8,34 (s; 1H; -NH-NH₂); 7,94 (m; 2H; H-2'); 7,31 (m; 3H; H-5 e H-3'); 4,64 (s; 1H; -NH₂).

RMN de ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 164,0 (C-4', C); 150,4 (C-4, -N-C=CH-); 129,6 (d; *J*_{2',F} = 9 Hz; C-2', CH); 116,1 (d; *J*_{3',F} = 22 Hz; C-3', CH); 115,7 (C-5, -C=CH-S-).

3.4 – Micro-organismos, preparo dos inóculos e ensaio de microdiluição em caldo

Os experimentos de avaliação da atividade antifúngica dos derivados 2-tiazolilhidrazinas seguiram o mesmo protocolo experimental apresentado nas **Seções 3.10** (p. 133) e **3.11** (p. 133) do **Capítulo 1** deste trabalho.

CONCLUSÃO

A aplicação dos algoritmos de aprendizado de máquina levou à construção de 2.820 modelos de classificação, em que foram selecionados seis com robustezes significativas. As técnicas de floresta aleatória, *perceptron* de múltiplas camadas e número de vizinhos próximos “k” levaram aos modelos com maiores robustezes para a predição de ambas as atividades anti-*C. albicans* e anti-*C. neoformans*, com valores de coeficiente de correlação de Matthews maiores que 0,55 para a validação interna e 0,70 para a validação externa. Os seis modelos selecionados para o protocolo de triagem virtual classificaram, em consenso, quase 500 2-tiazolilhidrazonas com potencial atividade contra os dois fungos com mais que 90% de probabilidade de assertividade. A caracterização quimioinformática mostrou que 109 dessas substâncias cumpriam os critérios estabelecidos por ambas as regras de Lipinski e Veber. Dessas, alguns representantes foram escolhidos para selecionar os análogos a serem sintetizados.

Quatro derivados tiossemicarbazonas (**TS2-5**) foram sintetizadas com bons rendimentos (61-100%), levando a dezoito derivados 2-tiazolilhidrazonas (**TH2a-h**, **TH3a**, **TH4a-h** e **TH5a**) com rendimentos razoáveis a bons (41-93%). Segundo nossa pesquisa na literatura, todas essas substâncias são inéditas. A tiossemicarbazona **TS1** não pode ser obtida visto que a oxidação do 3-butin-1-ol para 3-butin-1-al não foi bem-sucedida. É necessário aplicar outras metodologias para a oxidação do álcool em que seja possível isolá-lo na etapa de elaboração.

Quanto à avaliação da atividade biológica, os derivados contendo hidrazonas alifáticas e com ligantes mais polares (**TH3a**, **TH4a-h** e **TH5a**) foram mais ativos contra as espécies do gênero *Candida* em comparação com os derivados da nabumetona (**TH2a-h**) e outros derivados mais apolares descritos na literatura. Isso indica que a estratégia de selecionar os análogos menos lipofílicos realmente levou a substâncias mais ativas. Vale destacar que cinco substâncias (**TH2h**, **TH3a**, **TH4e-f** e **TH5a**) apresentaram valores de concentração inibitória mínima menores que 10 µmol/L contra o patógeno emergente *C. auris*, indicando que o esqueleto 2-tiazolilhidrazona é promissor para o desenvolvimento de uma classe de antifúngicos contra esse micro-organismo tão preocupante.

As observações vistas no estudo teórico a respeito do potencial de hidrólise foram relacionáveis com os dados experimentais de estabilidade dos derivados **63** e

72. Vê-se que as energias dos orbitais de fronteira são os principais parâmetros atrelados ao mecanismo de hidrólise das substâncias, podendo ser um critério a ser avaliado em estudos posteriores e para o planejamento de derivados contendo o grupo hidrazona mais estáveis em meio aquoso.

Os quatro derivados 2-tiazolilhidrazinas (**TH6a-d**) foram sintetizados com baixos rendimentos (25-59%). As quatro 2-tiazolilhidrazinas apresentaram valores de MIC menores que 10 µmol/L, mas não foram significativamente mais potentes que os análogos hidrazonas mais ativos deste trabalho e outros relatados na literatura. Isso refuta a hipótese de Franco *et al.* (2021) das hidrazonas atuarem como pró-fármacos, indicando que as hidrazinas provavelmente atuam por outro mecanismo de ação. Outra conclusão destes resultados é de que a porção hidrazona contribui mais expressivamente para a atividade biológica das 2-tiazolilhidrazonas, visto que as hidrazinas apresentaram pouca diferença em seus valores de MIC.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam que as 2-tiazolilhidrazonas possuem um potencial biológico expressivo como uma futura nova classe de antifúngicos. A aplicação da inteligência artificial se mostrou eficiente na predição da atividade antifúngica, podendo ser aplicados na otimização desse esqueleto na obtenção de substâncias ainda mais potentes. Outro ponto marcante é que a seleção de derivados contendo hidrazonas mais polares levou a substâncias mais ativas que aquelas contendo grupos mais apolares. Esse critério se mostrou importante para selecionar futuras substâncias com perfis farmacocinéticos mais adequados e, com isso, ter uma maior gama de aplicações terapêuticas, caso venham a se tornar fármacos em algum momento futuro.

Em continuação a esse trabalho, espera-se testar os derivados tiazólicos contra as espécies *C. gattii* e *C. neoformans*, objetivando validar experimentalmente as predições realizadas pelos modelos de classificação. Também, espera-se avaliar a estabilidade em meio aquoso dos derivados estudados no **Capítulo 2** (p. 135), a fim de validar os resultados teóricos obtidos. Além disso, as substâncias **TH3a**, **TH4c**, **TH4e-h**, **TH5a** e **TH6a-d** serão avaliadas em modelo *in vivo* de infecção com *Candida* spp. em larvas da espécie de besouro *Tenebrio molitor*, a fim de estudar o potencial terapêutico desses produtos para selecionar os mais promissores a serem avaliados em modelos de infecção com mamíferos.

REFERÊNCIAS

- AFFAN, M. A. et al. Synthesis, characterization and biological studies of organotin(IV) complexes of thiosemicarbazone ligand derived from pyruvic acid : x-ray crystal structure of [Me₂Sn(PAT)]. **The Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 63–72, 2009.
- ALCÂNTARA, F. C. et al. Teste de Degradação Forçada para Fármacos e Medicamentos. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 5, n. 1, 2013.
- ALI, T. et al. Clinical use of anti-TNF therapy and increased risk of infections. **Drug, Healthcare and Patient Safety**, v. 5, p. 79–99, 28 mar. 2013.
- ANBAZHAGAN, R.; SANKARAN, K. R. Syntheses, spectral characterization, single crystal X-ray diffraction and DFT computational studies of novel thiazole derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1050, p. 73–80, 24 out. 2013.
- ANDERSON, T. M. et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 5, p. 400–406, maio 2014.
- ASHRAF, N. et al. Re-drawing the Maps for Endemic Mycoses. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 843–865, 1 out. 2020.
- ASSE JUNIOR, L. R. et al. Virtual screening of antibacterial compounds by similarity search of Enoyl-ACP reductase (FabI) inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 51–68, 15 nov. 2019.
- AYATI, A. et al. Thiazole in the targeted anticancer drug discovery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 15, p. 1929–1952, 1 ago. 2019.
- BADDLEY, J. W. et al. Factors Associated with Mortality in Transplant Patients with Invasive Aspergillosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 12, p. 1559–1567, 15 jun. 2010.
- BALDAUF, S. L.; PALMER, J. D. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 11558–11562, 15 dez. 1993.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 1 abr. 2016.
- BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319–331, jun. 2020.
- BERTHOLD, M. R. et al. KNIME - the Konstanz information miner: version 2.0 and beyond. **ACM SIGKDD Explorations Newsletter**, v. 11, n. 1, p. 26–31, 16 nov. 2009.
- BHAGAT, R. T.; BUTLE, S. **Drug Repurposing: A Review**. 2021.

BODEY, G. et al. Fungal infections in cancer patients: An international autopsy survey. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 99–109, 1 fev. 1992.

BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, dez. 2017.

BRAGA, S. F. P. et al. Synthesis and cytotoxicity evaluation of thiosemicarbazones and their thiazole derivatives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 299–308, jun. 2016.

BRATTON, E. W. et al. Comparison and Temporal Trends of Three Groups with Cryptococcosis: HIV-Infected, Solid Organ Transplant, and HIV-Negative/Non-Transplant. **PLOS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43582, 24 ago. 2012.

BREDENKAMP, M. W. et al. Observations on the Hantzsch Reaction: Synthesis of N-tBoc-S-Dolaphenine. **Synthetic Communications**, v. 22, n. 21, p. 3029–3039, 1 nov. 1992.

CACERES, D. H. et al. Detection and Control of Fungal Outbreaks. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 741–745, 1 out. 2020.

CAFFREY, P. et al. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. **Chemistry & Biology**, v. 8, n. 7, p. 713–723, 1 jul. 2001.

CARRADORI, S. et al. Evaluation of a large library of (thiazol-2-yl)hydrazones and analogues as histone acetyltransferase inhibitors: Enzyme and cellular studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 569–578, 10 jun. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Candida auris: A drug-resistant germ that spreads in healthcare facilities**. , 21 dez. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/pdf/Candida_auris_508.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2022

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC and Fungal Diseases: Why are fungal diseases a public health issue?** , 20 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/fungal-factsheet-508c.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2022

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Tracking Candida auris**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>>. Acesso em: 6 ago. 2022.

CHAN, H. C. S. et al. Advancing Drug Discovery via Artificial Intelligence. **Trends in Pharmacological Sciences**, Special Issue: Rise of Machines in Medicine. v. 40, n. 8, p. 592–604, 1 ago. 2019.

CHANG, W.-C. et al. Pulmonary cryptococcosis: comparison of clinical and radiographic characteristics in immunocompetent and immunocompromised patients. **Chest**, v. 129, n. 2, p. 333–340, fev. 2006.

CHAURASIA, G. A REVIEW ON PHARMACEUTICAL PREFORMULATION STUDIES IN FORMULATION AND DEVELOPMENT OF NEW DRUG MOLECULES. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, v. 7, n. 6, p. 2313–2320, 31 maio 2016.

CHEN, E. P.; BONDI, R. W.; MICHALSKI, P. J. Model-based Target Pharmacology Assessment (mTPA): An Approach Using PBPK/PD Modeling and Machine Learning to Design Medicinal Chemistry and DMPK Strategies in Early Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 6, p. 3185–3196, 25 mar. 2021.

CHEN, H. et al. The rise of deep learning in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 6, p. 1241–1250, 1 jun. 2018.

CHEN, S. et al. Epidemiology and Host- and Variety-Dependent Characteristics of Infection Due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 499–508, 1 ago. 2000.

CHICCO, D.; JURMAN, G. The advantages of the Matthews correlation coefficient (MCC) over F1 score and accuracy in binary classification evaluation. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 6, 2 jan. 2020.

CHICCO, D.; WARRENS, M. J.; JURMAN, G. The Matthews Correlation Coefficient (MCC) is More Informative Than Cohen's Kappa and Brier Score in Binary Classification Assessment. **IEEE Access**, v. 9, p. 78368–78381, 2021.

CHIMENTI, F. et al. Synthesis and in vitro activity of 2-thiazolylhydrazone derivatives compared with the activity of clotrimazole against clinical isolates of *Candida* spp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 16, p. 4635–4640, 15 ago. 2007.

CHIMENTI, F. et al. Synthesis, Stereochemical Identification, and Selective Inhibitory Activity against Human Monoamine Oxidase-B of 2-Methylcyclohexylidene-(4-arylthiazol-2-yl)hydrazones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4874–4880, 1 ago. 2008.

CHIMENTI, F. et al. Synthesis, Stereochemical Separation, and Biological Evaluation of Selective Inhibitors of Human MAO-B: 1-(4-Arylthiazol-2-yl)-2-(3-methylcyclohexylidene)hydrazines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6516–6520, 9 set. 2010.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006290, 18 maio 2017.

CLARK, R. A. et al. Spectrum of *Cryptococcus neoformans* infection in 68 patients infected with human immunodeficiency virus. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, p. 768–777, out. 1990.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. G. **Organic chemistry**. 2. ed. [s.l.] Oxford University Press, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (ED.). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: M07-A10 ; approved standard**. 10. ed ed. Wayne, PA: Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, p. a019752, 7 jan. 2015.

CRAWFORD, J.; DALE, D. C.; LYMAN, G. H. Chemotherapy-induced neutropenia. **Cancer**, v. 100, n. 2, p. 228–237, 2004.

DAVIES, M. et al. ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W612–W620, 1 jul. 2015.

DE LOGU, A. et al. In vitro activity of 2-cyclohexylidenehydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 692–698, 1 maio 2005.

DE, S. K. et al. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship of Substrate Competitive, Selective, and in Vivo Active Triazole and Thiadiazole inhibitors of the c-Jun N-Terminal Kinase. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1943–1952, 9 abr. 2009.

DE SANTANA, T. I. et al. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874–886, 20 jan. 2018.

DENNING, D. W. Echinocandins: a new class of antifungal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 889–891, 1 jun. 2002.

DENNING, D. W. Minimizing fungal disease deaths will allow the UNAIDS target of reducing annual AIDS deaths below 500 000 by 2020 to be realized. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, p. 20150468, 5 dez. 2016.

DENNING, D. W. Calling upon all public health mycologists. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 6, p. 923–924, 1 jun. 2017.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20–33, 1 maio 2016.

DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLE, J. A. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 54, n. 2, p. 724–728, 15 jan. 1971.

DURANT, J. L. et al. Reoptimization of MDL Keys for Use in Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 42, n. 6, p. 1273–1280, 1 nov. 2002.

- DURRANT, J. D.; AMARO, R. E. Machine-Learning Techniques Applied to Antibacterial Drug Discovery. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 85, n. 1, p. 14–21, 2015.
- ELTON, D. C. et al. Deep learning for molecular design—a review of the state of the art. **Molecular Systems Design & Engineering**, v. 4, n. 4, p. 828–849, 5 ago. 2019.
- EMRI, T. et al. Echinocandins: production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 8, p. 3267–3284, 1 abr. 2013.
- FARGHALY, T. A. et al. Synthesis, Antimicrobial Activity and Molecular Docking Study of Thiazole Derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 2417–2425, 2017.
- FARGHALY, T. A. et al. Anti-viral activity of thiazole derivatives: an updated patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 32, n. 7, p. 791–815, 3 jul. 2022.
- FERNANDES, P. DE O. et al. Quantitative structure-activity relationship and machine learning studies of 2-thiazolyldrazone derivatives with anti-Cryptococcus neoformans activity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 14 jun. 2021.
- FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Chemoinformatics Approaches to Structure- and Ligand-Based Drug Design. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.
- FRANCO, P. H. C. et al. Stability-indicating method for the novel antifungal compound R176: Characterization and in vitro antifungal activity of its active degradation product. **Biomedical Chromatography**, v. 35, n. 3, p. e5014, 2021.
- FUKUDA, T. et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 827–833, 1 ago. 2003.
- GEDDES-MCALISTER, J.; SHAPIRO, R. S. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1435, n. 1, p. 57–78, 2019.
- GEORGI, A. et al. Cryptococcus gattii Meningoencephalitis in an Immunocompetent Person 13 Months after Exposure. **Infection**, v. 37, n. 4, p. 370–373, 1 ago. 2009.
- GOLDMAN, D. L. et al. Serologic Evidence for Cryptococcus neoformans Infection in Early Childhood. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. e66, 1 maio 2001.
- GÖLLER, A. H. et al. Bayer's in silico ADMET platform: a journey of machine learning over the past two decades. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 9, p. 1702–1709, 1 set. 2020.
- GONÇALVES, B. et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905–927, 1 nov. 2016.

GORE, V. et al. 5-Oxo-ETE Receptor Antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3725–3732, 9 maio 2013.

GRAY, K. C. et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 7, p. 2234–2239, 14 fev. 2012.

GUO, J. et al. Optimization, Structure–Activity Relationship, and Mode of Action of Nortopsentin Analogues Containing Thiazole and Oxazole Moieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 36, p. 10018–10031, 11 set. 2019.

GURUNG, A. B. et al. An Updated Review of Computer-Aided Drug Design and Its Application to COVID-19. **BioMed Research International**, v. 2021, p. e8853056, 29 jun. 2021.

HALGREN, T. A. MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. **Journal of Computational Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 720–729, 1999.

HANSCH, CORWIN.; FUJITA, TOSHIO. p- σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1616–1626, 1 abr. 1964.

HANTZSCH, A. Untersuchungen über Azole. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 250, n. 3, p. 257–273, 1889.

HANTZSCH, A.; WEBER, J. H. Ueber Verbindungen des Thiazols (Pyridins der Thiophenreihe). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 20, n. 2, p. 3118–3132, 1887.

HARRIS, J.; LOCKHART, S.; CHILLER, T. Cryptococcus gattii: where do we go from here? **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 113–129, 1 fev. 2012.

HAWKINS, P. C. D. et al. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 4, p. 572–584, 26 abr. 2010.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, p. 5.4.10, 28 jul. 2017.

HAY, R. J. Fungal infections. **Clinics in Dermatology**, v. 24, n. 3, p. 201–212, 1 maio 2006.

HEDNER, T. et al. Nabumetone. **Drugs**, v. 64, n. 20, p. 2315–2343, 1 out. 2004.

HUSSEIN, W.; TURAN-ZITOUNI, G. Synthesis of new thiazole and thiazolyl derivatives of medicinal significant-a short review. **MOJ Bioorganic & Organic Chemistry**, v. Volume 2, n. Issue 2, 12 mar. 2018.

IDNURM, A. et al. Deciphering the Model Pathogenic Fungus Cryptococcus Neoformans. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753–764, out. 2005.

- ISHIDA, S. et al. AI-Driven Synthetic Route Design Incorporated with Retrosynthesis Knowledge. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 62, n. 6, p. 1357–1367, 28 mar. 2022.
- ISHITA, K. et al. Synthesis and biological evaluation of aminothiazoles against *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 2251–2261, 15 maio 2018.
- JAIN, S. et al. Large-Scale Modeling of Multispecies Acute Toxicity End Points Using Consensus of Multitask Deep Learning Methods. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 2, p. 653–663, 22 fev. 2021.
- JIMÉNEZ-LUNA, J. et al. Artificial intelligence in drug discovery: recent advances and future perspectives. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 949–959, 2 set. 2021.
- JIMÉNEZ-LUNA, J.; GRISONI, F.; SCHNEIDER, G. Drug discovery with explainable artificial intelligence. **Nature Machine Intelligence**, v. 2, n. 10, p. 573–584, out. 2020.
- JOHNSON, M. D.; PERFECT, J. R. Caspofungin: first approved agent in a new class of antifungals. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 4, n. 5, p. 807–823, 1 maio 2003.
- KAITOH, K.; YAMANISHI, Y. TRIOMPHE: Transcriptome-Based Inference and Generation of Molecules with Desired Phenotypes by Machine Learning. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 9, p. 4303–4320, 27 set. 2021.
- KALIA, J.; RAINES, R. T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 39, p. 7523–7526, 2008.
- KANTARJIAN, H. M. et al. Cancer research in the United States: A critical review of current status and proposal for alternative models. **Cancer**, v. 124, n. 14, p. 2881–2889, 2018.
- KHALIL, A. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of aminothiazole derivatives against the fungal pathogens *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 532–547, 1 fev. 2015.
- KHAN, N.; RAWLINGS, B.; CAFFREY, P. A labile point in mutant amphotericin polyketide synthases. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 6, p. 1121–1126, 1 jun. 2011.
- KLOPMAN, G. Chemical reactivity and the concept of charge- and frontier-controlled reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, n. 2, p. 223–234, 1 jan. 1968.
- KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in Stability Testing, with Emphasis on Stability During Distribution and Storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857–868, 6 out. 1999.

KONTOYIANNIS, D. P. et al. Prospective Surveillance for Invasive Fungal Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients, 2001–2006: Overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 8, p. 1091–1100, 15 abr. 2010.

KORDALEWSKA, M. et al. Understanding Echinocandin Resistance in the Emerging Pathogen *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. e00238-18, 25 maio 2018.

KRONENBERGER, T. et al. Studies of *Staphylococcus aureus* FabI inhibitors: fragment-based approach based on holographic structure–activity relationship analyses. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 135–151, 27 jan. 2017.

KUHLER, K. et al. Fungal KATs/KDACs: A New Highway to Better Antifungal Drugs? **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 11, p. e1005938, 10 nov. 2016.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 8 out. 2015.

ŁĄCZKOWSKI, K. Z. et al. Synthesis, antimicrobial evaluation and theoretical prediction of NMR chemical shifts of thiazole and selenazole derivatives with high antifungal activity against *Candida* spp. **Journal of Molecular Structure**, v. 1108, p. 427–437, 15 mar. 2016.

ŁĄCZKOWSKI, K. Z. et al. Synthesis, lipophilicity determination, DFT calculation, antifungal and DPPH radical scavenging activities of tetrahydrothiophen-3-one based thiazoles. **Journal of Molecular Structure**, v. 1171, p. 717–725, 5 nov. 2018.

LALLA, R. V. et al. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. **Supportive Care in Cancer**, v. 18, n. 8, p. 985–992, 1 ago. 2010.

LAZERA, M. S. et al. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, n. 5, p. 379–383, 1 jan. 2000.

LINO, C. I. et al. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 248–260, 10 maio 2018.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings¹PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25.1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Special issue dedicated to Dr. Eric Tomlinson, *Advanced Drug Delivery Reviews*, A Selection of the Most Highly Cited Articles, 1991-1998. v. 46, n. 1, p. 3–26, 1 mar. 2001.

LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 134–140, 15 jan. 2017.

LORTHOLARY, O. et al. Fungal Infections in Immunocompromised Travelers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 6, p. 861–869, 15 mar. 2013.

LYNCH, D. P. Oral candidiasis: History, classification, and clinical presentation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 78, n. 2, p. 189–193, 1 ago. 1994.

MACALINO, S. J. Y. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 9, p. 1686–1701, 1 set. 2015.

MACCIONI, E. et al. Synthesis and anti-microbial activity of isothiosemicarbazones and cyclic analogues. **Farmaco (Societa chimica italiana)**, v. 57, n. 10, p. 809–817, 1 out. 2002.

MACDOUGALL, L. et al. Risk Factors for Cryptococcus gattii Infection, British Columbia, Canada - Volume 17, Number 2—February 2011 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. v. 17, n. 2, p. 7, 2011.

MAHAJAN, M. P.; SONDHI, S. M.; RALHAN, N. K. Studies in heterocyclics. III. Synthesis of thiazolotriazepines. **Australian Journal of Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 2053–2056, 1977.

MALTAROLLO, V. G. Classification of Staphylococcus Aureus FabI Inhibitors by Machine Learning Techniques. **International Journal of Quantitative Structure-Property Relationships (IJQSPR)**, v. 4, n. 4, p. 1–14, 2019.

MALTAROLLO, V. G. et al. In vitro and in silico studies of antioxidant activity of 2-thiazolylhydrazone derivatives. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 86, p. 106–112, 1 jan. 2019.

MANAVATHU, E. K.; CUTRIGHT, J. L.; CHANDRASEKAR, P. H. Organism-Dependent Fungicidal Activities of Azoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 11, p. 3018–3021, nov. 1998.

MENDEZ, D. et al. ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D930–D940, 8 jan. 2019.

MILJKOVIĆ, F. et al. Machine Learning Models for Human In Vivo Pharmacokinetic Parameters with In-House Validation. **Molecular Pharmaceutics**, v. 18, n. 12, p. 4520–4530, 6 dez. 2021.

MINERALI, E. et al. Comparing Machine Learning Algorithms for Predicting Drug-Induced Liver Injury (DILI). **Molecular Pharmaceutics**, v. 17, n. 7, p. 2628–2637, 6 jul. 2020.

MULLARD, A. Biotech R&D spend jumps by more than 15%. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 7, p. 447–447, 1 jul. 2016.

NARAYANAN, H. et al. Design of Biopharmaceutical Formulations Accelerated by Machine Learning. **Molecular Pharmaceutics**, v. 18, n. 10, p. 3843–3853, 4 out. 2021.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

NIKNAM, K. Pyridinium Chlorochromate Supported on Alumina as an Efficient Oxidizing Agent for Oxidation of Alcohols Under Solvent Free Conditions. **Asian Journal of Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 2513–2516, 2005.

NOSENGO, N. Can you teach old drugs new tricks? **Nature**, v. 534, n. 7607, p. 314–316, 1 jun. 2016.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Revisiting the Source of Candidemia: Skin or Gut? **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 12, p. 1959–1967, 15 dez. 2001.

OLIVEIRA, N. J. C. **Síntese, estudos computacionais e avaliação antifúngica de novos heterociclos tiazóis, tiadiazóis e tiadiazolínicos**. Dissertação de mestrado—[s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.

OLIVEIRA, N. J. C. et al. Computer-aided molecular design, synthesis and evaluation of antifungal activity of heterocyclic compounds. **Journal of Molecular Structure**, v. 1267, p. 133573, 5 nov. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. [s.l.] World Health Organization, 2014.

OUF, S. A. et al. Efficiency of newly prepared thiazole derivatives against some cutaneous fungi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 3287–3295, 23 jul. 2018.

PANKHURST, C. L. Candidiasis (oropharyngeal). **BMJ Clinical Evidence**, v. 2012, p. 1304, 20 fev. 2012.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive Fungal Infections among Organ Transplant Recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 8, p. 1101–1111, 15 abr. 2010.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 15 fev. 2016.

PATEL, L. et al. Machine Learning Methods in Drug Discovery. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5277, jan. 2020.

PATIL, A. et al. Synthesis and antifungal activity of 1,5-diaryl pyrazole substituted thiazole derivatives. **Indian Journal of Chemistry**, v. 54B, p. 918–923, jul. 2015.

PAWAR, C. D. et al. Synthesis and antimicrobial evaluation of novel ethyl 2-(2-(4-substituted)acetamido)-4-substituted-thiazole-5-carboxylate derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 15, p. 3525–3528, 1 ago. 2016.

PEARSON, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 22, p. 3533–3539, 1 nov. 1963.

- PEREIRA DE SÁ, N. et al. Thiazole compounds with activity against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 233–242, 18 set. 2015.
- PFALLER, M. A. et al. Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2163–2167, maio 2005.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, jan. 2007.
- PIANALTO, K. M.; ALSPAUGH, J. A. New Horizons in Antifungal Therapy. **Journal of Fungi**, v. 2, n. 4, p. 26, dez. 2016.
- PRESCOTT, BENJAMIN. 4-Hydroxy-2-butanone Thiosemicarbazone, a Potential Anticancer Agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 484–485, 1 maio 1967.
- PRICOPIE, A.-I. et al. Design and Synthesis of Novel 1,3-Thiazole and 2-Hydrazinyl-1,3-Thiazole Derivatives as Anti-Candida Agents: In Vitro Antifungal Screening, Molecular Docking Study, and Spectroscopic Investigation of their Binding Interaction with Bovine Serum Albumin. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3435, jan. 2019.
- QIAO, Q.; SO, S.-S.; GOODNOW, R. A. Stereochemical Control Factors in the Hantzsch Thiazole Synthesis: A Hammett Substitution Correlation Analysis. **Organic Letters**, v. 3, n. 23, p. 3655–3658, 1 nov. 2001.
- RASSOLOV, V. A. et al. 6-31G* basis set for third-row atoms. **Journal of Computational Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 976–984, 2001.
- REOLON, A.; PEREZ, L. R. R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 293–298, out. 2004.
- RESENDE, M. F. DE et al. Assessment of anti-diabetic activity of a novel hydrazine-thiazole derivative: *in vitro* and *in vivo* method. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, 10 jul. 2019.
- RODRIGUES, T.; BERNARDES, G. J. L. Machine learning for target discovery in drug development. **Current Opinion in Chemical Biology**, Next Generation Therapeutics. v. 56, p. 16–22, 1 jun. 2020.
- ROY, K.; KAR, S.; DAS, R. N. Statistical Methods in QSAR/QSPR. Em: ROY, K.; KAR, S.; DAS, R. N. (Eds.). **A Primer on QSAR/QSPR Modeling: Fundamental Concepts**. SpringerBriefs in Molecular Science. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 37–59.

SÁ, N. P. DE et al. Antivirulence activity and in vivo efficacy of a thiazole derivative against candidiasis. **Journal of Medical Mycology**, v. 31, n. 2, p. 101134, 1 jun. 2021.

SÁ, N. P. et al. A phenylthiazole derivative demonstrates efficacy on treatment of the cryptococcosis & candidiasis in animal models. **Future Science OA**, v. 4, n. 6, p. FSO305, 25 abr. 2018.

SÁ, N. P. et al. Antifungal Activity Directed Toward the Cell Wall by 2-Cyclohexylidenhydrazo-4-Phenyl-Thiazole Against *Candida albicans*. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 19, n. 4, p. 428–438, 30 nov. 2019.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1297–1313, nov. 2012.

