



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS EM SAÚDE

THIAGO FAUERHARMEL NUNES

**PANORAMA TECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS ANTIOXIDANTE
E ANTIBACTERIANO DE FENIL-TIOSSEMICARBAZONAS SINTÉTICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SALVADOR - BA
2016

THIAGO FAUERHARMEL NUNES

**PANORAMA TECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS ANTIOXIDANTE
E ANTIBACTERIANO DE FENIL-TIOSSEMICARBAZONAS SINTÉTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Tecnologias em Saúde da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologias em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Diego Silva Menezes

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Erlon Araújo Rodrigues

Salvador

2016

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

N972 Nunes, Thiago Fauerharmel
Panorama tecnológico e avaliação dos potenciais antioxidante e antibacteriano de fenil-tiossemicarbazonas sintéticas. / Thiago Fauerharmel Nunes – Salvador: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. 2016.

66 f.

Dissertação (mestrado) – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Requisito para obtenção de título de Mestre em Tecnologias em Saúde, 2016.

Orientação: Prof. Dr Diego Menezes
Co-orientação: Prof. Dr. Luiz Erlon Araújo Rodrigues

1. Antioxidantes. 2. Antibacterianos 3. Panorama tecnológico I. Menezes, Diego II. Rodrigues, Luiz Erlon Araújo III. Escola Bahiana de Medicina e Saúde. IV. Título.

CDU: 61

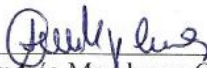
THIAGO FAUERHARMEL NUNES

**PANORAMA TECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANO DE FENIL-TIOSSEMICARBAZONAS
SINTÉTICAS**

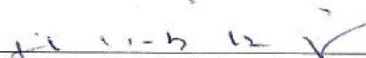
Dissertação apresentada a Escola Bahiana de
Medicina e Saúde Pública, como requisito
parcial para a obtenção do Título de Mestre
em Tecnologias em Saúde.

Local, de de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Andréa Mendonça Gusmão Cunha
Doutora em Ciências Médicas
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof. Dr. Anibal de Freitas Santos Júnior
Doutor em Química
Universidade Estadual da Bahia



Prof. Dr. Hugo Saba Pereira Cardoso
Doutor em Difusão do Conhecimento
Universidade Estadual da Bahia

Este trabalho é dedicado a todos os meus familiares e pessoas intimamente ligadas à minha vida, que durante o curso me ofereceram apoio, carinho e compreensão. Em especial, dedico o trabalho à minha esposa Manuela, ao meu irmão Gustavo e aos meus pais Ester e Marco, que sempre me ampararam, me incentivaram e me ensinaram. É de vocês o mérito do sucesso que se diz meu.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio e incentivo.
- À minha esposa Manuela Garrido, pelo carinho, preocupação e presença amiga durante a realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Diego Menezes, por aceitar mais uma vez me orientar, pela dedicação na transmissão dos ensinamentos, e principalmente pela amizade.
- Ao Prof. Dr. Luiz Erlon Araújo Rodrigues, pelas orientações e sugestões na realização deste trabalho.
- À Profa. Dra. Alene Vanessa, por sempre estar à disposição com ideias e sugestões para a realização deste trabalho.
- À Marianna Soares, Caio Vieira, Jailson Pinheiro e Kaique Filardi, pela disponibilidade e apoio na realização dos ensaios biológicos.
- À Msc. Fernanda Ferraz pelas orientações, ideias e o apoio para o desenvolvimento do panorama tecnológico.
- Ao Grupo de Pesquisa em Síntese Química e Bioatividade Molecular e ao Prof. Dr. Sílvio Cunha do Instituto de Química da UFBA, pela síntese das moléculas e disponibilidade em sanar dúvidas acerca de suas estruturas.
- À FAPESB, CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro.
- A todos não mencionados, que de alguma maneira, contribuíram de forma direta ou indireta na finalização deste trabalho.

“Poucos conseguem enxergar para onde
sua estrada os conduzirá antes de
chegarem ao final dela”

Legolas Verdefolha – O Senhor dos Anéis – As Duas Torres.

RESUMO

As tiossemicarbazonas são moléculas bastante descritas na literatura que apresentam uma estrutura básica $C=N-NH-CS-NHR$ e um amplo perfil farmacológico, com atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, antitumoral e antioxidante. Na primeira etapa do trabalho, realizou-se uma prospecção por documentos de patentes de tiossemicarbazonas, e foi possível observar que o cenário tecnológico dessa classe de moléculas voltada para saúde parece promissor. Além disso o presente trabalho investigou, *in vitro*, o potencial antioxidante e antibacteriano de dezoito fenil-tiossemicarbazonas obtidas pela síntese multicomponente. Para tanto, as substâncias foram sintetizadas, purificadas e, posteriormente, diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) para realização dos ensaios. Para a realização da avaliação do potencial antioxidante foram utilizados os métodos do 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) que avalia a capacidade antioxidantes através da captura do radical ABTS e do 2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil (DPPH), que avalia a atividade antioxidante pela captura do radical DPPH. Para avaliação da atividade antibacteriana foram cultivadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6638), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Eschericcia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1706), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) em caldo Mueller-Hinton a 35°C por 24 horas, sendo posteriormente determinada a concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição. A partir dos experimentos realizados encontrou-se seis moléculas com potencial antioxidante nos dois métodos de avaliação utilizados, e dentre as moléculas efetivas *in vitro* pode-se destacar três delas – RDG 49, RDG 91 e RDG 95 - constituindo assim substâncias de interesse para estudos futuros de investigação do mecanismo de ação antioxidante. Também foi possível observar atividade antibacteriana em três moléculas dentre as testadas – RDG 85, RDG 95 e RDG 99 – sendo a mais efetiva *in vitro* a RDG 95 que apresentou a menor CIM frente a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

Palavras-chave: Antioxidantes. Antibacterianos. Panorama tecnológico. Patentes. Tiossemicarbazonas.

ABSTRACT

The thiosemicarbazones are molecules well described in the literature which shown a basic structure $C=N-NH-CS-NHR$ and a broad pharmacological profile, such as antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitic, antitumor and antioxidant. This study investigated the *in vitro* antioxidant and antimicrobial potential of 18 phenyl-thiosemicarbazones obtained by multicomponent synthesis. Therefore, the compounds were synthesized, purified and then diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) for conducting the tests. To perform the evaluation of the antioxidant potential, the 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) method were used to evaluate the antioxidant capacity by capturing the radical ABTS and 2,2-Diphenyl- 1-picryl-hydrazyl (DPPH) evaluating the antioxidant activity by the capture of DPPH radical. To evaluate the antimicrobial activity, were grown bacterial strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6638), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Eschericcia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1706), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) in Mueller-Hinton broth at 35 ° C for 24 hours, later it was determined the minimum inhibitory concentration (MIC). From the experiments was found six molecules with antioxidant potential in both evaluation methods, and of the effective molecules can highlight three of them - RDG 49, RDG 91 and RDG 95 - thus constituting substances of interest for future studies in antioxidant mechanisms of action. It was also observed antimicrobial activity in three molecules among tested - RDG 85, 95 and RDG RDG 99 - being the most effective of them the RDG 95 showed the lowest MIC front the strain of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Thus was conducted a survey by thiosemicarbazone patent documents, and it was observed that the technological pipeline of this class of molecules targeted for health looks promising.

Keywords: Antioxidant. Anti-Bacterial Agents. Prospecting Technology. Patents. Thiosemicarbazones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição por década dos Depósitos de documentos de patentes de Tiossemicarbazonas com a CIP A61.	20
Figura 2 - Distribuição de todos os Depósitos por Localidade.	21
Figura 3 - Distribuição de Patentes que ainda estão sob proteção.	22
Figura 4 - Distribuição por década dos Depósitos de documentos de patentes de Tiossemicarbazonas com a classificação A61P31.	23
Figura 5 - Distribuição de Patentes de Tiossemicarbazonas utilizadas como antimicrobianos.	23
Figura 6 - Estrutura Genérica das Tiossemicarbazonas.	26
Figura 7 - Tiacetazona®, tiossemicarbazona com atividade antituberculose.	33
Figura 8 - Esquema da captura do DPPH por um Antioxidante.	38
Figura 9 - Esquema da neutralização do ABTS por um Antioxidante.	39
Figura 10 - Esquema da microplaca com a diluição dos extratos.	41
Figura 11 - Curva do radical DPPH para determinação da EC ₅₀ .	42
Figura 12 - Curva de Neutralização do Trolox (800-50 µM) frente ao radical DPPH para determinação da EC ₅₀	43
Figura 13 - Determinação das EC ₅₀ das tiossemicarbazonas RDG 49, RDG 67, RDG 69, RDG 71, RDG 72 e RDG 73 pelo método do DPPH em comparação ao Trolox (EC ₅₀ =568,7 µM).	44
Figura 14 - Determinação das EC ₅₀ das tiossemicarbazonas RDG 75, RDG 78, RDG 80, RDG 84, RDG 85 e RDG 86 pelo método do DPPH em comparação ao Trolox (EC ₅₀ =568,7 µM).	44
Figura 15 - Determinação das EC ₅₀ das tiossemicarbazonas RDG 91, RDG 93, RDG 95, RDG 96, RDG 98 e RDG 99 pelo método do DPPH em comparação ao Trolox (EC ₅₀ =568,7 µM).	45
Figura 16 - Tiossemicarbazonas com os menores valores de EC ₅₀ frente ao Trolox (EC ₅₀ =568,7 µM).	45
Quadro 1 - Fórmula Estrutural das fenil-tiossemicarbazonas com atividade antioxidante pelo método do DPPH.	46
Figura 17 - Curva-padrão do Trolox (1500-0 µM) frente ao radical ABTS.	48
Figura 18 - Determinação das porcentagens de inibição das tiossemicarbazonas RDG 49, RDG 67, RDG 69, RDG 71, RDG 72 e RDG 73 pelo método do ABTS em comparação ao Trolox (500 µM).	49
Figura 19 - Determinação das porcentagens de inibição das tiossemicarbazonas RDG 75, RDG 78, RDG 80, RDG 84, RDG 85 e RDG 86 pelo método do ABTS em comparação ao Trolox (500 µM).	49
Figura 20 - Determinação das porcentagens de inibição das tiossemicarbazonas RDG 91, RDG 93, RDG 95, RDG 96, RDG 98 e RDG 99 pelo método do ABTS em comparação ao Trolox (500 µM).	50
Figura 21 - Determinação das porcentagens de inibição das tiossemicarbazonas com atividade igual ou superior ao Trolox (500 µM).	50
Quadro 2 - Fórmula Estrutural das fenil-tiossemicarbazonas com atividade antioxidante pelo método do ABTS.	51
Quadro 3 - Fórmula Estrutural das fenil-tiossemicarbazonas com atividade antioxidante em ambos os métodos utilizados.	52
Quadro 4 - Fórmula Estrutural das fenil-tiossemicarbazonas com atividade antimicrobiana.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de patentes depositadas por base de dados com os termos e a Classificação Internacional de Patentes utilizados.	20
Tabela 2 - Número de Documentos de Patentes concedidas que ainda estão sob proteção e patentes não concedidas ou ainda em exigência.	21
Tabela 3 - Número de patentes encontradas com os termos e as CIP.	22
Tabela 4 - Número de Documentos de Patentes de Tiossemicarbazonas classificadas como agentes antimicrobianos (A61P31) concedidas que ainda estão sob proteção e patentes não concedidas ou ainda em exigência.	24
Tabela 5 - Moléculas sintetizadas pelo GPSQ, com os respectivos códigos utilizados para identificar as moléculas no laboratório.	36- 37
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) encontrada para a metodologia de microdiluição, de acordo com as cepas bacterianas.	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
CAPÍTULO I – PANORAMA TECNOLÓGICO	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Patentes, Prospecção Tecnológica e Busca de Anterioridade	15
3.2 Pesquisa e Desenvolvimento e as Tiossemicarbazonas	16
4 METODOLOGIA	18
4.1 Prospecção Patentária	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	25
6 REVISÃO DE LITERATURA	25
6.1 TIOSSEMICARBAZONAS	25
6.1.1 Radicais Livres e Antioxidantes	26
6.1.2 Antimicrobianos e Resistência Bacteriana	29
7 MATERIAL E MÉTODOS	34
7.1 Desenho do Estudo	34
7.2 Síntese das Tiossemicarbazonas	34
7.3 Ensaio para Avaliação da Capacidade Antioxidante	37
7.3.1 Ensaio do 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil (DPPH)	37
7.3.2 Ensaio do 2,2'-Azinobis (3-Etilbenzotiazolina-6-Ácido Sulfônico) (ABTS)	37
7.4 Ensaio para Avaliação Antibacteriana	38
7.4.1 Cultura de Células	38
7.4.2 Determinação do Inóculo Inicial	39
7.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Microdiluição	39
7.5 Análise Estatística	40
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
8.1 Avaliação Antioxidante	41
8.1.1 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método do DPPH	41
8.1.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método do ABTS	47
8.2 Avaliação da Atividade Antibacteriana pelo Método de Microdiluição em Caldo	53
9 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

As tiossemicarbazonas são uma classe de moléculas bem descritas na literatura e apresentam uma estrutura básica constituída por C=N-NH-CS-NHR. Existem duas estratégias gerais para síntese das tiossemicarbazonas, a primeira, através da via direta, a partir de reações quimiosseletivas entre tiossemicarbazidas e aldeídos ou cetonas ou, a segunda, através da via indireta, onde as tiossemicarbazonas são previamente preparadas a partir da hidrazina (NH₂-NH₂) com isotiocianatos, ditiocarbamatos ou ácidos tiocarbamoiltioglicólicos ⁽¹⁾.

Os efeitos químicos e biológicos das tiossemicarbazonas têm sido alvo de investigação há muitos anos. Esse interesse deve-se, principalmente, às propriedades da molécula vinculada à presença dos grupamentos químicos aldeído e cetona, que lhes confere uma variedade de mecanismos de ação. Além disso, essas estruturas químicas são facilmente sintetizadas. As tiossemicarbazonas são produzidas com um rendimento superior a 90%, havendo perda apenas de uma molécula de água, tal facilidade de obtenção, bem como o baixo custo, são fatores preconizados para o desenvolvimento de novos fármacos ^(1,2).

As tiossemicarbazonas possuem ampla versatilidade farmacológica, já foram descritas atividades antineoplásica ^(3,4), antibacteriana ^(5,6), antiviral ⁽⁷⁾, antifúngica ⁽⁸⁾, antiparasitária ⁽⁹⁻¹¹⁾ e antioxidante ⁽¹²⁾. As propriedades biológicas das semicarbazonas e das tiossemicarbazonas estão frequentemente relacionadas à sua característica de ligação com íons metálicos como o ferro, um exemplo, é a sua capacidade de inibir a enzima ribonucleotídeo redutase (RR), uma enzima chave envolvida na síntese *de novo* na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, cuja atividade catalítica é dependente de radicais tirosil diférricos ^(12,13).

O ferro é um elemento essencial, crucial para muitos processos vitais, como o crescimento e a proliferação celular. Entretanto, níveis elevados de ferro são associados com toxicidade, devido aos efeitos pró-oxidantes, e são especificamente relacionados à uma série de doenças correlatas ao estresse oxidativo, como cardiopatias, diabetes e câncer ⁽¹⁴⁾.

Espécies reativas do metabolismo do oxigênio (EROS) provocam danos oxidativos às células e acarretam em doenças degenerativas relacionadas a idade, câncer e uma ampla gama de doenças humanas ⁽¹⁵⁾. Um importante mecanismo de danos às membranas biológicas celulares são lesões causadas por radicais livres⁽¹⁶⁾. Desta forma, um modo simples e eficaz de prevenir essas doenças é a inibição direta dos danos oxidativos, já que muitos antioxidantes naturais e sintéticos estão no mercado para o tratamento e prevenção de diferentes doenças ⁽¹⁷⁾. A principal ação dos antioxidantes, nas doenças humanas, é evitar danos causados pela ação de espécies reativas de oxigênio. As EROS, tal como óxido nítrico, hidroxilas (OH•) e peróxidos (ROO•) são geradas, constantemente, durante o metabolismo em organismos vivos, sobretudo os aeróbicos, e podem causar danos em células normais. Vários antioxidantes sintéticos como o 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA) e o 2,6-diterc-butil-4-metilfenol (BHT) são comercialmente disponíveis ⁽¹⁸⁾.

Na última década, diversos grupos de pesquisa têm relatado que muitos dos antioxidantes comumente utilizados apresentam, também, atividade antimicrobiana. O consenso geral é que bactérias gram-positivas são mais afetadas pelo uso de antioxidantes do que as gram-negativas, porém, seus mecanismos ainda não são amplamente conhecidos ⁽¹⁹⁾. Aliado a isso, ao longo das últimas décadas, o desenvolvimento de novos antibióticos diminuiu significativamente ⁽²⁰⁾. Além do fato de o tratamento excessivo com os antibióticos disponíveis contribuir para a seleção das cepas bacterianas mais resistentes ⁽²¹⁾. Um fármaco com dupla funcionalidade, atuando como antioxidante e como antimicrobiano, seria de grande interesse das indústrias alimentícia e da saúde ⁽²²⁾.

Apesar dos avanços nas estratégias de uso racional dos antimicrobianos, conter o surgimento de resistência ainda representa uma situação crítica ⁽²³⁾. Uma elevada porcentagem de infecções hospitalares é causada por bactérias altamente resistentes, como os *Enterococcus* resistentes à metilicina e *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina, oxacilina e metilicina ⁽²⁴⁾ e as infecções causadas por esses microrganismos, resultam em maior risco de morbidade e mortalidade ⁽²⁵⁾. Considerando o cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS) exigiu um esforço urgente e consolidado para evitar regressão à era pré-antibiótico. Esta exigência se deu através da implementação de intervenções como a vigilância da resistência antimicrobiana, a utilização racional dos antimicrobianos, a redução do uso de

antimicrobianos na pecuária, a prevenção e controle das infecções no ambiente hospitalar e o fomento à inovação ⁽²³⁾.

