



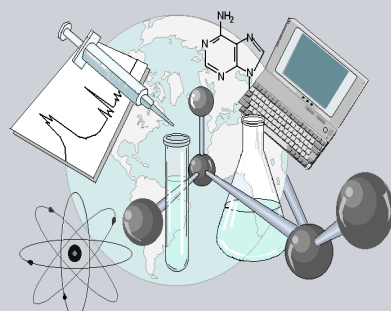
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA,  
ANTITUMORAL E ANTICOLINESTERÁSICA DE 1-  
FENILSSUBSTITUÍDO- $\beta$ -CARBOLINAS CONTENDO NA POSIÇÃO  
-3 O NÚCLEO 1,2,4-TRIAZÓLICO 4,5-DISSUBSTITUÍDO

Tese apresentada por  
**George Brand** ao Programa de Pós-  
Graduação em Química do Departamento  
de Química do Centro de Ciências Exatas  
da Universidade Estadual de Maringá  
como parte dos requisitos para a obtenção  
do título de Doutor em Química.

CE  
CE  
CE



Centro de  
Ciências Exatas

MARINGÁ, ABRIL/2015.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA,  
ANTITUMORAL E ANTICOLINESTERÁSICA DE 1-  
FENILSSUBSTITUÍDO- $\beta$ -CARBOLINAS CONTENDO NA POSIÇÃO -3  
O NÚCLEO 1,2,4-TRIAZÓLICO 4,5-DISSUBSTITUÍDO**

**Doutorando: George Brand**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Sarragiotto**

**Maringá, Abril/2015.**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

B817s Brand, George  
Síntese e avaliação da atividade antileishmania,  
antitumoral e anticolinesterásica de 1-  
fenilssubstituído- $\beta$ -carbolinas contendo na posição -  
3 o núcleo 1,2,4-triazólico 4,5-dissubstituído /  
George Brand. -- Maringá, 2015.  
112 f. : il., figs., tabs. gráfico, esquema +  
Anexo

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Helena  
Sarragiotto.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de  
Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

1.  $\beta$ -carbolina - Síntese orgânica. 2. Atividade  
biológica - Atividade antitumoral - Atividade  
antiprotzoário - Atividade anticolinesterásica. I.  
Sarragiotto, Maria Helena, orient. II. Universidade  
Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas.  
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação  
em Química. III. Título.

CDD 21.ed. 547.593

MN-001709

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Iseldo e Lúcia e a minha irmã, Narjara.*

*Obrigado pelo amor e cuidado*

*Amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde e fundamento.

Aos meus pais Iseldo F. Brand e Lucia F.S. Brand, minha irmã Narjara, pelo amor, orações, apoio e incentivo.

Agradeço especialmente a minha orientadora Prof. Dra. Maria Helena Sarragiotto por ter me aceitar no seu grupo de pesquisa, por ceder espaço em seu laboratório, compartilhar seu conhecimento e sempre me orientar com dedicação.

À minha amiga Valéria, pela amizade, companheirismo e contribuições científicas.

Aos meus amigos de laboratório Franciele, Marcos, Maria Augusta, Letycia, Manuela e Carla, pelo aprendizado, incentivo e amizade.

À Ivânia e Ana pela ajuda e realização dos espectros de RMN.

Aos Prof. Dr. Willian Ferreira da Costa, Emerson Meyer e Cláudio Roberto Novello pela colaboração na realização deste trabalho.

À Fundação Araucária e CAPES pela bolsa de estudo.

Ao Departamento de Química de Universidade Estadual de Maringá, pela disponibilidade para concretização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	I
ABSTRACT.....	III
INDICE DE TABELAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
INDICE DE ESQUEMAS.....	VI
INDICE DE GRÁFICOS.....	VIII
ÍNDICE DE ANEOS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	4
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Aspectos gerais sobre os alvos terapêuticos abordados: leishmaniose/câncer/Doença de Alzheimer.....	6
3.1.1 Leishmaniose.....	6
3.1.2 Câncer.....	9
3.1.3 Doença de Alzheimer (DA) .....	11
3.2 Atividades antileishmania, anticâncer e anticolinesterásica reportadas para derivados $\beta$ -carbolínicos.....	13
3.2.1 Atividade antileishmania de alcalóides tetraidro e $\beta$ - carbolínicos.....	13
3.2.2 Atividade antitumoral de alcalóides $\beta$ - carbolínicos.....	14
3.2.3 Atividade anticolinesterásica. de alcalóides $\beta$ - carbolínicos.....	17
3.3 Derivados 1,2,4-triazólicos 4-5-dissubstituídos.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Síntese e caracterização dos novos derivados 1-fenilssubstituído 3-(1,2,4- triazolo-4,5-dissubstituído) $\beta$ -carbolínicos.....	27
4.1.1 Síntese dos intermediários <b>11a-d</b> .....	27
4.1.2 Preparação e caracterização das 1-fenilssubstituído-3-(4- benzilidenoamino-5-tio/metiltio-1,2,4-triazolil) $\beta$ -carbolinas (13).....	33
4.1.3 Preparação e caracterização das 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)- 1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazóis (14).....	51
4.1.4 Preparação e caracterização das 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)- 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-6-tiol/tionas (15).....	56
4.1.5 Preparação e caracterização das 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)- 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-ona (16).....	60
4.2 Ensaio biológicos.....	67