SÁNCHEZ-CRUZ, N.; MEDINA-FRANCO, J. L. Epigenetic Target Fishing with Accurate Machine Learning Models. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 12, p. 8208–8220, 24 jun. 2021.

SATOH, K. et al. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 41–44, 2009.

SAYER, J. M.; JENCKS, W. P. General base catalysis of thiosemicarbazone formation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 23, p. 6353–6361, 1 nov. 1969.

SCANNELL, J. W. et al. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 3, p. 191–200, mar. 2012.

SCHELENZ, S. et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 5, p. 35, 2016.

SENGUPTA, P.; CHATTERJEE, B.; TEKADE, R. K. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 543, n. 1, p. 328–344, 30 maio 2018.

SERAFIM, M. S. M. et al. The application of machine learning techniques to innovative antibacterial discovery and development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 17 jun. 2020.

SERAFIM, M. S. M. et al. Machine learning techniques applied to the drug design and discovery of new antivirals: a brief look over the past decade. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 7 maio 2021.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 40–79, jan. 1999.

SHEN, C. et al. From machine learning to deep learning: Advances in scoring functions for protein–ligand docking. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 10, n. 1, p. e1429, 2020.

SHEN, C. et al. Accuracy or novelty: what can we gain from target-specific machine-learning-based scoring functions in virtual screening? **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 5, p. bbaa410, 1 set. 2021.

SHOHAM, S.; MARR, K. A. Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. **Future Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 639–655, maio 2012.

SILVA, I. R. **Estudos de estabilidade e farmacocinética de composto hidrazino-tiazólico com atividade antifúngica**. Dissertação de mestrado—[s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.

SILVA, I. R. et al. Preclinical pharmacokinetic study of a new thiazolyl hydrazone derivative with antifungal activity in mice plasma by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1149, p. 122180, 15 jul. 2020.

SILVA, I. R. et al. Improving the solubility of an antifungal thiazolyl hydrazone derivative by cyclodextrin complexation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 156, p. 105575, 1 jan. 2021.

SIMPSON, A. G. B.; ROGER, A. J. The real ‘kingdoms’ of eukaryotes. **Current Biology**, v. 14, n. 17, p. R693–R696, 7 set. 2004.

SINGH, M. et al. Design, synthesis and mode of action of novel 2-(4-aminophenyl)benzothiazole derivatives bearing semicarbazone and thiosemicarbazone moiety as potent antimicrobial agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 2, p. 263–282, 1 fev. 2016.

SINGH, U. P.; BHAT, H. R.; GAHTORI, P. Antifungal activity, SAR and physicochemical correlation of some thiazole-1,3,5-triazine derivatives. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, n. 2, p. 134–141, 1 jun. 2012.

SMRITY, S. Z.; SAIFUDDIN, A. H. M.; SULTANA, S. Stability Analysis of Formulated Emulsion Containing Black Cumin (*Nigella sativa*) Oil. **American Journal of Biomedical and Life Sciences**, v. 4, n. 3, p. 49, 28 maio 2016.

SOKOLOVA, A. S. et al. Synthesis and antiviral activity of camphor-based 1,3-thiazolidin-4-one and thiazole derivatives as Orthopoxvirus-reproduction inhibitors. **MedChemComm**, v. 9, n. 10, p. 1746–1753, 17 out. 2018.

SOUFAN, O. et al. DPubChem: a web tool for QSAR modeling and high-throughput virtual screening. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9110, 14 jun. 2018.

SPRINGER, D. J. et al. *Cryptococcus gattii* VGIII Isolates Causing Infections in HIV/AIDS Patients in Southern California: Identification of the Local Environmental Source as Arboreal. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 8, p. e1004285, 21 ago. 2014.

- STEPHENS, P. J. et al. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 45, p. 11623–11627, 1 nov. 1994.
- STOKES, J. M. et al. A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery. **Cell**, v. 180, n. 4, p. 688–702.e13, 20 fev. 2020.
- SUGII, A. Thiosemicarbazide derivatives. IV. 1-Carbamoyl-4-acylthiosemicarbazide. **Yakugaku Zasshi**, v. 79, n. 1, p. 100–102, 1959.
- SURABHI, S.; SINGH, B. K. COMPUTER AIDED DRUG DESIGN: AN OVERVIEW. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 8, n. 5, p. 504–509, 18 set. 2018.
- TAHA, D. E.; RAAUF, A. M. R.; ALI, K. F. Design, Synthesis, Characterization, Biological Activity and ADME Study of New 5-arylidene-4-Thiazolidinones Derivatives Having. **Al Mustansiriyah Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 77–88, 1 dez. 2019.
- TENÓRIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, p. 1030–1037, dez. 2005.
- TETKO, I. V. et al. Estimation of Aqueous Solubility of Chemical Compounds Using E-State Indices. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 41, n. 6, p. 1488–1493, 1 nov. 2001.
- TETKO, I. V.; TANCHUK, V. YU. Application of Associative Neural Networks for Prediction of Lipophilicity in ALOGPS 2.1 Program. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 42, n. 5, p. 1136–1145, 1 set. 2002.
- TETKO, I. V.; TANCHUK, V. YU.; VILLA, A. E. P. Prediction of n-Octanol/Water Partition Coefficients from PHYSPROP Database Using Artificial Neural Networks and E-State Indices. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 41, n. 5, p. 1407–1421, 1 set. 2001.
- THAKKAR, A. et al. Artificial intelligence and automation in computer aided synthesis planning. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 1, p. 27–51, 5 jan. 2021.
- TIMKEN, M. D.; WILSON, S. R.; HENDRICKSON, D. N. Dynamics of spin-state interconversion and cooperativity for ferric spin-crossover complexes in the solid state. 4. Pyruvic acid thiosemicarbazone complex. **Inorganic Chemistry**, v. 24, n. 21, p. 3450–3457, 1 out. 1985.
- TIROSH, I. et al. A genetic signature of interspecies variations in gene expression. **Nature Genetics**, v. 38, n. 7, p. 830–834, jul. 2006.
- TODA, M. Population-Based Active Surveillance for Culture-Confirmed Candidemia — Four Sites, United States, 2012–2016. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 68, 2019.

- TODA, M. et al. Trends in Agricultural Triazole Fungicide Use in the United States, 1992–2016 and Possible Implications for Antifungal-Resistant Fungi in Human Disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 129, n. 5, p. 055001, 5 maio 2021.
- TONHOLO, D. R. et al. Preclinical toxicity of innovative molecules: In vitro, in vivo and metabolism prediction. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, p. 108896, 5 jan. 2020.
- TRIPATHI, A. C. et al. Privileged scaffolds as MAO inhibitors: Retrospect and prospects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 445–497, 10 fev. 2018.
- VALLABHANENI, S. et al. The Global Burden of Fungal Diseases. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 1–11, 1 mar. 2016.
- VAMATHEVAN, J. et al. Applications of machine learning in drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 6, p. 463–477, jun. 2019.
- VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 1 jun. 2002.
- VERÍSSIMO, G. C. et al. HQSAR and random forest-based QSAR models for anti-*T. vaginalis* activities of nitroimidazoles derivatives. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 90, p. 180–191, 1 jul. 2019.
- VERÍSSIMO, G. C. et al. The Brazilian compound library (BraCoLi) database: a repository of chemical and biological information for drug design. **Molecular Diversity**, 28 jan. 2022.
- VINCENT, J. L. et al. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. **Intensive Care Medicine**, v. 24, n. 3, p. 206–216, 1 mar. 1998.
- WALL, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Current Antimycotics, New Prospects, and Future Approaches to Antifungal Therapy. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 445, ago. 2020.
- WANG, R.; FU, Y.; LAI, L. A New Atom-Additive Method for Calculating Partition Coefficients. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 37, n. 3, p. 615–621, 1 maio 1997.
- WANG, R.; GAO, Y.; LAI, L. Calculating partition coefficient by atom-additive method. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 19, n. 1, p. 47–66, 1 set. 2000.
- WHALEY, S. G. et al. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2017.
- WHEELER, R. T.; FINK, G. R. A Drug-Sensitive Genetic Network Masks Fungi from the Immune System. **PLOS Pathogens**, v. 2, n. 4, p. e35, 28 abr. 2006.
- WIECEK, J. et al. Organotin complexes of pyruvic acid thiosemicarbazone: Synthesis, crystal structures and antiproliferative activity of neutral and cationic

diorganotin complexes. **Polyhedron**, The Impact of Crystallography on Inorganic Chemistry in Greece. v. 28, n. 15, p. 3298–3304, 13 out. 2009.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 1, p. 78–81, 1 jan. 2014.

XU, H. et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a case control study from China. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 4, p. 403–408, 1 abr. 2012.

YAP, C. W. PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 7, p. 1466–1474, 2011.

YEFIDOFF-FREEDMAN, R. et al. 3-Substituted Indazoles as Configurationally Locked 4EGI-1 Mimetics and Inhibitors of the eIF4E/eIF4G Interaction. **ChemBioChem**, v. 15, n. 4, p. 595–611, 2014.

YILDIZ, I. A DFT Approach to the Mechanistic Study of Hydrozone Hydrolysis. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 120, n. 20, p. 3683–3692, 26 maio 2016.

YU, J. et al. Organic Compound Synthetic Accessibility Prediction Based on the Graph Attention Mechanism. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 62, n. 12, p. 2973–2986, 27 jun. 2022.

ZHU, Q. On the performance of Matthews correlation coefficient (MCC) for imbalanced dataset. **Pattern Recognition Letters**, v. 136, p. 71–80, 1 ago. 2020.

ZOTCHEV, S. B. Polyene Macrolide Antibiotics and their Applications in Human Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 211–223, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Espectros das tiossemicarbazonas

Apêndice A.1 – Espectros de RMN de TS2

Figura A.1.1 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TS2.

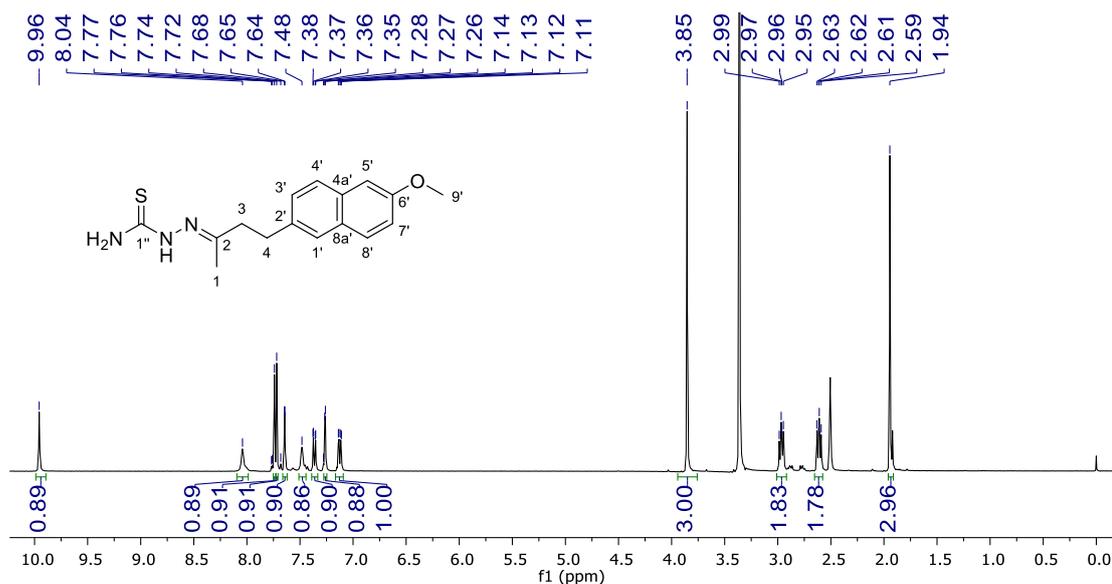


Figura A.1.2 – Expansões do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ_{H} 1,80-4,00 e 7,00-8,10) de TS2.

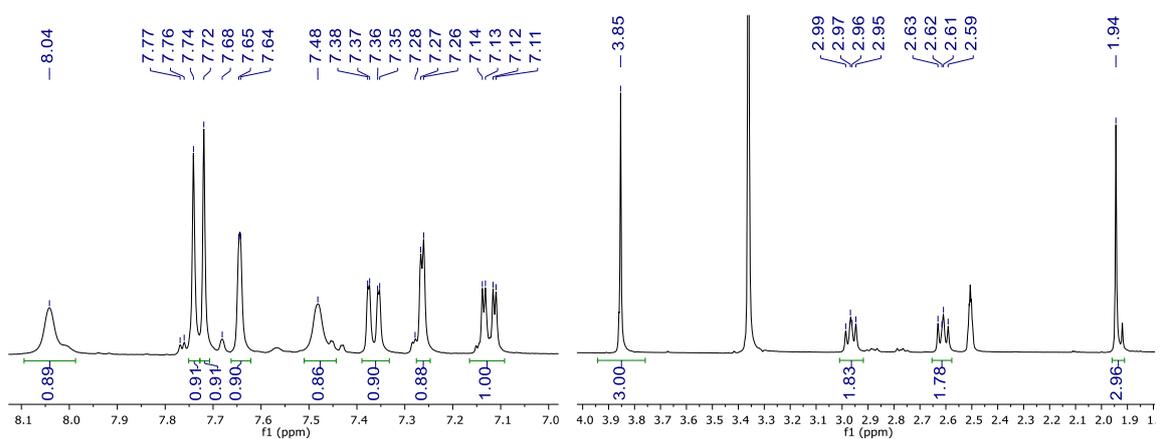


Figura A.1.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, DMSO-d_6) de TS2.

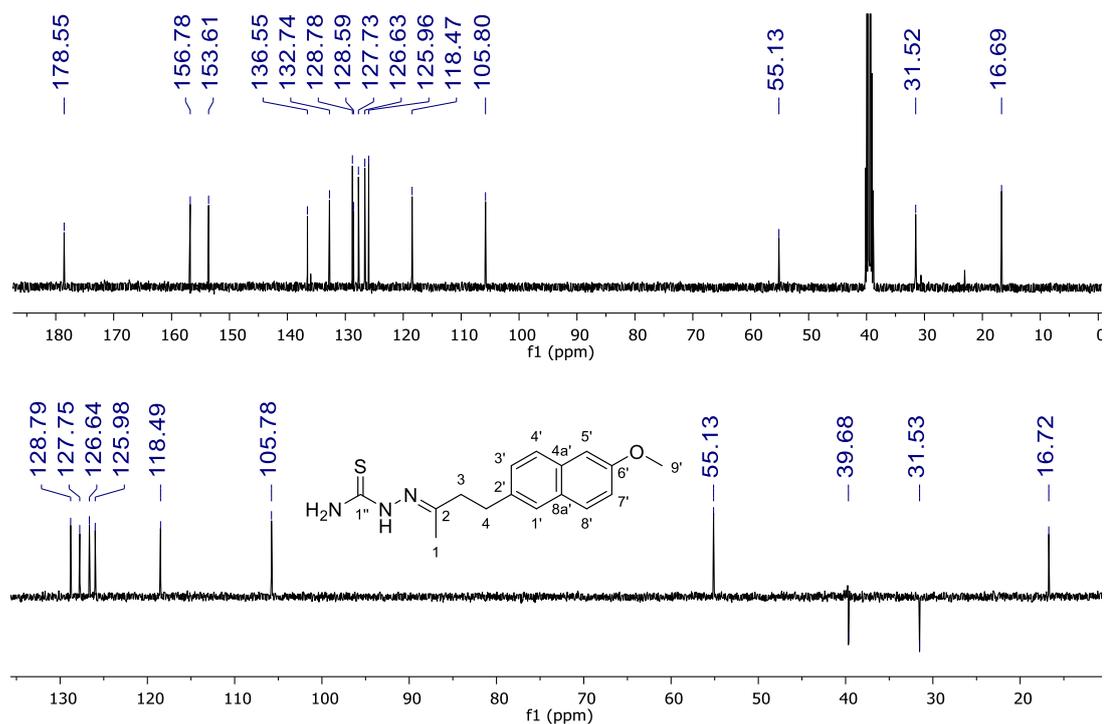


Figura A.1.4 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, DMSO-d_6) de TS2.

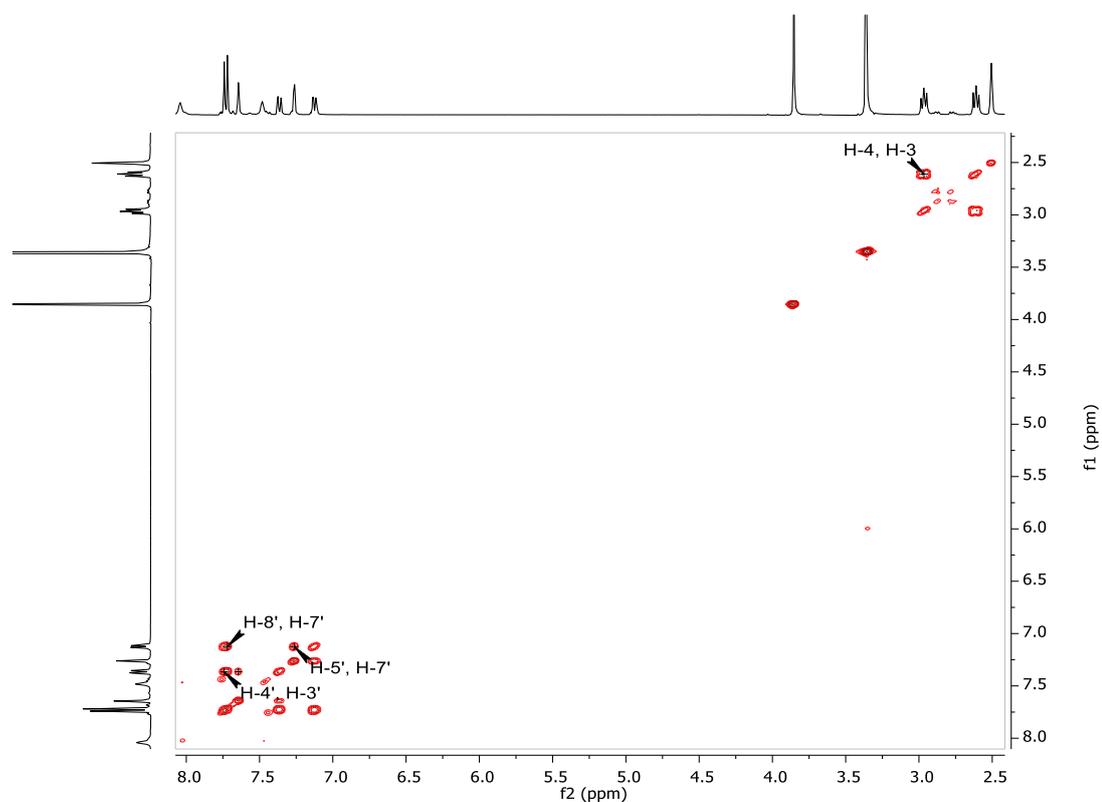


Figura A.1.5 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, DMSO- d_6) de TS2.

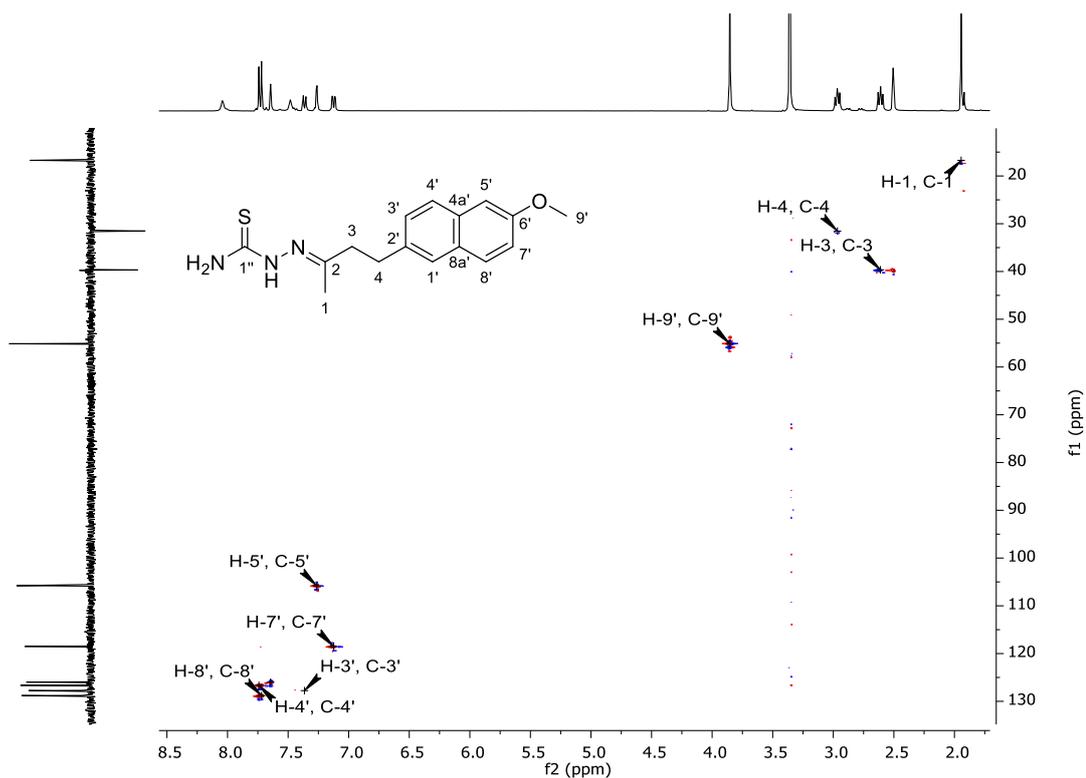
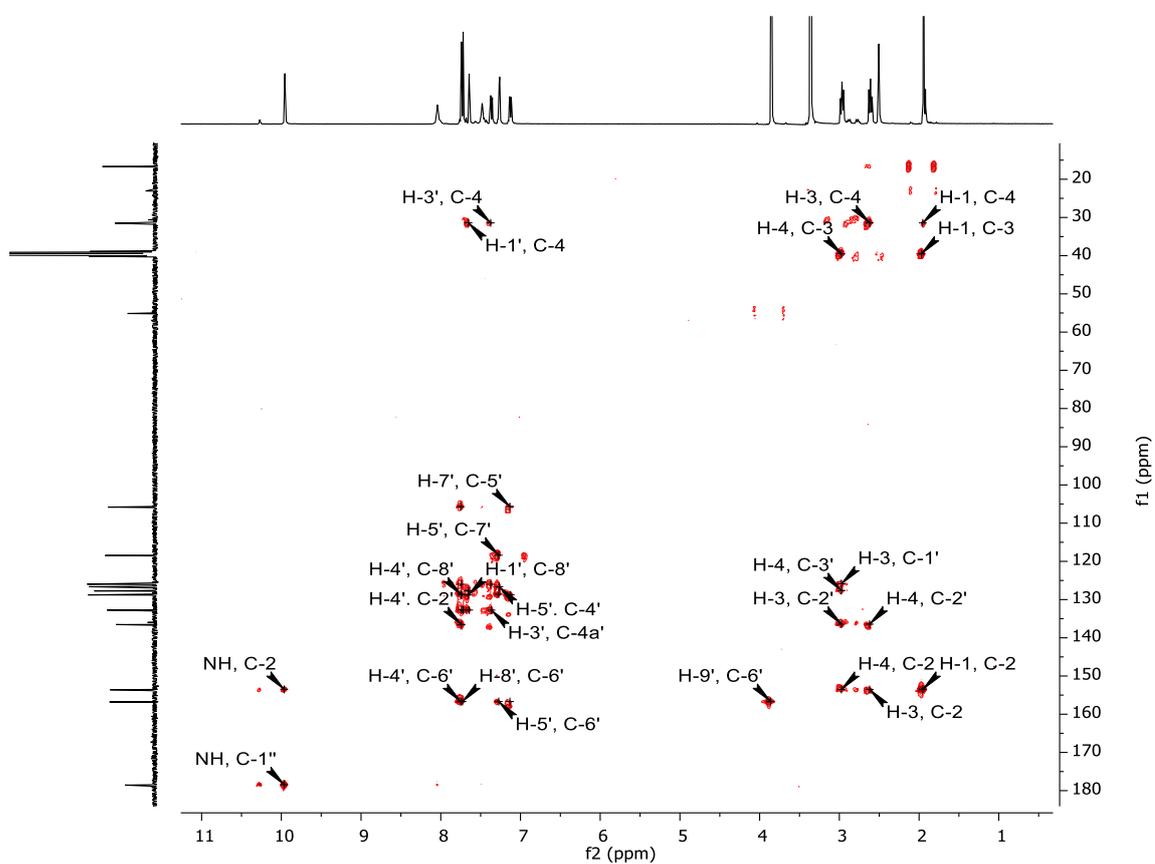


Figura A.1.6 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, DMSO- d_6) de TS2.



Apêndice A.2 – Espectros de RMN de TS3

Figura A.2.1 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TS3.

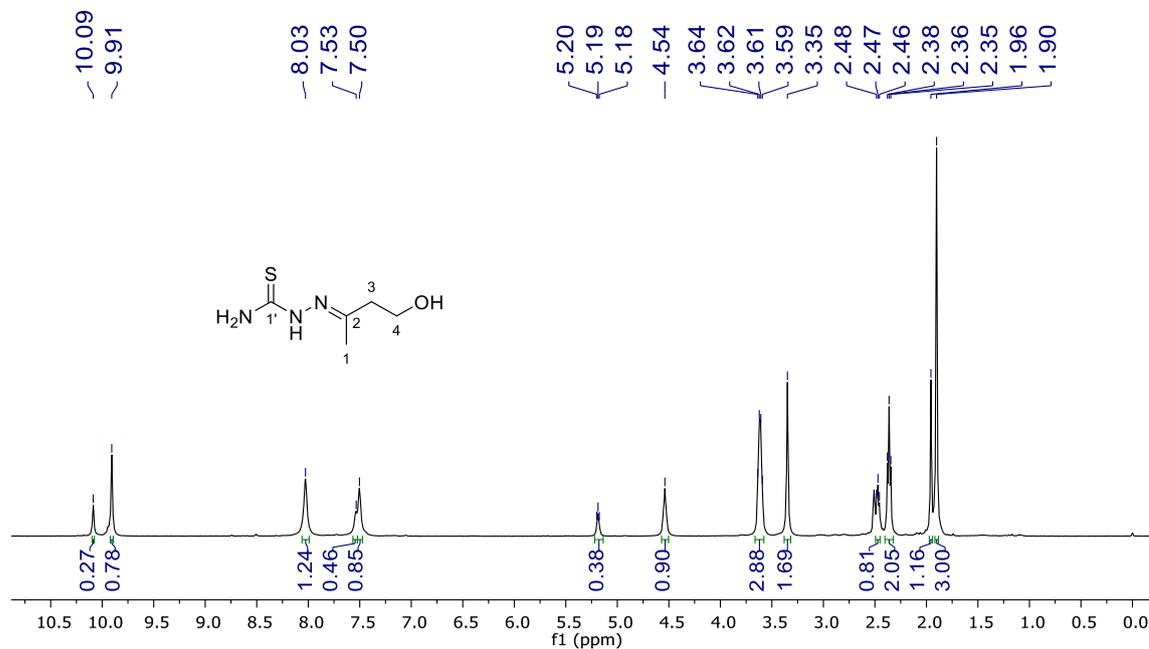
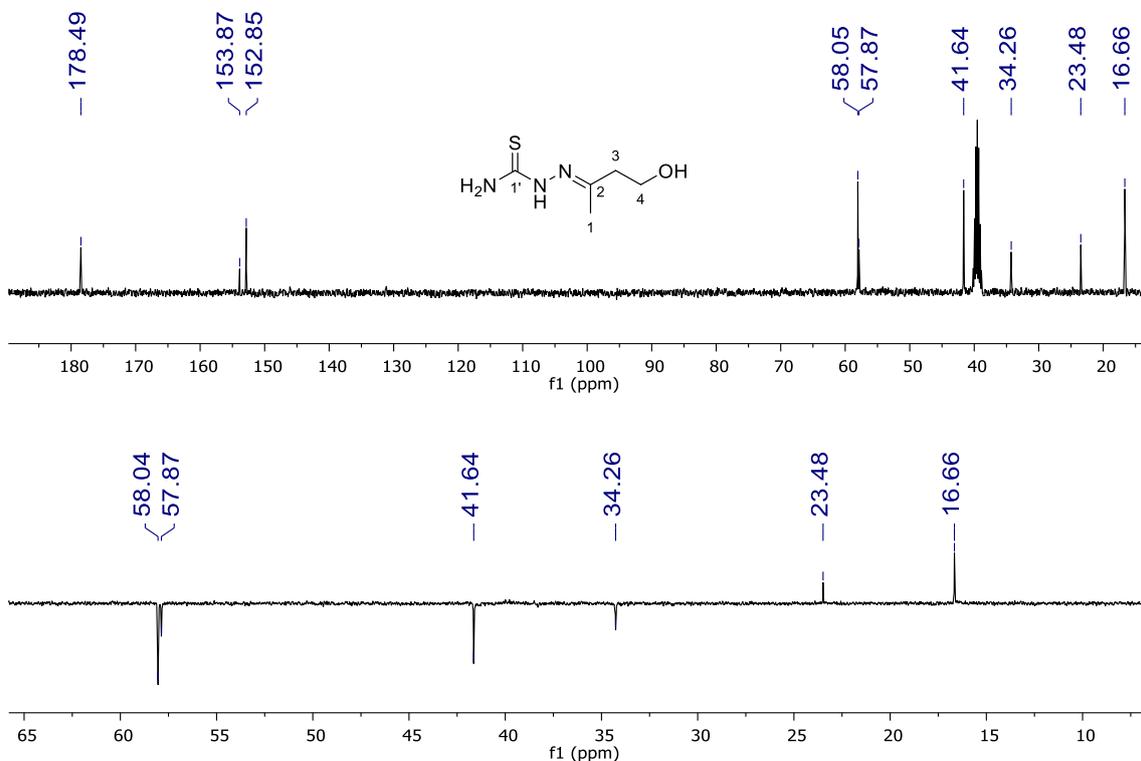


Figura A.2.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TS3.