O processo de desenvolvimento de um fármaco inovador, desde a etapa de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) até sua introdução no mercado, pode ocorrer de forma variada, de acordo com o composto; no entanto, existe um paradigma de desenvolvimento que, há muito, é utilizado como modelo geral ⁽²⁶⁾. Este paradigma retrata a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos como um processo que ocorre em uma sequência de fases (que podem se sobrepor), divididas em cinco grandes grupos: a etapa de pré-descoberta, descoberta, a etapa pré-clínica, clínica e o registro através dos documentos de patentes ^(27,28). Com o intuito de constatar as tendências de inovação de uma determinada área do conhecimento ou produto de interesse, as universidades e centros de pesquisa estão utilizando o sistema de propriedade intelectual para criar um ambiente favorável ao desenvolvimento científico-tecnológico, com destaque para as tecnologias passíveis de proteção por patentes ⁽²⁹⁾.

Portanto, com o intuito de mapear os desenvolvimentos científico e tecnológico das tiossemicarbazonas na saúde, realizou-se uma prospecção tecnológica para visualizar as tendências do mercado, desde as primeiras patentes de tiossemicarbazonas até as publicadas mais recentemente. A prospecção tecnológica também permite identificar de que maneira o desenvolvimento tecnológico é capaz de influenciar de forma significativa a indústria, a economia e, conseqüentemente, a sociedade.

Por fim, faz-se necessário o desenvolvimento de antioxidantes sintéticos alternativos que apresentem poucos efeitos colaterais. Além disso o surgimento de novos antimicrobianos é crucial para combater seleção de bactérias resistentes. Neste contexto, as tiossemicarbazonas podem representar uma alternativa, pois são compostos que exibem como característica uma grande variedade de atividades farmacológicas conferidas pela versatilidade estrutural com que podem ser sintetizadas. Sendo assim, realizou-se a avaliação de dezoito fenil-tiossemicarbazonas com o objetivo de identificar novas moléculas com atividades antibacteriana e antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Elaborar um panorama tecnológico dos documentos de patentes de tiossemicarbazonas depositados no mundo e investigar o potencial farmacológico de dezoito fenil-tiossemicarbazonas - derivadas do benzaldeído, de aldeídos alfabeta saturados, da acetona e da isatina - quanto às suas atividades antioxidante e antibacteriana.

2.2 Específicos

- I. Realizar uma busca por documentos de patentes de tiossemicarbazonas nos bancos de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e do *European Patent Office* (EPO).
- II. Definir o número total de documentos de patentes depositados até os dias de hoje.
- III. Identificar o número de patentes concedidas e ainda sob proteção.
- IV. Evidenciar os países onde os documentos de patentes estão depositados.
- V. Destacar o cenário tecnológico das tiossemicarbazonas como agentes antimicrobianos e antioxidantes.
- VI. Mensurar o potencial antioxidante das tiossemicarbazonas e comparar com a atividade de antioxidantes padrão;
- VII. Avaliar a ação antibacteriana *in vitro* de 18 moléculas sobre as linhagens ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhimurium*;

CAPÍTULO I – PANORAMA TECNOLÓGICO

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Patentes, Prospecção Tecnológica e Busca de Anterioridade

O documento de patente é um título de propriedade temporária sobre uma invenção ou modelo de utilidade, outorgado pelo Estado, aos inventores ou autores ou outras pessoas físicas ou jurídicas detentoras de direitos sobre uma criação que atendam aos requisitos de patenteabilidade ⁽²⁹⁾.

A função da patente é, portanto, conferir ao seu proprietário um direito limitado no tempo, que varia de acordo com o tipo de patente (se modelo de utilidade ou patente de invenção) e, no espaço, visto que as patentes são territoriais, permitindo-o impedir terceiros, sem o seu consentimento, de produzir, usar, vender ou importar o objeto da patente ⁽³⁰⁾.

A concessão de uma patente se trata de um acordo entre o Estado e o detentor do direito, no qual em contrapartida ao direito de exclusividade, concedido por meio de um Órgão Competente - no caso do Brasil, o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) - o inventor se obriga a revelar detalhadamente toda a informação técnica da matéria protegida pela patente, a qual ficará à disposição da sociedade por meio do acesso gratuito às bases de patentes ⁽³¹⁾.

Muitas informações podem ser encontradas em documentos de patentes publicados; na realidade, as patentes são consideradas uma fonte essencial de conhecimento científico e tecnológico. O monitoramento tecnológico, através das patentes, é uma ferramenta de análise estratégica importante para o desenvolvimento de produtos que, em um futuro próximo, podem impactar a sociedade ⁽³²⁾.

A fim de constatar as tendências do crescimento de uma determinada área do conhecimento ou produto de interesse, muitos pesquisadores estão voltando sua atenção aos estudos de prospecção de tecnologias ⁽³³⁾.

Através dos estudos de prospecção, são levantadas todas as tecnologias existentes identificando o estágio de maturidade da tecnologia em questão. É possível, também, avaliar os aspectos de tecnologias concorrentes, lacunas a serem preenchidas, identificar os inventores que pesquisam o mesmo tema, países de origem das patentes, classificações dos documentos, entre outros dados. A prospecção também pode ser utilizada como uma ferramenta para a busca de anterioridade de uma tecnologia, tornando possível avaliar se a tecnologia já foi previamente desenvolvida, se já apossada ou se já está em uso pela sociedade ⁽³⁴⁾.

A prospecção tecnológica é, portanto, de fundamental importância para o desenvolvimento de novos projetos tecnológicos. É uma ferramenta que deve ser utilizada, pois influencia todo o processo de pesquisa e desenvolvimento ⁽³⁵⁾.

3.2 Pesquisa E Desenvolvimento e as Tiossemicarbazonas

O processo de desenvolvimento de um novo fármaco, como um antibiótico por exemplo, pode durar de 10 a 15 anos e, para cada 5.000-10.000 compostos que entram na linha de P&D, normalmente apenas 1 recebe aprovação para uso. O custo médio do desenvolvimento de um fármaco, desde sua síntese até sua aprovação pela entidade regulatória de um país, é estimado entre US\$ 800 milhões a US\$ 1,3 bilhões ⁽³⁶⁾. O custo elevado para desenvolver uma nova droga está relacionado à grande parcela de compostos que são reprovados à medida que avançam nas etapas de P&D (triagens laboratoriais, testes em animais e em seres humanos e ensaios necessários para a aprovação regulatória desses fármacos) ^(37,38).

O retorno do capital investido em P&D e lucratividade de uma nova droga passa, então, a depender fortemente da exclusividade do mercado. Levando-se em consideração que o custo de imitação dessas novas moléculas é baixo em relação aos altos custos para desenvolver novos fármacos, essa exclusividade de mercado é, majoritariamente, baseada na obtenção de uma proteção patentária forte e ampla ⁽³⁹⁾.

Segundo o *Das Österreichische Patentamt* (Escritório de Patentes Austríaco) seria possível economizar cerca de 30% dos custos de P&D despendidos em alguns países europeus, caso fossem utilizadas informações técnicas disponíveis em bancos de patentes. Ainda na Europa, o *Intellectual Property Office UK* (Organização Britânica de Patentes) afirmou que cerca de US\$ 30 bilhões são, anualmente, desperdiçados na Comunidade Europeia devido a informações duplicadas, o que poderia ser facilmente revertido com a verificação concomitante de informações tecnológicas e a pesquisa propriamente dita ⁽⁴⁰⁾.

As tiossemicarbazonas possuem inúmeras aplicações biológicas descritas na literatura científica e tecnológica, desde atividade anticancerígena à antimalárica. De maneira geral, a atividade biológica desta classe de moléculas é associada à sua capacidade de se coordenar a metais de transição. As estratégias de aplicação biológica das tiossemicarbazonas são desenvolvidas através da racionalização de estruturas queladas com metais, considerando sua semelhança com um agente bioquímico natural. Estruturas não coordenadas a metais, por sua vez, também apresentam atividade biológica importante frente a diversos patógenos. Existem diversas patentes descrevendo a obtenção e a aplicação de tiossemicarbazonas na área da saúde ⁽⁴¹⁾.

Uma das patentes recentemente publicadas, por exemplo, pertencente à Universidade do Estado da Moldova (*Universitatea de Stat din Moldova*), reivindicou a síntese de tiossemicarbazonas heterocíclicas coordenadas ao cobre e a atividade antibacteriana frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Proteus vulgaris* ⁽⁴²⁾. Outra patente, de um grupo da Universidade da Moldova, também solicitou a proteção de uma tiossemicarbazona coordenada a prata (I) que demonstrou atividade contra *Salmonella abony* ⁽⁴³⁾.

Dessa forma, a pesquisa em bancos de patentes realizada neste trabalho evita que esforços sejam despendidos no desenvolvimento de tecnologias já existentes e, em virtude de identificar substituintes nas estruturas moleculares das tiossemicarbazonas que podem estar relacionados à sua atividade antibacteriana ou antioxidante, faz-se necessária uma abordagem sobre o panorama tecnológico dessas moléculas, direcionando assim a busca por moléculas passíveis de patenteamento.

4 METODOLOGIA

4.1 Prospecção Patentária

A prospecção foi realizada com base nos pedidos de patentes depositados no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil e no *European Patent Office* (EPO) eliminando-se as repetições.

A pesquisa foi delimitada por documentos depositados entre os anos de 1940 e 2015 e as palavras-chave utilizadas foram truncadas para incluir nas buscas as formas de plural das palavras, no banco de dados europeu foi utilizado o termo: *Thiosemicarbazon**; e no banco de dados do INPI foi utilizado: Tiossemicarbazon*. A busca, na base internacional, ainda foi combinada a com as Classificações Internacionais de Patentes (CIP): A61 (Ciência médica ou veterinária; Higiene), A61P31 (agentes anti-infecciosos, i.e., antibióticos, antissépticos, quimioterapêuticos) e A61P39/06 (agentes captadores de radicais livres ou antioxidantes) com a intenção de reduzir a inclusão de documentos não pertinentes aos usos na ciência médica/veterinária e de higiene. Após a coleta, os resultados encontrados foram exportados para o Microsoft Office Excel® e foram desenhadas séries de dados sintetizando os seguintes parâmetros: país de depósito, distribuição temporal das patentes e as patentes cuja proteção ainda está em vigor ou não, de acordo com o código de status de patente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi realizada a busca nas bases de patentes europeia e brasileira com as palavras-chave isoladas, sem nenhum filtro de busca e, nos campos título e resumo no EPO e no INPI. As classificações foram acrescentadas, progressivamente, para filtrar os resultados na área de interesse. Os resultados das primeiras buscas estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Número de patentes depositadas por base de dados com os termos e a Classificação Internacional de Patentes utilizados.

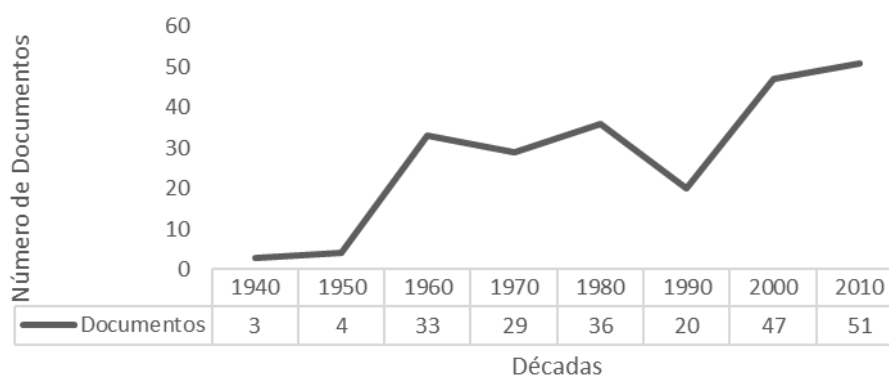
Palavra-chave	Classificação Internacional de Patentes (CIP)	INPI	EPO
Tiossemicarbazona*	Não utilizada	6	-
	A61	0	-
Thiosemicarbazona*	Não utilizada	-	495
	A61	-	218

Fonte: Acervo do Autor, 2015

Considerando que o EPO apresentou um maior número de documentos de patentes depositados e que os documentos depositados no INPI já estavam contabilizados no EPO, iniciou-se a compilação de dados utilizando a busca do termo escolhido com a CIP A61, com o intuito de verificar a quantidade de documentos em que as tiossemicarbazonas estão sendo protegidas nas áreas da ciência médica/veterinária e de higiene.

Utilizando os 218 documentos de patentes encontrados na base europeia, verificou-se que os depósitos estão em ascensão inconstante quando distribuídos por década (Figura 1).

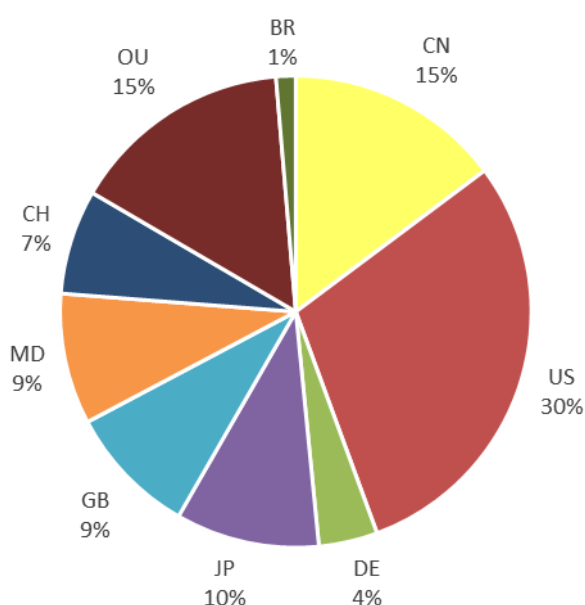
Figura 1 - Distribuição por década dos Depósitos de documentos de patentes de Tiossemicarbazonas com a CIP A61.



Fonte: Acervo do autor, 2015.

De acordo com os dados apresentado na Figura 1, os países que mais possuem depósitos de tiossemicarbonos com a classificação A61 são os Estados Unidos da América (EUA) e a China, com 66 e 33 patentes, respectivamente. Seguidos por Japão com 22 depósitos, Grã-Bretanha e a República da Moldova com 20 depósitos cada uma. O Brasil possui apenas três depósitos de tiossemicarbonos, todos pertencentes a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A distribuição está representada na Figura 2.

Figura 2 - Distribuição de todos os Depósitos por Localidade.



(BR=Brasil; CH=Suíça; CN= China; DE=Alemanha; GB= Reino Unido; JP=Japão; MD= República da Moldova; US= Estados Unidos; OU= outros.)
Fonte: Acervo do autor, 2015.

Realizando um novo recorte, das 218 patentes depositadas no mundo, obteve-se 108 documentos com 20 anos ou menos a contar da data de depósito e 110 patentes já estão em domínio público. As patentes cujo período de proteção se encerrou, ingressam em domínio público. Como as patentes possuem validade de 20 anos, a contar da data de depósito, analisou-se o número de documentos de patentes concedidos que ainda estão em vigor, ou seja, quantas patentes foram concedidas entre 1995 a 2015 (Tabela 2).

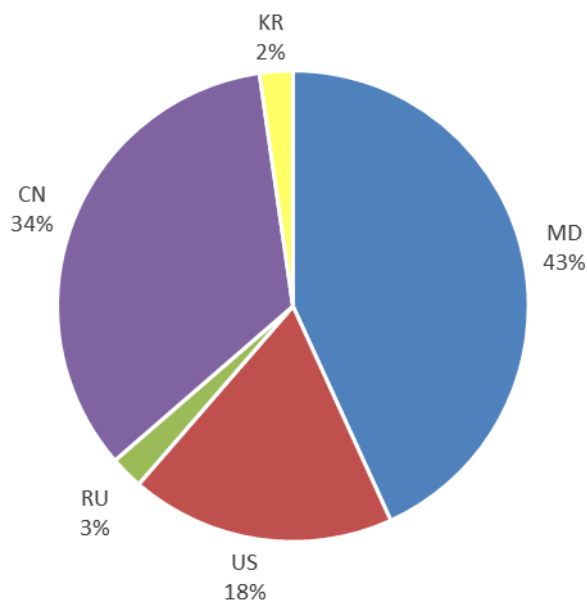
Tabela 2 - Número de Documentos de Patentes concedidas que ainda estão sob proteção e patentes não concedidas ou ainda em exigência.

Patentes	Número de Documentos
Concedidas em vigor	44
Não concedidas/Ainda em exigência	64

Fonte: Acervo do Autor, 2015

Assim, também foi possível demonstrar quais países possuem documentos de patentes de tiossemicarbazonas que ainda estão sob proteção (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição de patentes que ainda estão sob proteção.



(KR= Coreia do Sul; RU= Rússia; CN= China; MD= República da Moldóva; US= Estados Unidos.)

Fonte: Acervo do autor, 2015.

Os países que possuem mais patentes concedidas de tiossemicarbazonas são a República da Moldóva e a China, com 19 e 15 patentes, respectivamente. Seguidos pelos EUA com oito documentos ainda sob proteção. As três patentes brasileiras ainda não foram concedidas (Figura 3).

Quando os documentos de patentes foram filtrados com as classificações mais específicas, A61P31 (agentes anti-infecciosos, i.e., antibióticos, antissépticos, quimioterapêuticos) e A61P39/06 (agentes captadores de radicais livres ou antioxidantes), observou-se que não existem depósitos reivindicando tiossemicarbazonas com atividade terapêutica específica para a classificação A61P39/06, e apenas 31 documentos foram encontrados com a classificação A61P31 (Tabela 3).

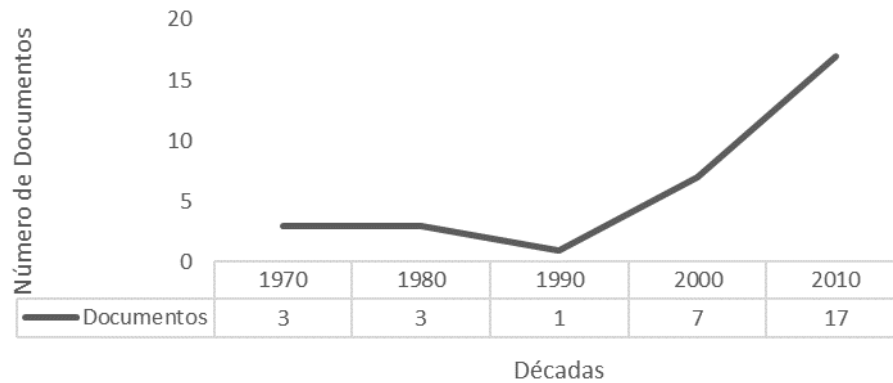
Tabela 3 - Número de patentes encontradas com os termos e as CIP.