4.2.1 Avaliação da atividade antitumoral.....	67
4.2.2 Avaliação da atividade antileishmania.....	70
4.2.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica.....	71
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>74</b>
5.1 Instrumentação .....	74
5.2 Materiais e Métodos.....	74
5.3 Sínteses.....	75
5.3.1 Triptofano metil éster (63) .....	75
5.3.2 Preparação das 1-(fenilssubstituído)-3-carbometóxi-tetraidro- $\beta$ - carbolinas (64).....	75
5.3.3 Preparação das 1-(fenilssubstituído)-3-carbometóxi- $\beta$ -carbolinas (65).....	75
5.3.4 Preparação das 1-(fenilssubstituído)- $\beta$ -carbolina-3-carboidrazidas (66).....	76
5.3.5 Procedimento geral para a preparação de 1-fenilsubstituído-3-(4-amino- 5-tiol-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolinas (11).....	76
5.3.6 Preparação da 1-fenil-3-(4-amino-5-metiltio-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (75) .....	77
5.3.7 Preparação das 1-fenilsubstituídos-3-(4-benzilidenoamino-substituído- 5-metiltio-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina 76, 77, 79 e 80.....	77
5.3.8 Preparação das 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3- d]-1,2,3,4-tiazóis (14).....	79
5.3.9 Preparação das 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4- b][1,3,4]tiadiazol-6-tiol/tionas (15).....	79
5.3.10 Obtenção do composto 85.....	80
5.3.11 Obtenção do compostos 88 .....	80
5.4 Ensaios Biológicos.....	81
5.4.1 Determinação da atividade antitumoral.....	81
5.4.2 Determinação atividade frente a <i>Leshmania amazonensis</i> .....	82
5.4.3 Determinação da atividade anticolinesterásica.....	83
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>99</b>

## RESUMO

### Síntese e avaliação da atividade antileishmania, antitumoral e anticolinesterásica de 1-fenilssubstituído- $\beta$ -carbolinas contendo na posição-3 o núcleo 1,2,4-triazólico 4,5-dissubstituído

*Palavras-chave:*  $\beta$ -carbolina, 1,2,4-triazol 4,5-dissubstituído, síntese, atividade biológica

No presente trabalho realizamos a síntese e avaliação da atividade antileishmania, antitumoral e anticolinesterásica de uma série de derivados  $\beta$ -carbolínicos-1-fenilssubstituídos contendo na posição-3 o núcleo 1,2,4-triazol 4,5-dissubstituído. As 1-fenilssubstituído-3-(4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazol-3-il)  $\beta$ -carbolinas **11**, intermediários para a síntese dos 1,2,4-triazóis 4,5-dissubstituídos propostos, foram obtidas a partir da reação de esterificação do L-triptofano comercial (**12**), seguido da condensação de Pictet-Spengler do L-triptofano esterificado (**63**) com aldeídos aromáticos substituídos. A oxidação das tetraidro- $\beta$ -carbolinas (**64**), seguido do tratamento das  $\beta$ -carbolinas (**65**) com hidrazina hidratada forneceu as  $\beta$ -carbolina-3-carboidrazidas (**66**), as quais forneceram as 1-fenilssubstituído-3-(4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazol-3-il)  $\beta$ -carbolinas (**11**) através da ciclização intramolecular em meio básico dos correspondentes ditiocarbazatos (**67**). As bases de Schiff (**76**, **77**, **79** e **80**) foram obtidas a partir da condensação da 1-fenil-3-(4-amino-5-metiltio-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (**75**) com diferentes aldeídos aromáticos em micro-ondas. A formação do heterociclo 1,2,4-triazolo-[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazol foi possível através da diazotação/ciclização do intermediário **11**, fornecendo os 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazóis (**14**). As 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-6-tiol/tionas (**15**) foram preparadas pela reação dos 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazóis (**11**) com dissulfeto de carbono, na presença de hidróxido de sódio, em metanol. As condições testadas para introdução do heterociclo fundido 1,2,4-triazolo-[3,4-b]-1,3,4-tiadiazin-6-ona na posição-3 do núcleo  $\beta$ -carbolínico, a partir da reação de **11** com ácido cloroacético ou bromoacetato de etila forneceram apenas os produtos S-alkilados. A formação dos compostos sintetizados foi confirmada com base nas análises dos dados espectroscópicos de EM, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC. Os compostos sintetizados **76,77** e **79** e **14a-c** foram submetidos à avaliação da atividade antitumoral *in vitro* frente a oito células tumorais humanas: pulmão (NCI-460), colo (HT-29), próstata (PC-3), mama (MCF-7), rim (786-0), glioma (U-251), ovário resistente (NCI/ADR-RES), ovário (OVCAR-3). Todos os



derivados testados apresentaram uma potente atividade frente à linhagem de células tumorais de mama (MCF-7) com  $IC_{50}$  na faixa de 2,07-4,75  $\mu$ m. Os compostos **11a-d** foram avaliados frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, sendo mais ativo o derivado **11b** com  $IC_{50}$  igual a 6,98  $\mu$ M. O potencial anticolinesterásico *in vitro*, como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) revelou que todos os derivados inibiram a enzima com valores de  $IC_{50}$  na faixa de 17,7 a 97,7  $\mu$ M.