Apêndice A.3 – Espectros de RMN de TS4

Figura A.3.1 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TS4.

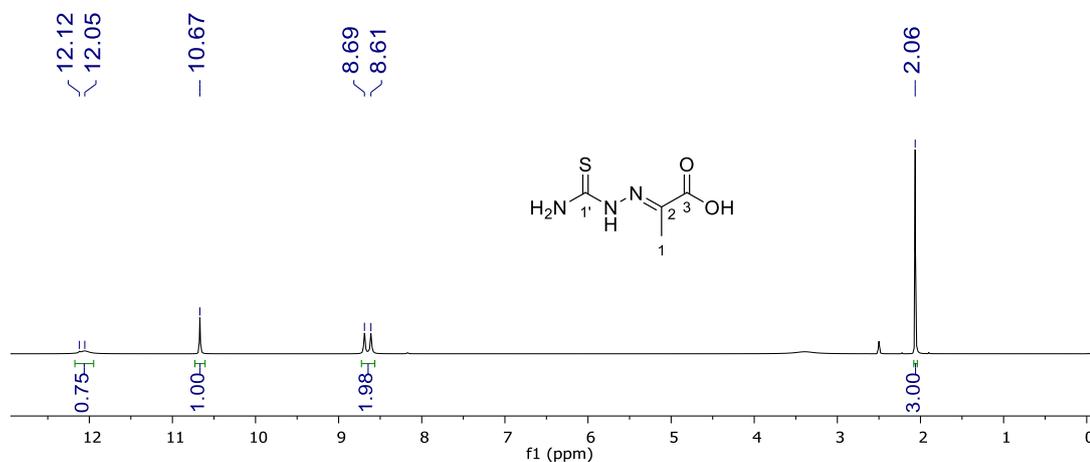
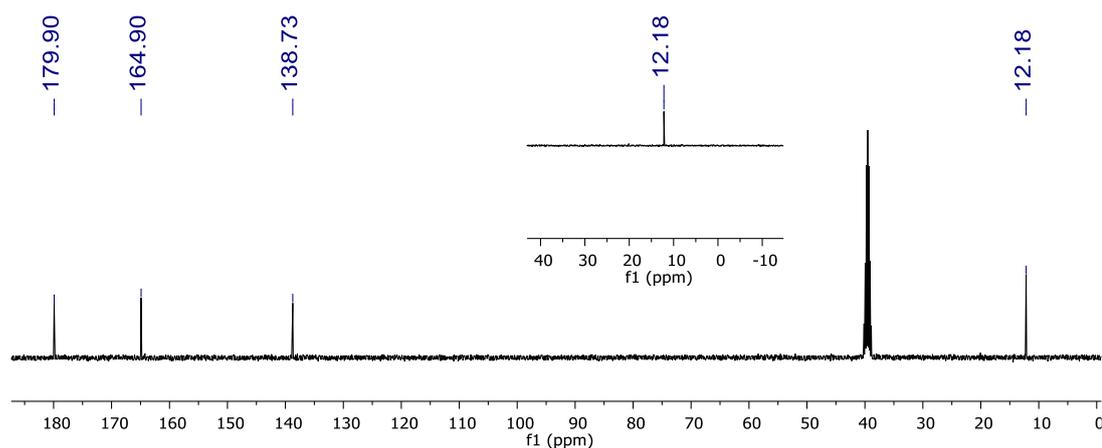


Figura A.3.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TS4.



Apêndice A.4 – Espectros de RMN de TS5

Figura A.4.1 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TS5.

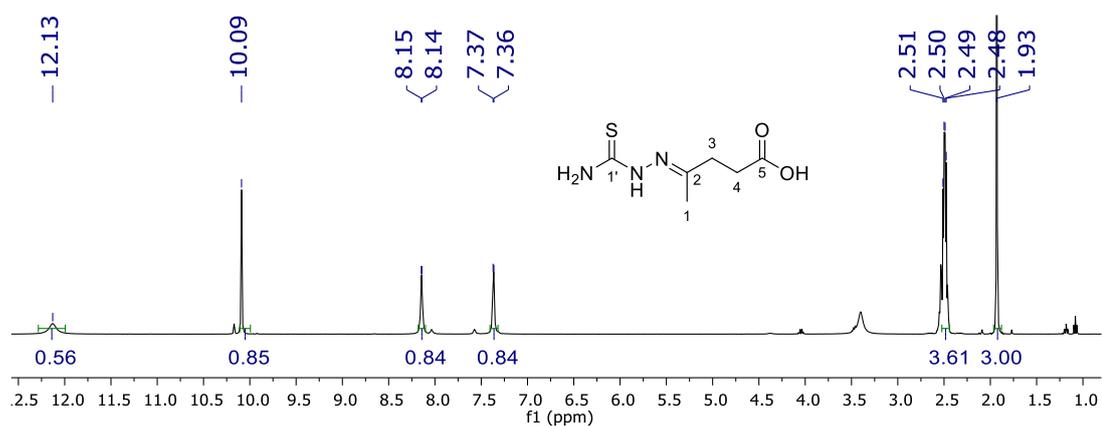
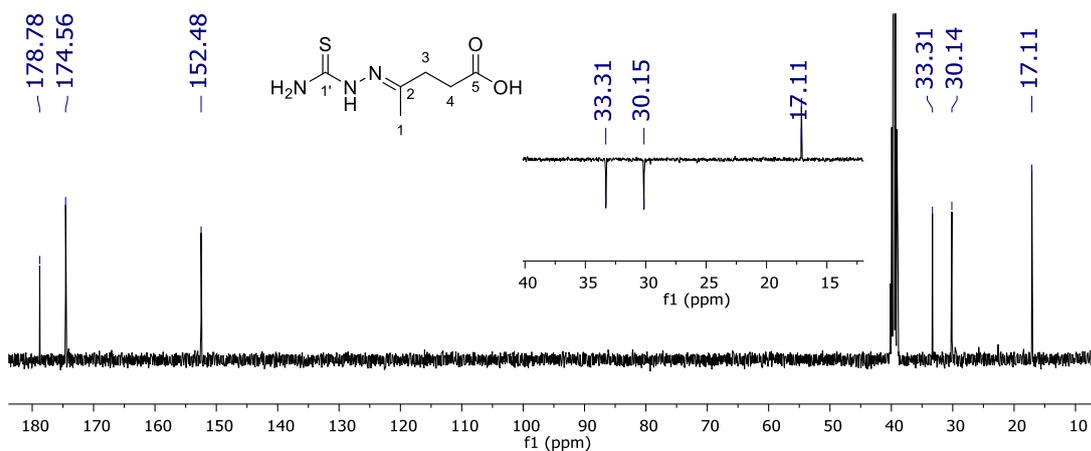


Figura A.4.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TS5.



APÊNDICE B – Espectros das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo aromático

Apêndice B.1 – Espectros de RMN de TH2a

Figura B.1.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH2a.

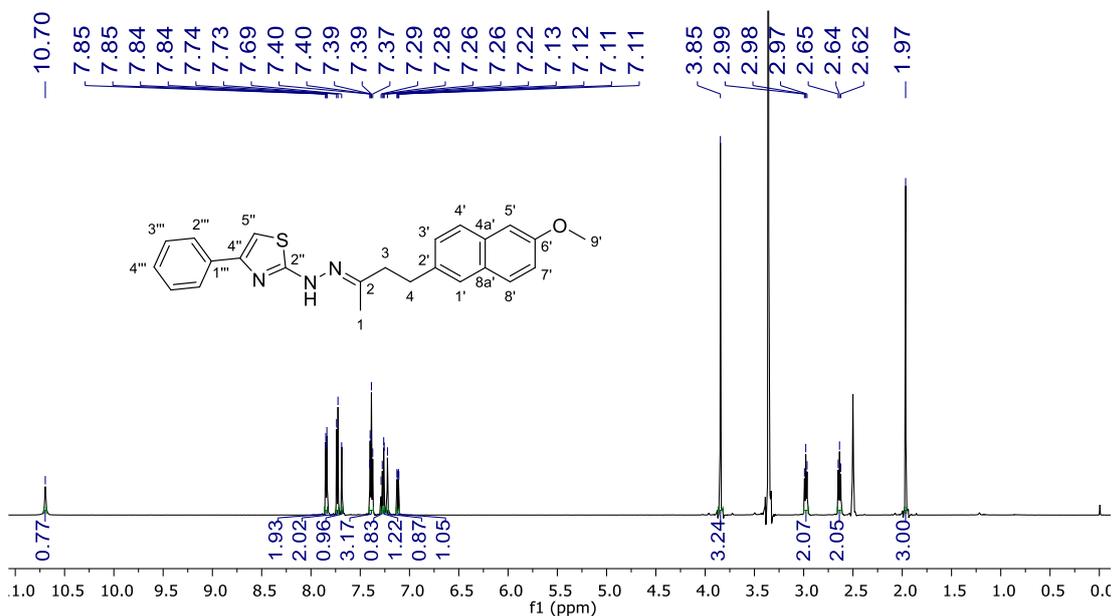


Figura B.1.2 – Expansões do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ_{H} 2,00-4,00 e 7,10-7,90) de TH2a.

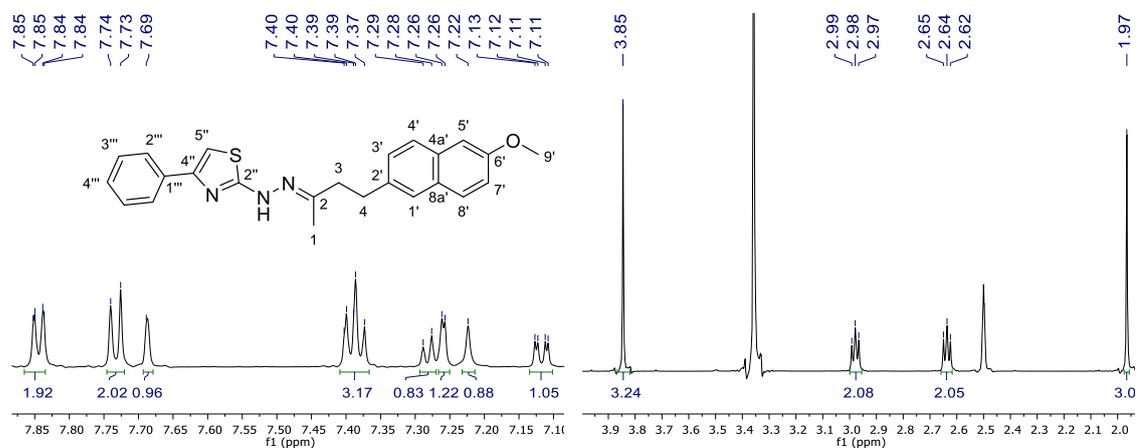


Figura B.1.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH2a.

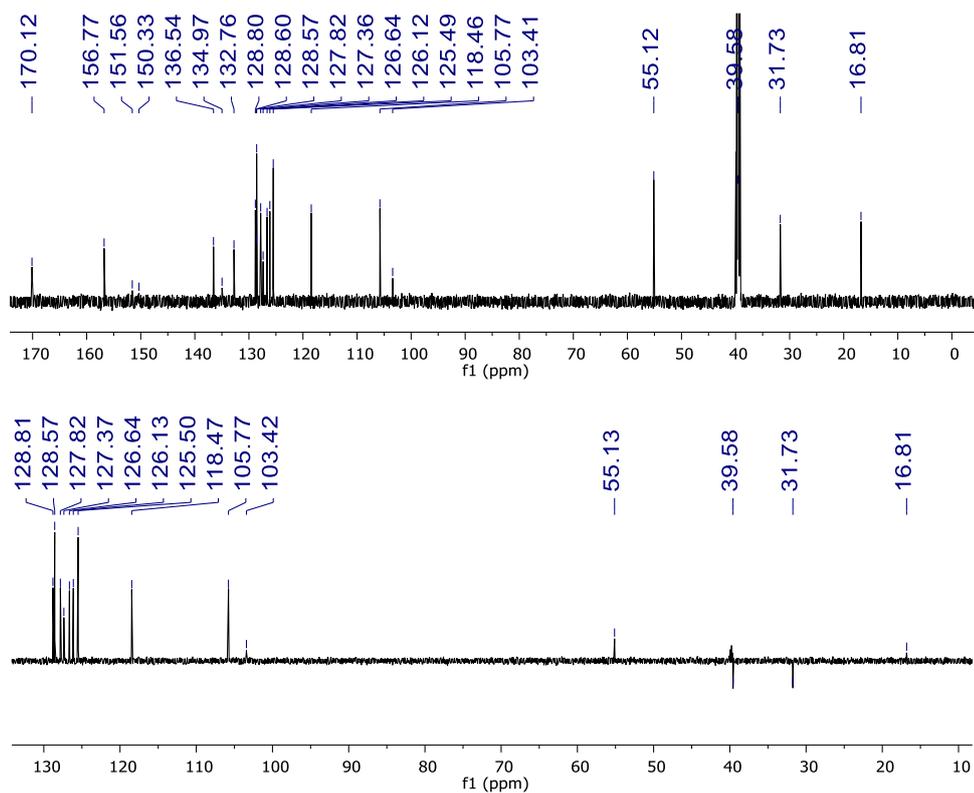


Figura B.1.4 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2a.

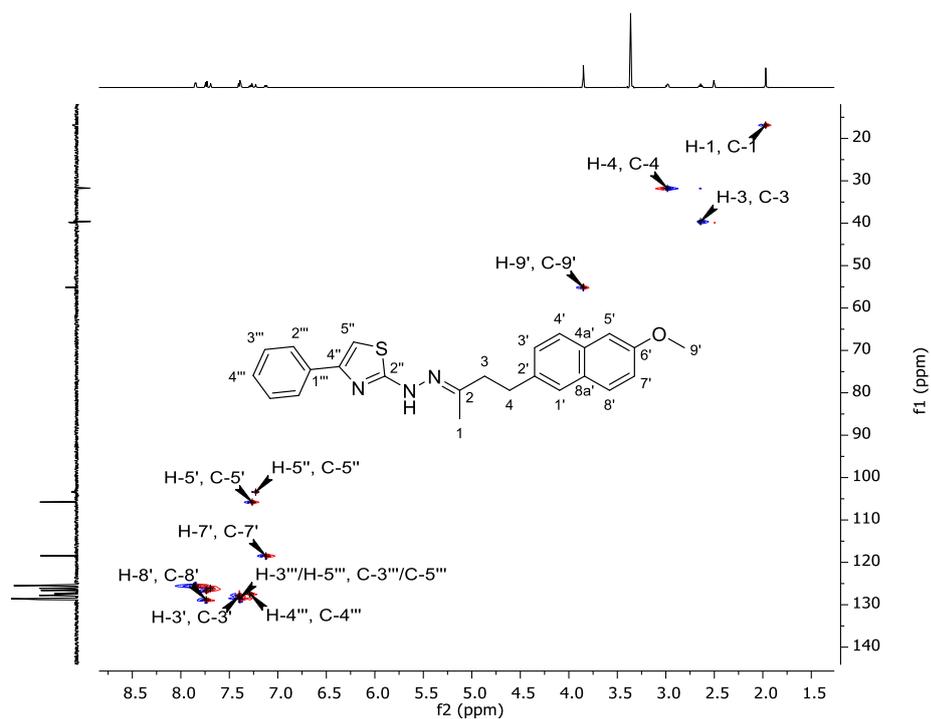
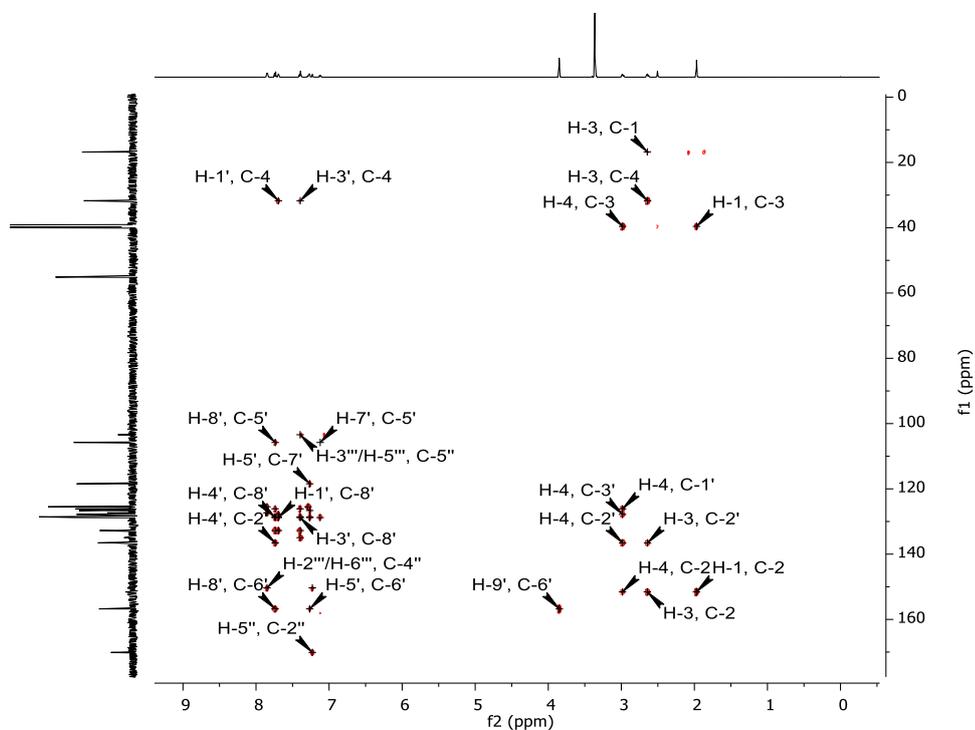


Figura B.1.5 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2a.



Apêndice B.2 – Espectros de RMN de TH2b

Figura B.2.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH2b.

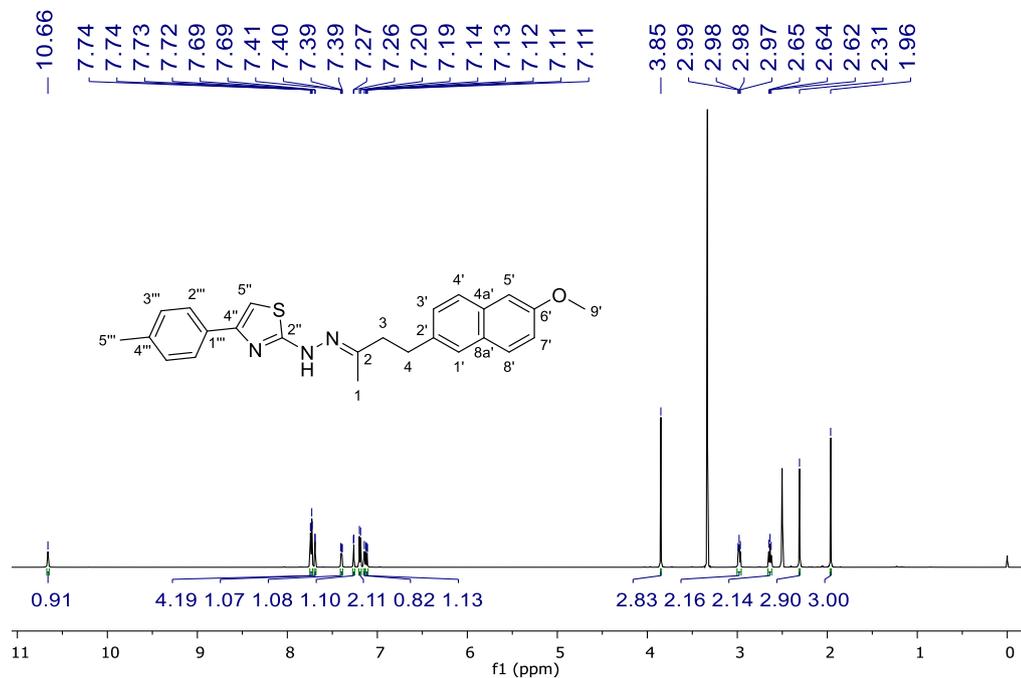


Figura B.2.2 – Expansões do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ_{H} 1,50-4,00 e 7,10-7,80) de TH2b.

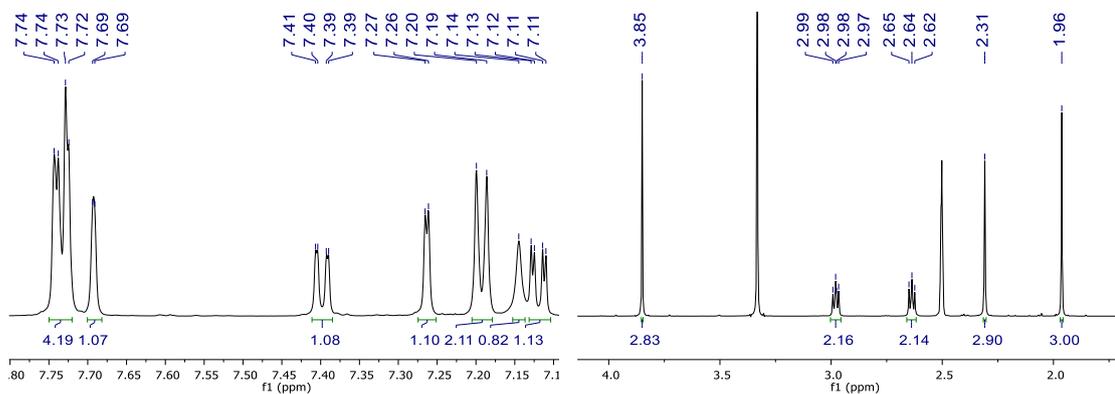


Figura B.2.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de TH2b.

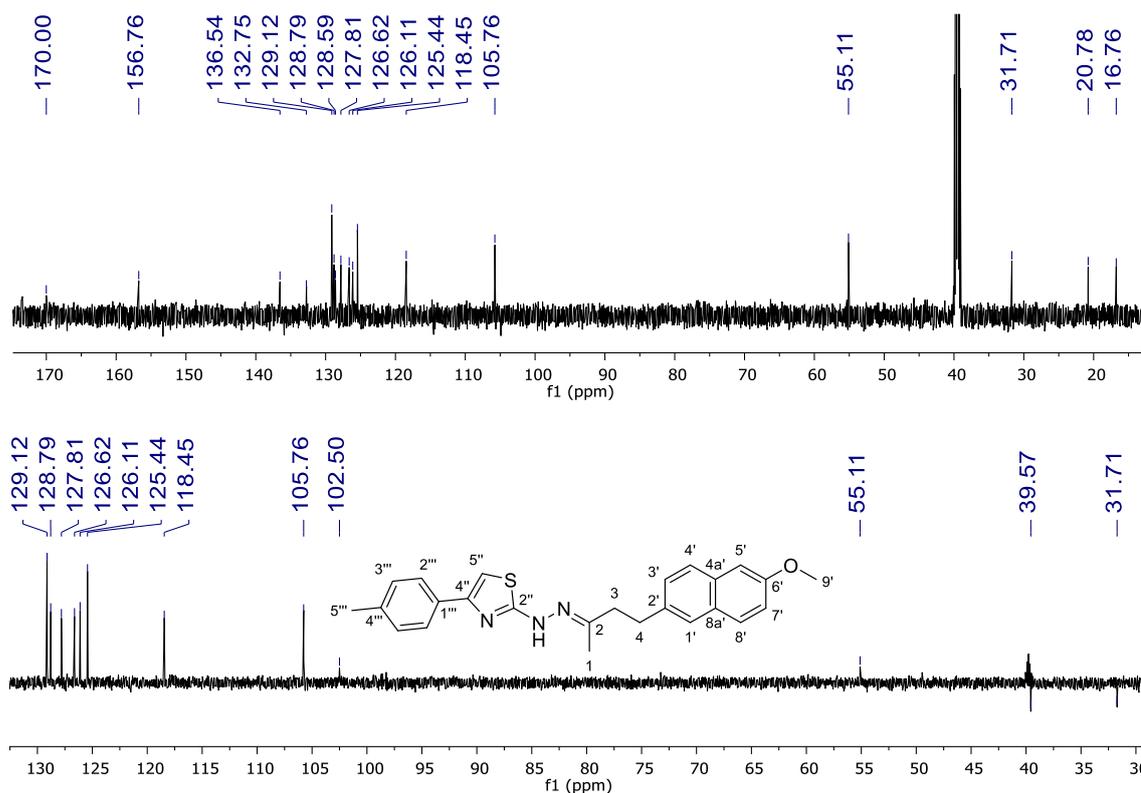


Figura B.2.4 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de TH2b.

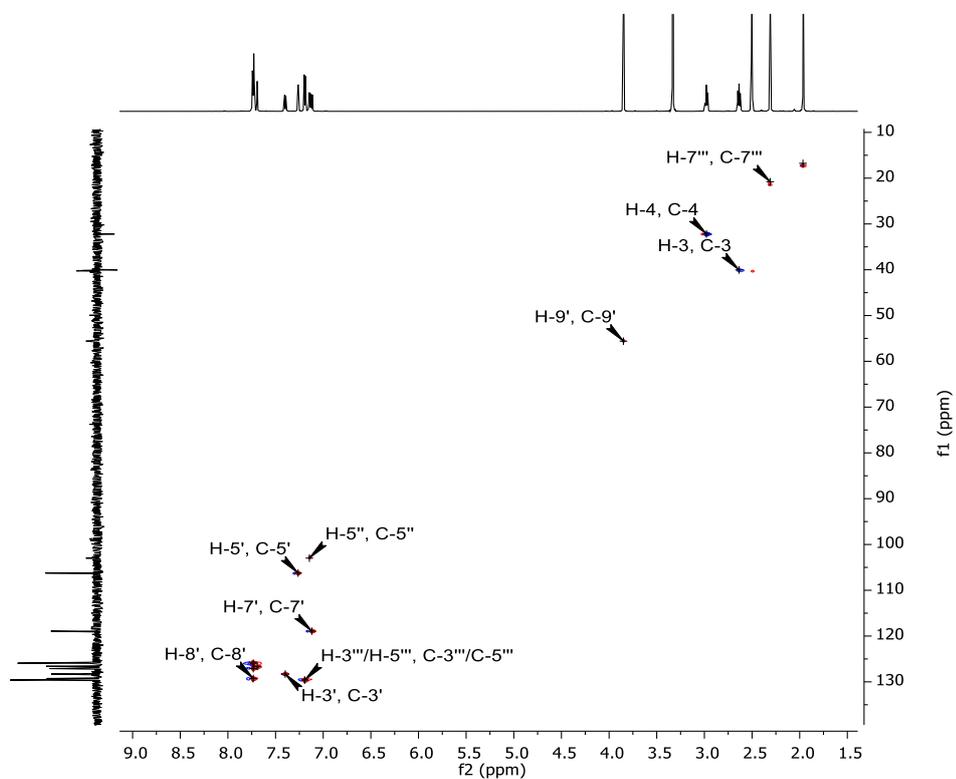
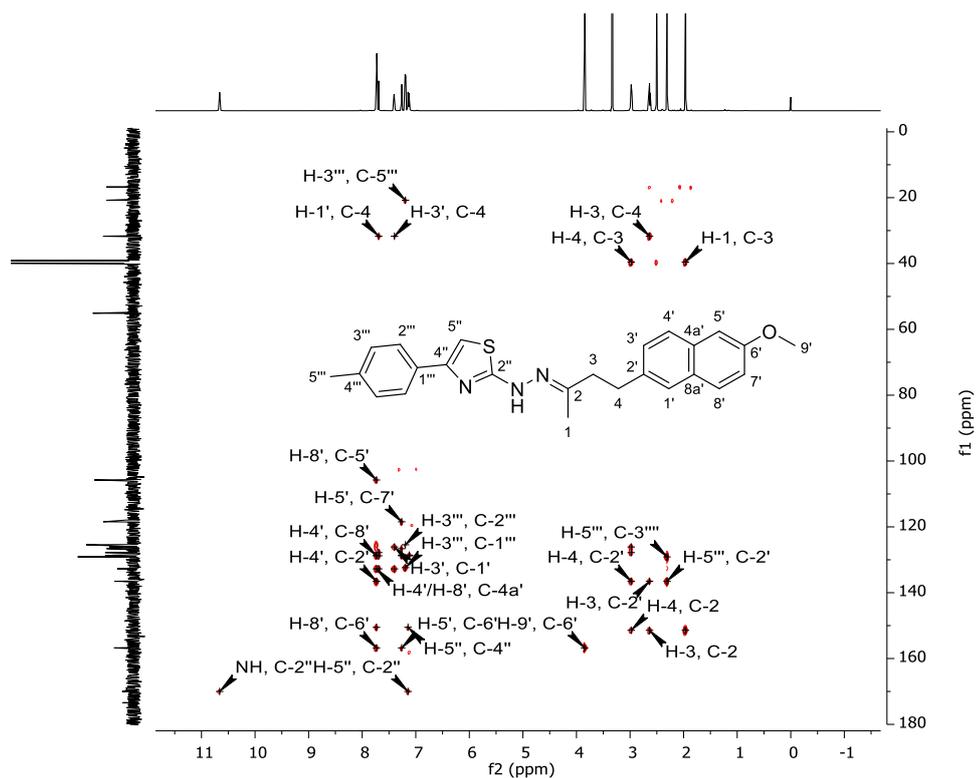


Figura B.2.5 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2b.