Palavra-chave	Classificação internacional de patentes (CIP)	INPI	EPO
Tiossemicarbazon*	A61P31	0	-
	A61P39/06	0	-
Thiosemicarbazon*	A61P31	-	31
	A61P39/06	-	0

Fonte: Acervo do Autor, 2015

Dos 31 documentos depositados com a CIP A61P31, apenas 25 foram depositados e publicados nos últimos 20 anos como se pode observar na figura 20. Desses, 17 foram depositados nos últimos 5 anos, demonstrando o aumento do interesse em utilizar tiossemicarbazonas como agentes antimicrobianos (Figura 4).

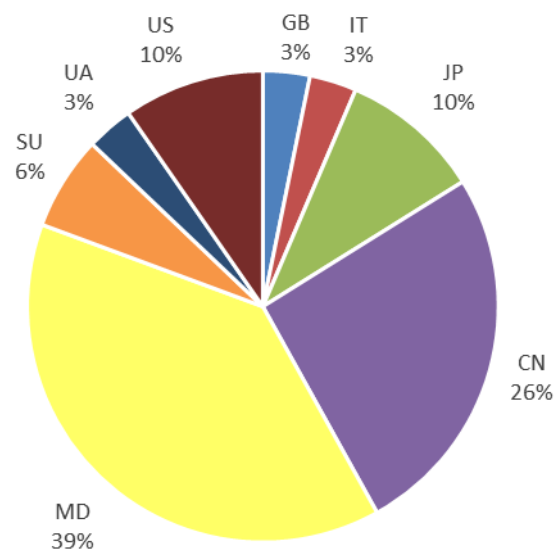
Figura 4 - Distribuição por década dos depósitos de documentos de patentes de tiossemicarbazonas com a classificação A61P31.



Fonte: Acervo do Autor, 2015

Analisando os dados dos 31 documentos de patente encontrados, os países que mais possuem depósitos de tiossemicarbazonas com a classificação A61P31 são a República da Moldova e a China, com 12 e 8 patentes, respectivamente. Seguidos por Japão e EUA com 3 depósitos cada um. O Brasil não possui depósitos de tiossemicarbazonas que apresentem essa CIP. A distribuição está representada na Figura 5.

Figura 5 - Distribuição de patentes de tiossemicarbazonas utilizadas como antimicrobianos.



(CN= China; GB= Reino Unido; IT= Itália; JP=Japão; MD= República da Moldova; UA= Ucrânia; US= Estados Unidos; SU= União Soviética)

Fonte: Acervo do Autor, 2015

Destacando as patentes depositadas entre os anos de 1995 e 2015, com a CIP A61P31, que apresentam o *status* de concedidas, tem-se 25 patentes, sendo que 6 delas até então não foram concedidas e 19 foram concedidas e estão sob proteção (Tabela 4).

Tabela 4 - Número de documentos de patentes de tiossemicarbazonas classificadas como agentes antimicrobianos (A61P31) concedidas que ainda estão sob proteção e patentes não concedidas ou ainda em exigência.

Patentes	Número de Documentos
Concedidas em vigor	19
Não concedidas/Ainda em exigência	6

Fonte: Acervo do Autor, 2015

Analisando todos os 31 documentos de patentes de tiossemicarbazonas com a classificação A61P31, não se encontrou nenhuma das moléculas que foram testadas quanto a atividade antimicrobiana neste trabalho. Tornando as moléculas utilizadas neste trabalho, passíveis de proteção patentária.

Nesta etapa do trabalho, foi possível observar que o cenário tecnológico dessa classe de moléculas voltada para saúde parece promissor, uma vez que o número de documentos armazenados na base de dados do EPO, é elevado. O cenário brasileiro parece bem menos promissor com poucos pedidos depositados, o que leva a crer que há pouco interesse da exploração econômica desses bens no mercado brasileiro.

É possível observar uma ligeira redução nos depósitos na década de 70, pois a primeira tiossemicarbazona que foi utilizada como medicamento era um agente antiviral, a N-metil-isatina-tiossemicarbazona, que ficou conhecida como metisazona ou Marboran®. O medicamento foi utilizado, principalmente, na Índia e no Chile e demonstrou ser efetivo para profilaxia de varíola, entretanto, sua utilização foi reduzida por conta da descoberta da vacina e posterior erradicação da doença ^(44,45).

Outra tiossemicarbazona utilizada como medicamento, a *p*-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona, comercializada com o nome de Tiacetazona®, cuja atividade bacteriostática tornou-a uma droga amplamente utilizada em países como a África do Sul para o tratamento de *Mycobacterium tuberculosis*, pode ter sido responsável pelo declínio nos depósitos de

tiossemicarbazonas na década de 90. Houve o relato de problemas de toxicidade em um amplo estudo clínico realizado com pacientes coinfectados com vírus da imunodeficiência humana (HIV), além do surgimento de cepas resistentes a tiocetazona®^(46,47).

Recentemente, uma nova tiossemicarbazona, a Triapina® (3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona), vem alcançando resultados promissores em estudos clínicos de fase II para o tratamento de diversos tipos de câncer, como carcinoma de células escamosas em metástase de cabeça e pescoço^(48,49). Esses dados tornam possível inferir que o interesse pelas tiossemicarbazonas foi renovado, reafirmando a grande versatilidade farmacológica da classe de moléculas e justificando o aumento nos depósitos realizados entre os anos 2000 e os dias de hoje.

Outra análise possível a partir dos resultados obtidos é que desde o advento da tecnologia, na década de 40, o interesse do mercado mundial em proteger usos medicinais das tiossemicarbazonas vem se aprimorando, sendo que nos últimos 20 anos, houveram aproximadamente metade dos depósitos registrados nas bases de dados do EPO e do INPI.

Nos últimos 20 anos, o Brasil se encontra à frente de países como Japão, Itália, Alemanha, Reino Unido, Coreia do Sul. Porém, o número de patentes brasileiros ainda corresponde a cerca de 10% do total de patentes de países como os EUA e a China. Na publicação do Índice Global de Inovação 2015, uma pesquisa realizada em parceria entre a Universidade de Cornell, a Escola de Pós-Graduação em Negócios (INSEAD) na França e a Organização Mundial da Propriedade Intelectual, o Brasil ocupou o 70º lugar na lista dos países mais inovadores do mundo, atrás de países como Oman, Mongólia, Panamá e Armênia⁽⁵⁰⁾, demonstrando, assim, que as ações de P&D no país ainda estão muito incipientes.

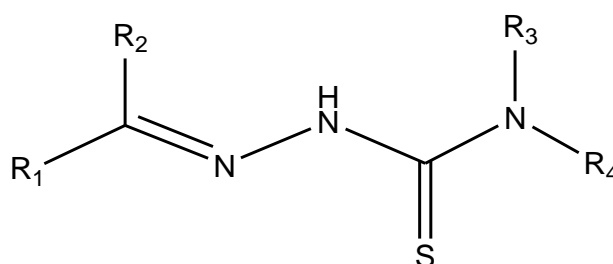
6 REVISÃO DE LITERATURA

6.1 Tiossemicarbazonas

Os efeitos químicos e biológicos das tiossemicarbazonas vem sendo alvo de pesquisas há muitas décadas. Isso deve-se, principalmente, às propriedades da molécula vinculada à presença dos grupamentos aldeído e cetona,¹ que lhes confere uma ampla variedade de mecanismos de ação. Além disso, essas estruturas químicas são facilmente sintetizadas².

As tiossemicarbazonas são classificadas como bases de Schiff, pois apresentam um esqueleto geral de C=N-N-(C=S)-N em suas estruturas (Figura 6). Esta classe de substâncias desperta grande interesse por conta de descobertas recentes, na última década, acerca das suas potencialidades farmacológicas. O principal motivo de sua potencialidade está diretamente ligado à estrutura, pois a presença de átomos de nitrogênio (N) e enxofre (S) em configurações do tipo sp^2 lhes confere configurações eletrônicas que permitem a coordenação com metais de transição⁴¹.

Figura 6 - Estrutura Genérica das Tiossemicarbazonas.



Fonte: Acervo do autor, 2015. (Adaptado de Tenório et al. 2005)¹

Duas estratégias são comumente utilizadas para obtenção dessas moléculas. A primeira delas é a obtenção direta, através da condensação de aldeídos e/ou cetonas com tiossemicarbazidas; a segunda estratégia é a obtenção indireta das tiossemicarbazonas que envolve a preparação prévia de tiossemicarbazidas ou hidrazonas utilizando hidrazina ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$), seguida de condensação com o composto carbonilado específico, ou então seguida de uma reação com

isotiocianatos, ditiocarbamatos ou ácidos tiocarbamoiltioglicólicos. São substâncias de fácil estocagem, não necessitando de armazenamento especial, nem tampouco apresentam sensibilidade à luz¹.

O principal mecanismo de ação das tiossemicarbazonas está diretamente relacionado a capacidade de associação aos metais de transição, o que as tornam ótimos protótipos de fármacos ⁽⁵¹⁾. Dentre as propriedades biológicas que estão relacionadas à complexação dessas substâncias aos metais está a sua capacidade de inibir a enzima ribonucleotídeo redutase (RR). A capacidade de inibir a RR é de particular importância, pois a participação da enzima na síntese *de novo* de desoxirribonucleotídeos é necessária para a replicação e reparo do DNA, a consequente inibição da enzima leva à parada do ciclo celular na fase G1/S ⁽⁵²⁾, o que permite esse efeito é o fato das tiossemicarbazonas serem quelantes de metais, uma vez que a enzima requer radicais tirosils diférricos para iniciar sua atividade catalítica ⁽⁵³⁾.

Outra importante propriedade biológica das tiossemicarbazonas é a lipofilia, que controla a taxa de entrada da droga nas células. Esta propriedade aumentada pode ser explicada com base na teoria da quelação. Após a quelação, a polaridade do íon metálico é reduzida como resultado da sobreposição do orbital do ligante e um compartilhamento parcial de cargas positivas do íon metálico com grupos doadores, além disso aumenta o deslocamento de elétrons no anel quelado e incrementa a lipofilia do quelato ⁽⁵⁴⁾.

6.1.1 Radicais Livres e Antioxidantes

Os radicais livres são, amplamente, definidos como espécies altamente reativas, sendo continuamente gerados em todos os sistemas biológicos através do próprio metabolismo fisiológico ⁽⁵⁵⁾.

Dentre os principais radicais mais discutidos estão as Espécies Reativas do metabolismo do Oxigênio (ERO) e, dentre essas, podem-se destacar os radicais hidroxila (HO[•]), superóxido (O₂[•]), radicais peroxila (RO₂[•]), alcóxila (RO[•]), oxigênio singlete (¹O₂) e orgânicos (ROOH). Além das ERO, também estão envolvidas nos processos redox outras espécies reativas do metabolismo de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico ([•]NO) e o peroxinitrito (ONOO⁻) e espécies reativas de enxofre ⁽⁵⁶⁾.

Nos organismos vivos, em condições fisiológicas, os radicais livres participam de vários processos fisiológicos, dentre os quais, evidenciam-se a regulação do tônus vascular, modulação da adesão celular, amplificação da resposta imune, sinalização para apoptose, regulação de cinases e ativação de fatores de transcrição ⁽⁵⁷⁾.

Em sistemas aeróbios, é essencial o equilíbrio entre a geração e a detoxificação de espécies reativas, cuja manutenção se dá pela ativação dos mecanismos de defesa antioxidante, estratégias evolutivas de proteção dos seres vivos. Entretanto, se houver um desequilíbrio na geração destes, o balanço entre a formação e a remoção é perdido, resultando em uma condição de estresse oxidativo. Conseqüentemente, os radicais podem, assim, interagir com moléculas das membranas biológicas e tecidos ou diretamente com DNA induzindo processos patológicos ⁽⁵⁸⁾.

O estresse oxidativo pode ocorrer na vida moderna como resultado da exposição excessiva ao sol (radiação UV), aumento da poluição do ar, fumo, estresse, dentre outros fatores ⁽⁵⁹⁾. É um evento causado pela deficiência do sistema protetor e/ou pelo excesso de agentes oxidantes e apresenta efeitos prejudiciais ao funcionamento das células, tais como agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, prejuízo às enzimas, danos ao DNA ⁽⁶⁰⁾. Desta forma, está relacionado a várias patologias, como artrites, cânceres, doenças do coração e do pulmão, demência senil, esclerose múltipla entre outras. O envelhecimento também é um processo relacionado com as espécies reativas de oxigênio ⁽⁶¹⁾.

Nas ciências biomédicas antioxidante pode ser conceituado como qualquer substância que atrase, previna ou remova danos oxidativos de uma molécula alvo ⁽⁶²⁾. A célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas: através da ação detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, esse sistema é constituído pelas enzimas, superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e também pela glutathiona reduzida (GSH) e pela vitamina E (alfa-tocoferol); ou através do reparo da lesão ocorrida, destacando-se o ácido ascórbico, a glutathiona-reductase (GSH-Rd), a GSH-Px, entre outros ⁽⁶⁰⁾.

Esses componentes antioxidantes podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete, ou ainda exibir simultaneamente, mais de uma dessas funções ⁽⁶³⁾.

O uso de antioxidantes tem aumentado com as descobertas das propriedades dos componentes que são produzidos pelas plantas através do metabolismo secundário. Porém, uma abordagem diferente é prospectar substâncias sintéticas quanto ao seu potencial antioxidante e a viabilidade de uso dessas substâncias na indústria ^(63,64), como as tiossemicarbazonas.

As investigações quanto a atividade antioxidante das tiossemicarbazonas receberam mais destaque nos últimos 6 anos, sobretudo, após um estudo no qual a Triapina® foi testada em dois modelos, células derivadas de doença de Alzheimer e células neuroepiteliais olfativas envelhecidas. A molécula revelou efetividade na prevenção ou redução na acumulação de espécies reativas do oxigênio, contribuindo assim, com o aumento do interesse pelos mecanismos das atividades biológicas de ligantes, complexos metálicos e danos oxidativos celulares metais-dependentes ⁽⁶⁵⁾.

A atividade antioxidante de 2-cloro/nitro benzaldeído 4-phenil-3-tiossemicarbazonas e 2-cloro/nitro benzaldeído 4-metil-3-tiossemicarbazonas foi avaliada através do ensaio do 2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil (DPPH) foi reportada um total de oito moléculas com potencial melhor ou igual ao antioxidante padrão utilizado, o ácido ascórbico ^(65,66). Outro estudo, de Bal-Demirci e colaboradores, publicado em 2014, relatou a atividade antioxidante de S-metil-tiossemicarbazonas complexadas ao níquel (II), ferro (III) e oxovanádio (IV) testadas através do método de *Cupric ion reducing antioxidant capacity* (CUPRAC), da captura do radical hidroxila (OH•) e da captura do peróxido de hidrogênio ⁽⁶⁷⁾.

Recentemente, tiossemicarbazonas fenólicas foram avaliadas através do DPPH, da captura do peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica. Os resultados revelaram atividades altamente promissoras *in vitro*, sugerindo que essas moléculas constituem modelos atraentes para o desenvolvimento de drogas com múltiplos alvos biológicos ⁽⁶⁸⁾.

Baseado na observação de que um grande número de antioxidantes é capaz de suprimir o crescimento de diversos microrganismos ⁽¹⁹⁾, o uso de substâncias antioxidantes com multifuncionalidade, antimicrobiana e antioxidante, tem se tornado objeto de estudo de muitos trabalhos. Embora a efetividade dos antioxidantes como antimicrobianos seja variável de acordo com a espécie, a cepa de microrganismo ou ainda com o meio de cultivo utilizado na avaliação, a demanda por moléculas

multifuncionais está em constante crescimento devido a expansão das indústrias de alimentos e de medicamentos ⁽⁶⁹⁾.

6.1.2 Antimicrobianos e Resistência Bacteriana

Até o começo do século XX, mortes em função de infecções por bactérias patogênicas já eram comuns, porém as causas dessas doenças eram pouco conhecidas e não havia tratamento eficaz disponível ⁽⁷⁰⁾. A descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico de atividade clínica, por Alexander Fleming, deu início a era da antibioticoterapia. O resultado final desse progresso científico refletiu-se na mudança da expectativa de vida frente à várias doenças infecciosas, antes de difícil tratamento e de alta mortalidade ⁽⁷¹⁾.

Fármacos antibacterianos são compostos capazes de matar (agentes bactericidas) ou inibir o crescimento (agentes bacteriostáticos) de determinadas bactérias patogênicas com efeitos colaterais toleráveis sobre indivíduos ou animais tratados. Atualmente, existe uma grande variedade de fármacos antibacterianos, os quais são de origem sintética ou natural ⁽⁷²⁾.

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados de acordo com o mecanismo de ação: (a) inibidores da síntese da parede celular bacteriana: penicilinas, cefalosporinas, vancomicina e bacitracina; (b) agentes que alteram a permeabilidade da membrana celular: daptomicina, polimixinas; (c) inibidores da síntese de proteínas: cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e aminoglicosídeos; (d) agentes antimetabólitos: trimetropim, sulfonamidas (bloqueiam enzimas essenciais no metabolismo do folato); e (e) agentes que afetam o metabolismo bacteriano dos ácidos nucleicos: rifamicinas, quinolonas, metronidazol, fluoroquinolonas e ácido nalidíxico ^(73,74).

Os agentes antimicrobianos são também classificados como sendo específicos e inespecíficos. Os específicos atuam, principalmente, sobre o micro-organismo infeccioso, sendo considerados nessa classe os antibióticos e quimioterápicos. Os antimicrobianos inespecíficos, ou seja, compostos capazes de matar ou inibir o crescimento de qualquer microrganismo, não são considerados quimioterápicos e sim desinfetantes, antissépticos, germicidas, biocidas, esterilizantes, sanitizantes ⁽⁷⁵⁾.