## ABSTRACT

### Synthesis and antileishmania, antitumor and anticholinesterase activities evaluation of 1-phenyl substituted $\beta$ -carbolines bearing the 4,5-disubstituted-1,2,4-triazole nucleus at position-3

In the present work we synthesized and evaluated the antileishmanial, antitumor and anticholinesterase activities of 1-phenyl substituted  $\beta$ -carbolines bearing a 4,5-substituted 1,2,4-triazole at position-3. The 1-phenyl substituted 3-(4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol-3-yl)  $\beta$ -carbolines (**11**), intermediates for the preparation of the proposed derivatives, were prepared by the Pictet-Spengler condensation, under acid catalysis, of *L*-tryptophan methyl ester with aromatic aldehydes, followed by oxidation of 3-carbomethoxy-tetrahydro- $\beta$ -carbolines (**64**), to give the 3-carbomethoxy- $\beta$ -carbolines (**65**). Treatment of **65** with hydrazine hydrate gave the  $\beta$ -carboline-3-carbohydrazides **66**, which afforded the 1-phenyl substituted 3-(4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol-3-yl)  $\beta$ -carbolines (**11**) by intramolecular cyclization of their corresponding dithiocarbazates (**67**). The Schiff bases (**76**, **77**, **79** e **80**) were obtained from the condensation of 1-phenyl-3-(4-amino-5-thiomethyl-1,2,4-triazol-3-yl)  $\beta$ -carboline (**75**) with aromatic aldehydes, under microwave irradiation, in DMF. The diazotization reaction, followed by cyclization, of the intermediates **11** with sodium nitrite, in acidic medium, afforded the 3-(1-substituted-9*H*- $\beta$ -carbolin-3-yl)-1,2,4-triazolo[4,3-*d*]-1,2,3,4-thiatriazoles (**14**). The 3-(1-substituted-9*H*- $\beta$ -carbolin-3-yl)-1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazole-6-thiol/thiones (**15**) were prepared from the reaction of 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazoles (**11**) with carbon disulfide in sodium hydroxide as base. Attempts to introduce the fused heterocycle 1,2,4-triazolo-[3,4-*b*]-1,3,4-thiadiazin-6-one at position-3 of  $\beta$ -carboline nucleus by reaction of **11** with chloroacetic acid or ethyl bromoacetate afforded only the S-alkylated products. All compounds were characterized by their spectroscopic data (MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and HSQC). Compounds **76**, **77** and **79**, and **14a-c**, were evaluated for their antitumor activity *in vitro* against eight human tumor cell lines: lung (NCI-460), colon (HT-29), prostate (PC-3), breast (MCF-7), renal (786-0), glioma (U-251), resistant ovarian (NCI/ADR-RES), ovarian (OVCAR-3). All compounds showed potent activity against the tumor breast cells (MCF-7) with  $\text{GI}_{50}$  in the 2.07 to 4.75  $\mu\text{M}$ . The derivatives **11a-d** were evaluated against promastigote forms of *Leishmania amazonensis*, being more active the derivative **11b**, with  $\text{GI}_{50}$  of 6.98  $\mu\text{M}$ . The assays results for compounds **11a-d** towards acetylcholinesterase inhibition showed that all derivatives inhibited the enzyme with  $\text{GI}_{50}$  values in the range of 17,7 to 97,7  $\mu\text{M}$ .

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Medicamentos empregados na terapia da leishmaniose e seus respectivos nomes químicos/comerciais.....	8
<b>Tabela 2.</b> Características gerais dos inibidores das colinesterases.....	12
<b>Tabela 3:</b> Dados de inibição frente AChE e BChE publicados por Otto e col. (2014).....	18
<b>Tabela 4:</b> Dados de inibição para AChE publicados por Rook e col. (2010).....	19
<b>Tabela 5.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (300/75,5 MHz) para 3-(4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazol-3-il)-1-fenil-β-carbolina ( <b>11c</b> ).....	33
<b>Tabela 6.</b> Condições testadas nas tentativas de obtenção dos derivados <b>13</b> .....	34
<b>Tabela 7.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (300/75,5 MHz) para <b>75</b> .....	40
<b>Tabela 8.</b> Condições testadas e resultados obtidos nos procedimentos usados para preparação das bases de Schiff 5-S-metiladas.....	40
<b>Tabela 9.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (300/75,5 MHz) para 1-fenil-3-[4-(2-clorofeniletildenioamino)-[1,2,4]-triazolo-5-metil-tio]-β-carbolina ( <b>76-E</b> ).....	44
<b>Tabela 10.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (300/75,5 MHz) para 1-fenil-3[4-(benzilidenoamino-5-metiltio-[1,2,4]-triazolo-)]-β-carbolina <b>77-(E)</b> .....	46
<b>Tabela 11.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (300/75,5 MHz) para 1-fenil-3-(5-metiltio-1,2,4-triazolo-3-il)-β-carbolina ( <b>78</b> ).....	50
<b>Tabela 12.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (300/75,5 MHz) para 3-(1-fenil-9H-β-carbolin-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazole ( <b>14a</b> ).....	54
<b>Tabela 13.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (300/75,5 MHz) para para 3-(1-fenil-9H-β-carbolin-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazole-6-tiol/tiona ( <b>15a</b> ).....	59
<b>Tabela 14.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (300/75,5 MHz) para 1-fenil-3[4-amino-5-S-tilmetiletóxicarbonil-1,2,4-triazolil]-β-carbolina <b>91</b> .....	65
<b>Tabela 15.</b> Valores de GI <sub>50</sub> (em μM) obtidos nos ensaios de atividade antitumoral <i>in vitro</i> para os derivados <b>76, 77, 79</b> e <b>14a-b</b> .....	67
<b>Tabela 16.</b> Valores de GI <sub>50</sub> (em μM) obtidos nos ensaios de atividade antitumoral <i>in vitro</i> para os derivados β-carbólicos <b>11a,b</b> e <b>75</b> .....	69
<b>Tabela 17:</b> Valores de IC <sub>50</sub> (μM) frente a <i>L.amazonensis</i> para os compostos <b>11a-d</b> .....	70
<b>Tabela 18:</b> Valores de IC <sub>50</sub> (μM) para inibição frente AChE, compostos <b>11 a-d</b> .....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas básicas do núcleo tetraidro- $\beta$ -carbolina (1) e $\beta$ -carbolina (2).....	1
<b>Figura 2.</b> Estruturas básicas dos compostos tetraidro- $\beta$ -carbolínicos e $\beta$ -carbolínicos 1,3-dissubstituídos sintetizados e avaliados biologicamente em estudos anteriores.....	2
<b>Figura 3.</b> Derivados $\beta$ -carbolinas contendo a unidade 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazol sintetizados por Formagio e col.(2008).....	3
<b>Figura 4:</b> Fármacos comerciais usados no tratamento de Alzheimer.....	13
<b>Figura 5:</b> Derivados sintetizados por Xiao e col [15] ativos frente à células tumorais humanas.....	15
<b>Figura 6:</b> Derivados sintetizados por Cao e col. [16 e 17] ativos frente à células tumorais humanas.....	16
<b>Figura 7:</b> Derivados sintetizados por Chen e col. [21] ativos frente à células tumorais humanas.....	17
<b>Figura 8:</b> Derivados sintetizados por Shott e col. [63] com potencial inibição <i>in vitro</i> frente AChE e BChE.....	19
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>11c</b> .....	32
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>11c</b> .....	32
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>73</b> .....	35
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para o produto obtido na <b>Entrada 2</b> .....	36
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) da reação de <b>11a</b> com benzaldeído, sob catálise ácida – $\text{H}_2\text{SO}_4$ .....	37
<b>Figura 14.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) da reação de <b>11a</b> com benzaldeído, sob catálise ácida – TsOH.....	38
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>75</b> .....	39
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>75</b> .....	39
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>77-E</b> e <b>77-Z</b> ..	42
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) do produto <b>76-(E)</b> obtido da condensação de <b>75</b> com <i>o</i> -clorobenzaldeído.....	43
<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz, DMSO- $d_6$ ) do produto <b>76-(E)</b> obtido da condensação de <b>75</b> com <i>o</i> -clorobenzaldeído.....	43
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>77-(E)</b> .....	45
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>77-(E)</b> .....	45
<b>Figura 22.</b> Mapa de contorno de HSQC para <b>77-(E)</b> .....	46
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>78</b> .....	49
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>78</b> .....	49
<b>Figura 25.</b> Mapa de contorno de HSQC para <b>78</b> .....	50
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>14a</b> .....	53
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>14a</b> .....	54
<b>Figura 28.</b> Espectro de massas (IE, 70eV) para <b>14a</b> .....	55
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>15a</b> .....	58
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>15a</b> .....	59
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>85</b> .....	61
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>88</b> .....	64
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>88</b> .....	65