Apêndice B.3 – Espectros de RMN de TH2c

Figura B.3.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2c.

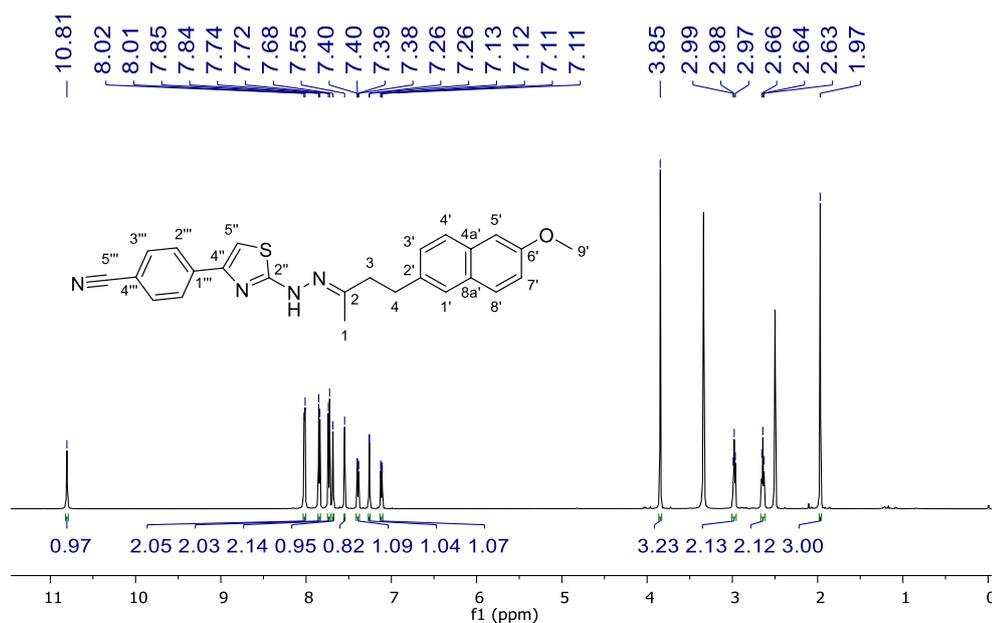


Figura B.3.2 – Expansões do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ_{H} 1,80-4,00 e 7,10-8,10) de **TH2c**.

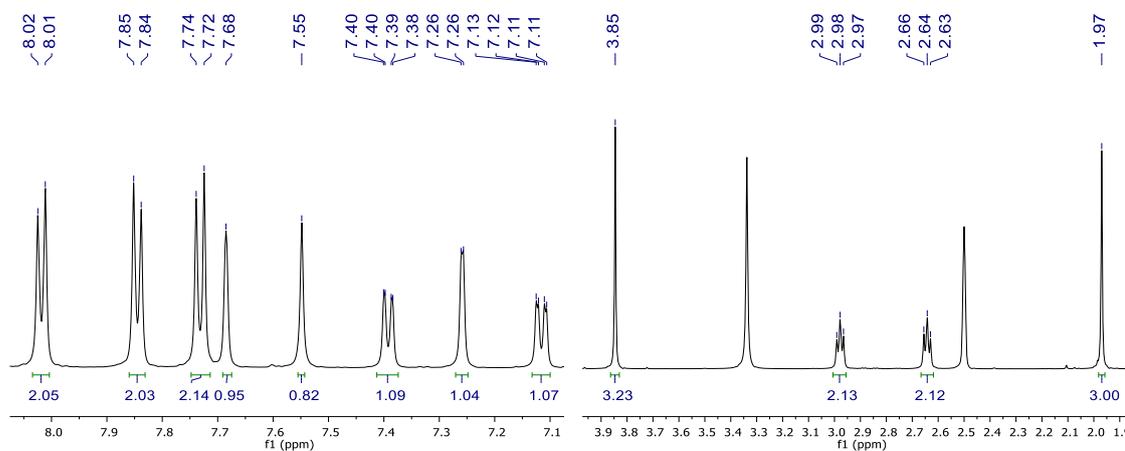


Figura B.3.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **TH2c**.

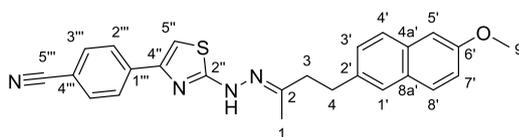
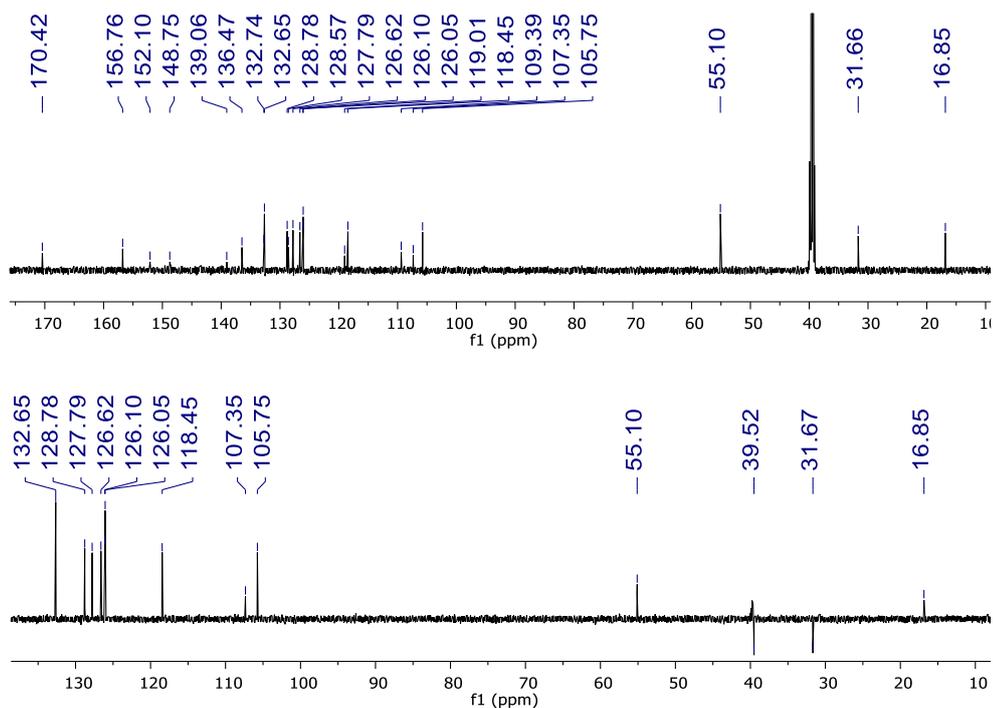


Figura B.3.4 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2c.

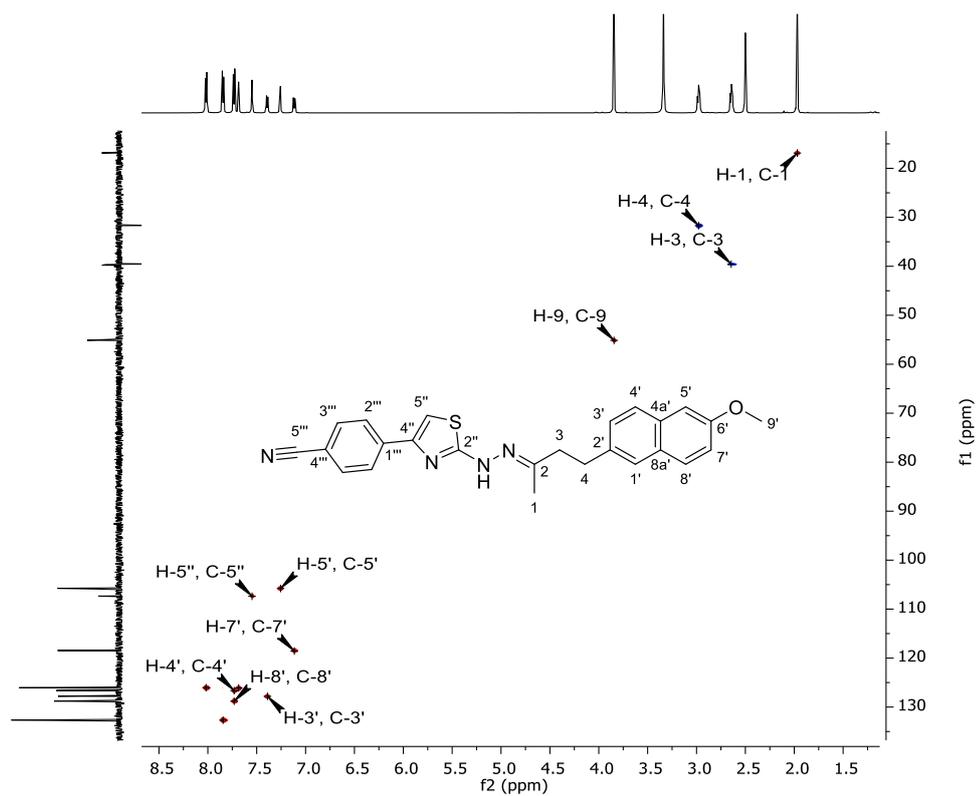
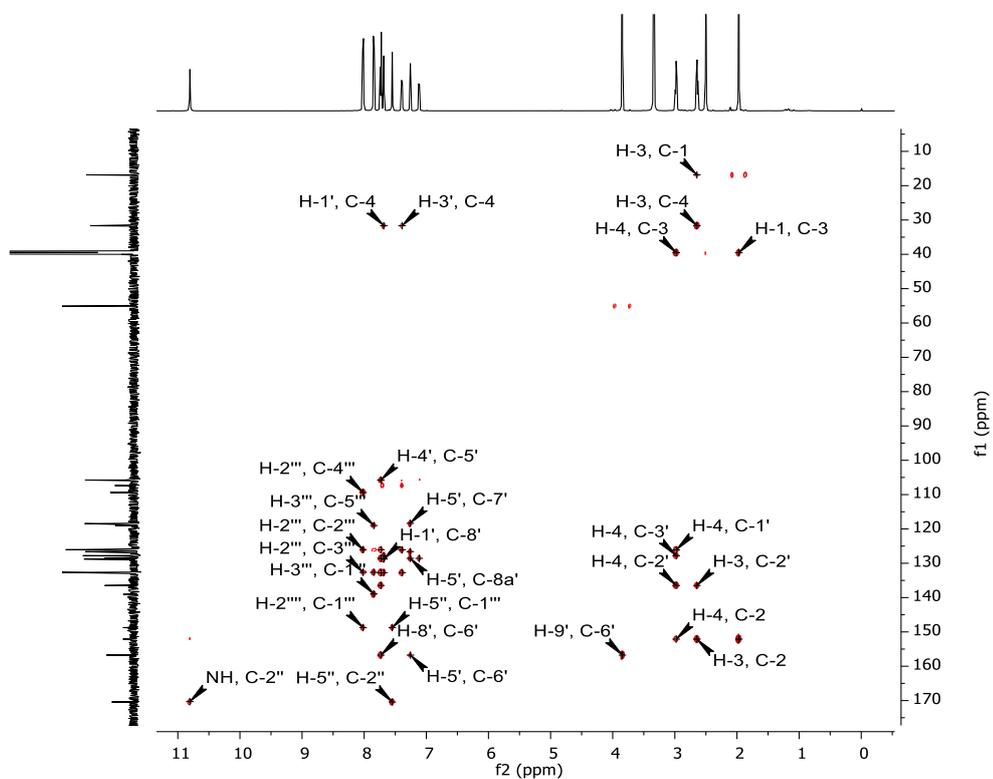


Figura B.3.5 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2c.



Apêndice B.4 – Espectros de RMN de TH2d

Figura B.4.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de TH2d.

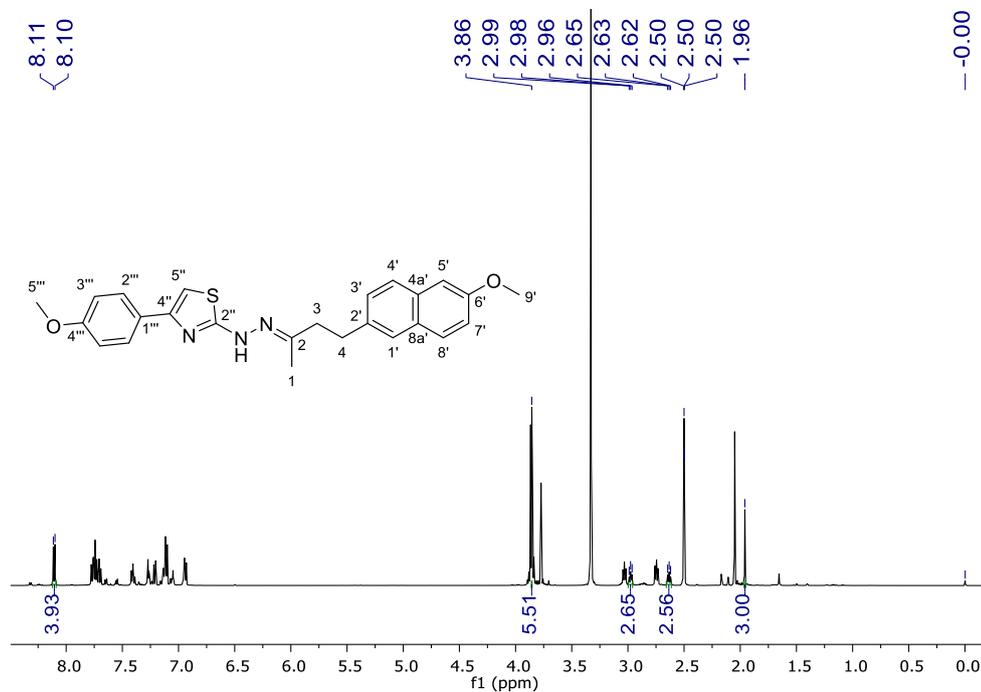


Figura B.4.2 – Expansões do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (δ_{H} 1,60-4,20 e 6,90-8,20) de TH2d.

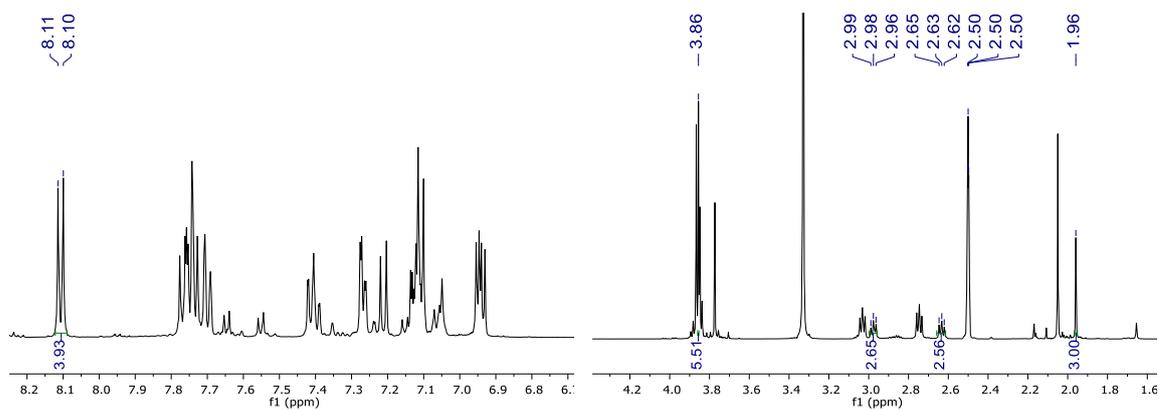


Figura B.4.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH2d.

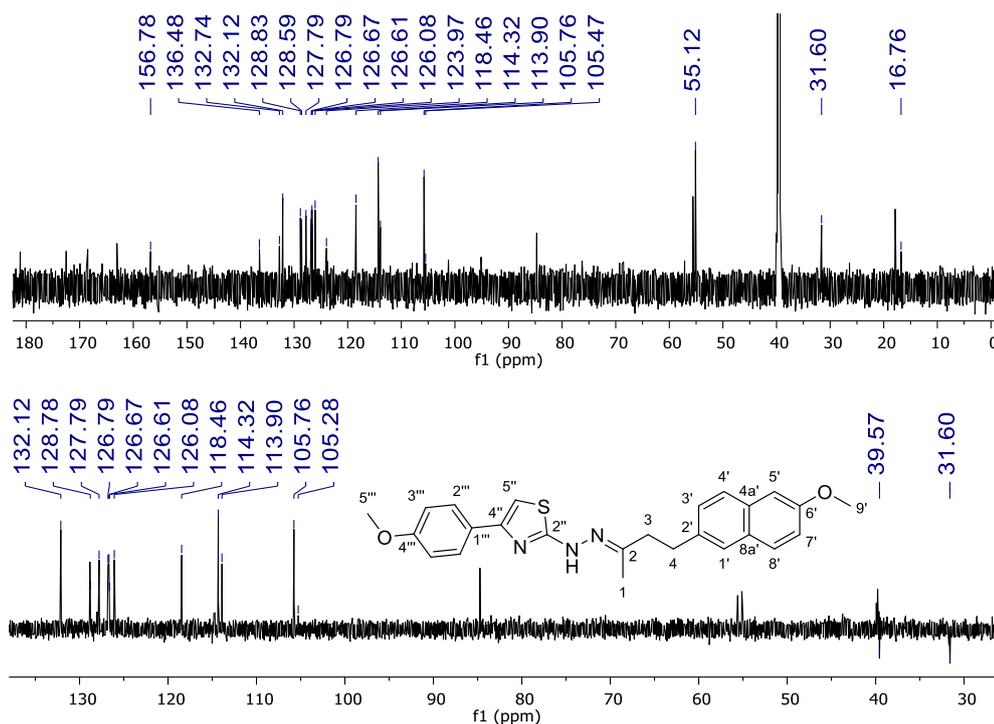
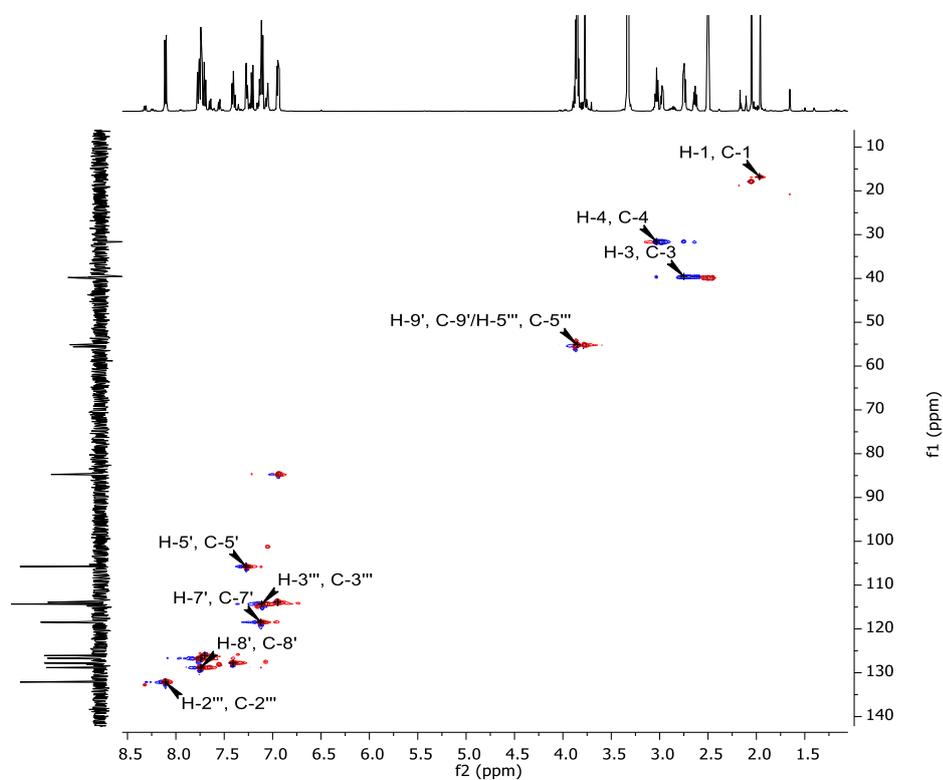


Figura B.4.4 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH2d.



Apêndice B.5 – Espectros de RMN de TH2e

Figura B.5.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH2e.

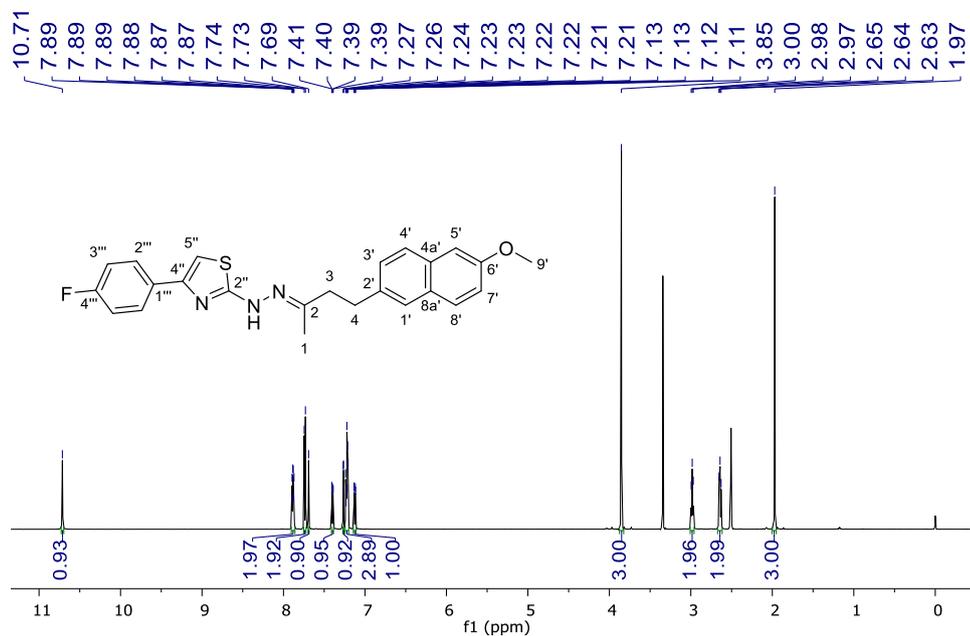


Figura B.5.2 – Expansões do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ_{H} 1,90-4,00 e 7,10-7,90) de TH2e.

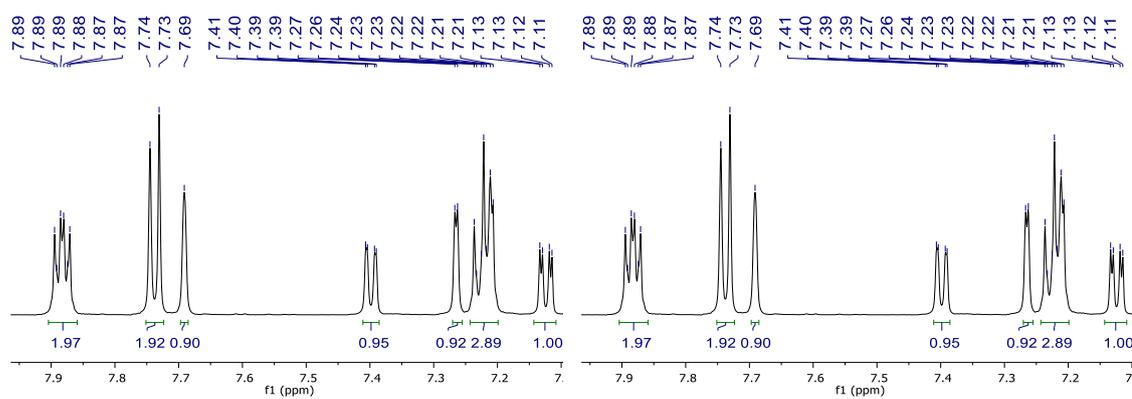


Figura B.5.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH2e.

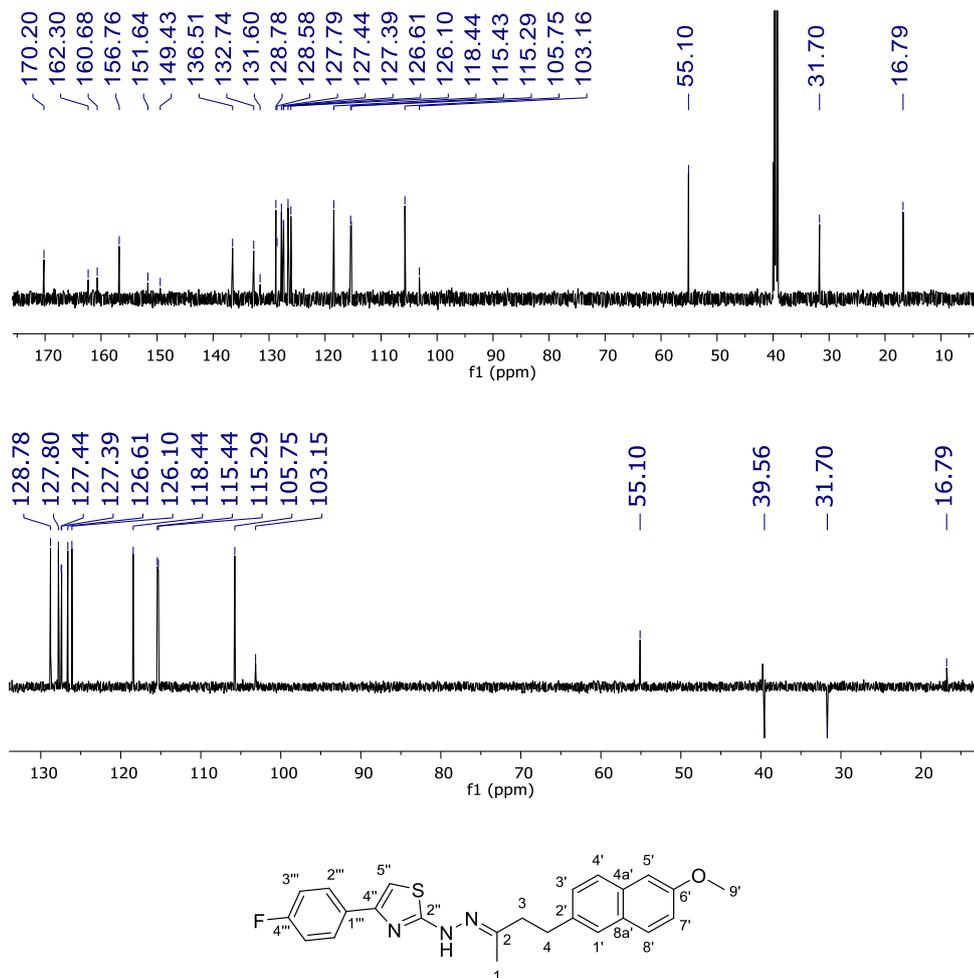


Figura B.5.4 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH2e.