O agente antimicrobiano ideal deve exibir toxicidade seletiva: a mesma pode ocorrer em função de um receptor específico necessário para a ligação do fármaco, ou pode depender da inibição de eventos bioquímicos essenciais para o microrganismo, mas não para o hospedeiro. Isto deve ocorrer, com maior probabilidade, nos organismos procariotos do que nos eucariotos, em função do maior grau de diferença com as células hospedeiras⁽⁷⁶⁾.

Durante as últimas décadas, o uso desenfreado de agentes antimicrobianos tem contribuído para a seleção de microrganismos resistentes à estes agentes. Associado a esse uso irracional, houve um aumento acentuado de infecções como resultado de imunodeficiências associadas à síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), quimioterapia anticancerígena e transplantes⁽⁷⁷⁾.

Uma bactéria é considerada resistente a um determinado antibiótico, quando é capaz de crescer, *in vitro*, em concentrações mais altas do que a maior concentração alcançada pela droga no sítio da infecção^(78,79). Alguns autores afirmam que esta resistência pode ser determinada pelo genoma da bactéria, que codifica a expressão de mecanismos bioquímicos capazes de neutralizar os efeitos dos antibióticos⁽⁸⁰⁾.

O conceito de resistência é relativo sendo definido em função das concentrações terapêuticas possíveis de serem atingidas no sangue, que é inferior àquela alcançada em certos fluidos, secreções e tecidos⁽⁸¹⁾. Assim, uma bactéria pode ser resistente à concentração da droga no sangue, mas ser morta por esta mesma droga ao se localizar, por exemplo, nas vias respiratórias, devido às mais altas concentrações alcançadas neste local, bem como pelos elementos constituintes e reações bioquímicos inerentes ao microambiente. O contrário pode acontecer, quando uma bactéria sensível se localiza em uma área onde o antibiótico não atinge uma concentração efetiva⁽⁸²⁾.

As bactérias, assim como todos os organismos vivos, adotam mecanismos, a fim de sobreviverem à ação letal dos quimioterápicos, que incluem a resistência, a tolerância e a persistência^(83,84). No caso da resistência, a bactéria continua proliferando, isto é, mantém a mesma velocidade de crescimento mesmo ao ser tratada com o antibiótico. Na tolerância, o crescimento é inibido, mas o número de bactérias viáveis não sofre alteração por longo período⁽⁸⁵⁾. De fato, a bactéria apresenta defesa apenas contra o efeito bactericida do antibiótico onde, o sucesso

terapêutico somente será alcançado quando a concentração do antibiótico alcançar o valor da concentração mínima bactericida (CMB), definida como a menor concentração do antibiótico capaz de matar 99,9% das bactérias presentes ⁽⁸⁶⁾. Finalmente, na persistência, uma pequena fração da população bacteriana submetida ao tratamento não sofre o efeito bactericida do antibiótico, independentemente de seu mecanismo de ação ⁽⁸⁷⁾.

Esses três mecanismos de defesa têm grande importância clínica, uma vez que, no caso da resistência, o fracasso terapêutico é total, restando, como única opção de tratamento, a substituição do antibiótico por outro ao qual a bactéria seja sensível ⁽⁸⁸⁾.

A persistência e a tolerância são críticas nos casos em que o combate à infecção envolve pacientes imunossuprimidos, como os indivíduos que vivem com AIDS, nos quais o sucesso da antibioticoterapia depende, essencialmente, do efeito bactericida da droga. Assim, cessado o efeito inibitório do antibiótico ao qual a cepa é persistente ou tolerante, a infecção recrudesce, face à inexistência das defesas do organismo ⁽⁸⁵⁾.

Os mecanismos de desenvolvimento de resistência bacteriana, podem ser de origem intrínseca, ou seja, uma característica que passou em determinado tempo a constar no DNA bacteriano que pode ser espécie ou gênero-específica. A resistência pode ser também selecionada por diferentes mecanismos genéticos como a mutação (menos frequente) e por transferência de DNA através de conjugação, transdução, transformação ou transposição ⁽⁸⁹⁾.

Dentre os mecanismos de resistência bacterianos, destacam-se alguns como: (a) inativação enzimática, mecanismo no qual enzimas catalisam e degradam o antibiótico ou alteram a sua estrutura de grupos funcionais inativando sua função; (b) efluxo do antibiótico, que ocorre através da superexpressão de genes codificantes de proteínas transportadoras de membrana as quais tornam a saída do antibiótico mais rápida do que sua difusão pela membrana; (c) modificação do sítio de ligação da droga com estruturas celulares como os ribossomos, proteínas ou constituintes de parede celular, tornando a afinidade de ligação droga-alvo reduzida e (d) alteração de permeabilidade da membrana, resultante da alteração na expressão das porinas que controlam a seletividade de moléculas, interferindo assim na penetração e ação de alguns antibióticos ⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾.

O surgimento de microrganismos resistentes vem crescendo e a perspectiva para o uso de drogas antimicrobianas no futuro é ainda incerta. Contudo, algumas ações podem ser adotadas para reduzir este problema, como controle do uso indiscriminado de antimicrobianos, desenvolvimento de pesquisa para melhor compreender os mecanismos genéticos de resistência, além da continuidade dos estudos de desenvolvimento de novas drogas sintéticas ou naturais ⁽⁹²⁾.

Neste contexto as tiossemicarbazonas vêm sendo amplamente testadas desde a década de 80 quanto as suas propriedades antimicrobianas, tanto como ligantes livres quanto complexadas com íons metálicos.

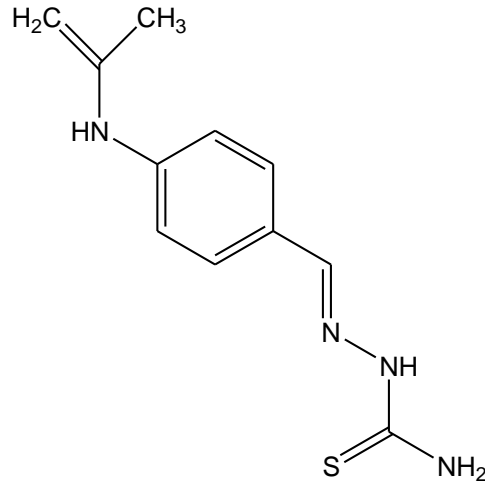
As 2-acetilpiridinas tiossemicarbazonas e seus complexos com Pt(II) apresentam atividade relatada contra *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitides*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus* do grupo D, porém foram inefetivos contra bacilos gram-negativos como *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli* e *Proteus* ⁽⁵⁾. Uma série diversa de tiossemicarbazonas e complexos de Ni(II), Mn(II), Co(II), Cu(II), Zn(II) e Bi(III), foram sintetizadas e apresentaram atividades de inibição do crescimento de uma grande variedade de microorganismos ^(93,94).

Uma tiossemicarbazona que se destaca na linha dos antimicrobianos é a *p*-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona, também conhecida pelo seu nome comercial Tiacetazona®, cuja atividade bacteriostática tornou-a um medicamento amplamente utilizado em países como a África do Sul para o tratamento de *Mycobacterium tuberculosis* sendo utilizada em conjunto com a isoniazida ⁽⁴⁶⁾. A Tiacetazona® (Figura 7) é uma pró-droga que requer a S-oxidação de sua fração tiocarbonil pela ação da proteína Rv3854c, também designada como enzima ativadora da Etionamida (EthA) ⁽⁹⁵⁾. O mecanismo de ação da Tiacetazona® ocorre através da depleção da biossíntese de ácido micólico, na etapa de desidratação do ciclo de alongamento da cadeia, função desempenhada pela enzima ácido-graxo sintase II (FAS-II), a via foi descoberta após verificar-se resistência cruzada entre a Tiacetazona® e a Etionamida ⁽⁹⁶⁾.

Outra tiossemicarbazona foi desenvolvida e aprovada para uso frente a cepas multi-droga resistentes (MDR) de *Mycobacterium tuberculosis*, na Rússia, no final de 2012. A *Perchlozone*®, é uma tiossemicarbazona derivada da piridina e funciona de

maneira análoga à Tiacetazona®. Apesar de ter sido recentemente lançada no mercado, já foram relatados casos de resistência cruzada entre as drogas ⁽⁹⁸⁾.

Figura 7 - Tiacetazona®, tiossemicarbazona com atividade antituberculose.



Fonte: Acervo do autor, 2015. (Adaptado de Elliot, 1996)⁷³

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Desenho do Estudo

Estudo experimental, *in vitro*, transversal, com a utilização de culturas de células *American Type Culture Collection* (ATCC). Realização de análises exploratórias, com mensurações quantitativas de variáveis contínuas dependentes e independentes, obtidas de no mínimo três experimentos independentes, realizados em triplicatas para cada avaliação/condição intervencional.

7.2 Síntese das Tiossemicarbazonas

As fenil-tiossemicarbazonas utilizadas para os testes foram sintetizadas pelo grupo de pesquisa em Síntese Química e Bioatividade Molecular (GPSQ) do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia (UFBA), como parte de um projeto em colaboração com o Núcleo de Biotecnologia, Bioprospecção e Propriedade Intelectual (NBBio) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Após a síntese, os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados no freezer à temperatura de -20°C.

As moléculas avaliadas (Tabela 5) foram sintetizadas em reação de uma etapa, empregando a reação acoplada tricomponente entre aril-isotiocianatos, hidrazina e compostos carbonílicos, isenta de catalisador e voltada para a obtenção de amplo espectro de tiossemicarbazonas. As condições experimentais de síntese foram direcionadas para metodologias de obtenção extremamente simples e de baixo custo, sendo útil para o desenvolvimento de bibliotecas mais complexas de moléculas ⁽⁹⁸⁾.

Tabela 5 - Moléculas sintetizadas pelo GPSQ, com os respectivos códigos utilizados para identificar as moléculas no laboratório.

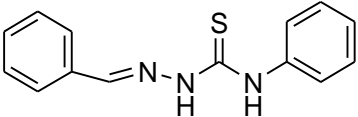
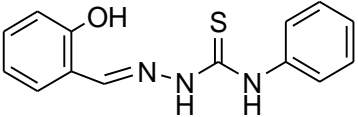
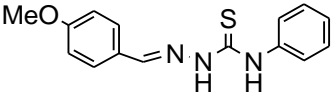
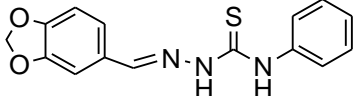
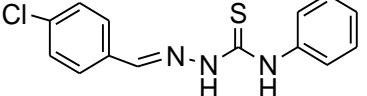
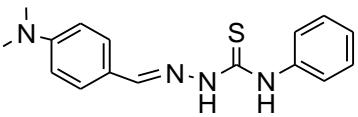
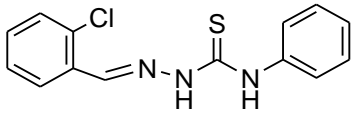
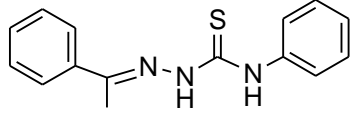
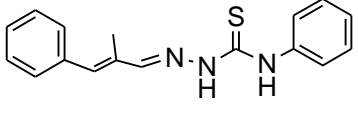
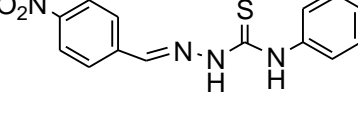
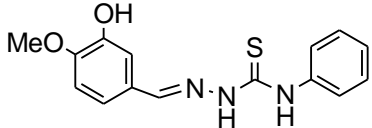
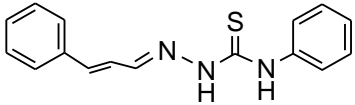
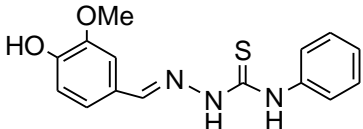
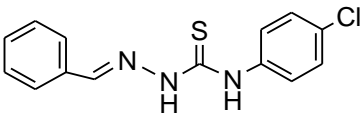
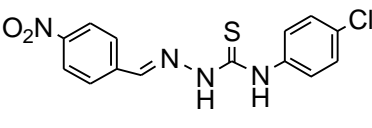
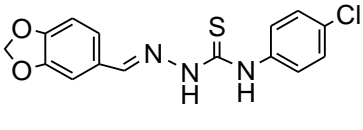
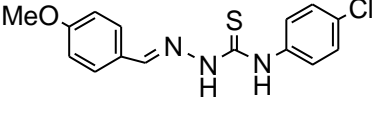
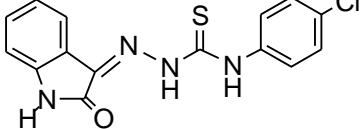
Nome da tiossemicarbazona	Código	Estrutura
Fenil-tiossemicarbazona do benzaldeído	RDG 49	
Fenil-tiossemicarbazona do salicilaldeído	RDG 67	
Fenil-tiossemicarbazona do 4-metoxibenzaldeído	RDG 69	
Fenil-tiossemicarbazona do piperonal	RDG 71	
Fenil-tiossemicarbazona do 4-clorobenzaldeído	RDG 72	
Fenil-tiossemicarbazona da 4-N,N-dimetilaminobenzaldeído	RDG 73	
Fenil-tiossemicarbazona do 2-clorobenzaldeído	RDG 75	
Fenil-tiossemicarbazona da acetofenona	RDG 78	
Fenil-tiossemicarbazona alfa-metilcinamaldeído	RDG 80	
Fenil-tiossemicarbazona do 4-nitrobenzaldeído	RDG 84	

Tabela 5 - Moléculas sintetizadas pelo GPSQ, com os respectivos códigos utilizados para identificar as moléculas no laboratório. (Continuação)

Fenil-tiossemicarbazona do 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído	RDG 85	
Fenil-tiossemicarbazona do metilcinamaldeído	RDG 86	
Fenil-tiossemicarbazona do 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído	RDG 91	
4-clorofenil-tiossemicarbazona do benzaldeído	RDG 93	
4-clorofenil-tiossemicarbazona do 4-nitrobenzaldeído	RDG 95	
4-clorofenil-tiossemicarbazona do piperonal	RDG 96	
4-clorofenil-tiossemicarbazona do 4-metoxibenzaldeído	RDG 98	
4-clorofenil-tiossemicarbazona da isatina	RDG 99	

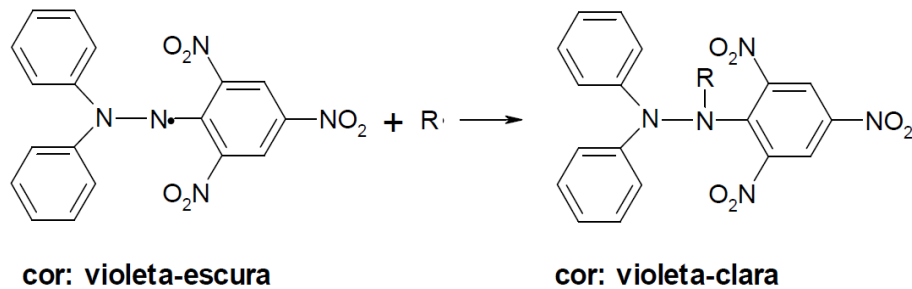
Fonte: Acervo do autor, 2015.

7.3 Ensaios para Avaliação da Capacidade Antioxidante

7.3.1 Ensaio do 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil (DPPH)

O método da captura do radical DPPH foi realizado a partir de uma solução a 60 μM de DPPH em metanol. Essa solução ficou em repouso e protegido da luz por 1 hora para formação do radical. Para avaliação da captura do DPPH, utilizou-se 1950 μL dessa solução com diferentes concentrações das tiossemicarbazonas (50, 75, 100 e 500 μM) e, após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram realizadas as leituras no espectrofotômetro de absorção molecular UV - VIS com comprimento de onda de 515 nm (Figura 3). Posteriormente, as curvas de inibição dose-resposta do radical DPPH foram determinadas e, através da função das curvas de cada uma das drogas, foi realizado o cálculo da concentração eficiente para inibir 50% do DPPH (EC_{50}) de cada uma das substâncias (Figura 8). O Trolox (análogo da vitamina E) foi utilizado como controle (Adaptado de BRAND-WILIAMS & CUVELIER, 1995) ⁽⁹⁹⁾.

Figura 8 - Esquema da captura do DPPH por um antioxidante.



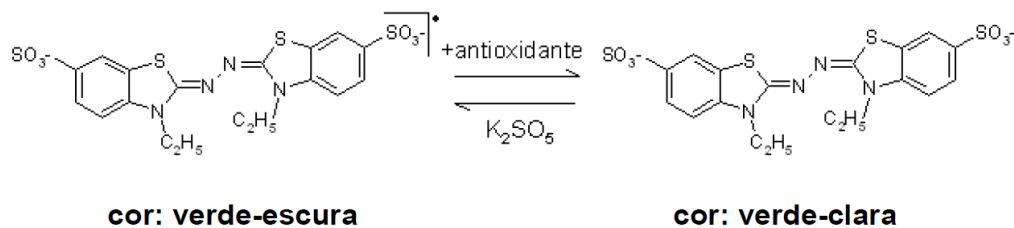
Fonte: Rufino et al, 2007 ⁽¹⁰⁰⁾

7.3.2 Ensaio do 2,2'-Azinobis (3-Etilbenzotiazolína-6-Ácido Sulfônico) (ABTS)

Para avaliação do potencial antioxidante pelo método do ABTS, foi preparada em água deionizada uma solução a 7 mM do 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico). Dessa solução, retirou-se 5 mL e adicionou-se 88 μL de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) na concentração de 2,45 mM, sendo ao final incubado por 16-20h horas, sob proteção da luz, para promover a produção do radical cátion $\text{ABTS}^{+\cdot}$.

Posteriormente, a solução foi diluída em etanol até atingir a absorvância de $0,700 \pm 0,020$, lida a 734 nm em um espectrofotômetro de absorção molecular UV - VIS. Decorrente da formação dos radicais, alíquotas de 20 μL de uma solução estoque de 1 mg mL^{-1} dos extratos foram adicionados à 2 mL da solução final de ABTS•+ e, após 6 minutos de incubação, as leituras foram realizadas a uma absorvância de 734 nm (Figura 9).

Figura 9 - Esquema da neutralização do ABTS por um antioxidante.