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Estruturas das séries dos novos derivados $\beta$ -carbolínicos-1,2,4-triazol-4,5-substituídos propostos.....	5
<b>Esquema 2.</b> Síntese de triazolo-tiadiazóis a partir do 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazóis.....	20
<b>Esquema 3.</b> Síntese de triazolo-tiadiazinas a partir do 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazóis.....	21
<b>Esquema 4.</b> Síntese de triazolo-tiadiazepinas a partir do 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazóis.....	22
<b>Esquema 5.</b> Síntese de 1,2,4-triazol-1,3,4-tiadiazólicos a partir do 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazóis.....	23
<b>Esquema 6.</b> Síntese de 1,2,4-triazol-1,3,4-tiadiazólicos a partir do 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazóis.....	24
<b>Esquema 7.</b> Síntese descrita por Ji e col. (2013) [1] para obtenção de benzilidenoamino-1,2,4-triazóis.....	25
<b>Esquema 8.</b> Síntese descrita por Al-Harbi [2] para obtenção benzilidenoamino-triazóis ( <b>61</b> ) e de 1,2,4,-triazol[3,4,-b][1,3,4]tiadiazol-6-tiol ( <b>62</b> ).....	26
<b>Esquema 9.</b> Rota para a síntese dos derivados 1-fenilsubstituídos-3-(4-amino-5-tiol-1,2,4-triazolo-3-il)- $\beta$ -carbolina ( <b>11</b> ).....	28
<b>Esquema 10.</b> Obtenção de tetraidro- $\beta$ -carbolinas via condensação de Pictet-Spengler.....	29
<b>Esquema 11.</b> Mecanismo para síntese das tetraidro- $\beta$ -carbolinas via reação de Pictet-Spengler. ....	29
<b>Esquema 12.</b> Mecanismo proposto para formação do núcleo 4-amino-5-tioxo-1,2,4-triazolico .....	31
<b>Esquema 13.</b> Metodologias para síntese de derivados 4-benzilidenoamino-substituídos a partir de 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazóis.....	34
<b>Esquema 14.</b> Obtenção do produto N-acetilado <b>73</b> a partir de <b>11a</b> .....	35
<b>Esquema 15.</b> Produtos de ciclocondensação resultantes da reação de <b>11a</b> com benzaldeído, sob catálise ácida ( <b>Entradas 3 e 4</b> ).....	37
<b>Esquema 16.</b> Síntese do produto S-metilado <b>75</b> a partir de <b>11a</b> .....	38
<b>Esquema 17.</b> Mecanismo para formação de bases de Schiff a partir 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazóis.....	41
<b>Esquema 18.</b> Mecanismo proposto para formação de <b>78</b> .....	48
<b>Esquema 19.</b> Proposta de pirólise em fase gasosa de 4-arilidenoimino-1,2,4-3-(2H)-onas .....	48
<b>Esquema 20.</b> Metodologias descritas para a obtenção de 1,2,4-triazolo-[3,4-d]-1,2,3,4-tiatriazol ( <b>82</b> ).....	51
<b>Esquema 21.</b> Síntese das 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazóis ( <b>14a-b</b> ) .....	52
<b>Esquema 22.</b> Mecanismo proposto para formação dos derivados <b>14a-b</b> .....	52
<b>Esquema 23.</b> Proposta de fragmentação para 3-(1-fenil-9H- $\beta$ -carbolin-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazole ( <b>14a</b> ).....	55
<b>Esquema 24.</b> Metodologias descritas para a obtenção de 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-6-tiol/tiones ( <b>83</b> ).....	56
<b>Esquema 25.</b> Rota para síntese dos derivados <b>15a e b</b> .....	57
<b>Esquema 26.</b> Mecanismo proposto para formação dos derivados <b>15</b> .....	57
<b>Esquema 27.</b> Metodologias descritas para a preparação de 1,2,4-triazolo-[3,4-b]-1,3,4-tiadiazin-6-onas ( <b>84</b> ).....	60
<b>Esquema 28.</b> Condições testadas para a preparação de 16a: a) ClCH <sub>2</sub> COOH, AcONa, EtOH, refluxo; b) ClCH <sub>2</sub> COOH, KOH, EtOH, refuxo; c) ClCH <sub>2</sub> COOH, Et <sub>3</sub> N, DMF; d) AcOH, DMF; e) TsOH, DMF; f) K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , DMF, MW; g) DCC, THF; h) AcONa, DMSO.....	62