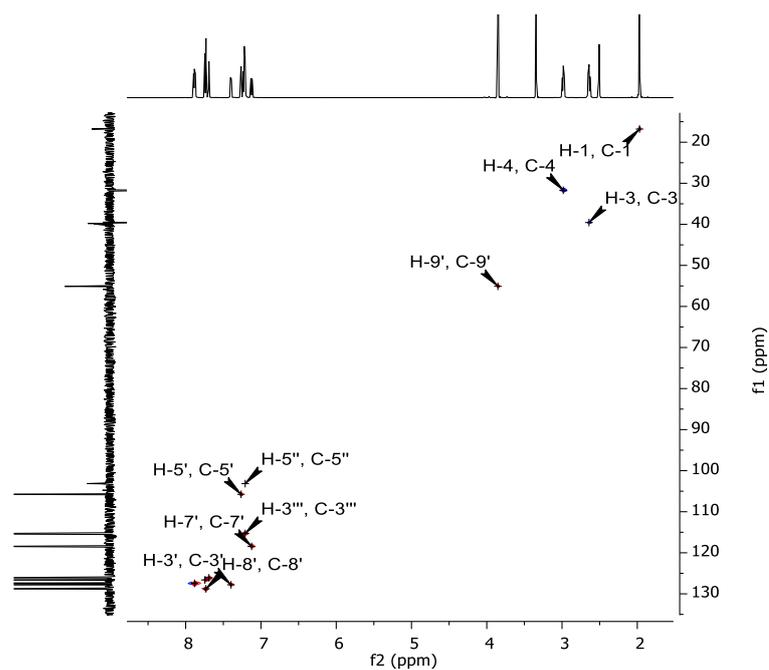
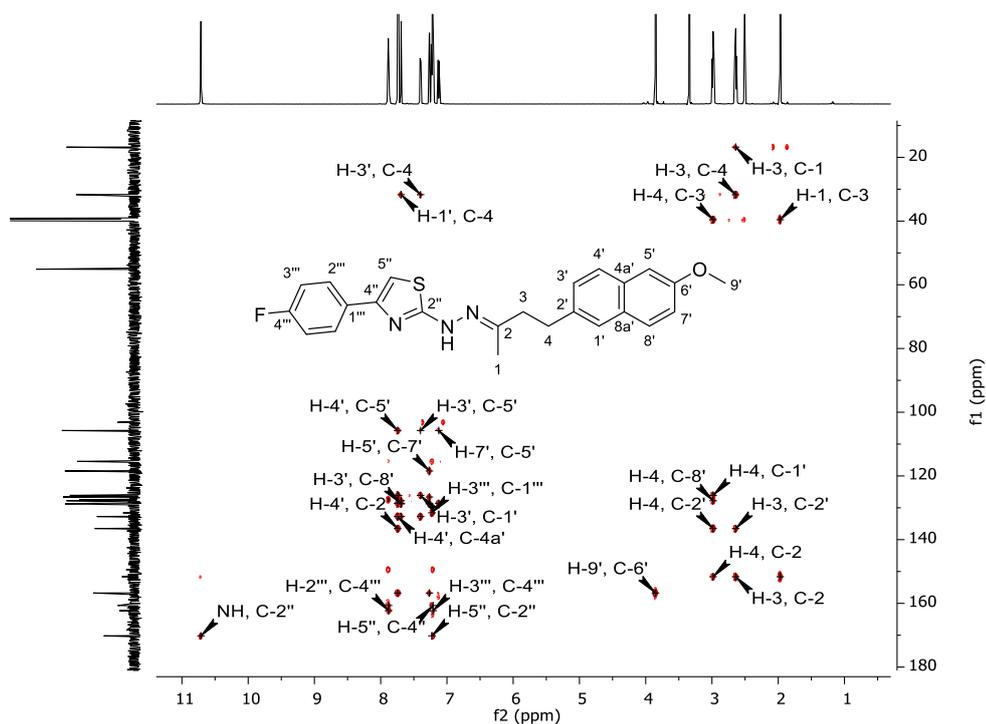


Figura B.5.5 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2e.



Apêndice B.6 – Espectros de RMN de TH2f

Figura B.6.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2f.

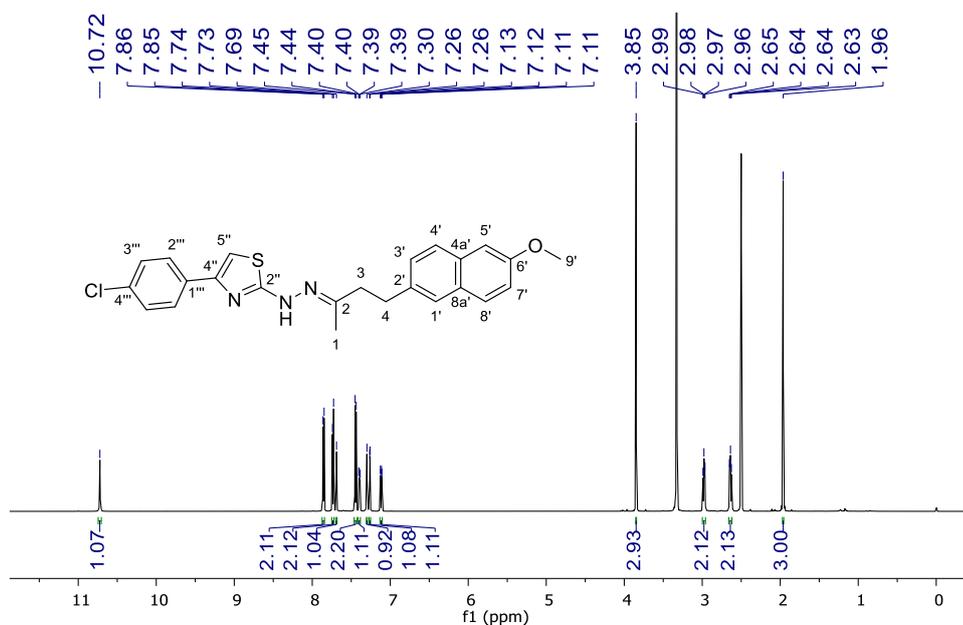


Figura B.6.2 – Expansões do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ_{H} 1,90-4,00 e 7,10-7,90) de **TH2f**.

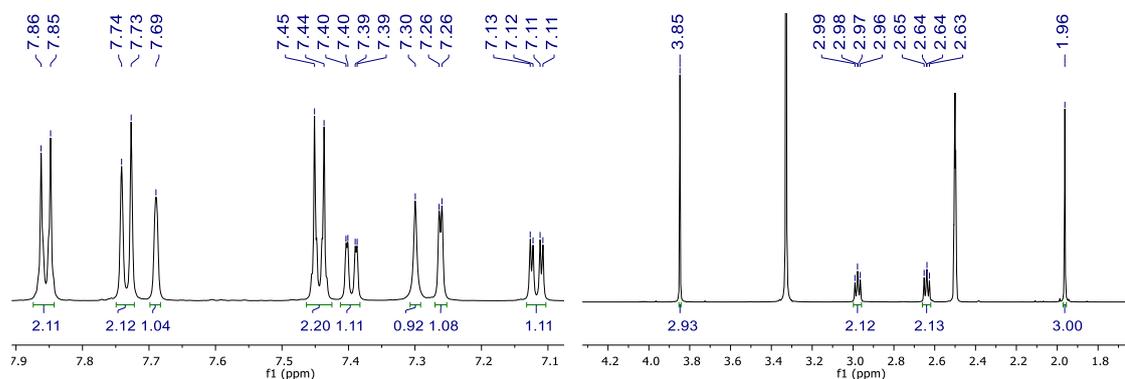


Figura B.6.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **TH2f**.

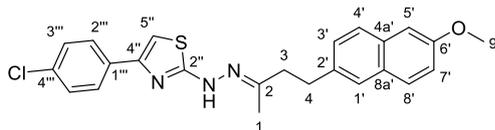
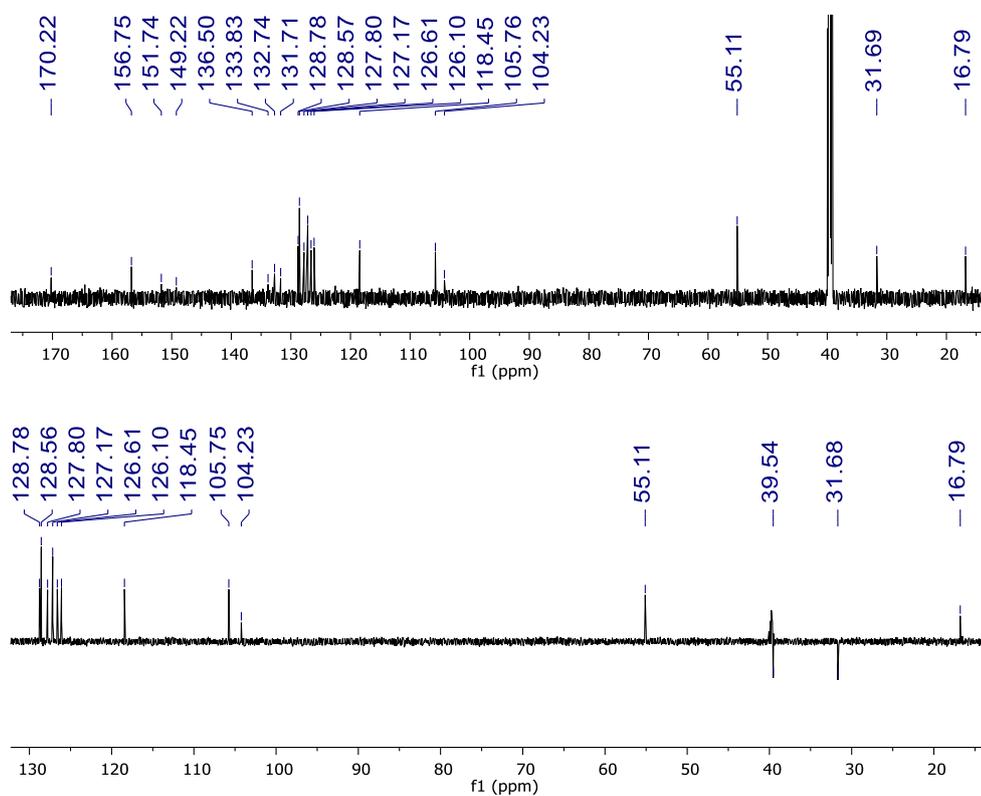


Figura B.6.4 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2f.

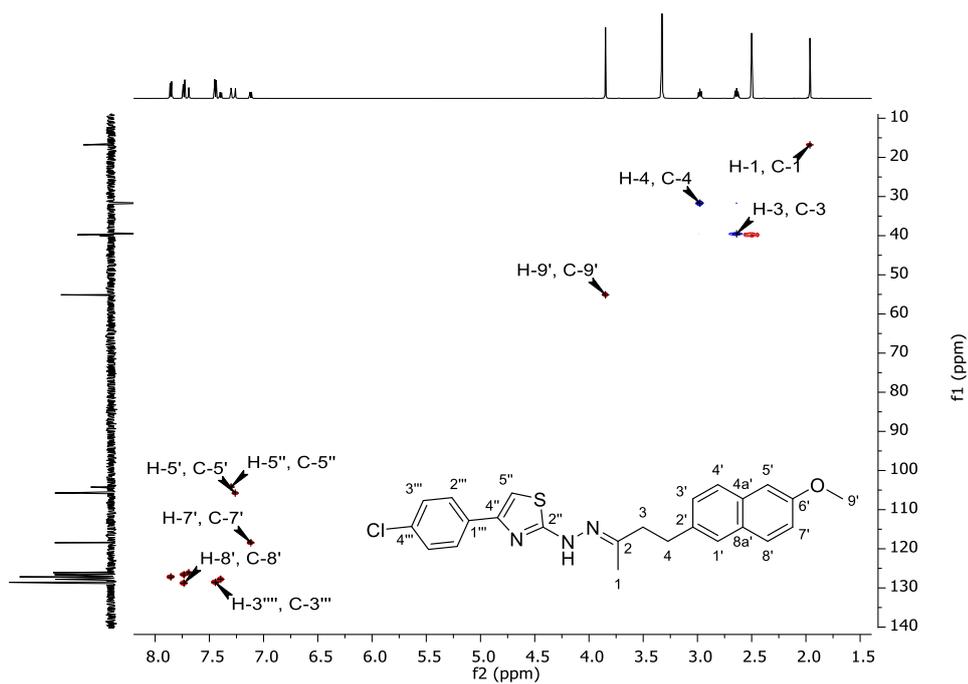
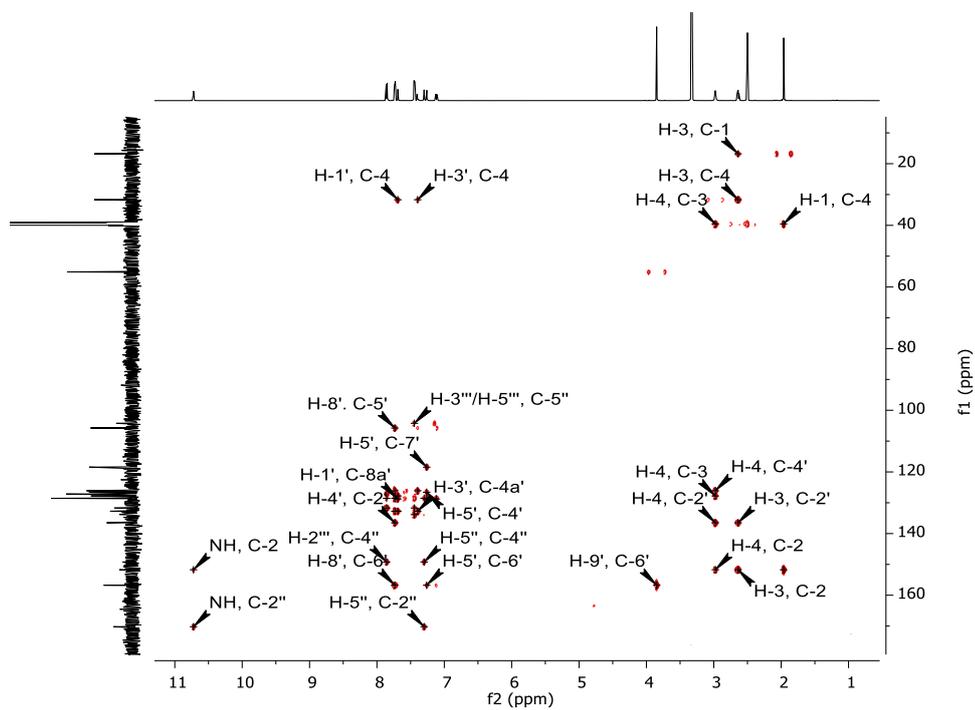


Figura B.6.5 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2f.



Apêndice B.7 – Espectros de RMN de TH2g

Figura B.7.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH2g.

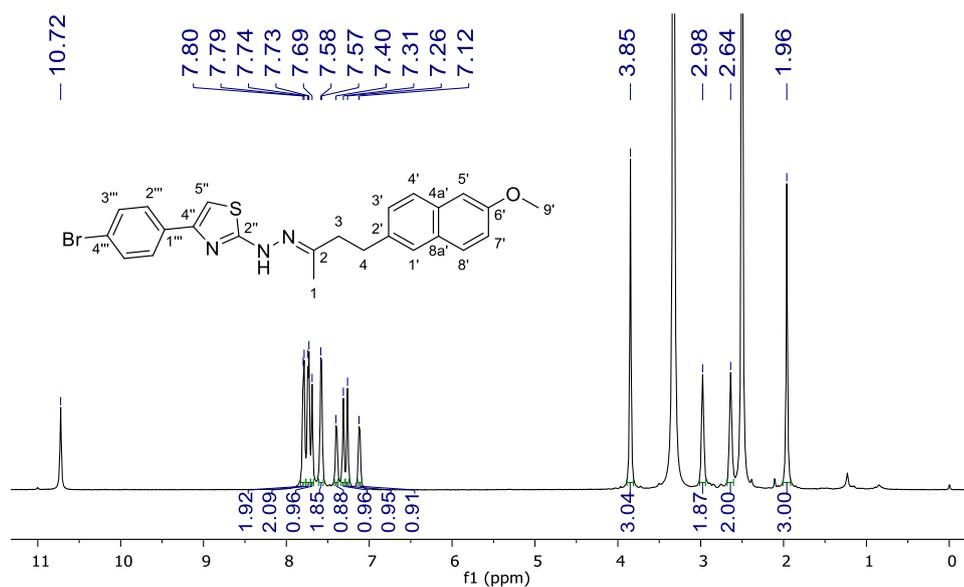


Figura B.7.2 – Expansões do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ_{H} 1,60-4,20 e 7,10-7,90) de TH2g.

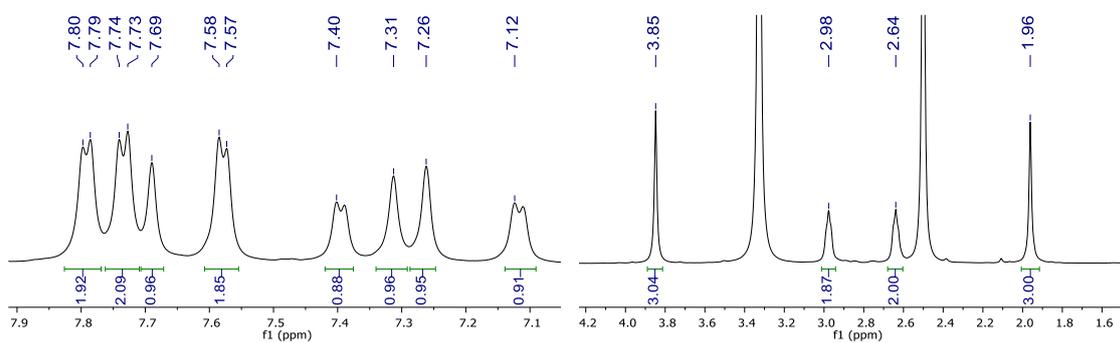


Figura B.7.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH2g.

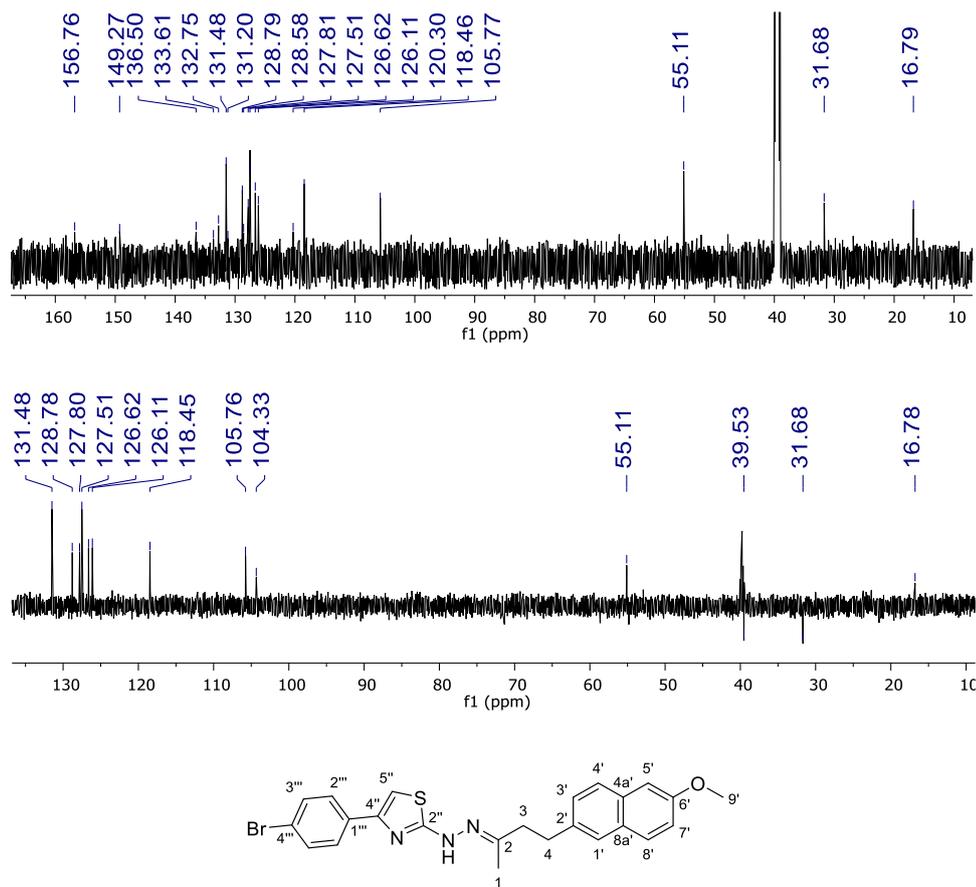


Figura B.7.4 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2g.

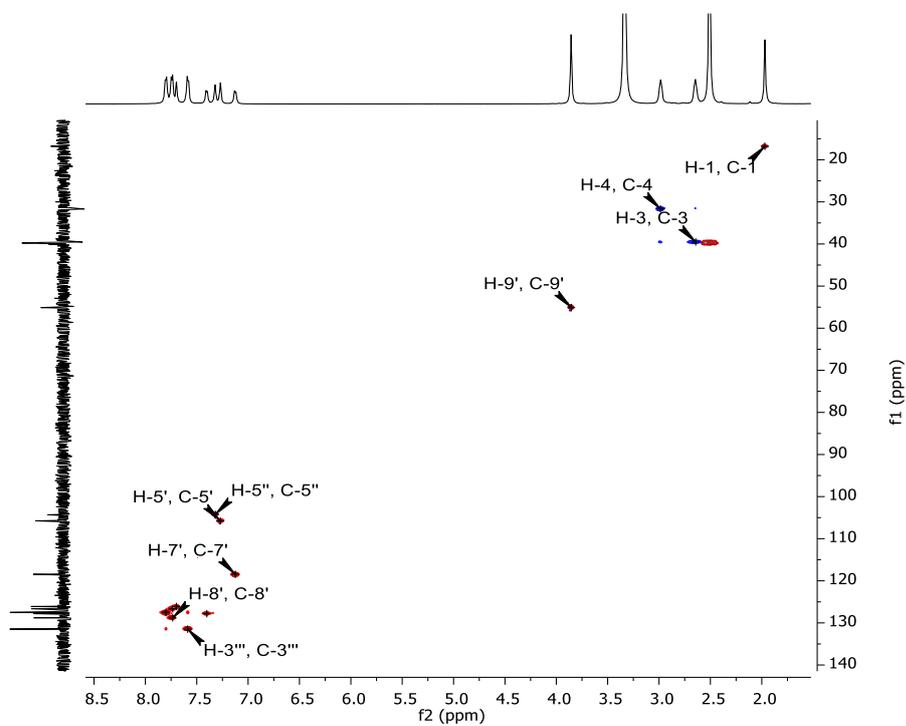
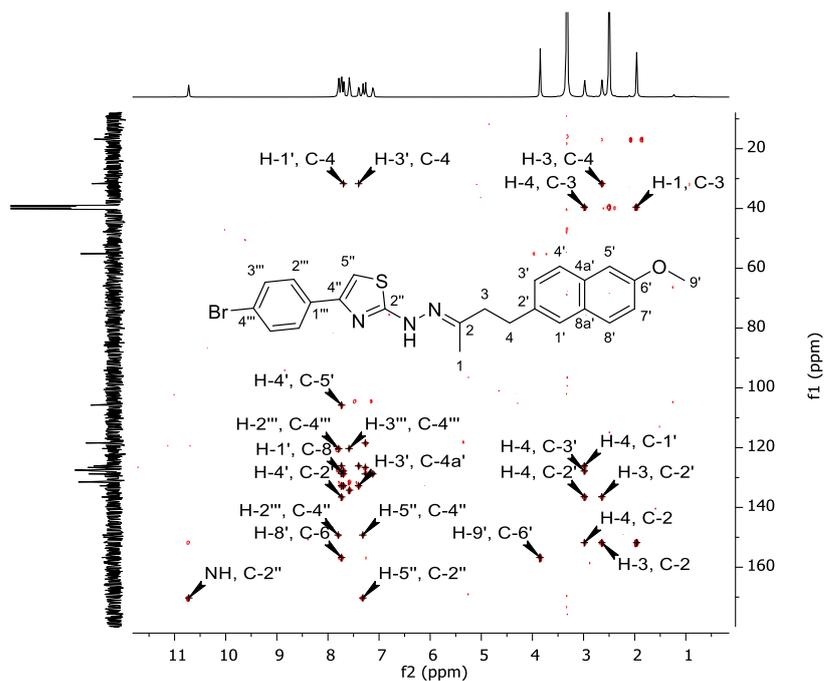


Figura B.7.5 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2g.



Apêndice B.8 – Espectros de RMN de TH2h

Figura B.8.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de TH2h.

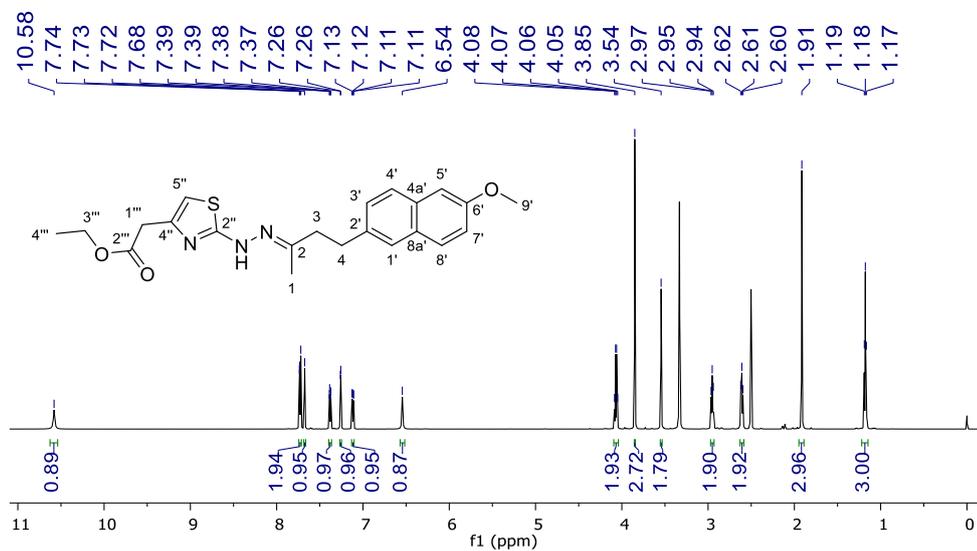


Figura B.8.2 – Expansões do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (δ_{H} 1,20-4,10 e 6,40-8,00) de **TH2h**.

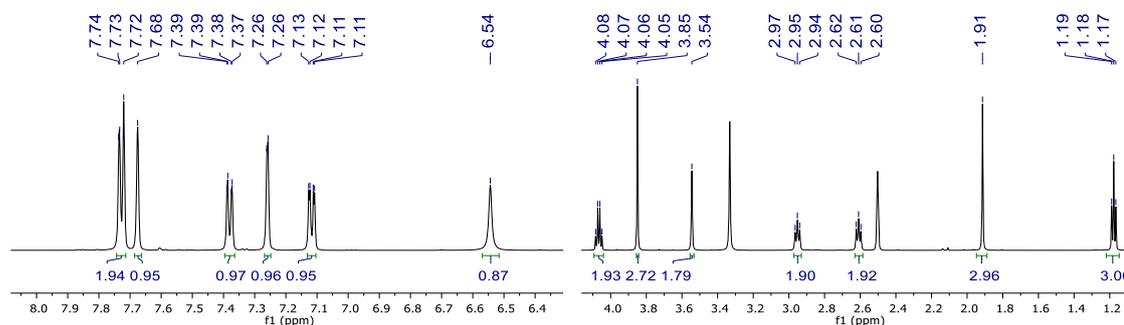


Figura B.8.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **TH2h**.