Fonte: Rufino et al, 2007 ⁽¹⁰¹⁾

Para avaliar a atividade antioxidante, as substâncias foram comparadas ao Trolox (análogo da vitamina E), uma vez que o ensaio é referido na literatura por *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC). A porcentagem da inibição do radical ABTS foi calculada segundo a fórmula:

$$\% = -\left(\frac{X \times 100}{Y}\right) + 100$$

Onde X = Absorbância da amostra em teste e Y = Absorbância do ABTS + 20 μL de Etanol (Adaptado de RE et al. 1999) ⁽¹⁰²⁾.

7.4 Ensaios para Avaliação Antibacteriana

7.4.1 Cultura de Células

As cepas bacterianas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6638), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1706), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). As cepas foram conservadas e armazenadas na bacterioteca dos laboratórios de ensino, da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – Campus Cabula, congeladas em freezer a temperatura de -20°C em caldo

Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com 20% de glicerol. Em ocasião de uso, as bactérias eram subcultivadas em caldo Mueller-Hinton a 35°C por 24 horas.

7.4.2 Determinação do Inóculo Inicial

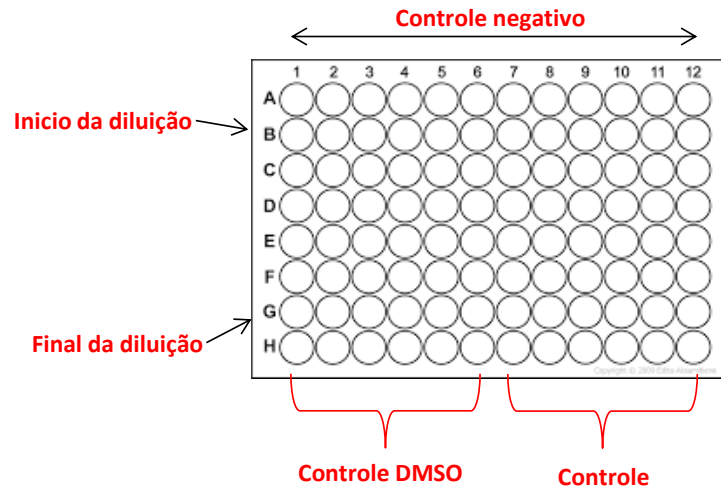
As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura em caldo Mueller-Hinton até o crescimento exponencial, em geral de três a cinco horas, até atingir turvação equivalente à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland. A turbidez da cultura foi verificada, em seguida usando um espectrofotômetro UV - VIS para obter leituras de densidade ótica (O.D. 625 nm) entre 0,08 a 0,10 determinando assim, a padronização do inóculo (1×10^8 UFC/mL) em relação a solução McFarland 0,5. Posteriormente, foram realizadas diluições, em caldo, obtendo-se uma suspensão de 5×10^5 UFC/mL (pré-inóculo), concentração que foi utilizada nos ensaios ⁽¹⁰³⁾.

7.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Microdiluição

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em placas de poliestireno com tampas estéreis. Nas placas contendo 96 poços, adicionaram-se 50 µL do caldo Mueller-Hinton nas colunas de 1 a 12 e linhas, de A a H. Em seguida, acrescentou-se mais 50 µL de uma solução de caldo com as tiossemicarbazonas diluídas na concentração de $1024 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos poços da linha B e colunas de 1 a 12. Foi, então, realizada uma diluição seriada, à razão de 2, a partir das linhas B até G sendo os 50 µL da última diluição descartados. A linha H foi utilizada para o controle positivo para o crescimento bacteriano e para controle do crescimento sob dimetilsulfóxido (DMSO), uma vez que as substâncias foram diluídas neste solvente. O antibiótico usado como controle foi o Cloranfenicol. O esquema geral pode ser observado na Figura 10. Após as diluições, inoculou-se em todos os poços da placa 50 µL de suspensões com os inóculos padronizados, exceto a linha A (controle negativo do crescimento bacteriano). A diluição final dos experimentos variou entre 256 e $8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estes ensaios foram incubados a 35°C

por 24 horas de acordo com a metodologia descrita, segundo a norma M7-A10 para testes com bactérias ⁽¹⁰³⁾.

Figura. 10 - Esquema da microplaca com a diluição dos extratos.



Fonte: Acervo do autor, 2015.

7.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram representados como a média \pm desvio padrão e foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA e pós-teste de Tukey ou Dunnet com nível de significância mínimo de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, por pelo menos três vezes independentes.

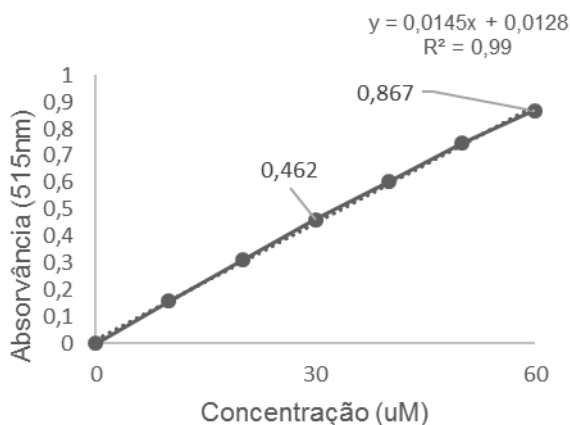
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Avaliação Antioxidante

8.1.1 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método do DPPH

Nesta etapa, foram realizados estudos da atividade antioxidante das 18 feniltiossemicarbazonas sintéticas frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil. Para calcular a concentração eficiente para inibir 50% do radical (EC_{50}) e avaliar a capacidade das moléculas de neutralizar o radical DPPH foi necessária a construção de uma curva de concentração *versus* absorvância para determinar o valor em absorvância equivalente à 50% da concentração do radical. Como utilizou-se o radical na concentração de 60 μM , foi possível determinar a absorvância de 100% da presença do radical, correspondendo a um valor médio de 0,867 unidades de absorvância (UA), e a absorvância para 30 μM foi determinada como 50% da presença do radical (EC_{50}), correspondendo a um valor médio de 0,462 unidades de absorvância (UA), como mostra a curva representada na Figura 11.

Figura 11 - Curva do radical DPPH para determinação da EC_{50} .

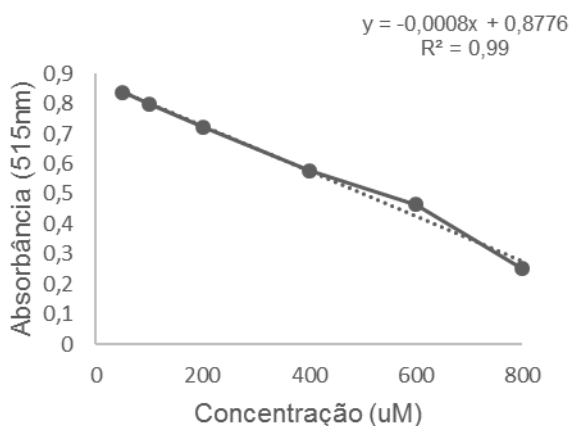


Fonte: Acervo do autor, 2015.

Após a determinação da absorvância de 50% do radical, determinou-se a curva do Trolox, o antioxidante utilizado como padrão e controle dos experimentos. As amostras, em concentrações seriadas de Trolox (800-50 μM), foram incubadas por 1 hora na presença do radical DPPH e, com isso obteve-se a curva de inibição do radical em relação à presença de Trolox (Figura 12). Através da curva, determinou-se a equação da reta e calculou-se a concentração eficiente para inibir

50% do radical (EC_{50}), substituindo a absorvância equivalente à 50% da presença do radical. Os experimentos foram realizados na ausência de luz, pois o radical apresenta fotossensibilidade.

Figura 12 - Curva de neutralização do Trolox (800-50 μM) frente ao radical DPPH para determinação da EC_{50} .

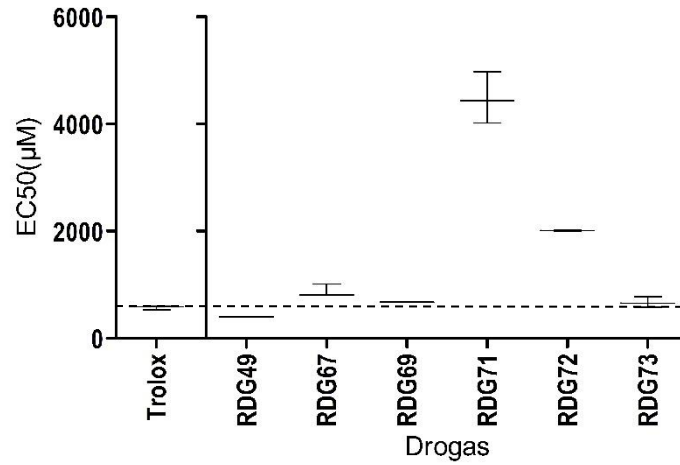


Fonte: Acervo do autor, 2015.

Em seguida, as substâncias foram incubadas uma a uma, em concentrações seriadas, por 1h com o radical DPPH para construção de suas respectivas curvas de neutralização e obtenção de suas respectivas equações da reta, tornando possível o cálculo de suas EC_{50} . Através das curvas de inibição das drogas foi possível visualizar que algumas moléculas obtiveram resultados promissores quando comparadas ao Trolox ($EC_{50} = 568,7 \mu\text{M}$). Os resultados estão apresentados em três figuras para facilitar a visualização. Todos os experimentos foram realizados em ambiente escuro e em triplicatas, em pelo menos três vezes independentes.

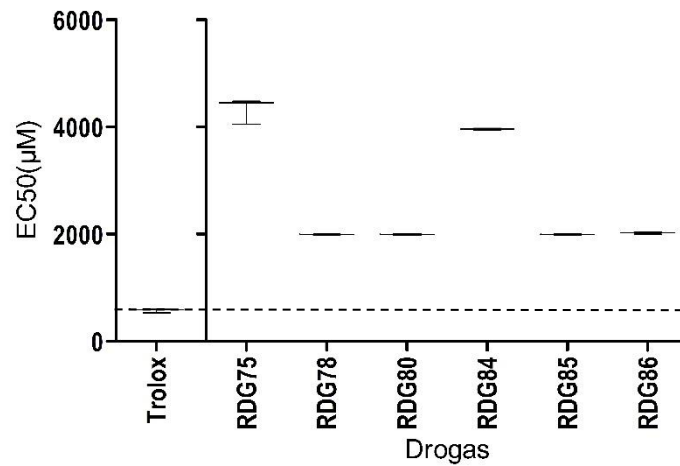
Os valores de EC_{50} obtidos através do teste de neutralização do radical DPPH para todas as tiossemicarbazonas estão ilustrados nas figuras 13, 14 e 15. Os resultados indicam que os compostos RDG 49, RDG 67, RDG 69, RDG 73, RDG 91 e RDG 95 apresentaram a capacidade de neutralizar o DPPH de maneira semelhante ao Trolox.

Figura 13 - Determinação das EC_{50} das tiossemicarbazonas RDG 49, RDG 67, RDG 69, RDG 71, RDG 72 e RDG 73 pelo método do DPPH em comparação ao Trolox ($EC_{50} = 568,7 \mu M$).



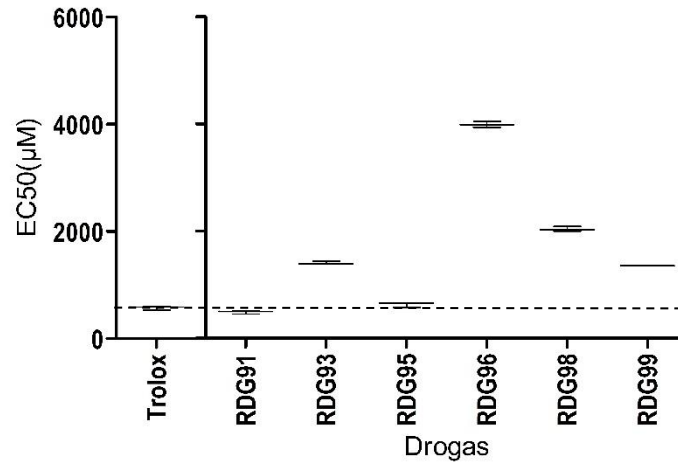
Fonte: Acervo do autor, 2015.

Figura 14 - Determinação das EC_{50} das tiossemicarbazonas RDG 75, RDG 78, RDG 80, RDG 84, RDG 85 e RDG 86 pelo método do DPPH em comparação ao Trolox ($EC_{50} = 568,7 \mu M$).



Fonte: Acervo do autor, 2015.

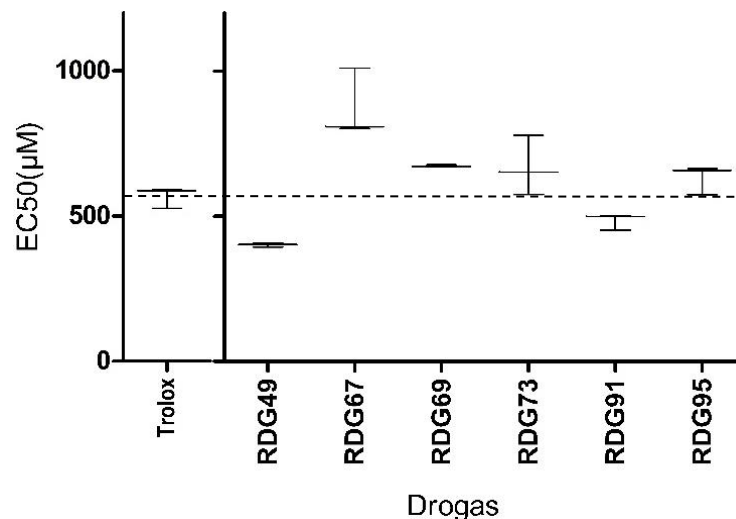
Figura 15 - Determinação das EC_{50} das tiossemicarbazonas RDG 91, RDG 93, RDG 95, RDG 96, RDG 98 e RDG 99 pelo método do DPPH em comparação ao Trolox ($EC_{50} = 568,7 \mu M$).



Fonte: Acervo do autor, 2015.

Na Figura 16 estão destacadas as tiossemicarbazonas que apresentaram capacidade antioxidante frente ao DPPH semelhantes ou superiores à do Trolox. Dentre elas, as RDG 49 e RDG 91 apresentaram resultados superiores quando comparadas ao Trolox.

Figura 16 - Tiossemicarbazonas com os menores valores de EC_{50} frente ao Trolox ($EC_{50} = 568,7 \mu M$).



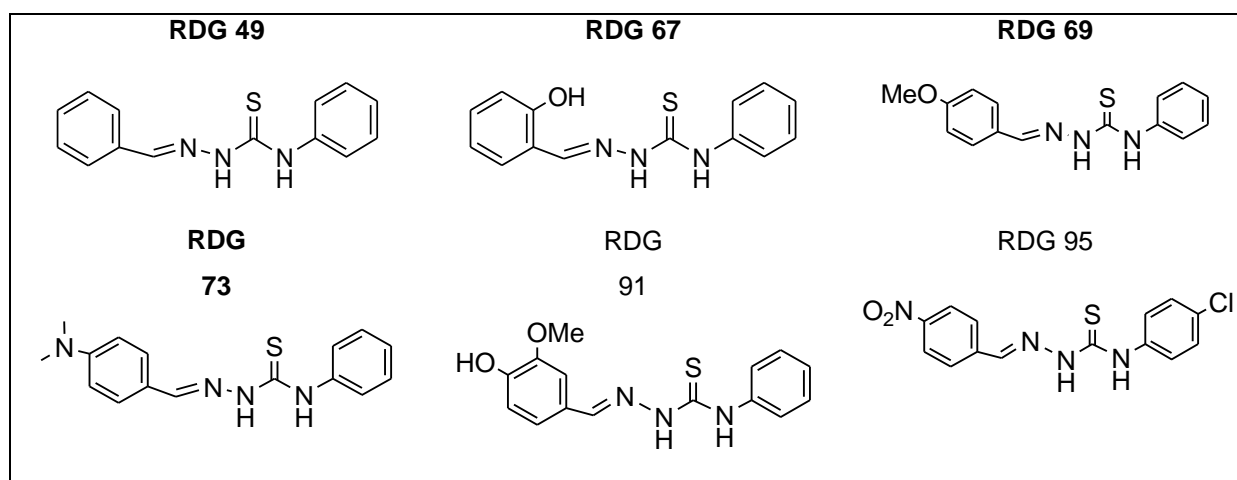
Fonte: Acervo do autor, 2015.

O DPPH é um dos poucos radicais orgânicos estáveis de nitrogênio disponíveis que apresenta coloração púrpura. Esse ensaio é baseado na medição da capacidade de um antioxidante em neutralizar o radical DPPH e sua avaliação

pode ser realizada através da ressonância do *spin* eletrônico (EPR) ou pelo decréscimo de absorvância. O método de avaliação utilizado neste trabalho, relatado por Brand-Williams e colaboradores em 1995, foi o ensaio de descoloração, que se baseia no decréscimo de absorvância observado em espectrofotômetro UV-VIS ⁽¹⁰⁴⁾.

Analisando os resultados da captura do radical DPPH, foi possível observar que as fenil-tiossemicarbazonas derivadas do benzaldeído – RDG 49, RDG 67, RDG 69, RDG 73, RDG 91, RDG 95 (Quadro 1) - foram as mais efetivas, tornando possível evidenciar que, dentre as fenil-tiossemicarbazonas derivadas do benzaldeído, a molécula sem substituintes apresenta-se como a mais eficaz. Observando as estruturas, as substituições que parecem ser toleráveis no anel dos benzaldeídos para manutenção da atividade antioxidante são monossustituições de hidroxila na posição 2, metoxila na posição 4 e dimetilamino na posição 4. Quanto às bissustituições toleráveis, demonstra-se que existe uma inibição da atividade antioxidante nas substituições de metoxila junto à hidroxila nas posições 4 e 3 respectivamente, uma vez que a molécula com essas substituições em posições diferentes (3 e 4, respectivamente) demonstrou atividade frente ao radical DPPH. A substituição proposta no anel fenil das tiossemicarbazonas foi a inclusão de cloro na posição 4, e as substituições parecem não ser toleráveis, exceto quando o grupo nitro na posição 4 dos aldeídos está presente.