<b>Esquema 29.</b> Síntese reportadas para obtenção de 1,2,4-triazolo-[3,4- <i>b</i> ]-1,3,4-tiadiazin-6-ona]( <b>87</b> ) e/ou intermediários não-ciclizados a partir de 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis.....	<b>63</b>
<b>Esquema 30.</b> Metodologia empregada para síntese de 16: a) BrCH <sub>2</sub> COOEt, KOH, EtOH, refluxo; b) KOH, DMF.....	<b>63</b>
<b>Esquema 31.</b> Reações envolvidas na avaliação da atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman.....	<b>71</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Gráfico da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>versus</i> crescimento celular para o ensaio da avaliação da atividade antitumoral do composto 77.....	<b>68</b>
<b>Gráfico 2.</b> Gráfico da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>versus</i> crescimento celular para o ensaio da avaliação da atividade antitumoral composto 14a.....	<b>68</b>
<b>Gráfico 3.</b> Gráfico da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) <i>versus</i> crescimento celular para o ensaio da avaliação da atividade antitumoral o composto 14b....	<b>69</b>
<b>Gráfico 4.</b> Gráfico da % de inibição <i>versus</i> Log [ ] para a 11d.....	<b>72</b>
<b>Gráfico 5.</b> Gráfico da % de inibição <i>versus</i> Log [ ] para a Rivastigmina..	<b>72</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A.1</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>11a</b> ..	<b>100</b>
<b>Anexo A.2</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>11a</b> .....	<b>101</b>
<b>Anexo A.3</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>11b</b> ..	<b>102</b>
<b>Anexo A.4</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>11b</b> .....	<b>103</b>
<b>Anexo A.5</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>11d</b> ..	<b>104</b>
<b>Anexo A.6</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>11d</b> .....	<b>105</b>
<b>Anexo A.7</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>79</b> .....	<b>106</b>
<b>Anexo A.8</b> Mapa de Contorno de HSQC para <b>79</b> .....	<b>108</b>
<b>Anexo A.9</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>14b</b> ...	<b>109</b>
<b>Anexo A. 10</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>14b</b> .....	<b>110</b>
<b>Anexo A.11</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>15b</b>	<b>111</b>
<b>Anexo A.12</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para <b>15b</b> .....	<b>112</b>



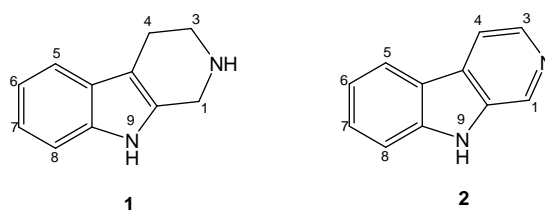
## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>AcOH</b>	Ácido acético
<b>AcONa</b>	Acetato de sódio
<b>CCDA</b>	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
<b>CC</b>	Cromatografia em Coluna
<b>COSY</b>	H-H correlation spectroscopy
<b><i>d</i></b>	Dupleto
<b><i>dd</i></b>	Duplo Dupleto
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração do fármaco que causa a inibição de 50% do crescimento celular
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento
<b><i>m</i></b>	Multiplete
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b><i>s</i></b>	Simpleto
<b><i>t</i></b>	Triplete
<b>TFA</b>	Ácido Trifluoroacético
<b>TsOH</b>	Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>δ</b>	Deslocamento Químico
<b>δ<sub>H</sub></b>	Deslocamento Químico de Hidrogênio
<b>δ<sub>C</sub></b>	Deslocamento Químico de Carbono-13
<b>EM</b>	Espectrometria de Massas
<b>SRB</b>	Sulforodamina B

## 1. INTRODUÇÃO

Alcalóides tetraidro- $\beta$ -carbolínicos (1) e  $\beta$ -carbolínicos (2) representam uma grande classe de compostos indólicos amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em espécies vegetais, animais marinhos, insetos e mamíferos, bem como em alimentos e em tecidos e fluidos corporais (**Figura 1**) [3].