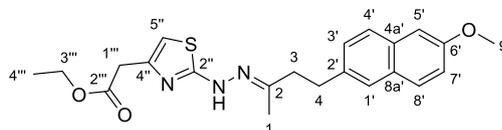
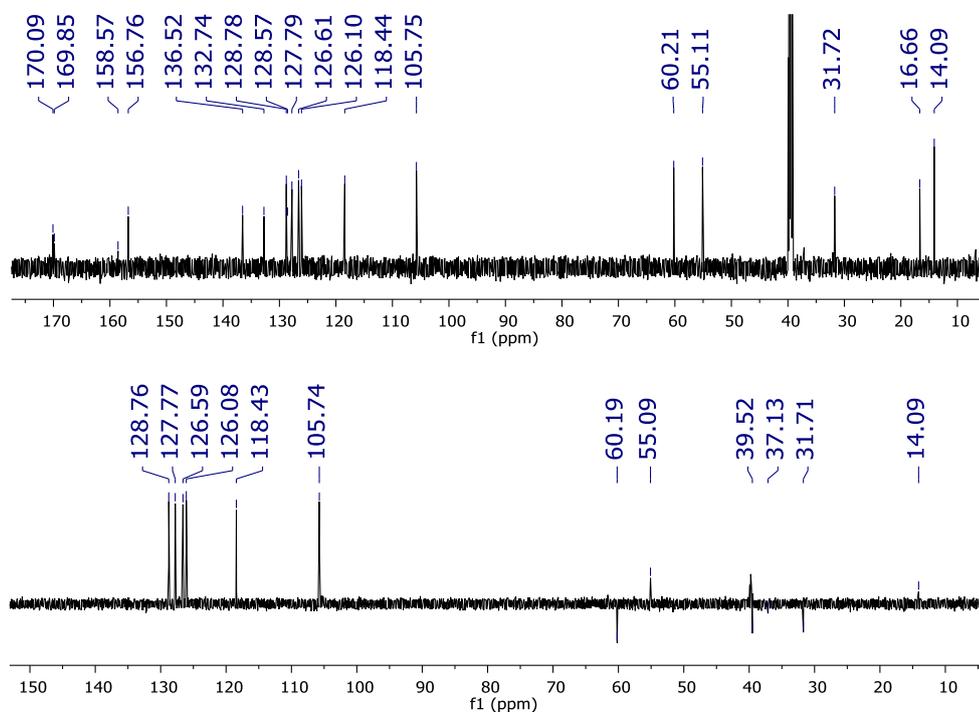


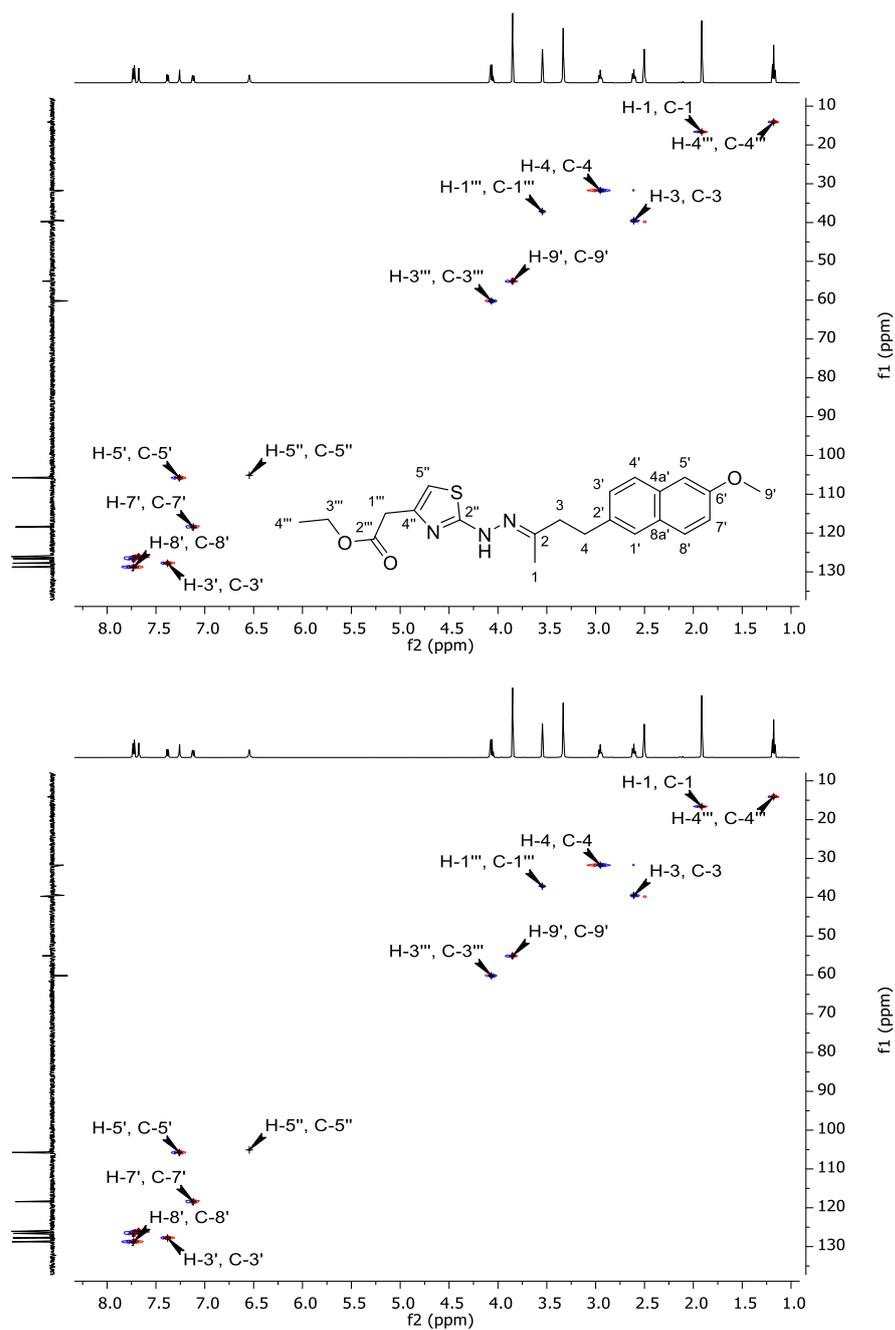
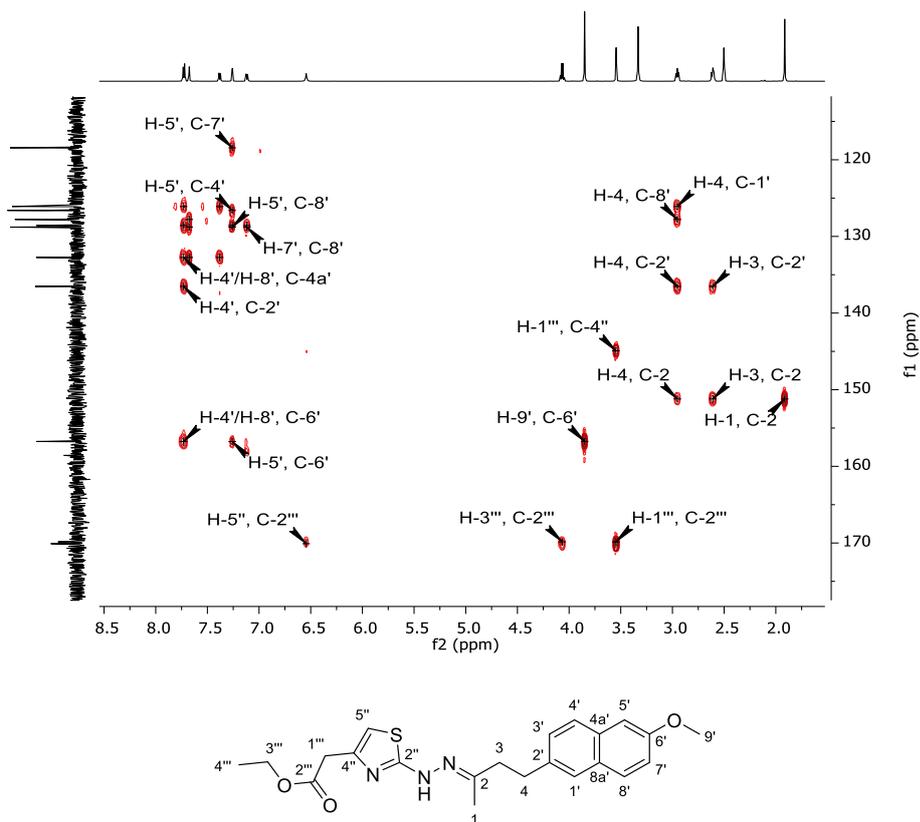
Figura B.8.4 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2h.

Figura B.8.5 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) de TH2h.



APÊNDICE C – Espectros das 2-tiazolilhidrazonas contendo grupo álcool ou ácido carboxílico

Apêndice C.1 – Espectros de RMN de TH3a

Figura C.1.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH3a.

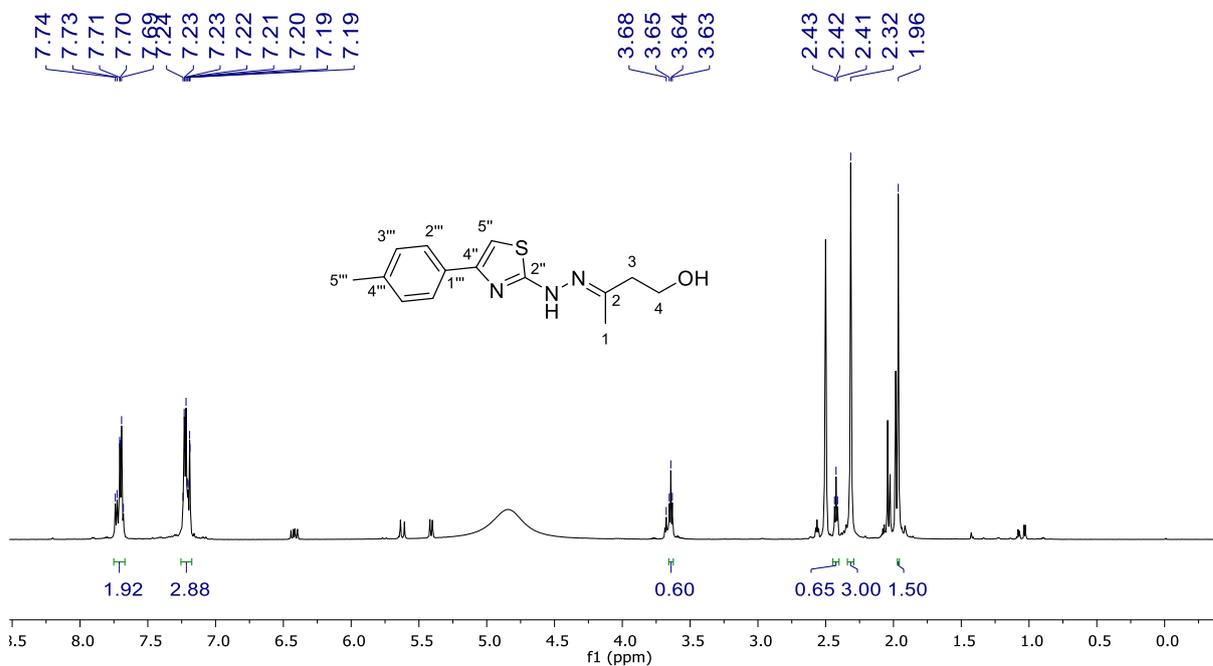
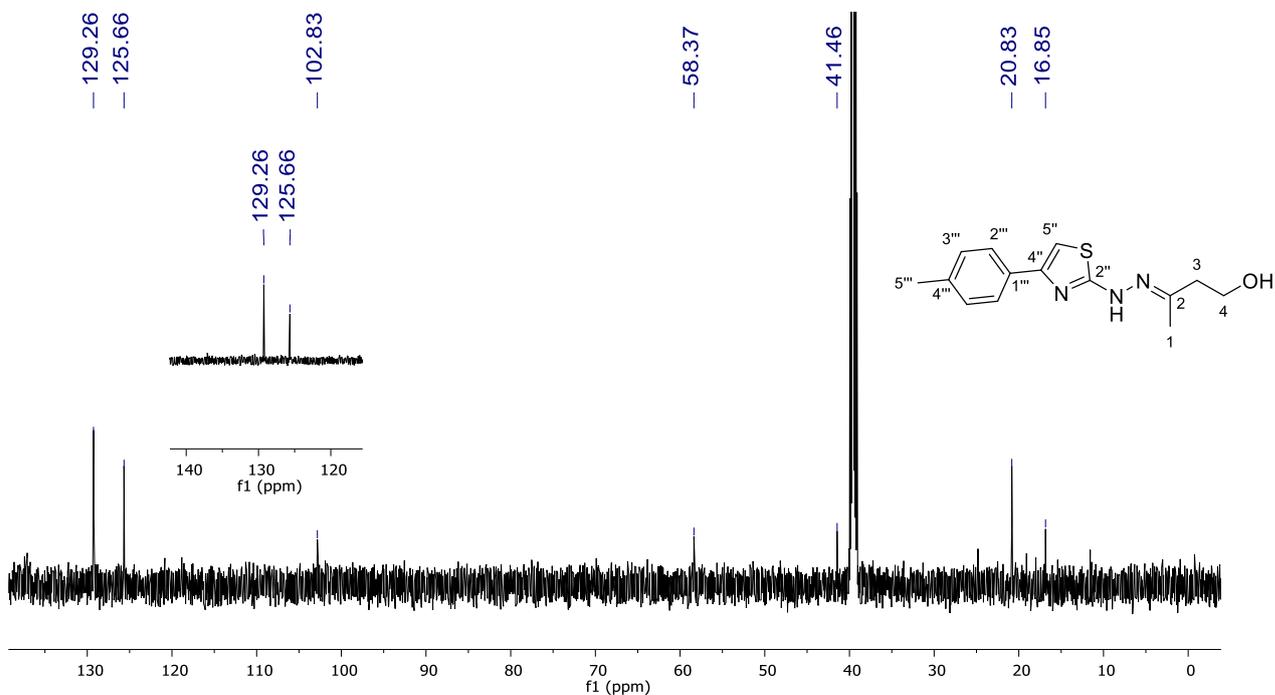


Figura C.1.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH3a.



Apêndice C.2 – Espectros de RMN de TH4a

Figura C.2.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH4a.

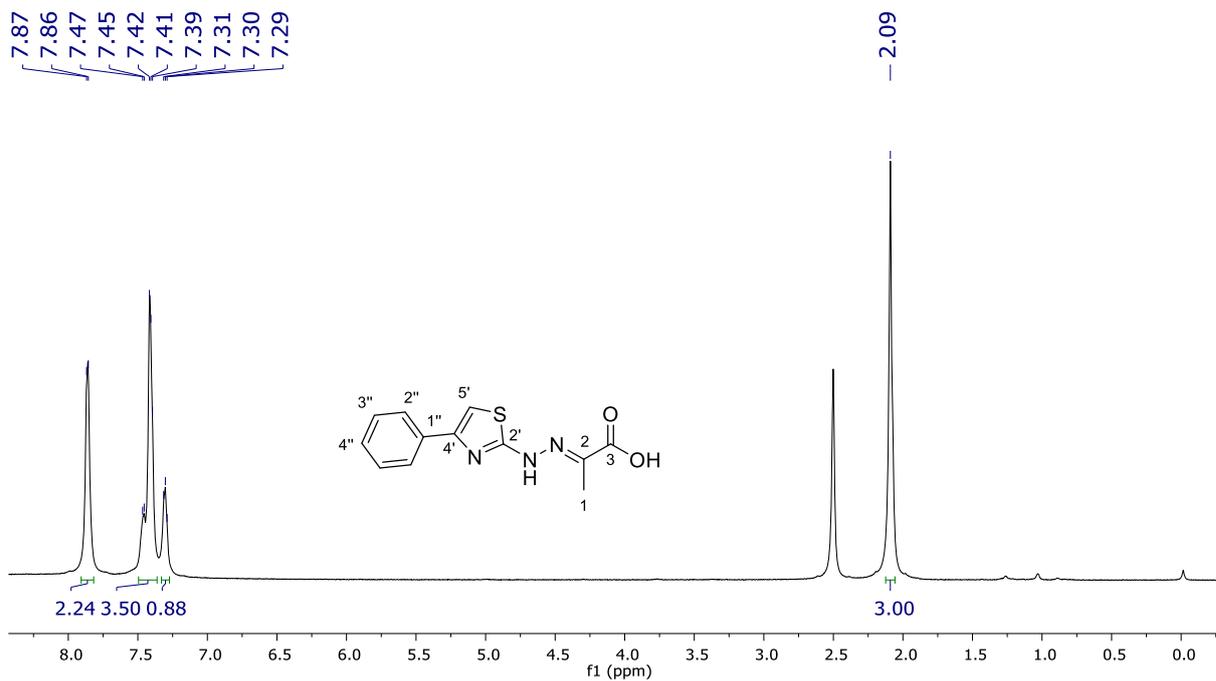
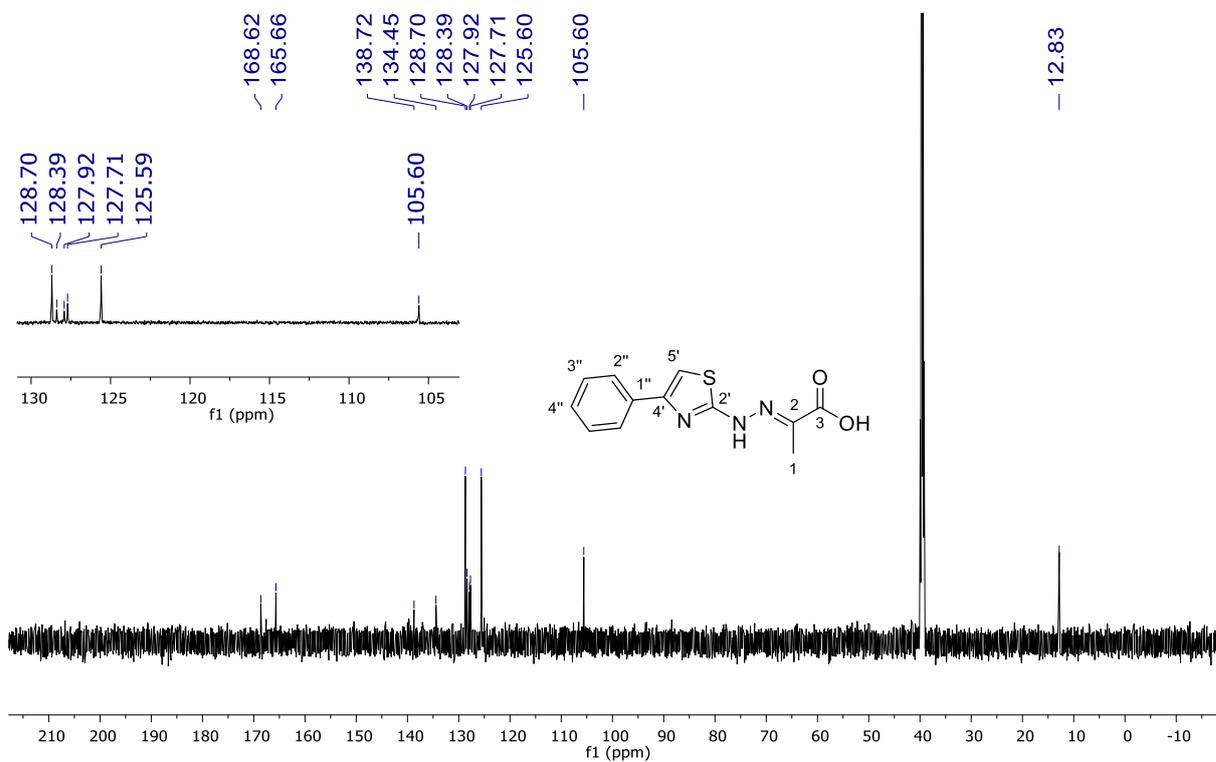


Figura C.2.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH4a.



Apêndice C.3 – Espectros de RMN de TH4b

Figura C.3.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **TH4b**.

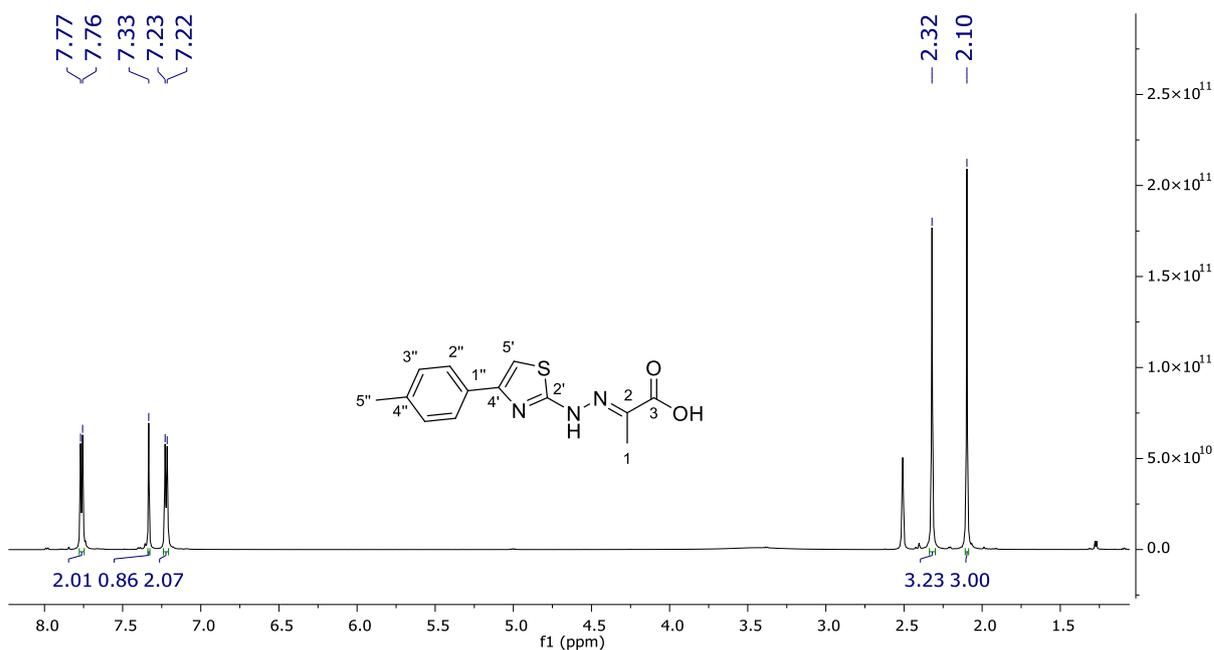
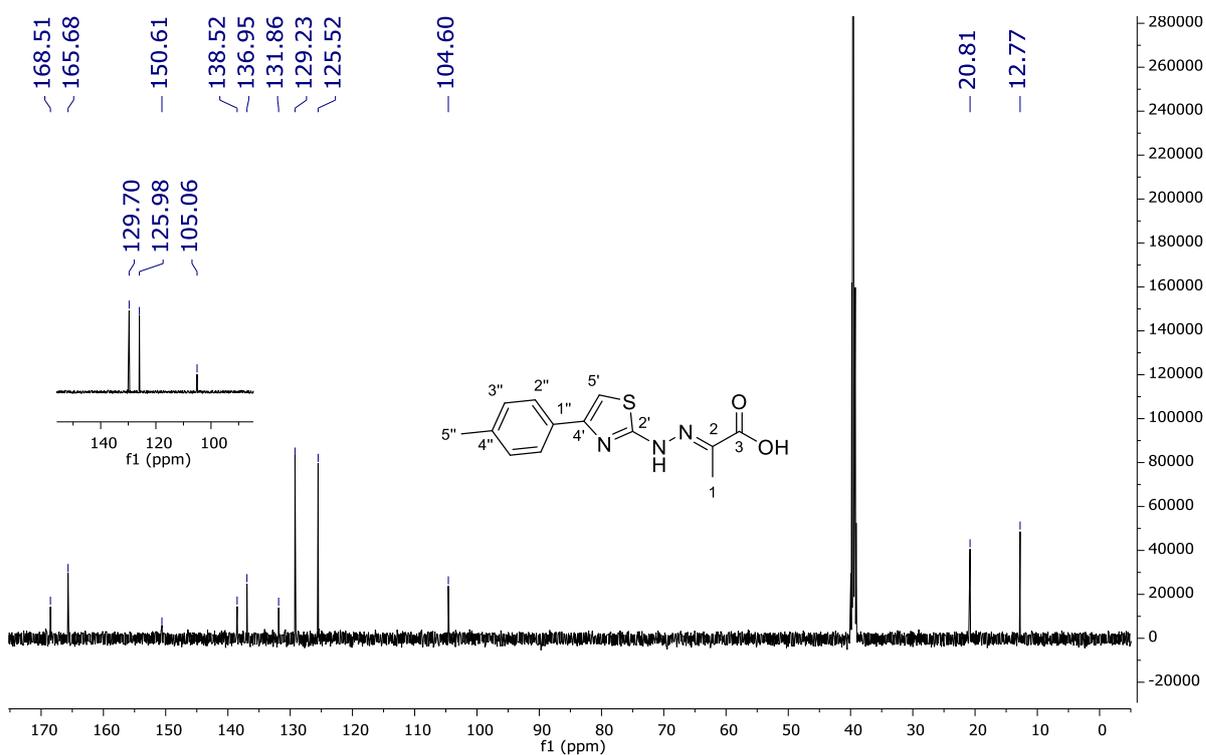


Figura C.3.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **TH4b**.



Apêndice C.4 – Espectros de RMN de **TH4c**

Figura C.4.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH4c.

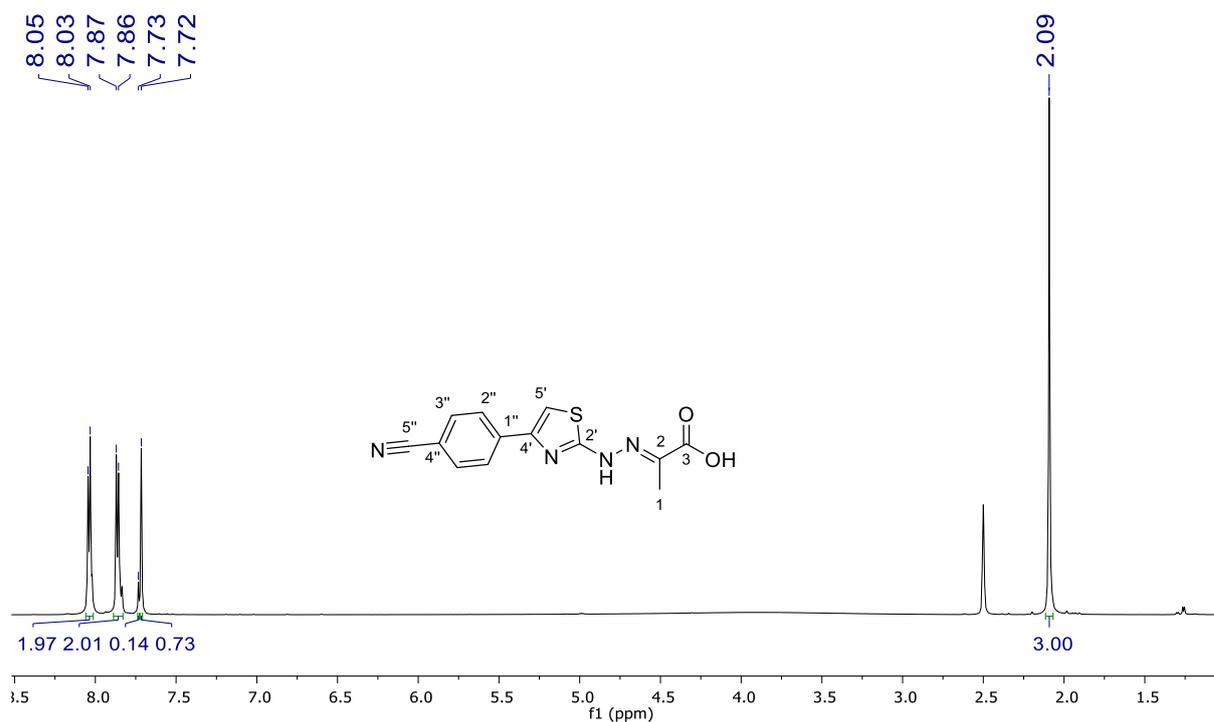
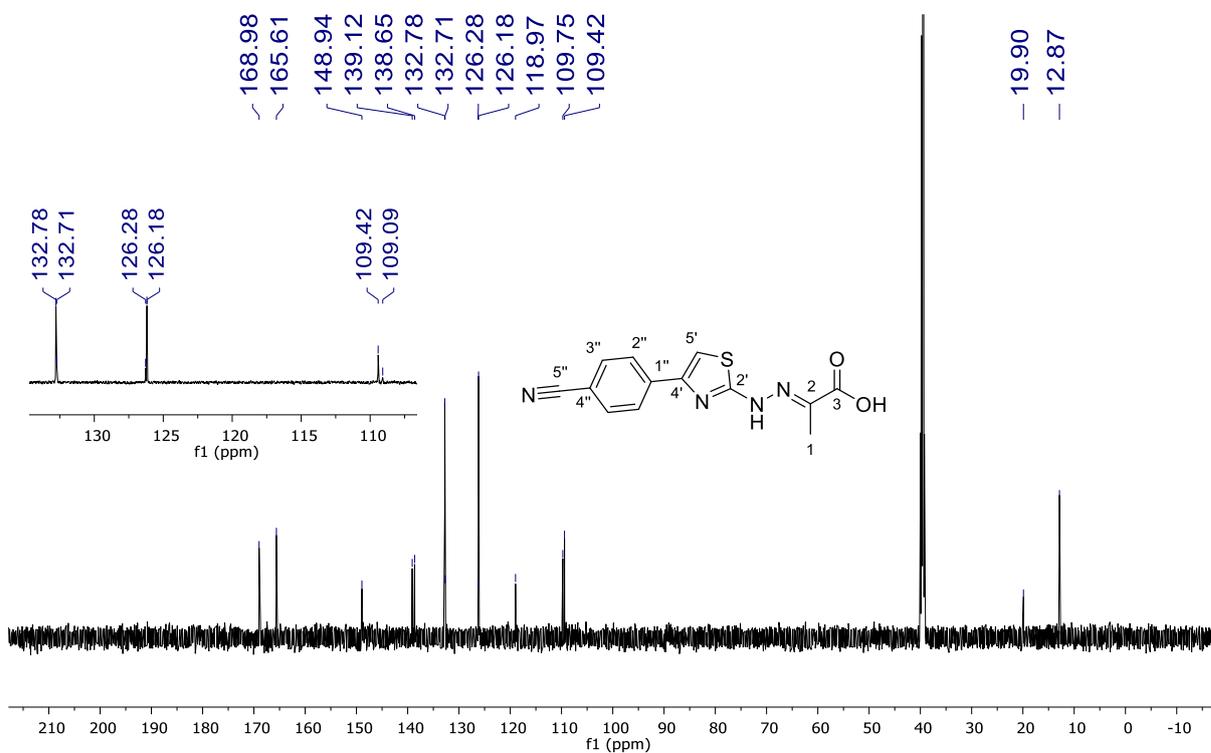


Figura C.4.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH4c.