Quadro 1. Fórmulas Estruturais das fenil-tiossemicarbazonas com atividade antioxidante pelo método do DPPH.



Fonte: Acervo do autor, 2015.

Um estudo realizado por Nguyen e colaboradores (2013) investigou a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de uma série de benzaldeído-

tiossemicarbazonas derivadas do galactopiranosil e concluíram que quatro, das treze moléculas avaliadas, obtiveram resultados superiores ao controle utilizado no ensaio do DPPH, o resveratrol. Ainda neste trabalho foi proposto que a atividade antioxidante desses compostos frente ao DPPH, deve-se à presença de grupos N-H que podem compartilhar átomos de hidrogênio para o radical DPPH e posteriormente produzir uma ressonância estável com o anel do benzaldeído. Além disso, o estudo afirma que os substituintes 4-NMe₂, 3-OEt-4-OH, 3-OMe-4-OH e 4-OH, ligados ao benzaldeído, são mais eficientes ao formar a ressonância eletrônica, explicando assim a atividade superior aos outros compostos ⁽¹⁰⁵⁾.

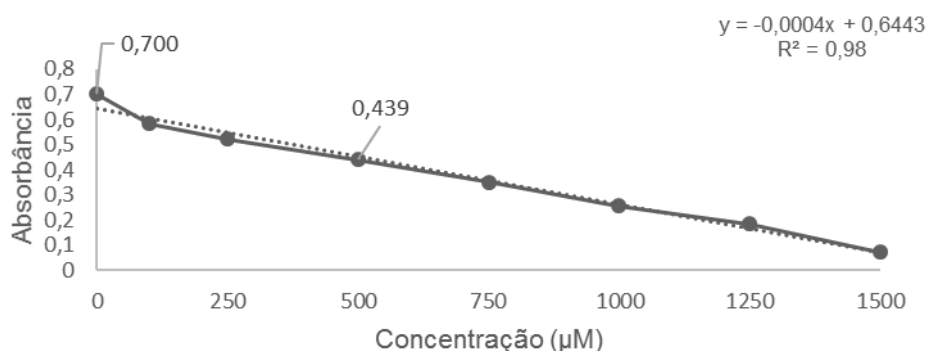
Outro trabalho, realizado por Jagadeesh e colaboradores (2015), avaliou a atividade antioxidante da 2,4'-dibromoacetofenona tiossemicarbazona e seus complexos de Cu(II), Ni(II) e Pd(II) e concluiu que o ligante livre apresentou mais eficiência quando comparado aos complexos metálicos ⁽¹⁰⁶⁾. Dois trabalhos de Prathima e colaboradores (2010 e 2011) avaliaram cinco fenil-tiossemicarbazonas derivadas do benziloxibenzaldeído e seus complexos metálicos de cobalto, níquel, cobre e manganês e encontraram atividade antioxidante frente ao radical DPPH nos ligantes livres e em complexos com o cobalto ^(107,108).

Calcaterra e colaboradores (2015) publicaram um trabalho, recentemente, em que avaliaram 4 fenil-tiossemicarbazonas derivadas do benzaldeído pelos métodos do DPPH, captura do radical peróxido de hidrogênio e inibição da peroxidação lipídica pelo método do tiocianato férrico. Todos os compostos apresentaram atividade antioxidante e os dados sugeriram que o número de grupos hidroxila é diretamente proporcional à atividade antioxidante apresentada pelas moléculas. Neste trabalho, os dados não concordam completamente com a sugestão de Calcaterra e colaboradores, uma vez que a ocorrência de um grupamento hidroxila na molécula não garantiu atividade antioxidante elevada, embora a sugestão não possa ser completamente descartada ⁽⁶⁸⁾.

8.1.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método do ABTS

Nesta etapa da avaliação da atividade antioxidante, analisou-se as 18 feniltiossemicarbazonas frente ao radical ABTS^{•+}. A preparação do radical foi realizada sempre no dia anterior ao dia das análises para que a solução de ABTS e persulfato de potássio pudesse descansar por 16-20h no escuro e promover a formação do radical ABTS^{•+}. A cada experimento construiu-se uma curva-padrão do Trolox para validar os testes e determinar uma concentração a ser utilizada como fator de comparação frente as substâncias testadas; na Figura 17 estão representadas as médias de todas as curvas que foram construídas. A incubação da reação com o ABTS foi de 6 minutos e foi realizada em ambiente escuro por conta da fotossensibilidade do radical. Os dados são representados com a absorvância média obtida em três leituras e em três experimentos independentes.

Figura 17 - Curva-padrão do Trolox (1500-0 μM) frente ao radical ABTS.



Fonte: Acervo do autor, 2015.

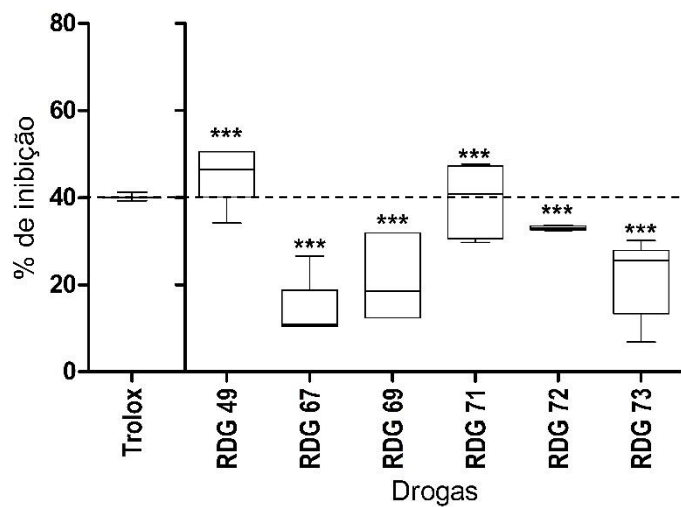
Para facilitar a comparação, calculou-se a porcentagem de inibição dos valores obtidos na curva do Trolox e selecionou-se a concentração de 500 μM do Trolox e 500 μM das tiossemicarbazonas para a comparação dos resultados.

Em seguida as substâncias foram, uma a uma, incubadas por 6 minutos com o radical ABTS. Através das absorvâncias obtidas, foram determinadas as porcentagens de inibição das tiossemicarbazonas e então foi realizada a avaliação através do cálculo da porcentagem de inibição de cada uma das moléculas frente ao radical ABTS. Para tanto, utilizou-se o zero da curva no Trolox (0 μM) para representar 0% de inibição e a ausência de absorvância para representar 100% de

inibição. Todos os experimentos foram realizados em ambiente escuro e realizados em triplicatas e pelo menos três vezes independentes.

Com a determinação das porcentagens de inibição foi possível observar que as tiossemicarbazonas, de maneira, geral apresentaram capacidade de inibir o radical ABTS como pode ser visualizado nas figuras 18, 19 e 20.

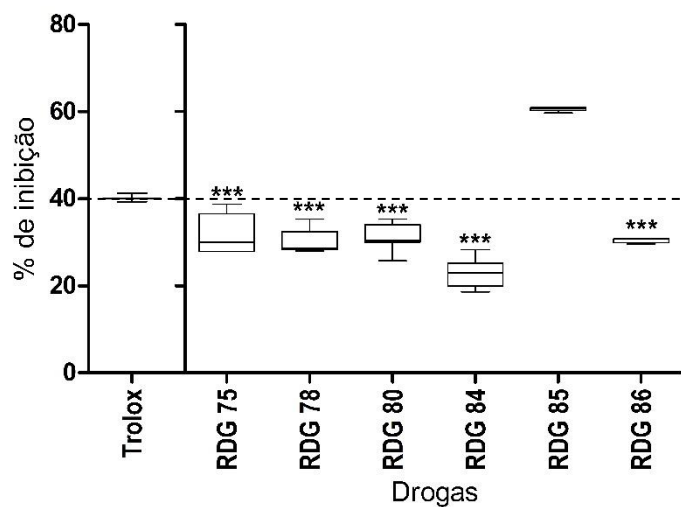
Figura 18 - Determinação das porcentagens de inibição das tiossemicarbazonas RDG 49, RDG 67, RDG 69, RDG 71, RDG 72 e RDG 73 pelo método do ABTS em comparação ao Trolox (500 μ M).



Fonte: Acervo do autor, 2015.

*P<0,05, **P<0,001 e ***P<0,0001 (ANOVA, Dunnet).

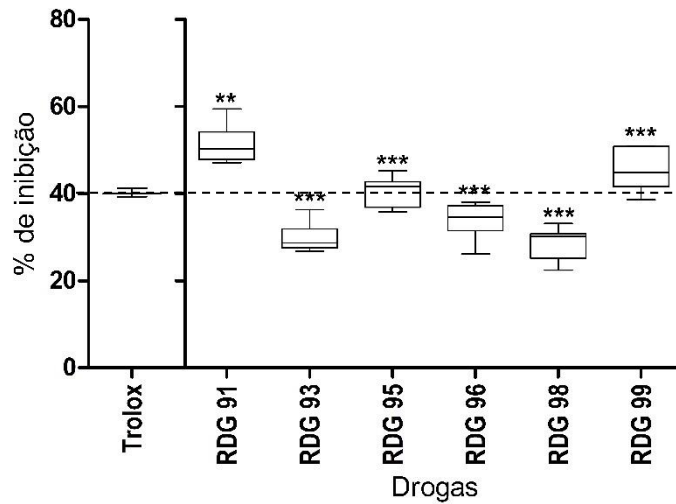
Figura 19 - Determinação das porcentagens de inibição das tiossemicarbazonas RDG 75, RDG 78, RDG 80, RDG 84, RDG 85 e RDG 86 pelo método do ABTS em comparação ao Trolox (500 μ M).



Fonte: Acervo do autor, 2015.

*P<0,05, **P<0,001 e ***P<0,0001 (ANOVA, Dunnet).

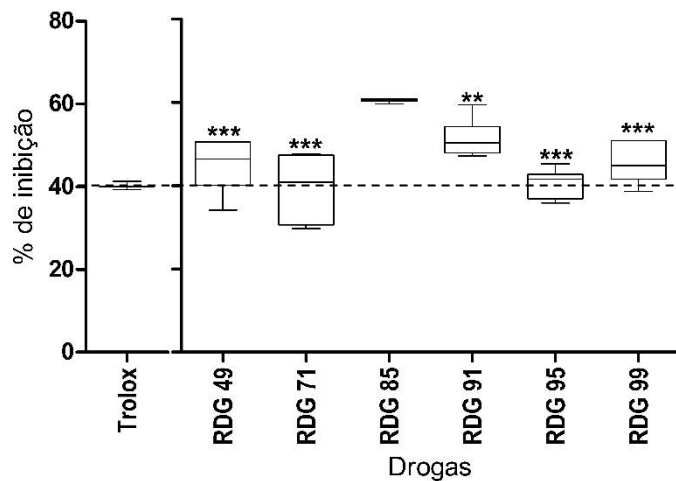
Figura 20 - Determinação das porcentagens de inibição das tiossemicarbazonas RDG 91, RDG 93, RDG 95, RDG 96, RDG 98 e RDG 99 pelo método do ABTS em comparação ao Trolox (500 μ M).



Fonte: Acervo do autor, 2015.
*P<0,05, **P<0,001 e ***P<0,0001 (ANOVA, Dunnet).

No entanto, apenas as tiossemicarbazonas RDG 49, RDG 71, RDG 85, RDG 91, RDG 95 e RDG 99 apresentam atividade antioxidante semelhante ou superior ao Trolox frente ao radical ABTS (Figura 21).

Figura 21 - Determinação das porcentagens de inibição das tiossemicarbazonas com atividade igual ou superior ao Trolox (500 μ M).

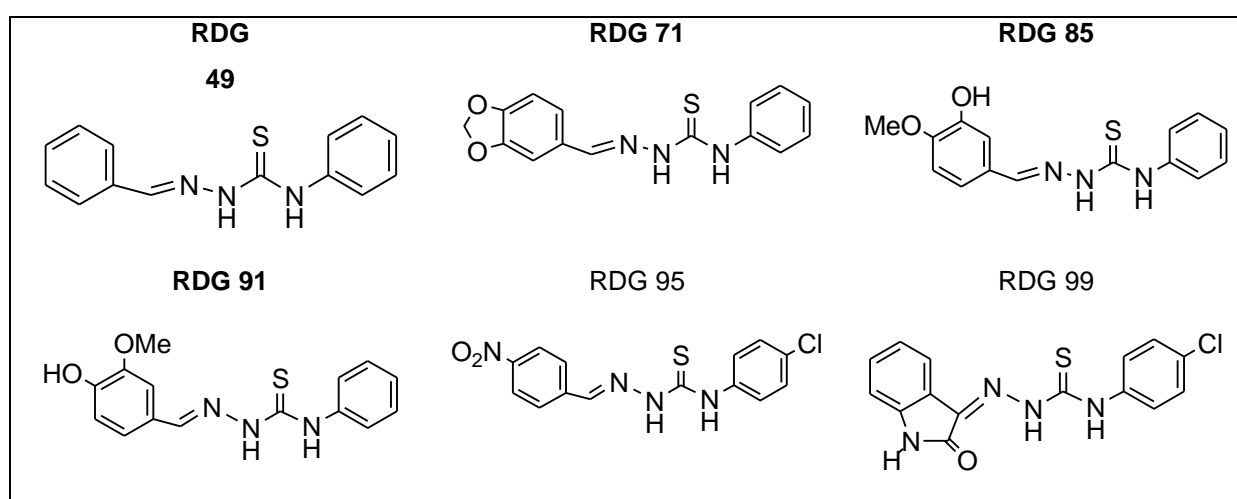


Fonte: Acervo do autor, 2015.
*P<0,05, **P<0,001 e ***P<0,0001 (ANOVA, Dunnet).

Neste ensaio da atividade antioxidante, o ABTS é oxidado pelo persulfato de potássio para formação do cátion $ABTS^{\bullet+}$ que, em sua forma radicalar, apresenta coloração em um tom verde azulado. A avaliação da atividade antioxidante se dá através da adição de substâncias antioxidantes que diminuirão a tonalidade da cor. Sua quantificação ocorreu no espectrofotômetro e os resultados foram sempre comparados ao Trolox, o ensaio também referido na literatura por *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC).

Observando as moléculas que foram efetivas no ensaio do ABTS (Quadro 2), pode-se inferir que as fenil-tiossemicarbazonas derivadas do benzaldeído e da isatina apresentaram atividade antioxidante. Dentre as moléculas derivadas do benzaldeído, a atividade da molécula sem substituintes (RDG 49) pareceu ser mantida. Quando o anel do benzaldeído apresenta dois substituintes oxigenados (RDG 71, RDG 85 e RDG 91) sem substituições no anel fenil das tiossemicarbazonas as substituições são toleradas, e, das moléculas com substituição do cloro na posição 4 no anel fenil das tiossemicarbazonas, novamente a atividade antioxidante foi observada quando o grupo nitro na posição 4 dos aldeídos está presente (RDG 95). A tiossemicarbazona derivada da isatina pareceu, também, tolerar a substituição do cloro na posição 4 no anel fenil da tiossemicarbazona (RDG 99).

Quadro 2 - Fórmulas Estruturais das fenil-tiossemicarbazonas com atividade antioxidante pelo método do ABTS.



Fonte: Acervo do autor, 2015.

Um estudo realizado por Brodowska e colaboradores (2016), complexou um flavonóide chamado naringenina à uma tiossemicarbazona e avaliou o ligante livre e

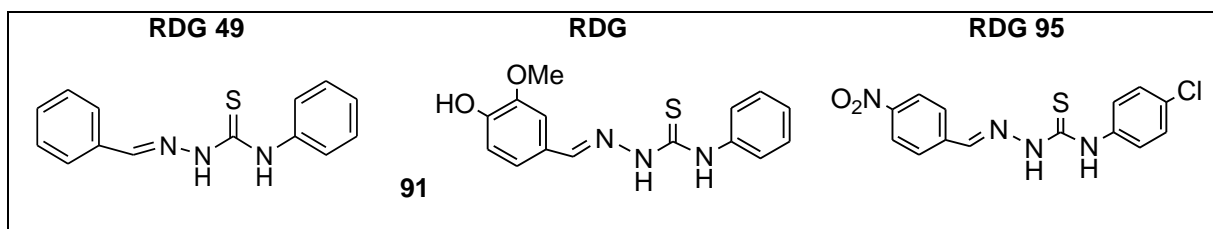
complexado ao cobre quanto à sua atividade antioxidante, através dos métodos do DPPH, do ABTS e do *Ferric-reducing antioxidant power* (FRAP). Os resultados revelaram que o complexo naringenina-tiossemicarbazona e seu complexo metálico apresentam atividade superior à naringenina livre e à tiossemicarbazona livre. Os autores também afirmam que o número de hidroxilas ligados aos anéis fenólicos da estrutura influenciam diretamente no aumento da atividade antioxidante ⁽¹⁰⁹⁾.

Yousef e colaboradores (2014) sintetizaram complexos de Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) e Cd(II) com tiossemicarbazonas derivadas da piridina e do pirazol e investigaram a atividade antioxidante através do ABTS. Os autores observaram que todos os complexos metálicos apresentaram atividade antioxidante inferior aos ligantes livres ⁽¹¹⁰⁾. Em outro estudo, realizado na Romênia, Ilies e colaboradores (2015), avaliaram a atividade antioxidante da 2-formilpiridina fenil-tiossemicarbazona e seus complexos de Ni(II) e Cu(II) utilizando o radical ABTS e relataram que o ligante livre e um dos complexos com Cu(II) apresentaram atividade antioxidante semelhante aos padrões utilizados no ensaio o BHT e o BHA ⁽¹¹¹⁾.

Barcelos e colaboradores (2011) avaliaram a capacidade da isatina-3-N⁴-benziltiossemicarbazona (IBTC) em prevenir modificações oxidativas em porções lipídicas e proteicas da lipoproteína de baixa densidade (LDL) mediadas por diferentes oxidantes *in vitro*. Os autores concluíram que a IBTC possui grande potencial antioxidante, pois apresenta propriedade de captura de radicais livres (TRAP assay) e capacidade de reduzir a peroxidação lipídica (TBARS). A avaliação realizada pelo grupo é de grande interesse à indústria farmacêutica pois prospecta novas moléculas com o intuito de prevenir a oxidação do LDL, evento crucial para o desenvolvimento da aterosclerose. A IBTC apresenta grande semelhança estrutural com a RDG 99, o que reforça a atividade encontrada através da metodologia do ABTS ⁽¹¹²⁾.