**Figura 1.** Estruturas básicas do núcleo tetraidro- $\beta$ -carbolina (1) e  $\beta$ -carbolina (2)



Devido ao amplo espectro de propriedades bioquímicas e farmacológicas demonstradas por compostos desta classe, várias pesquisas têm sido desenvolvidas para a obtenção destes, seja pela síntese ou pelo isolamento a partir de produtos naturais. Dentre as propriedades farmacológicas apresentadas, destacam-se suas ações como antivirais [4-9], antiprotozoários [10-13] e, principalmente, antitumorais [14-23]. Mais recentemente, os estudos tem focado a ação desta classe de compostos como inibidores da monoamina oxidase (MAO), das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, estas associadas à Doença de Alzheimer (DA), bem como os efeitos protetores devido à inibição enzimática e às suas propriedades antioxidantes [24-27].

O potencial farmacológico de alcaloides tetraidro- $\beta$ -carbolínicos e  $\beta$ -carbolínicos despertou nosso interesse pelo seu estudo, tendo como foco inicial o desenvolvimento de novos agentes parasiticidas e antitumorais a partir desta classe de compostos. Esta linha de pesquisa vem sendo desenvolvida desde 2003, em colaboração com pesquisadores do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá e do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas, que são responsáveis pelos ensaios de atividade.

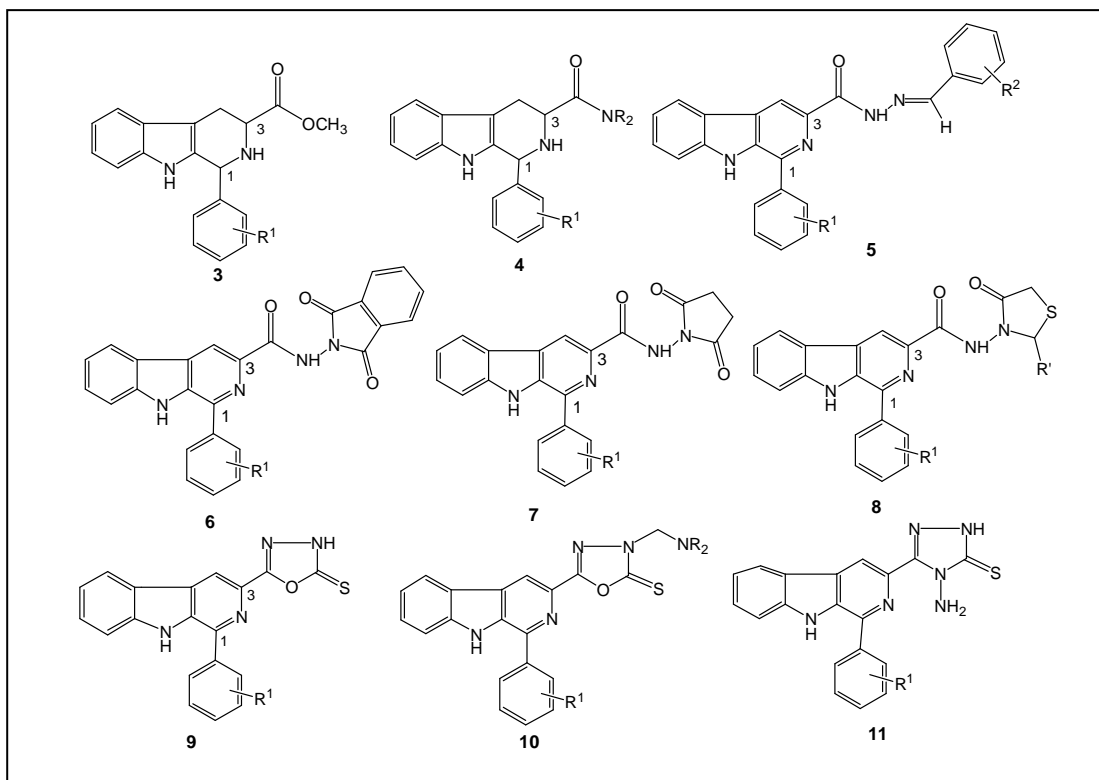
Nos trabalhos desenvolvidos, realizamos a síntese e a avaliação da atividade biológica *in vitro* de algumas séries de compostos contendo diferentes substituintes nas posições-1 e -3 do núcleo  $\beta$ -carbolínico, uma vez que, segundo a literatura, a presença de determinados substituintes nas posições -1, -2, -3 e/ou -9 do referido

núcleo pode dar origem a derivados mais ativos e com menor toxicidade. Na **Figura 2** encontram-se as estruturas básicas das séries de compostos sintetizados.

Dentre os trabalhos realizados por nosso grupo, podemos citar a síntese e a avaliação da atividade antitripanossômica e antileishmania de uma série de alcalóides tetraidro  $\beta$ -carbolínicos contendo o grupo fenil, com diferentes substituintes, na posição-1 e o grupo carbometóxi (**3**) e N-alkilcarboxamida (**4**) na posição-3, com resultados significativos de atividade frente a *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* [28,29,30,31].

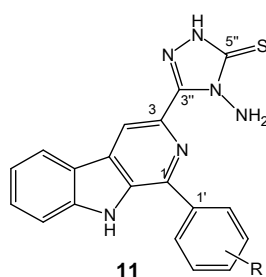
Além disso, várias séries de compostos  $\beta$ -carbolínicos contendo os grupos benzilidenocarboidrazida (**5**), imida-carboxamida (**6 e 7**), 4-tiazolidinona (**8**), 1,3,4-tio-oxadiazolil (**9**) e suas respectivas bases de Mannich (**10**), 4-amino-5-tio-1,2,4-triazolil (**11**), na posição-3, foram sintetizadas e avaliadas *in vitro* frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas. Vários dos derivados obtidos apresentaram potente atividade antitumoral, com valores de IC<sub>50</sub> (concentração para a inibição de 50% do crescimento celular) inferiores a 5  $\mu$ M [32-37].