Apêndice C.5 – Espectros de RMN de TH4d

Figura C.5.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH4d.

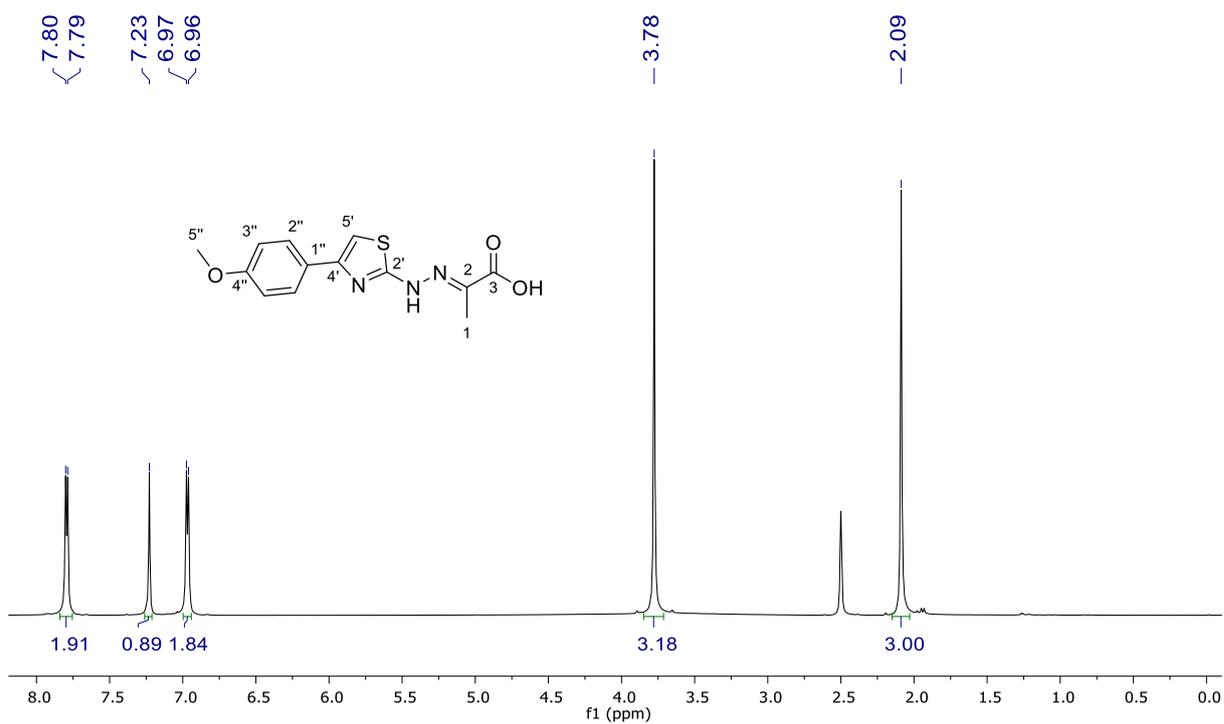
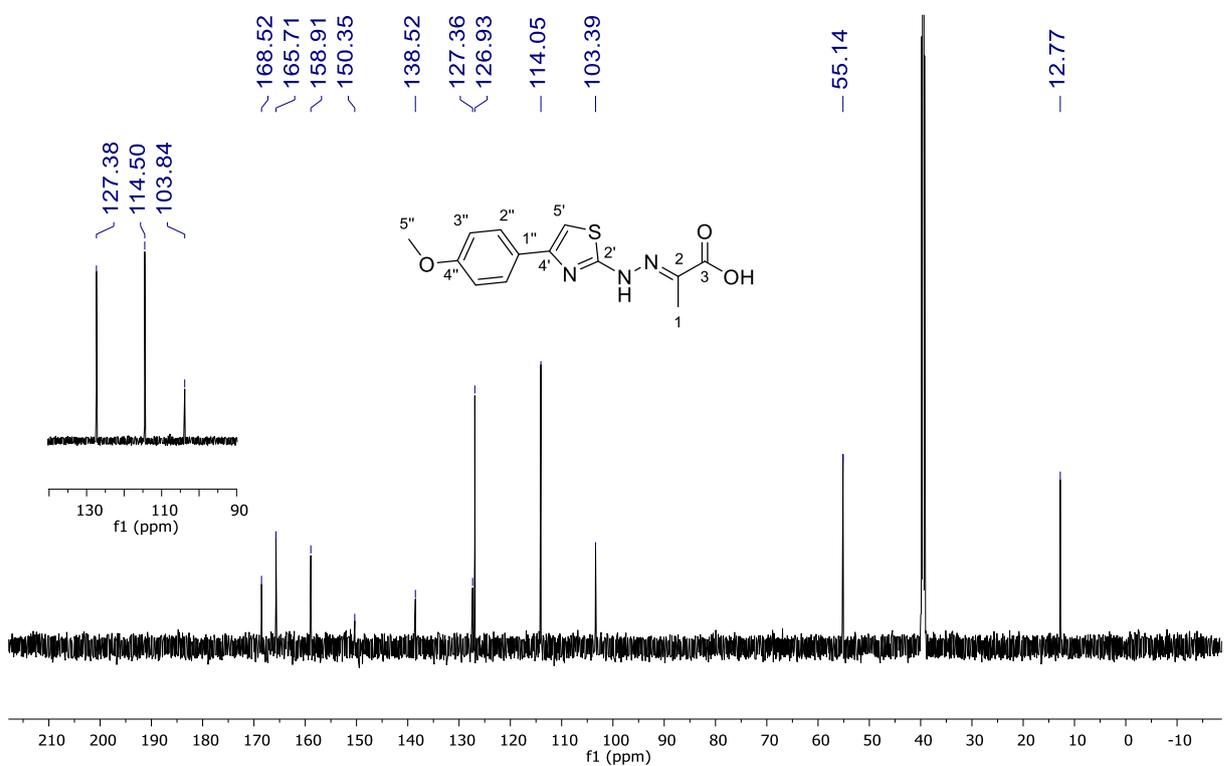


Figura C.5.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH4d.



Apêndice C.6 – Espectros de RMN de TH4e

Figura C.6.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) de **TH4e**.

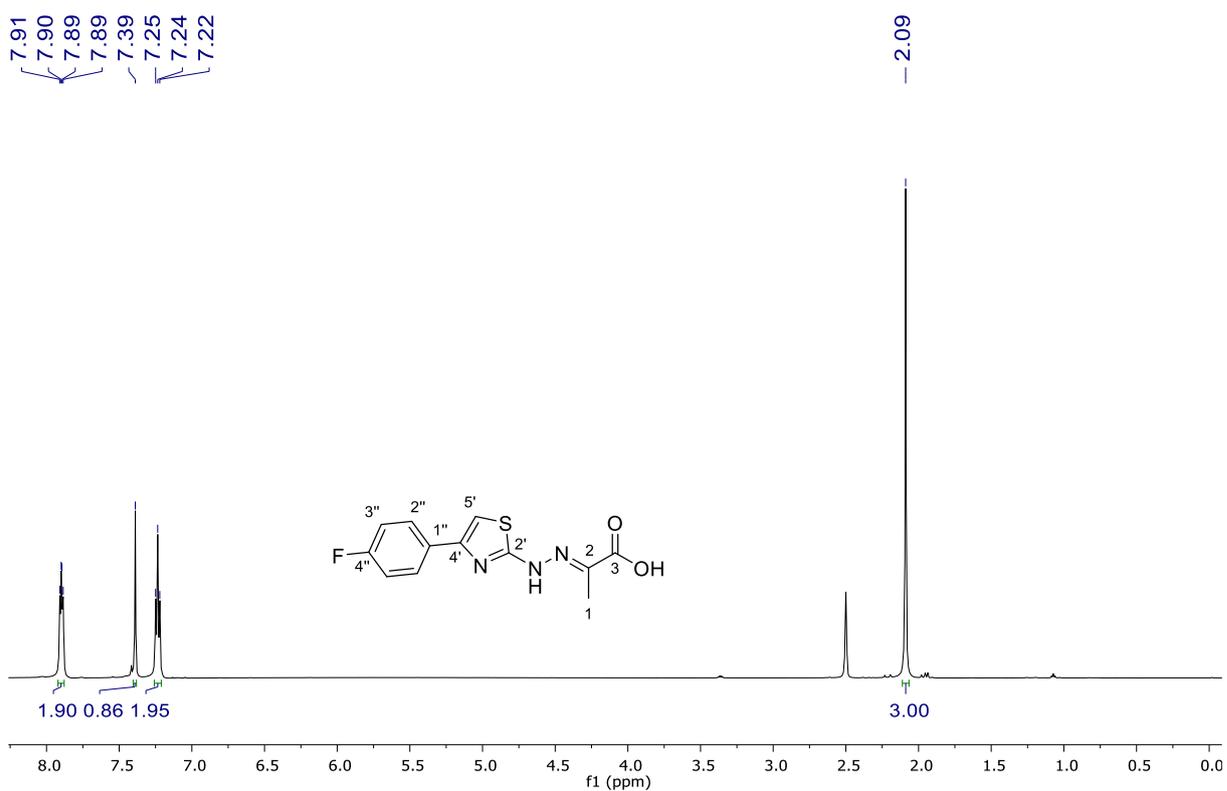
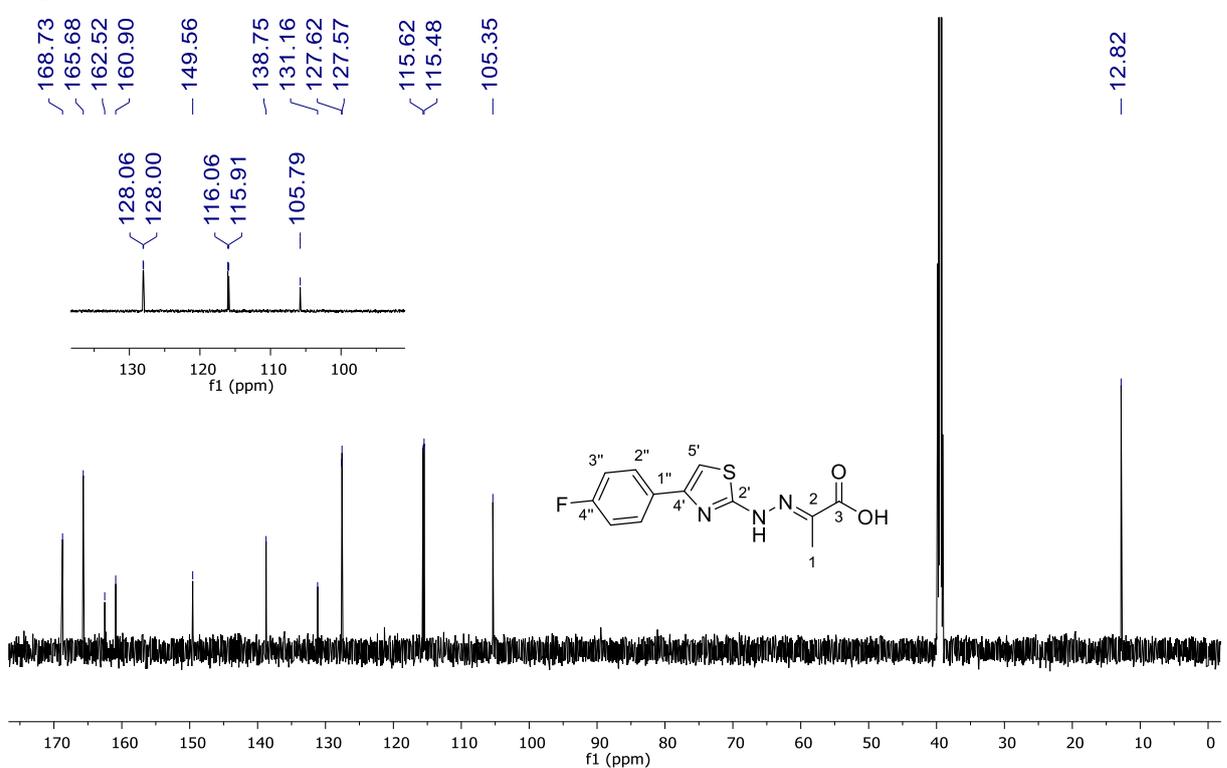


Figura C.6.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, DMSO-d_6) de **TH4e**.



Apêndice C.7 – Espectros de RMN de **TH4f**

Figura C.7.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH4f.

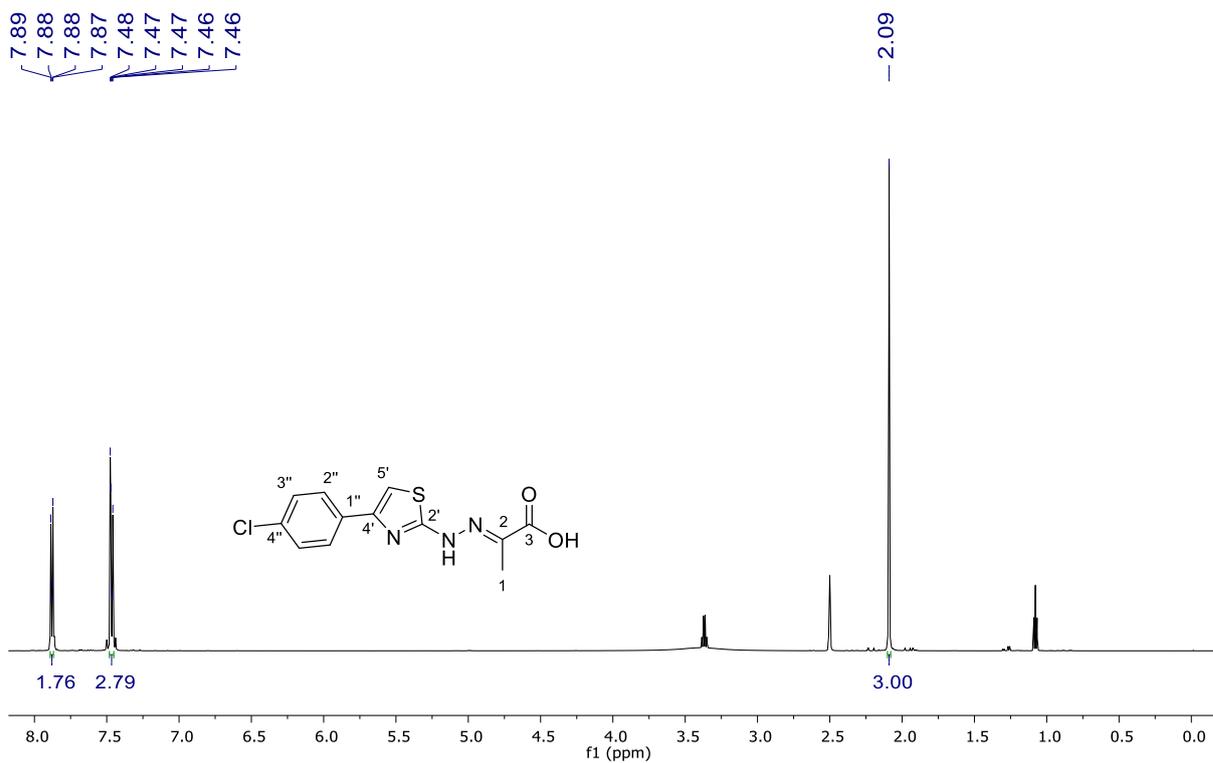
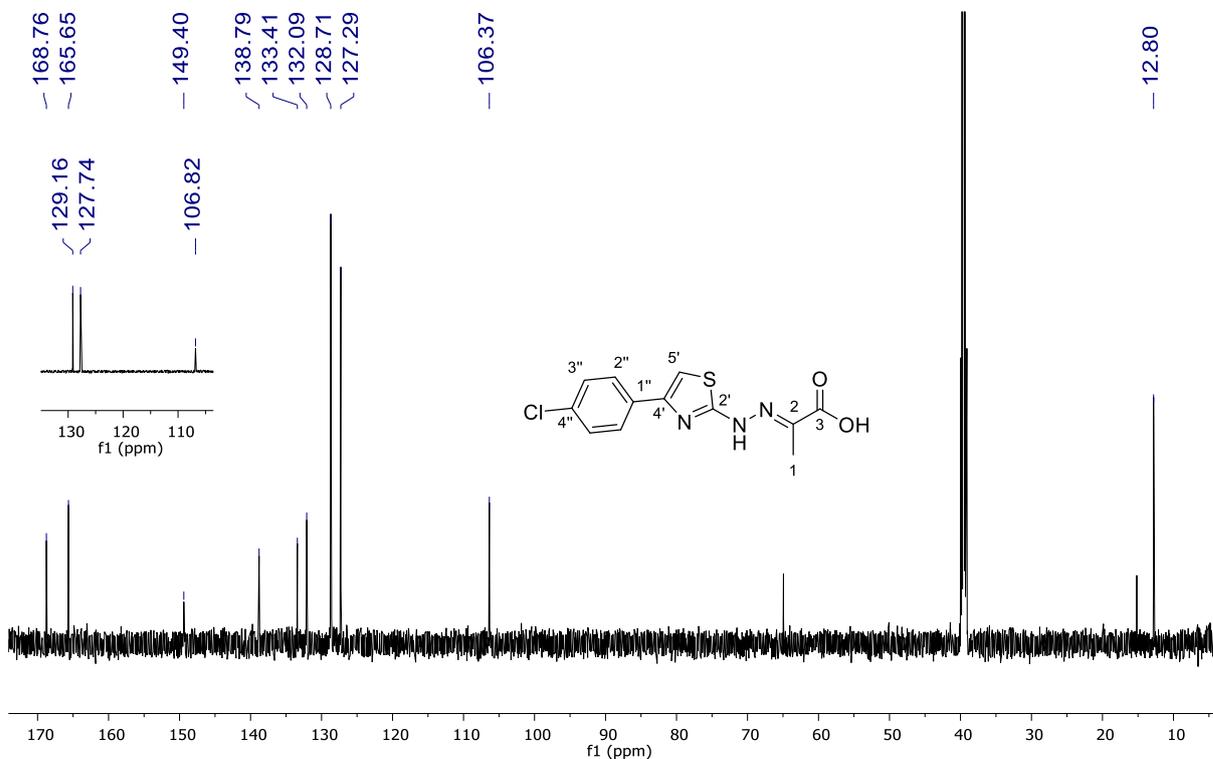


Figura C.7.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH4f.



Apêndice C.8 – Espectros de RMN de TH4g

Figura C.8.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **TH4g**.

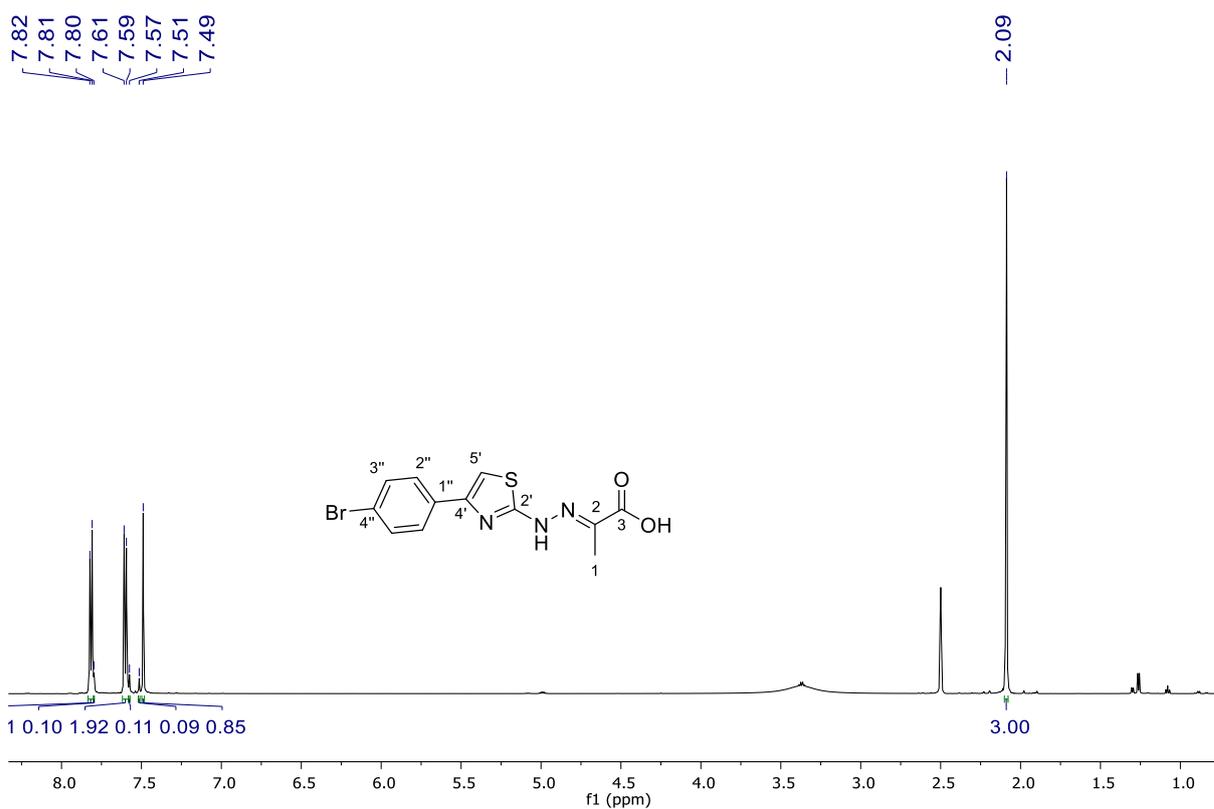
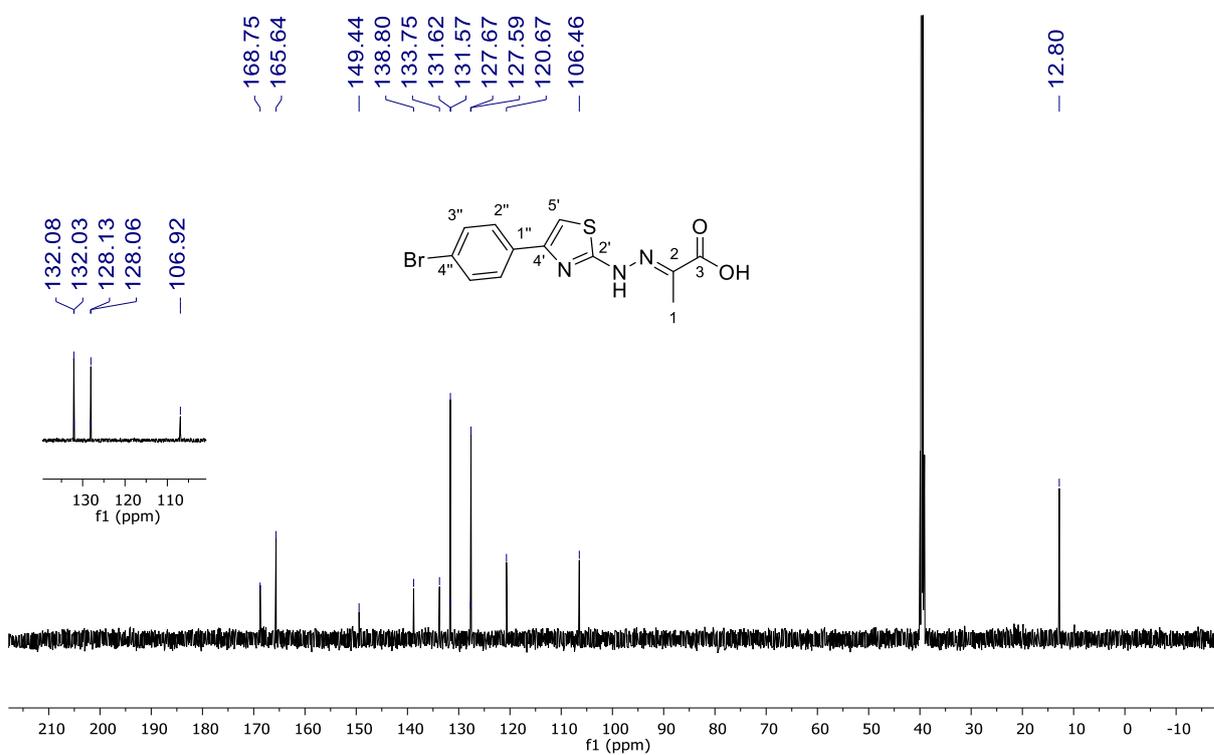


Figura C.8.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **TH4g**.



Apêndice C.9 – Espectros de RMN de **TH4h**

Figura C.9.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH4h.

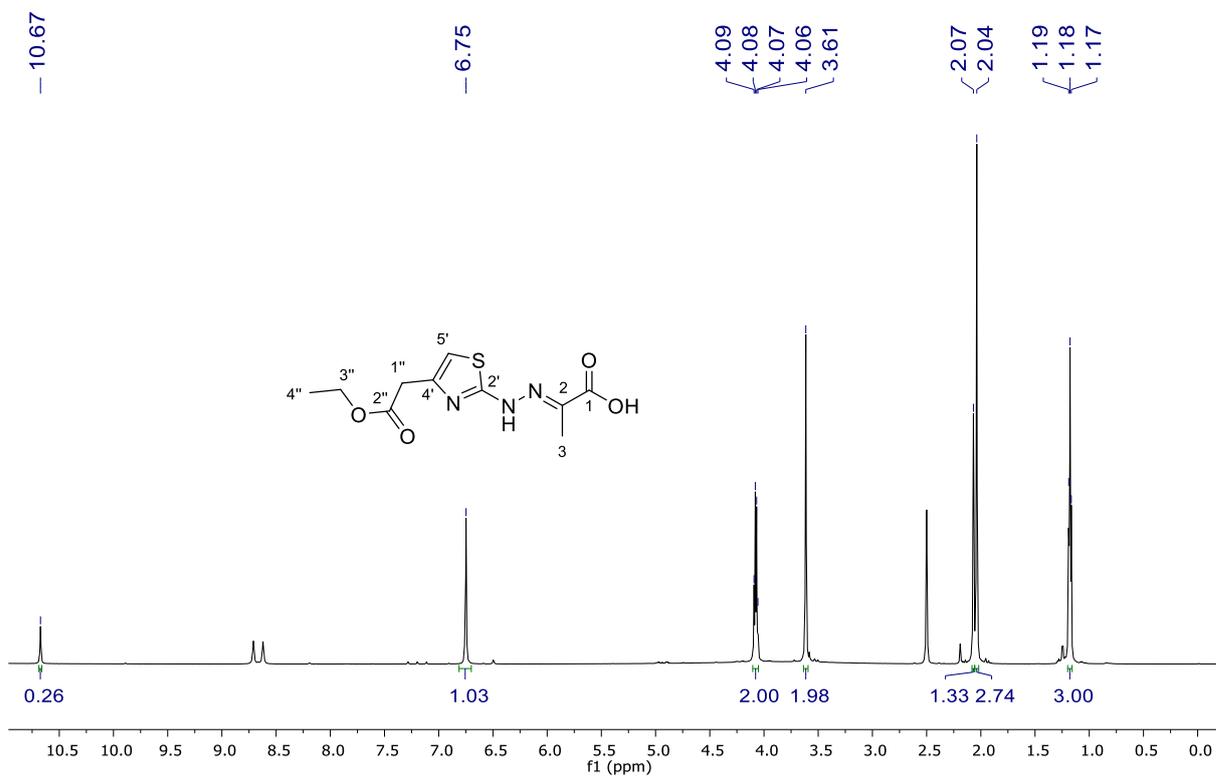
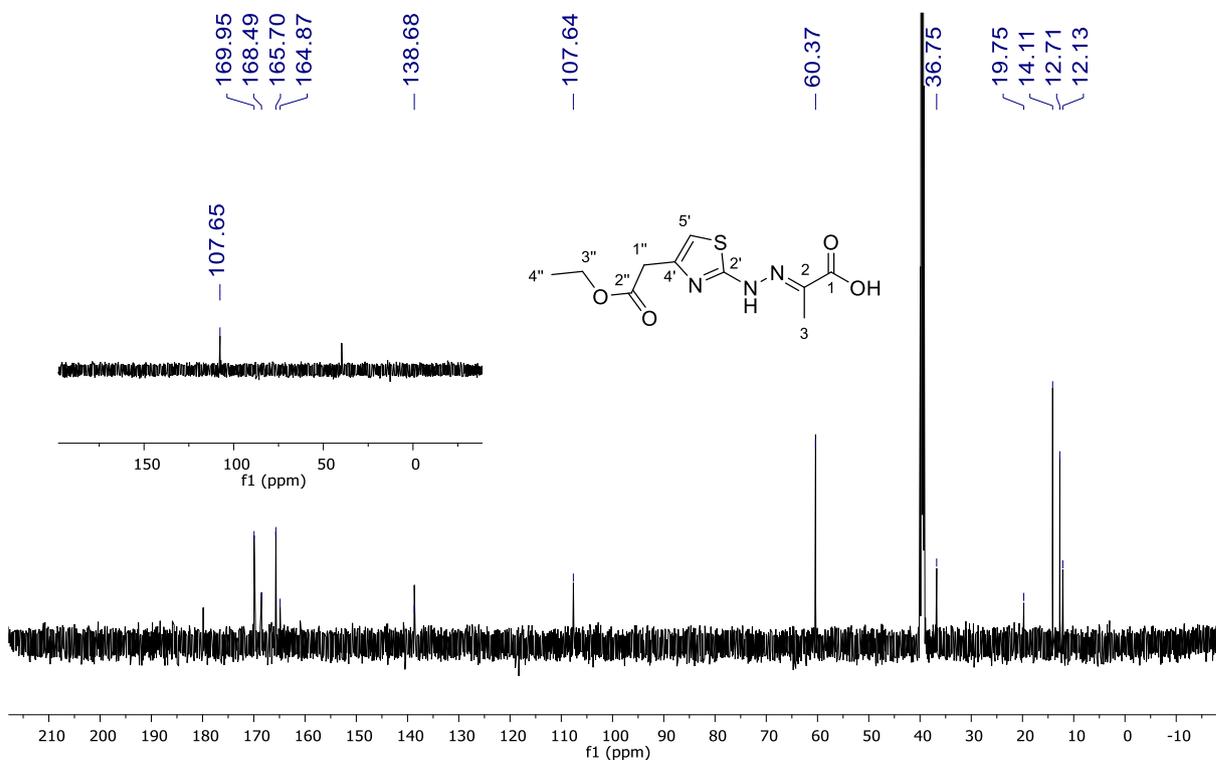


Figura C.9.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH4h.