Diante da combinação dos dados dos dois ensaios antioxidantes, as moléculas que demonstraram maior capacidade antioxidante estão no Quadro 3.

Quadro 3 - Fórmulas Estruturais das fenil-tiossemicarbazonas com atividade antioxidante em ambos os métodos utilizados.



Fonte: Acervo do autor, 2015.

Pode-se inferir, do conjunto dos dados, que as tiossemicarbazonas de benzaldeídos são as mais eficazes, quando comparadas com as tiossemicarbazonas derivadas de cetonas, de aldeídos alifáticos saturados e da isatina. Dos substituintes do anel da fenil-tiossemicarbazona, prevalecem as moléculas sem nenhum substituinte, exceto o cloro, quando o grupo nitro na posição 4 dos aldeídos está presente. Por fim, são toleráveis, mantendo a capacidade antioxidante, substituições nos benzaldeídos com dois substituintes oxigenados com uma hidroxila na posição *Para*.

Não existem muitos trabalhos publicados que avaliem a atividade antioxidante de tiossemicarbazonas e, poucos deles propõem o estudo das estruturas moleculares para explicar a atividade apresentada. Contudo, analisando os trabalhos já publicados, para atividade antioxidante, as tiossemicarbazonas não complexadas à metais aparentam apresentar melhor atividade antioxidante quando comparada às complexadas a metais.

8.2 Avaliação da Atividade Antibacteriana pelo Método de Microdiluição em Caldo

Determinou-se como Concentração Inibitória Mínima (CIM) a menor concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do organismo nos poços da microdiluição. A detecção foi realizada visualmente, através da comparação da turvação entre os poços de controle positivos, negativo e do antibiótico padrão, tendo como resultado o valor absoluto mais frequente, e a avaliação foi desenvolvida seguindo a norma M7-A10⁽¹⁰³⁾, através da metodologia de microdiluição em caldo. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) encontrada para a metodologia de microdiluição, de acordo com as cepas bacterianas.

	<i>S. aureus</i> ATCC 6638	<i>M. luteus</i> ATCC 10240	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. faecalis</i> ATCC 297121	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i> ATCC 1706	<i>S.</i> <i>typhimurium</i> ATCC 14028
RDG 49	-	-	-	-	-	-	-
RDG 67	-	-	-	-	-	-	-
RDG 69	-	-	-	-	-	-	-
RDG 71	-	-	-	-	-	-	-
RDG 72	-	-	-	-	-	-	-
RDG 73	-	-	-	-	-	-	-
RDG 75	-	-	-	-	-	-	-
RDG 78	-	-	-	-	-	-	-
RDG 80	-	-	-	-	-	-	-
RDG 84	-	-	-	-	-	-	-
RDG 85	-	-	-	-	256 µg mL ⁻¹	-	-
RDG 86	-	-	-	-	-	-	-
RDG 91	-	-	-	-	-	-	-
RDG 93	-	-	-	-	-	-	-
RDG 95	64 µg mL ⁻¹	-	-	-	-	-	-
RDG 96	-	-	-	-	-	-	-
RDG 98	-	-	-	-	-	-	-
RDG 99	128 µg mL ⁻¹	256 µg mL ⁻¹	-	-	-	-	-

Fonte: Acervo do autor, 2015.

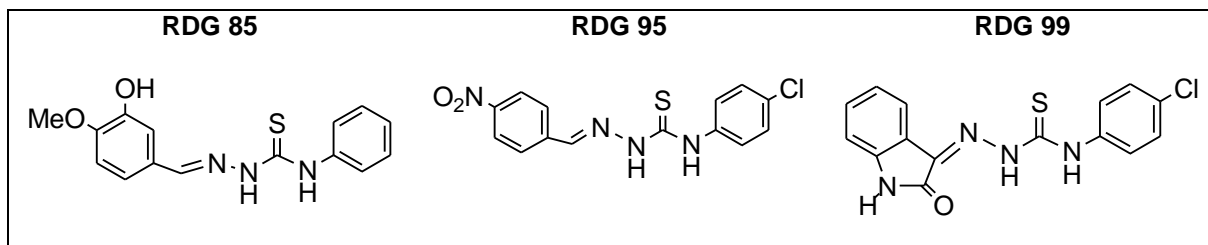
O símbolo “-” indica que a concentração inibitória mínima é superior à 256 µg mL⁻¹. O Cloranfenicol foi o antibiótico usado como padrão e teve como CIM 8 µg mL⁻¹ para todos os microrganismos.

Ao se observar a Tabela 6 nota-se que o composto RDG 99 apresentou atividade frente à *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, apesar dos valores elevados de CIM, 128 e 256 µg mL⁻¹ respectivamente. O composto RDG 85

apresentou atividade apenas frente à *Enterococcus faecalis*, com um valor de 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já o composto RDG 95 demonstrou atividade somente frente à *Staphylococcus aureus*, com a menor CIM ($64 \mu\text{g mL}^{-1}$) demonstrada pelas tiossemicarbazonas.

Na avaliação da atividade antibacteriana, dentre as moléculas testadas, demonstraram atividade (Quadro 4) duas fenil-tiossemicarbazonas derivadas do benzaldeído (RDG 85 e RDG 95) e a derivada da isatina (RDG 99) que são moléculas estruturalmente díspares. Apesar disso pode-se inferir que a presença ou ausência do cloro no anel fenil das tiossemicarbazonas não é suficiente para determinar que as moléculas demonstrem atividade antibacteriana, mas aliada a presença do grupo nitro no anel do benzaldeído ou a presença da isatina pode ser determinante para a mesma. Estudos com grupos nitro em outras posições e outras isatinas sem a presença do grupo cloro, precisam ser realizados para que se firme uma relação de estrutura atividade mais aprimorada. Ademais, as fenil-tiossemicarbazonas demonstraram ser efetivas em bactérias gram-positivas e não em gram-negativas, ainda que tenham demonstrado efetividade, *in vitro*, inferior ao antibiótico padrão utilizado nos experimentos.

Quadro 4 - Fórmulas Estruturais das fenil-tiossemicarbazonas com atividade antimicrobiana.



Fonte: Acervo do autor, 2015.

Em trabalho realizado por Aquino (2007) e colaboradores (2008), algumas fenil-tiossemicarbazonas derivadas do benzaldeído com substituições de grupos metoxi, flúor, cloro e metil em posições diferentes no anel do benzaldeído foram sintetizadas e avaliadas quanto a atividade antimicrobiana, e as substituições não foram suficientes para apresentarem atividade antimicrobiana frente as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16), *Micrococcus luteus* (ATCC 2225), *Enterococcus faecalis* (ATCC 6057), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29665) ^(113,114). Esses dados reforçam os achados neste trabalho de que poucas das fenil-tiossemicarbazonas livres avaliadas se apresentam como moléculas efetivas frente a agentes bacterianos.

Um grupo de pesquisadores chineses liderados por Zhang e colaboradores (2015) sintetizou e avaliou a atividade antimicrobiana de uma série inicial de 10 feniltiossemicarbazonas derivadas da isatina frente a cepas ATCC de *S. aureus*, *B. subtilis* e um isolado clínico de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), porém apenas um dos compostos revelou-se um bom inibidor para os três microrganismos testados. A molécula efetiva apresentava em sua estrutura uma substituição de cloro na posição 7 da isatina e um hidrogênio no grupo fenil. Encorajados pelos resultados preliminares, sintetizaram uma segunda geração de 41 compostos com variações nos radicais da isatina e do grupo fenil baseados na molécula inicial e os avaliaram frente às cepas de ATCCs de *S. aureus* e *B. subtilis* e isolados clínicos de *E. faecalis* resistente à vancomicina (VRE), *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e pelos menos 15 isolados de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA). Com o resultado dessa nova síntese, foi sugerido que a presença de um átomo halogênio na posição 7 da isatina, aliado a outro halogênio ou grupo metil na posição 4 do anel fenil provocam uma diminuição na CIM frente às bactérias gram-positivas. O estudo conclui que as feniltiossemicarbazonas derivadas da isatina constituem uma nova família de compostos antibacterianos para gram-positivos e, sugere que o mecanismo de ação dos compostos deve ser diferente da vancomicina uma vez que os isolados de VRE responderam com doses baixas de CIM ⁽¹¹⁵⁾.

Khan e colaboradores (2014), sintetizaram uma tiossemicarbazona derivada do 3-acetil-2,5-dimetiltiofenil e a complexaram à Cu(II), Ni(II) e Co(II) e avaliaram sua atividade frente a cepas de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. typhimurium* e *E. coli*. O ligante livre não se apresentou efetivo frente a nenhuma das bactérias testadas, já os complexos metálicos de Cu(II) apresentaram CIM efetiva tanto para os microrganismos gram-positivos quanto os gram-negativos ⁽¹¹⁶⁾. Um outro trabalho, realizado por Mendes e colaboradores (2007), avaliou a atividade antimicrobiana de N(4)-toluil 2-formil- e 2-acetil-piridina tiossemicarbazonas e seus complexos com Cu(II) e, concluíram que a coordenação ao cobre leva a uma significativa diminuição de valores de CIM contra o crescimento de colônias de bactérias gram-negativas *Salmonella typhimurium* ⁽¹¹⁷⁾.

Diversos trabalhos relatam que as atividades biológicas das tiossemicarbazonas estão frequentemente relacionadas à coordenação à metais. Primeiramente, pela lipofilia, que controla a taxa de entrada na célula e é modificada

quando há coordenação. Além disso, o complexo metálico pode ser mais ativo que o ligante livre, ou o complexo metálico pode ser um veículo para a ativação do ligante como agente citotóxico ^(3,7,8,10). A coordenação pode ser, de fato, um fator que melhora a atividade citotóxica das tiossemicarbazonas, porém os estudos de avaliação da atividade antioxidante das tiossemicarbazonas dão indícios de que isso nem sempre é verdadeiro.

Este trabalho teve como objetivo investigar o perfil farmacológico de 18 fenil-tiossemicarbazonas - derivadas do benzaldeído, de aldeídos alfa saturados, da acetona e da isatina - quanto às suas atividades antioxidante e antibacteriana, estudou-se também, as estruturas das moléculas, a fim de determinar quais substituintes podem justificar as atividades apresentadas. Foram identificadas algumas moléculas com atividade antioxidantes e antibacterianas que necessitam de estudos mais aprofundados para elucidar seu modo de atuação. Contudo, os ensaios utilizados restringem-se a experimentos *in vitro* e, a análise de citotoxicidade, foi realizada em um modelo bacteriano, apenas; sendo assim, não se pode garantir ausência de toxicidade em células mais complexas.

9 CONCLUSÃO

A elaboração do panorama tecnológico permitiu considerar que apesar de existir um foco no desenvolvimento de tiossemicarbazonas como moléculas candidatas à processos tecnológicos relacionados à saúde, não foi possível encontrar nenhuma das fenil-tiossemicarbazonas avaliadas protegidas por documentos de patentes até a presente data. Portanto, as moléculas testadas neste trabalho podem, futuramente, tornar-se objeto de um depósito de patente.

A partir da análise dos resultados encontrados neste trabalho quanto ao potencial antioxidante e antibacteriano das 18 fenil-tiossemicarbazonas avaliadas, foi possível considerar:

- As substâncias RDG 49, RDG 91 e RDG 95 apresentaram atividade antioxidante, constituindo assim, substâncias de interesse para estudos de investigação do mecanismo de ação.

- Na investigação da atividade antimicrobiana, as três moléculas mais efetivas foram as RDG 85, RDG 95 e RDG 99, sendo a mais promissora delas a RDG 95, que apresentou a menor CIM frente a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

- Dentre as moléculas que seriam passíveis de proteção é possível sugerir que as que se apresentam como promissoras são as fenil-tiossemicarbazonas do benzaldeído que possuem substituintes cloro na posição 4 do anel fenil e grupos nitro na posição 4 do anel do benzaldeído.

Portanto, pode-se inferir que, no presente trabalho, foram identificadas moléculas com atividades antioxidante e antibacteriana iguais ou superiores as substâncias consideradas padrão de eficiência. Todavia, os estudos restringem-se a resultados *in vitro* e, a análise de citotoxicidade, foi realizada em um modelo procarioto; sendo assim, não se pode garantir ausência de toxicidade em sistemas mais complexos. Dessa forma, cabe a necessidade de estudos mais aprofundados para validação do potencial farmacológico.

REFERÊNCIAS

- 1 - Tenório RP, Góes AJS, Lima JG, Faria AR, Alves AJ, Aquino TM. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Quím. Nova.* 2005; 28(6):1030-1037.
- 2 - Beraldo H, Gambino D. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. *Mini-Rev. in Med.Chem.* 2004; 4:31-39.
- 3 - Li MX, Chen CL, Zhang D, Niu JY, Ji BS. Mn(II), Co(II) and Zn(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: synthesis, characterization, X-ray crystal structures and antitumor comparison. *Euro. Journ. Med Chem.* 2010; 45(7): 3169-77.
- 4 - El-Naggar MM, El-Waseef AM, El-Halafawy KM, El-Sayed IH. Antitumor activities of vanadium(IV), manganese(IV), iron(III), cobalt(II) and copper(II) complexes of 2-methylaminopyridine. *Cancer Lett.* 1998; 133(1):71-6.
- 5 - Kovala-Demertzi D, Demertzis MA, Miller JR, Papadopoulou C, Dodorou C, Filousis G. Platinum(II) complexes with 2-acetyl pyridine thiosemicarbazone: Synthesis, crystal structure, spectral properties, antimicrobial and antitumour activity, *Journ. of Inorg. Biochem.* 2001; 86(2-3):555-563.
- 6 - Kasuga NC, Sekino K, Koumo C, Shimada N, Ishikawa M, Nomiya K. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 4- and 6-coordinate nickel(II) complexes with three thiosemicarbazones and semicarbazone ligands, *Journ. of Inorg. Biochem.* 2001; 84(1-2):55-65.
- 7 - Glisoni RJ, Cuestas ML, Mathet VL, Oubiña JR, Moglioni AG, Sosnik A. Antiviral activity against the hepatitis C virus (HCV) of 1-indanone thiosemicarbazones and their inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Eur. Journ. of Pharma. Scien.* 2012; 47(3):596-603.
- 8 - Rodríguez-Argüelles MC, López-Silva EC, Sanmartín J, Pelagatti P, Zani F. Copper complexes of imidazole-2-, pyrrole-2- and indol-3-carbaldehyde thiosemicarbazones: inhibitory activity against fungi and bacteria. *Journ. of Inorg. Biochem.* 2005; 99(11):2231-9.
- 9 - Glinma B, Kpoviessi SD, Gbaguidi FA, Kapanda CN, Bero J, Quetin-Leclercq J, et al. Trypanocidal and cytotoxic evaluation of synthesized thiosemicarbazones as potential drug leads against sleeping sickness. *Mol. Biol. Rep.* 2010; 41(3):1617-22.
- 10 - Carvalho CS, de Melo EJT, Tenório RP, Góes AJS. Anti-parasitic action and elimination of intracellular *Toxoplasma gondii* in the presence of novel thiosemicarbazone and its 4-thiazolidinone derivatives. *Bra. Journ. of Med. and Bio. Res.* 2010; 43: 139-149.
- 11 - Magalhaes-Moreira DR, Oliveira ADT, Gomes PATM, Simone CA, Villela FS, Ferreira RS, et al. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. *Euro. Journ. of Med. Chem.* 2014; 75: 467-78.

- 12 - Yu Y, Kalinowski DS, Kovacevic Z, Siafakas AR, Jansson PJ, Stefani C, et al. Thiosemicarbazones from the Old to New: Iron Chelators That Are More Than Just Ribonucleotide Reductase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2009; 52: 5271–5294.
- 13 - Pedrido R, Gonzalez-Noya AM, Romero MJ, Martinez-Calvo M, Vazquez Lopez M, et al. Pentadentate thiosemicarbazones as versatile chelating systems. A comparative structural study of their metallic complexes. *Dalton Trans.* 2008: 6776–6787.
- 14 - Bystrom LM, Rivella S. Cancer cells with irons in the fire. *Free Rad. Bio. and Med.* Article in Press. 2014.
- 15 - Amarowicz R, Estrella I, Hernandez T, Robredo S, Troszynska A, Kosinska A, et al. Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*). *Food. Chem.* 2010; 121: 705–711.
- 16 - Shruti S, Archana M, Vivek KB, Savita S. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana*. *Bert. Food. Chem. Toxicol.* 2009; 47: 2338–2343.
- 17 - Hadjipavlou-Litina D, Magoulas GE, Krokidis M, Papaioannou D. Syntheses and evaluation of the antioxidant activity of acitretin analogs with amide bond(s) in the polyene spacer. *Euro. Journ. Med. Chem.* 2010; 45: 298–310.
- 18 - Jaishree V, Ramdas N, Sachin J, Ramesh B. In vitro antioxidant properties of new thiazole derivatives. *Journ. of Saudi Chem. Soc.* 2012; 12: 371-376.
- 19 - Fung DY, Lin CC, Gailani MB. Effect of phenolic antioxidants on microbial growth. *Crit. Rev. Microbiol.* 1985; 12: 153-183.
- 20 - Cantas L, Shah SQA, Cavaco LM, Manaia CM, Walsh F, Popowski M, et al. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front. in Microbio.* 2013; 4: 96.
- 21 - Kuehn BM, IDSA: better, faster diagnostics for infectious diseases needed to curb overtreatment, antibiotic resistance. *Journ. of the Amer. Med. Assoc.* 2013; 310(22): 2385–2386.
- 22 - Rúa J, Fernández-Álvarez L, Castro C, Del Valle P, Arriaga D, García-Armesto MR. Antibacterial activity against foodborne *Staphylococcus aureus* and antioxidant capacity of various pure phenolic compounds. *Food. Pathog. Dis.* 2010; 8(1): 149-57.
- 23 - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE [OMS]. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. *Organização Mundial de Saúde [OMS]. Genebra.* 2014: 257.
- 24 - Zhang R, Eggleston K, Rotimi V, Zeckhauser RJ. Antibiotic resistance as a global threat: evidence from China, Kuwait and the United States. *Global. and Health.* 2006; 2: 6.
- 25 - Bassetti M, Righi E, Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? *Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology.* 2013: 2013: 428–432.
- 26 - Dickson M, Gagnon J. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Disc. [S.I.].* 2004; 3(5): 417-429.