Apêndice C.10 – Espectros de RMN de TH5a

Figura C.10.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH5a.

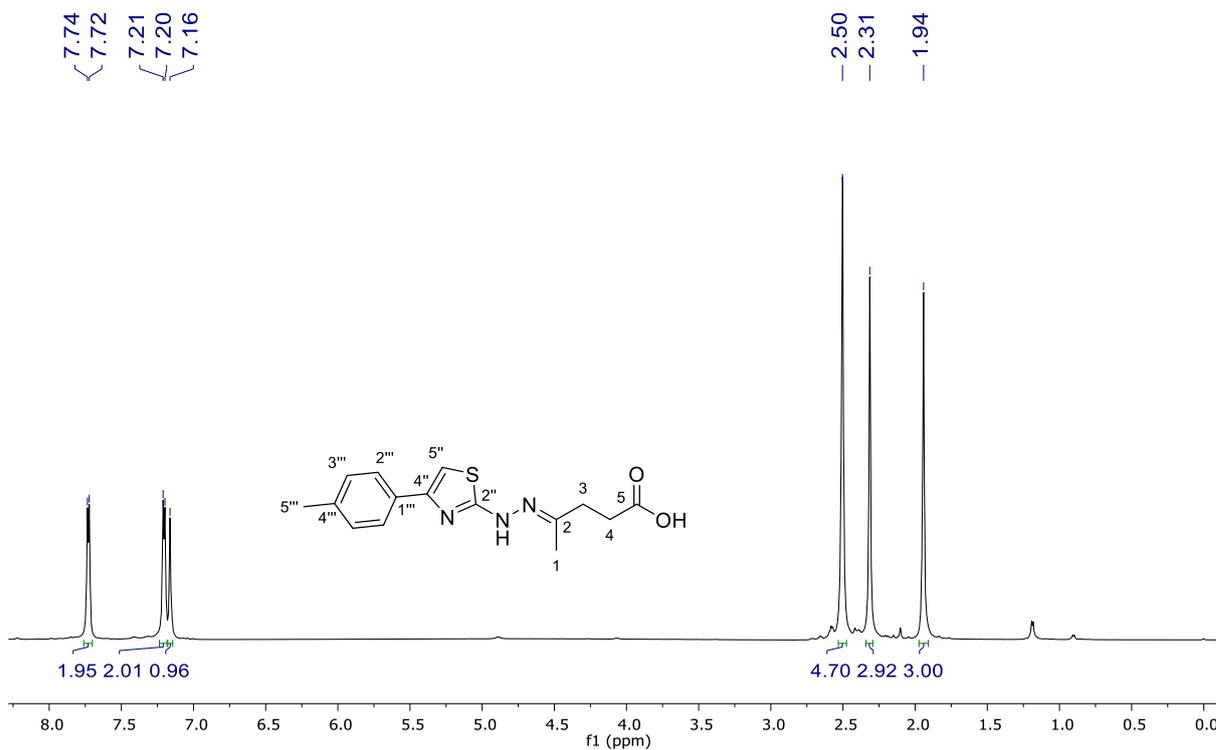
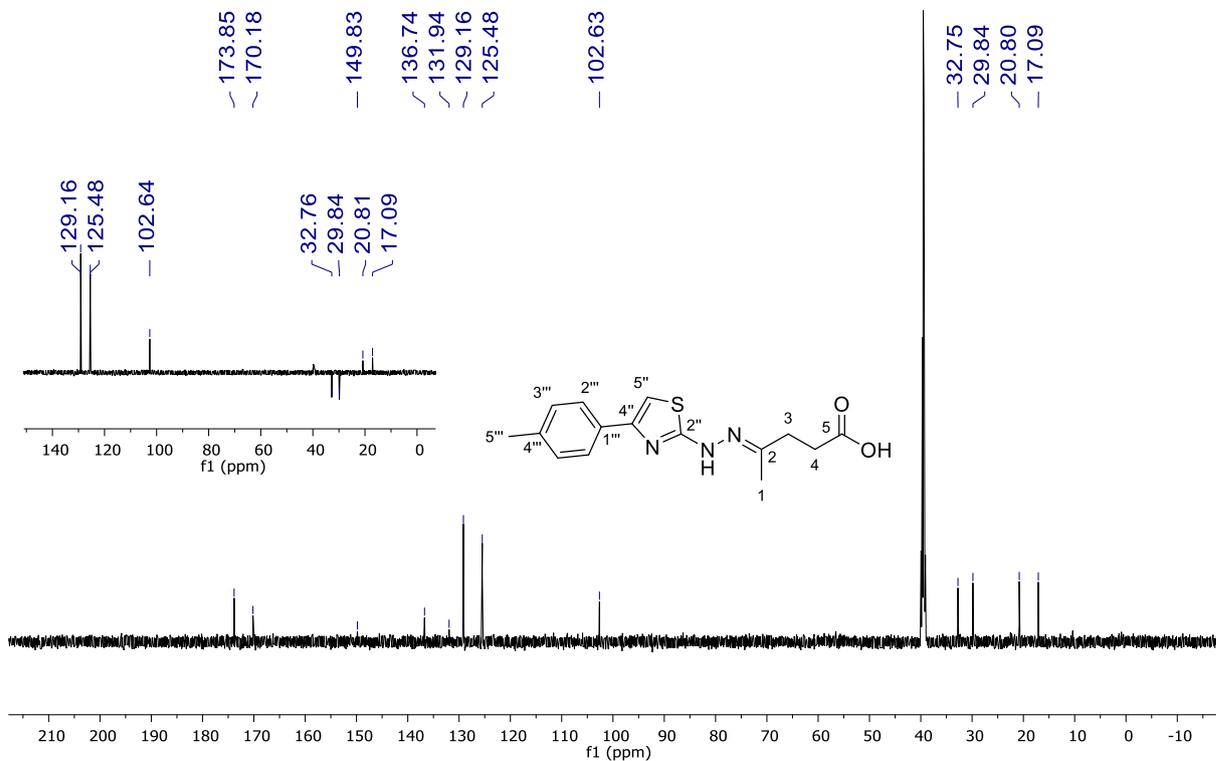


Figura C.10.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH5a.



APÊNDICE D – Espectros das 2-tiazolilhidrazinas

Apêndice D.1 – Espectros de RMN de TH6a

Figura D.1.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH6a.

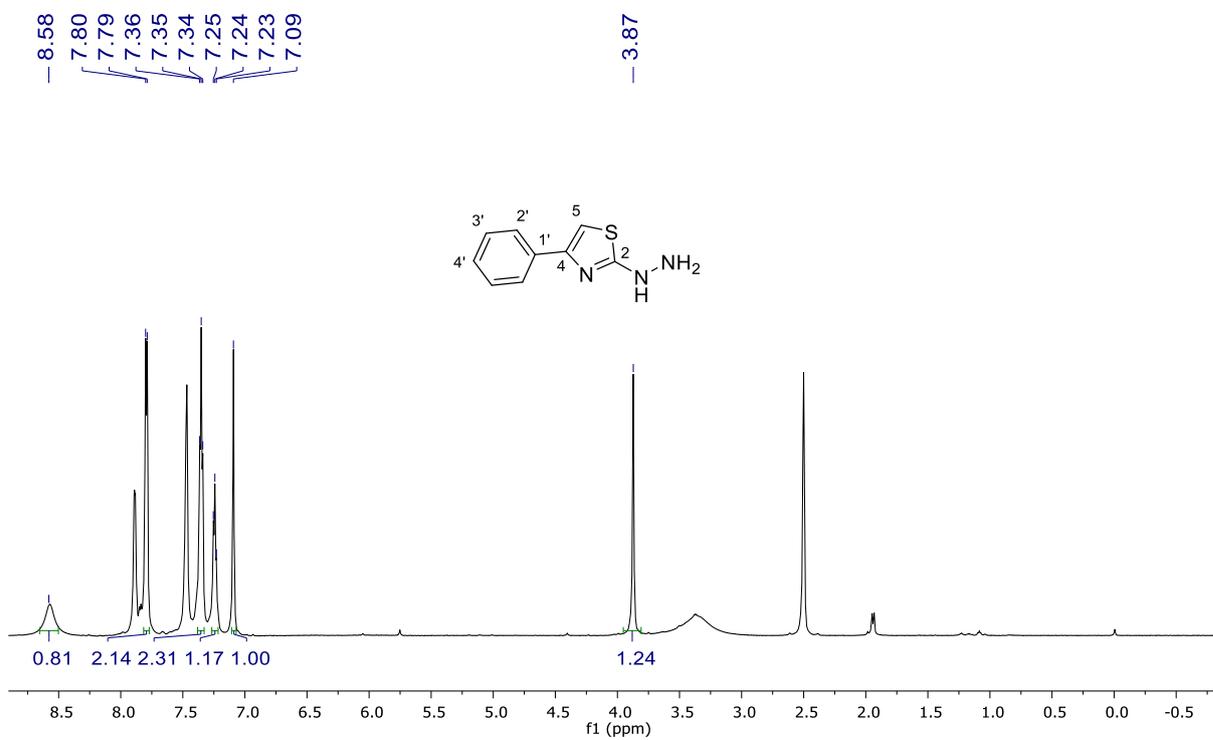
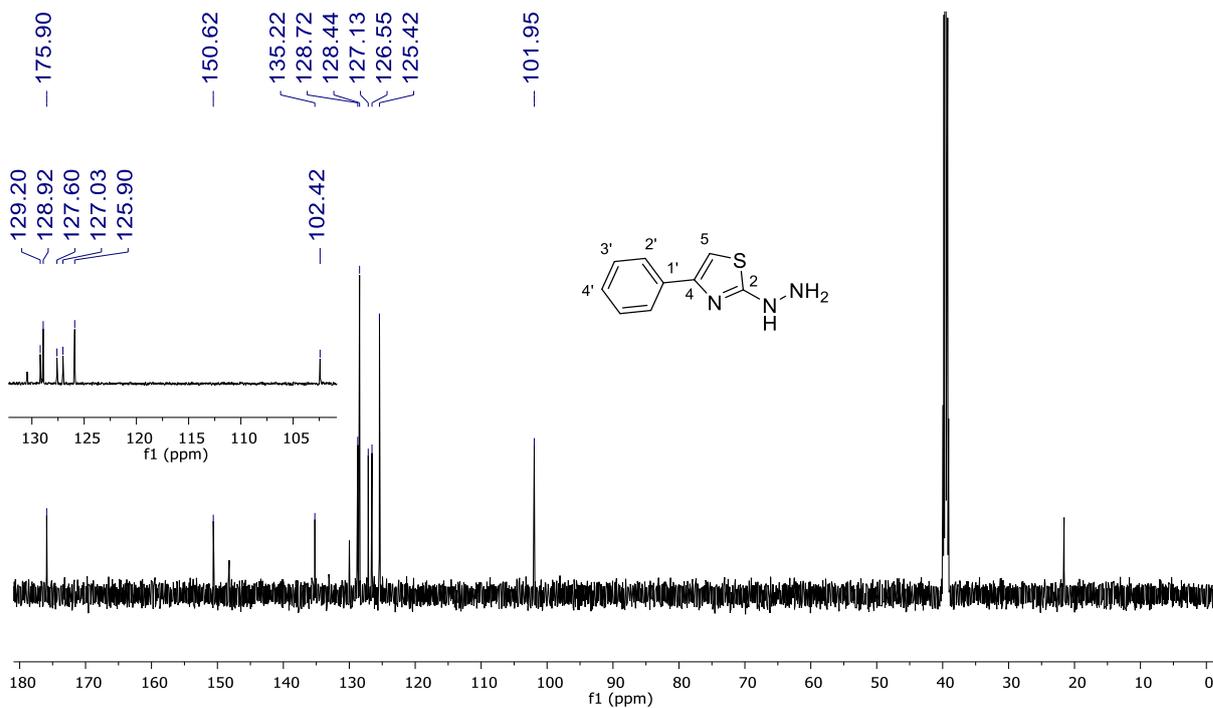


Figura D.1.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH6a.



Apêndice D.2 – Espectros de RMN de TH6b

Figura D.2.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH6b.

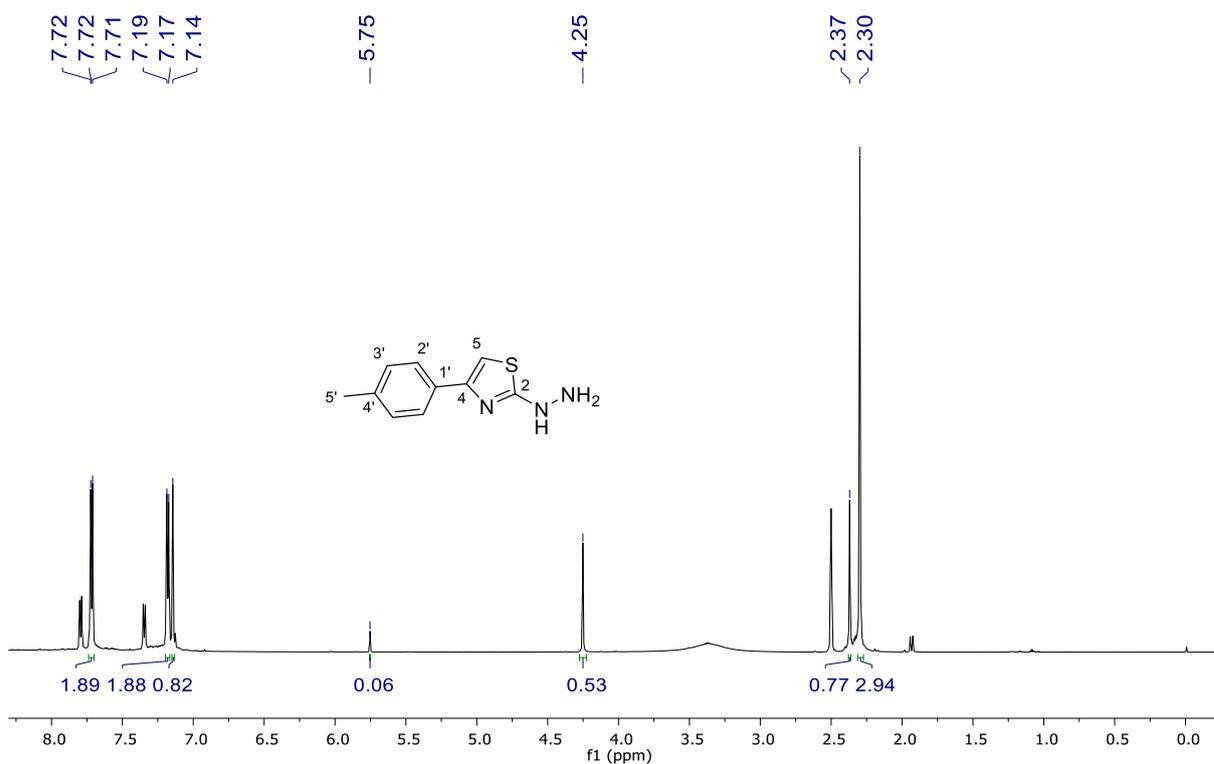
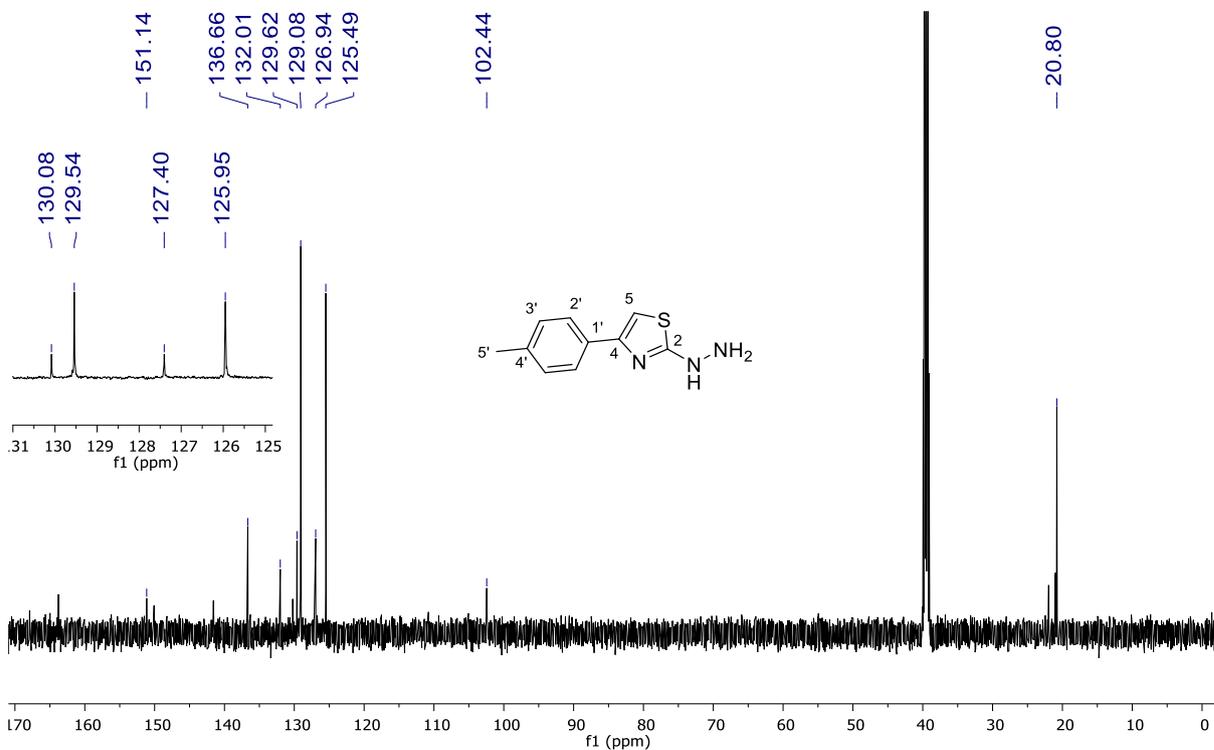


Figura D.2.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH6b.



Apêndice D.3 – Espectros de RMN de TH6c

Figura D.3.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH6c.

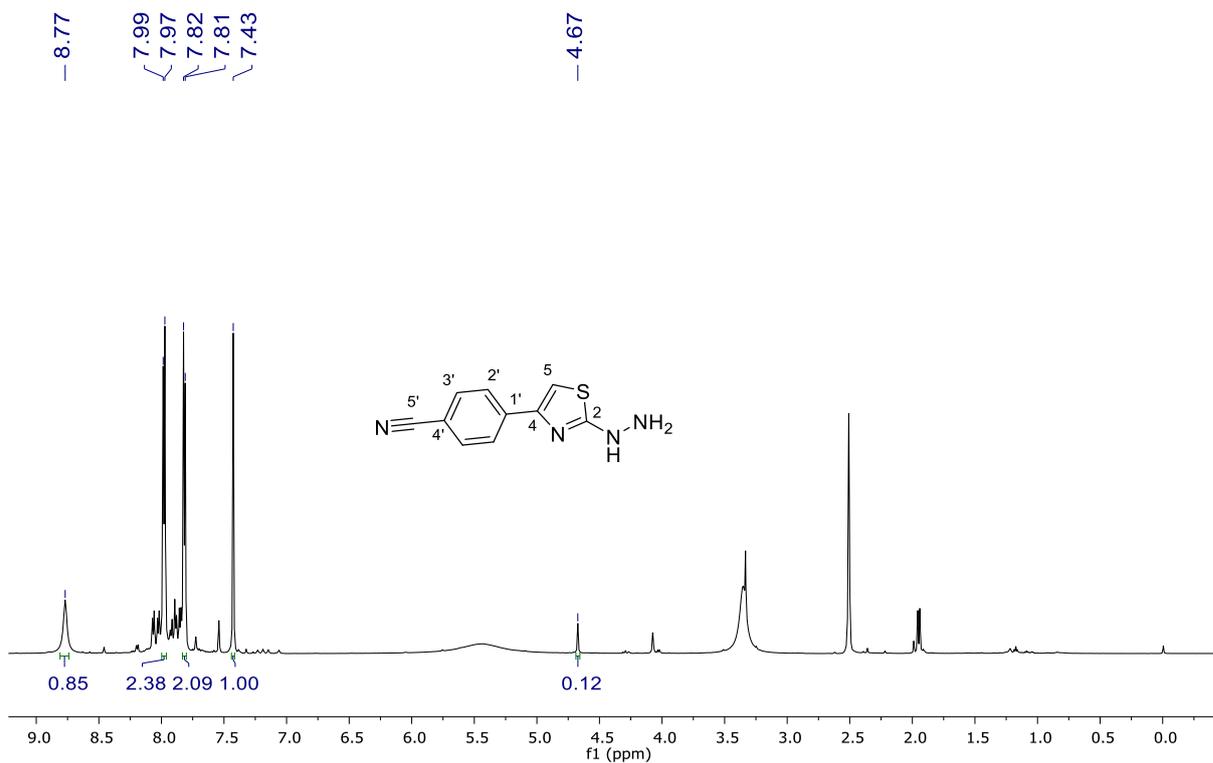
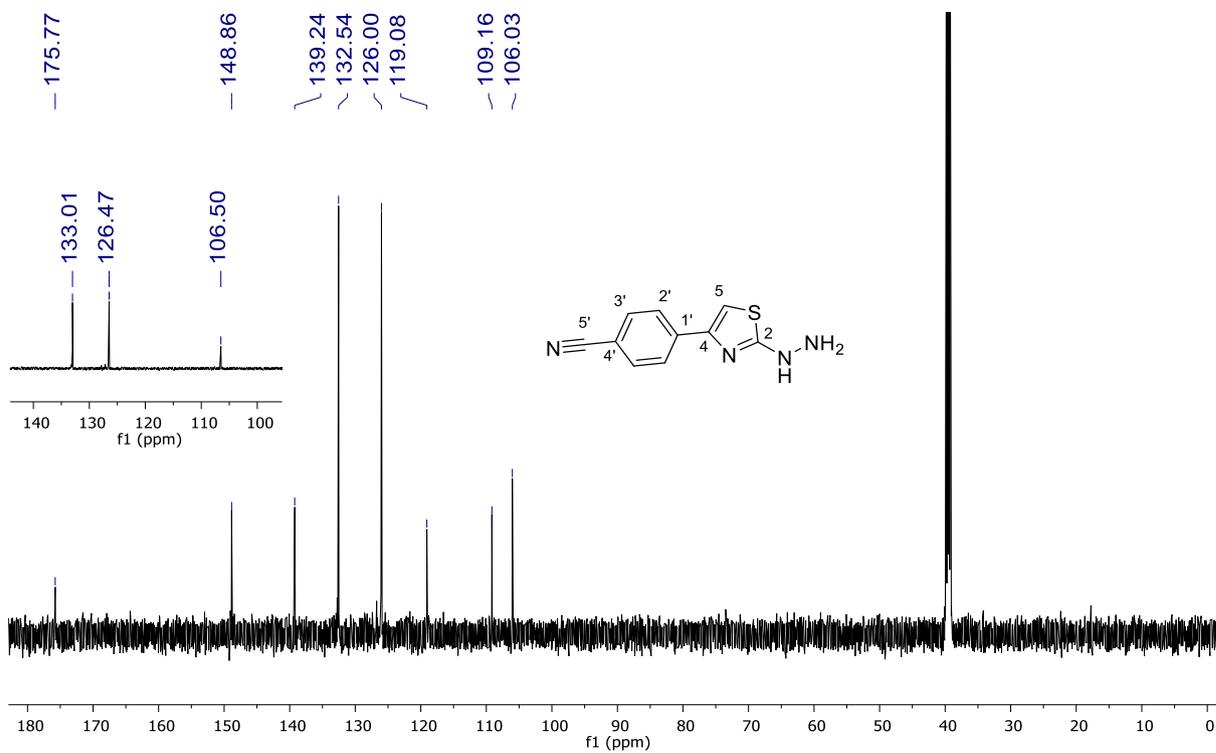


Figura D.3.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH6c.



Apêndice D.4 – Espectros de RMN de TH6d

Figura D.4.1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH6d.

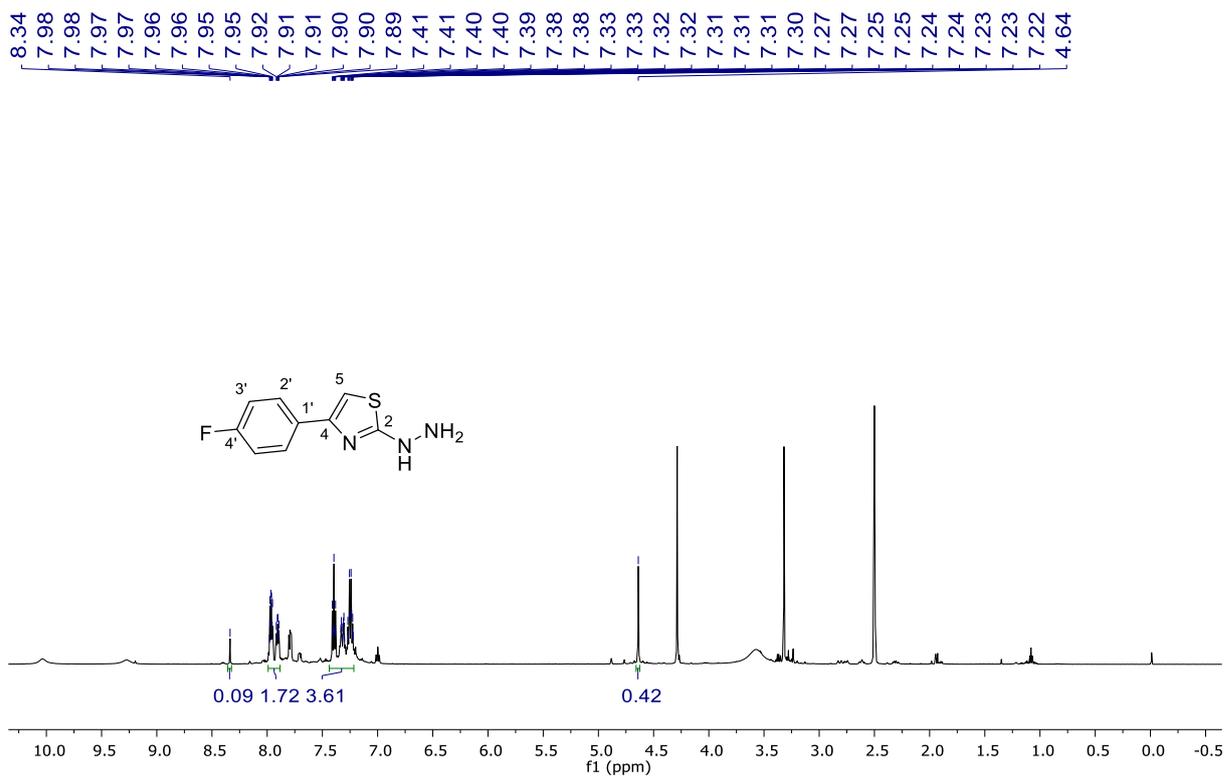


Figura D.4.2 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de TH6d.