- 27 - Dimasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journ. of Health Econ.* [S.I.]; 2003: 22(2): 151-185.
- 28 - Pieroni JP, Capanema LXL, Reis C, Souza JOB, Silva LG. Terceirização da P&D de Medicamentos: Panorama do Setor de Testes Pré-Clínicos no Brasil. Rio de Janeiro. 2009: 29: 359-392.
- 29 - Nunes JDS, Oliveira LGD. Universidades Brasileiras - Utilização do Sistema de Patentes de 2000 a 2004. Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI: Brasília, 2007.
- 30 - Ferreira AA, Guimaraes ER, Contador JC. Patente Como Instrumento Competitivo E Como Fonte De Informação Tecnológica. *Gest. Prod. São Carlos.* 2009: 16(2): 209-221.
- 31 - INPI. Manual para o Depositante de Patentes. Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI – Diretoria de Patentes, 2015.
- 32 - De Asevedo MOF, Oliveira GS, Alencar MOB, Oliveira J, Freitas R. Prospecção Tecnológica: Utilização De Alcaloides No Tratamento Da Doença De Alzheimer. *GEINTEC – Gestão, Inovação E Tecnologias.* 2014: 4(3): 1017-1025.
- 33 - Costa N, Oliveira S, Silva J, Pacheco A, Abreu M, Ferreira P. Potencial Terapêutico E Tecnológico Da Planta Calotropis procera. *GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias.* 2015: 5.
- 34 - Quintella CM, Meira M, Guimarães AK, Tanajura AS, Silva HRG. Prospecção tecnológica como uma ferramenta aplicada em ciência e tecnologia para se chegar a inovação. *Revista Virtual de Química.* 2011: 3(5): 406-415.
- 35 - Amparo KKK, Ribeiro MCO, Guarieiro LLN. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica. *Perspect. ciênc. inf.* 2012: 17(4): 195-209.
- 36 - IFPMA - International Federation of Pharmaceutical Manufacturers Association. The pharmaceutical innovation platform: sustaining better health for patients worldwide. Outubro de 2004. Disponível em:<http://www.who.int/intellectualproperty/Pharmaceutical_innovation.pdf>. Acesso em: 20/12/2015.
- 37 - Dimasi JA, Grabowski HG. The cost of biopharmaceutical R&D: Is biotech different? *Managerial and Decision Economics.* 2007: 28: 469-479.
- 38 - Barton J, Emanuel E. The patents-based pharmaceutical development process: Rationale, problems, and potential reforms. *Jama-Journal of the American Medical Association [S.I.].* 2005: 294(16): 2075-2082.
- 39 - Simmons E. Prior art searching in the preparation of pharmaceutical patente applications. *Drug Discovery Today [S.I.].* 1998: 3(2): 52-60.
- 40 - Oliveira GL, Suster R. Informações de Patentes: Ferramenta Indispensável para pesquisa e o Desenvolvimento Tecnológico. *Quím. Nova.* 2005: 28: 36-40.
- 41 - Cunha S, Santos AO, Silva TL. Tiossemicarbazonas: Aspectos Estruturais, Farmacológicos e Sintéticos. *Rev. Proc. Quim.* 2011: 5(9); 50-55.

- 42 - Stratulat E, Prisacari V, Revenco M, Dizdari A, Sova S, Corja I, Palamarciuc O. Inventores; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, Depositante. Acetato-(8-formylquinolinethiosemicarbazone)copper(II) compound, exhibiting antibacterial activity, MD, patente, MD2015000025 20150306, 30 de Novembro de 2015.
- 43 - Gulea A, Tapcov V, Graur V, Buzatu-Balachin E, Petrenko P, Ciurmacov I. Inventores. Universitatea De Stat Din Moldova, Institutul De Fizica Aplicata Al Academiei De Stiinte A Moldovei. Depositante. Catena-([mu]-nitrato)[[mu]-(2-hydroxybenzylidene)-4-prop-2-en-1-ylthiocarbazone-S]silver with antimicrobial activity against bacteria Salmonella abony.MD, Patente, MD2012000044 20120531. 30 de Outubro de 2013.
- 44 - Bauer DJ. Clinical experience with the antiviral drug marboran (1-methylisatin-3-thiosemicarbazone) *Annals of New York Academy of Sciences*. 1965: 130; 110–117.
- 45 - Cofre J. Metisazona (Marboran®) en el tratamiento de la diseminación de la vacuna antivariolosa. *Rev. Chilena Pediatría*. 1975: 46; 1.
- 46 - Elliott AM, Foster SD. Thiacetazone: Time to call a halt?: Considerations on the use of thiacetazone in African populations with a high prevalence of human immunodeficiency virus infection, *Tubercle and Lung Disease*. 1996: 77(1): 27-29.
- 47 - Manetti F, Corelli F, Biava M, Fioravanti R, Porretta G C, Botta M. Building a pharmacophore model for a novel class of antitubercular compounds, *Il Farmaco*; 2000: 55(6–7): 484-491.
- 48 - Finch RA, Liu MC, Cory AH, Cory JG, Sartorelli AC. Triapine (3 -Aminopyridine-2-Carboxaldehyde Thiosemicarbazone; 3 - A P) : An Inhibitor Of Ribonucleotide Reductase With Antineoplastic Activity. *Advan. Enzyme Regul.* 1999: 39: 3-12.
- 49 - Nutting CM, van Herpen CM, Miah AB, Bhide SA, Machiels JP, Buter J, et al. Phase II study of 3-AP Triapine in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 2009: 20: 1275-1279.
- 50 - Cornell University, INSEAD, WIPO (2015): *The Global Innovation Index 2015: Effective Innovation Policies for Development*, Fontainebleau, Ithaca, and Geneva. 2015.
- 51 - Beraldo H. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Quim. Nova*. 2004: 27(3): 461-471.
- 52 - Green DA, Antholine WE, Wong SJ, Richardson DR, Chitambar CR. Inhibition of malignant cell growth by 311, a novel iron chelator of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class: Effect on the r2 subunit of ribonucleotide reductase. *Clin. Cancer Res.* 2001: 7: 3574–3579.
- 53 - Antholine W, Knight J, Whelan H, Petering DH. Studies of the reaction of 2-formylpyridine thiosemicarbazone and its iron and copper complexes with biological systems, *Mol. Pharmacol.* 1977: 13: 89-98.
- 54 - Bashari V, Rinke D, Beckford F. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Organometallic Ruthenium (II) Complexes. *Journ. of Undergrad. Chem. Res.* 2006: 2: 99-104.
- 55 - Vieira, AJSC. Radicais oxidantes: da Química à Biologia. *Bol. Soc. Port. Qui., Lisboa*; 2006: 100.

- 56 - Guaratini T, Medeiros MHG, Colepicolo P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: Uso e avaliação de sua eficácia. *Quim. Nova.* 2007; 30(1): 206-213.
- 57 - Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 2002; 82: 47–95.
- 58 - Yoshikawa T, Naito Y. What is oxidative stress? *JMAJ.* 2002; 45: 271–276.
- 59 - Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *Journal of Labor and Clin Med.* 1992; 119; 598-560.
- 60 - Ferreira ALA, Matsubara LS,. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass MedBrasil.* 1997; 43(1): 61-68.
- 61 - Vicedo TB, Correas FJ H. Antioxidants: una terapéutica de futuro? *Nutr. Hosp.* 1997; 12(3): 108-120.
- 62 - Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4th edition ed. Clarendon, Oxford. 2007.
- 63 - Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology.* 1995; 33(7); 601-617.
- 64 - Canterle LP. Erva-mate e atividade antioxidante. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria. 2005: 99.
- 65 - Sampath K, Sathiyaraj S, Jayabalakrishnan C. Evaluation of DNA-binding, DNA cleavage, antioxidant and cytotoxic activity of mononuclear ruthenium(II) carbonyl complexes of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2013; 115; 287–296.
- 66 - Sampath K, Sathiyaraj S, Jayabalakrishnan C. DNA binding, DNA cleavage, antioxidant and cytotoxicity studies on ruthenium(II) complexes of benzaldehyde 4-methyl-3-thiosemicarbazones. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2013; 105; 582–592.
- 67 - Bal-Demirci T, Sahin M, Ozyurek M, Kondakci E, Ulkuseven B. Synthesis, antioxidant activities of the nickel(II), iron(II) and oxovanadium(IV) complexes with N₂O₂ chelating thiosemicarbazones. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2014; 126; 317–323.
- 68 - Calcaterra V, López O, Fernández-Bolanos J, Plata G, Padrón J. Phenolic thio- and selenosemicarbazones as multi-target drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2015; 94: 63-72.
- 69 - Galal AM. Natural product-based phenolic and nonphenolic antimicrobial food preservatives and 1,2,3,4-tetrahydroxybenzene as a highly effective representative: a review of patente literature 2000–2005. *Recent patents on anti-infective drug Discovery.* 2006; 1(2); 231–239.
- 70 - Souza MVN, Vasconcelos TRA. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Quím. Nova.* 2005; 28(4); 678-682.
- 71 - Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G. *Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

- 72 - Guimaraes DO, Momesso LS, Pupo M. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím. Nova*. 2010; 33(3): 667-679.
- 73 - Goodman, Gilman. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10 Ed. Editora McGrawHill, 757-69, 2005.
- 74 - Simmons KJ, Chopra I, Fishwick CWG. Structure-based discovery of antibacterial drugs. *Nature Reviews Microbiology*. 2010; 8; 501-510.
- 75 - De Souza MM, Bella Cruz A, Schuhmacher MB, Kreuger MRO, Freitas RA, Bella Cruz RC. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: Bresolin, TNB, Cechinel Filho V. *Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*. Itajaí: UNIVALI, 2003.
- 76 - Mims C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D, Willians R. *Microbiologia Médica*. 3. ed. São Paulo: Manole, 2005
- 77 - Machado PRL, Carvalho L, Araújo MIAS, Carvalho EM. Mecanismos De Resposta Imune Às Infecções. *An. Bras. Dermatol.* 2004; 79(6): 647-662.
- 78 - Tortora GJ, Funcke BR, Case CI. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2005.
- 79 - Trabulsi LR, Altherthum F. *Microbiologia*. Editora Atheneu, São Paulo, 4ª edição, 2005.
- 80 - Saunders JR. Genetic, evolution of antibiotic resistance. *Br Med Bull*. 1984; 40; 54-60.
- 81 - Ang JY, Ezike E, Asmar BI. Antibacterial resistance. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*. 2004; 3; 229-39.
- 82 - Jacobs MR, Anon J, Appelbaum PC. Mechanisms of resistance among respiratory tract pathogens. *Clin Lab Med*. 2004; 24; 419-53.
- 83 - Freitas CC. Resistência e tolerância a antibióticos em cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes do HUAP-UFF. *Rev Bras Med*. 1989; 46; 312-16.
- 84 - Van Assett GJ. Penicillin tolerance, treatment failure in Group A streptococcal pharyngotonsillitis. *Eur J Clin Infect Dis*. 1996; 15; 107-15.
- 85 - Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005; 41; 120-26.
- 86 - Erson KL. Is bacterial resistance to antibiotic an appropriate example of evolutionary change? *CRSQ*. 2005; 41; 318-26.
- 87 - Rolain JM, Rault D. Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Richettsia* genus. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1063; 222-30.
- 88 - Min LI, Yuping-Lai, Amer EV, David JC, Daniel ES, Michael O. Gram Positive Three-component Antimicrobial Peptidesensing System. *PNAS*. 200; 104; 9469-74.
- 89 - Rossi F, Andreazzi DB. *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*. Editora Atheneu, São Paulo, 2005.

- 90 - Madigan MT. et al. Controle do crescimento microbiano. In: Microbiologia de Brock. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 91 - Silveira GP, Nome F, Gesser JC, Mandolesi M, Terenzi H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Quim. Nova.* 2006; 29; 844-855.
- 92 - Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2000; 31(2): 247-256.
- 93 - Li Q, Tang H, Li Y, Wang M, Wang L F, Xia C G. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of novel Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II) complexes with vitamin K3-thiosemicarbazone, *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2000; 78(2); 167-174.
- 94 - Dittes U, Diemer R, Lenz O, Keppler B K. New bismuth(III) complexes with derivatives of tropolones and thiosemicarbazones against the gastritis-causing bacteria *helicobacter pylori*. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 1995; 59(2–3); 215.
- 95 - Dover L, Alahari A, Gratraud P, Gomes J, Bhowruth V, Reynolds R, et al. EthA, a Common Activator of Thiocarbamide-Containing Drugs Acting on Different Mycobacterial Targets. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(3): 1055-1063.
- 96 - Grzegorzewicz A, Korduláková J, Jones V, Born S, Belardinelli J, Vaquie A, et al. A Common Mechanism of Inhibition of the Mycobacterium tuberculosis Mycolic Acid Biosynthetic Pathway by Isoxyl and Thiacetazone. *The Journal Of Biological Chemistry.* 2012; 287(46); 38434–38441.
- 97 - Gopal P, Dick T. The new tuberculosis drug Perchlozone shows cross-resistance with thiacetazone. *Int. J. Antimicrob Agents.* 2015; 45: 430–433.
- 98 - Cunha S, Silva TL. One-pot and catalyst-free synthesis of thiosecarbazones via multicomponent coupling reactions. *Tetrahedron Letters.* 2009; 50: 2090-2093.
- 99 - Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology.* 1995; 28; 25-30.
- 100 - Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Jiménez JP, Calixto, FDS. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza – CE (Comunicado Técnico on-line: 127) 2007.
- 101 - Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Jiménez JP, Calixto FDS. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS•+. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza - CE(Comunicado Técnico on-line: 128) 2007.
- 102 - Re R, Pelegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine.* 1999; 26; 1231-1237.
- 103 - Clinical and Laboratory Standards Institute – NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI/NCCLS document M07-A10.

- 104 - Prior R, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005: 53; 4190-4302.
- 105 - Nguyen DT, Le TH, Bui TTT. Antioxidant activities of thiosemicarbazones from substituted benzaldehydes and N-(tetra-O-acetyl- β -D galactopyranosyl)thiosemicarbazide. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013: 60; 199-207.
- 106 - Jagadeesh M, Lavanya M, Kalangi SK, Sarala Y, Ramachandraiah C, Reddy AV. Spectroscopic characterization, antioxidant and antitumour studies of novel bromo substituted thiosemicarbazone and its copper(II), nickel(II) and palladium(II) complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015: 135; 180–184.
- 107 - Prathimaa B, Subba Rao Y, Ramesha GN, Jagadeesha M, Reddyb YP, Chalapathia PV, Varada-Reddya A. Synthesis, spectral characterization and biological activities of Mn(II) and Co(II) complexes with benzyloxybenzaldehyde-4-phenyl-3-thiosemicarbazone. *Spectrochimica Acta Part A*. 2011: 79; 39–44.
- 108 - Prathimaa B, Subba-Rao Y, Adinarayana RS, Reddyc YP, Varada-Reddya A. Copper(II) and nickel(II) complexes of benzyloxybenzaldehyde-4-phenyl-3-thiosemicarbazone: Synthesis, characterization and biological activity. *Spectrochimica Acta Part A*. 2010: 77; 248–252.
- 109 - Brodowska K, Skyula A, Garribba E, Lodyga-Chruscinska E, Sójka M. Naringenin Schiff base: antioxidant activity, acid–base profile, and interactions with DNA. *Transition Met Chem*. 2016: 41; 179-189.
- 110 - Yousef TA, Abu El-Reash GM, Al-Jahdali M, El-Bastawesy R. Synthesis, spectral characterization and biological evaluation of Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) and Cd(II) complexes with thiosemicarbazone ending by pyrazole and pyridyl rings. 2014: 129; 163-72.
- 111 - Ilies DC, Shova S, Radulescu V, Pahontu E, Rosu T. Synthesis, characterization, crystal structure and antioxidant activity of Ni(II) and Cu(II) complexes with 2-formilpyridine N(4)-phenylthiosemicarbazone. *Polyhedron*. 2015: 97; 157-166.
- 112 - Barcelos RP, Portella RL, Rosa EJF, Fonseca AS, Bresolin L, Carratu V, et al. Thiosemicarbazone derivate protects from AAPH and Cu³⁺-induced LDL oxidation. *Life Sciences*. 2011: 89; 20-28.
- 113 - Aquino TM. Síntese e Avaliação das Atividades Anti-*Toxoplasma gondii* e Antimicrobiana de Benzaldeído 4-Fenil-3-Tiossemicarbazonas e Derivados 2[(Fenilmetileno)hidrazono]-3-fenil-4-tiazolidinona-5-substituídos. Recife. Tese [Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Síntese e Planejamento de Fármacos]. Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, 2007.
- 114 - Aquino TM, Liesen AP, Silva REA, Lima VT, Carvalho CS, Faria AR, et al. Synthesis, anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones and 2-[(phenylmethylene)hidrazono]-4-oxo-3-phenyl-5-thiazolidineacetic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008: 16(1); 446–456.

115 - Zhang XM, Guo H, Li ZS, Song FH, Wang WM, Dai HQ, et al. Synthesis and evaluation of isatin-b-thiosemicarbazones as novel agents against antibiotic-resistant Gram-positive bacterial species. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 101; 419-430.

116 - Khan SA, Asiri AM, Al-Amry K, Mailk MA. Synthesis, characterization, electrochemical studies, and In vitro antibacterial activity of novel thiosemicarbazone and its Cu(II), Ni(II), Co(II) complexes. *The Scientific World Journal*. vol. 2014; Article ID 592375; 9 pages; 2014.

117 - Mendes IC, Moreira JP, Mangrich AS, Balena SP, Rodrigues BL, et al. Coordination to copper(II) strongly enhances the in vitro antimicrobial activity of pyridine-derived N(4)-tolyl thiosemicarbazones, *Polyhedron*. Vol. 26; Issue 13; P. 3263-3270; 2007.