**Figura 2.** Estruturas de compostos tetraidro- $\beta$ -carbolínicos e  $\beta$ -carbolínicos 1,3-dissubstituídos sintetizados e avaliados biologicamente em estudos anteriores.



Dentre as séries de compostos apresentados na **Figura 3**, destaca-se o potencial biológico observado para a série de  $\beta$ -carbolinas contendo a unidade 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol (**11**) sintetizada no trabalho desenvolvido por Formagio *et al.* (2008) [32]. Para os compostos sintetizados (**11**), os derivados contendo os grupos: -fenila, *o*-clorofenila, *p*-N,N-dimetilaminofenila e *p*-hidroxifenila, na posição-1 da unidade  $\beta$ -carbolina apresentaram valores significantes de inibição frente a linhagens de células carcinogênicas de pulmão, ovário e rim com IC<sub>50</sub> na faixa de 0,26 a 6,80  $\mu$ M, conforme apresentado na **Figura 3**.

**Figura 3.** Derivados  $\beta$ -carbolinas contendo a unidade 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol sintetizados por Formagio e col.(2008) [32].



R	H	<i>o</i> -Cl	<i>p</i> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>p</i> -OH
	GI <sub>50</sub> 1,59 $\mu$ M	GI <sub>50</sub> 6,80 $\mu$ M	GI <sub>50</sub> 0,97 $\mu$ M	GI <sub>50</sub> 0,26 $\mu$ M
	Pulmão (NCI-460)	Ovário (OVCAR)	Rim (786-0)	Rim (786-0)

Derivados 1,2,4-triazolínicos com substituintes nas posições-3 e -5 têm chamado a atenção dos pesquisadores nas últimas duas décadas. A presença dos centros nucleofílicos amino (posição-4) e mercapto (posição-5) no núcleo triazólico, como no caso da série de derivados **11**, fazem deste núcleo um importante material de partida para a construção de novos derivados, incluindo derivados contendo sistemas condensados (núcleos fundidos). Além disto, as atividades biológicas de vários derivados 1,2,4-triazóis e seus análogos N-substituídos ou, contendo sistemas fundidos, tem sido amplamente investigadas por possuírem diversas aplicações no campo da Química Medicinal.

Os resultados promissores obtidos por nosso grupo em relação à atividade antitumoral para a série de 3-(4-amino-5-tioxi-1,2,4-triazolil)  $\beta$ -carbolinas (**11**); o potencial do núcleo 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol como precursor para novos derivados, além da necessidade de obtenção de novos agentes antileishmania, anticâncer e anticolinesterásicos motivaram a continuidade de estudos envolvendo a síntese e a relação estrutura-atividade de compostos  $\beta$ -carbolínicos contendo o núcleo 1,2,4-triazol-4,5-substituído na posição-3.

## 2. OBJETIVOS

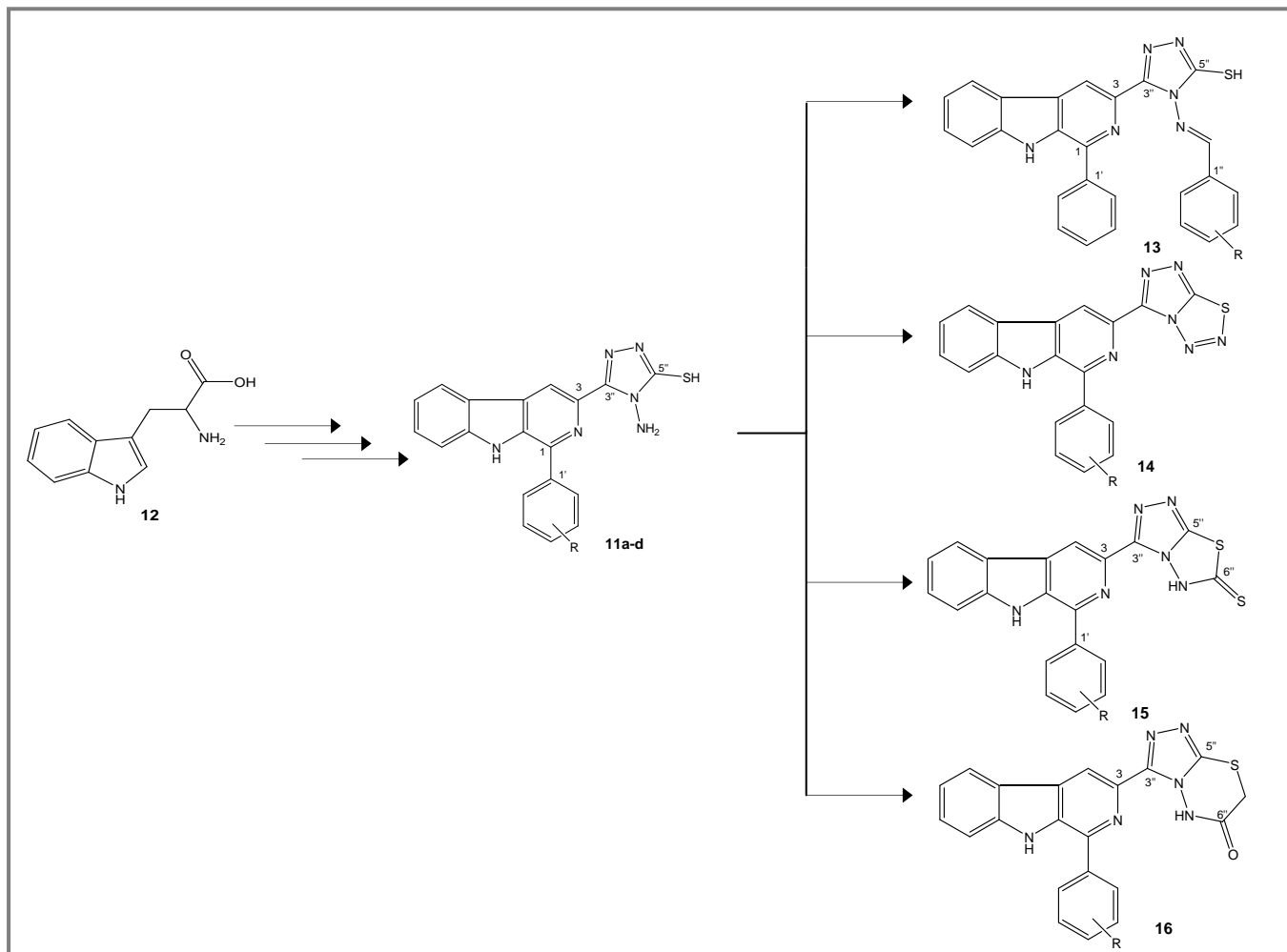
### Geral:

- ✓ Síntese, avaliação da atividade biológica e estudos de relação estrutura-atividade de novos derivados  $\beta$ -carbolínicos contendo o heterociclo 1,2,4-triazol-4,5-dissubstituído na posição -3 (**Esquema 1**).

### Específicos:

- ✓ Preparação de uma série de derivados 1-fenilssubstituído  $\beta$ -carbolínicos contendo na posição-3 o grupo 4-amino-5-tioxo/tio-1,2,4-triazol (**11**), partir do *L*-triptofano (**12**);
- ✓ Preparação de uma série de 1-fenilsubstituído-3-(4-benzilidenoamino-5-tio/tioxo- $\beta$ -1,2,4-triazol-3-il)  $\beta$ -carbolinas (**13**);
- ✓ Preparação de uma série de 3-(1-substituído-9*H*- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazóis (**14**);
- ✓ Preparação de uma série de 3-(1-substituído-9*H*- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-6-tiol/tionas (**15**);
- ✓ Preparação de uma série de 3-(1-substituído-9*H*- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-ona (**16**);
- ✓ Realização de ensaios biológicos *in vitro* para a avaliação das atividades antileishmania, antitumoral e anticolinesterásica dos compostos sintetizados;
- ✓ Realização de estudos de relação estrutura/atividade dos compostos sintetizados.

**Esquema 1.** Estruturas das séries dos novos derivados  $\beta$ -carbólicos-1,2,4-triazol-4,5-substituídos propostos.



### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Aspectos gerais sobre os alvos terapêuticos abordados: leishmaniose/câncer/Doença de Alzheimer**

##### **3.1.1 Leishmaniose**

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por parasitas do gênero *Leishmania* da família Trypanosomatidae e que apresenta características clínicas e epidemiológicas diversas em cada área geográfica. A doença está associada à desnutrição, condições precárias de habitação, sistemas imunológicos comprometidos e aos locais aonde recursos financeiros não chegam [38].

A contaminação ocorre através de protozoários parasitas de mais de 20 espécies de *Leishmania* e as leishmanioses são transmitidas aos seres humanos por insetos hematófagos (flebotomos ou flebotomíneos infectados femininos) conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. Os protozoários são organismos dimórficos: promastigota ou flagelada (encontrada no tubo digestivo do inseto vetor) e outra aflagelada ou amastigota (observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados). O período de incubação da doença no ser humano é, em média, de dois a três meses, podendo variar de duas semanas a dois anos [39,40].

Existem três formas principais da doença: visceral – Leishmaniose visceral (LV) conhecida como kala-azar, forma mais grave da doença e fatal, caracterizada por ataques de febre irregulares, perda de peso, aumento do fígado e baço, levando também a anemia; cutânea (LC) forma mais comum, formação de úlceras nas partes expostas do corpo como, desfiguração e cicatrizes permanentes e a mucocutânea (LM), forma mais destrutiva da doença causando mutilação parcial ou total das mucosas do nariz, boca e garganta [38].

As leishmanioses afetam 12 milhões de pessoas no mundo e estão distribuídas em 88 países. A incidência anual mundial de novos casos é de cerca de 2 milhões, sendo 1,5 milhões de casos de LC e 500 mil de LV e, segundo a OMS, o número de casos de leishmaniose não relatados é aproximadamente 5 vezes maior do que os números oficiais. Estimam-se 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes anualmente [38].

O Brasil é um dos países com as maiores taxas de dados reportados e apresenta uma média de 28.000 novos casos de LC e 2.000 novos casos de LV por

ano. No ano de 2009, o estado do Paraná notificou 409 casos de leishmaniose tegumentar americana, representando 88% dos casos registrados na região Sul do País [41,42].

Inicialmente o tratamento da doença era feito com compostos à base de antimônio (antimoniais pentavalentes –  $Sb^{5+}$ ) como o antimoniato de metilglucamina, também utilizado nos primeiros casos de leishmania no Brasil. A necessidade de alternativa farmacológica deve-se à elevada toxicidade e efeitos colaterais indesejáveis quando administrado. Em outros lugares do mundo, essa ainda continua sendo a alternativa para o tratamento nos casos de LV e LC [43].

Outros medicamentos vêm sendo utilizados no tratamento das diversas formas da doença, entre os quais se destacam a pentamidina, anfotericina B, miltefosina e a paromomicina (**Tabela 1**) [44].

Os medicamentos utilizados são na maioria tóxicos e não eliminam o parasita de indivíduos infectados. As principais desvantagens associadas com Anfotericina B são alto custo, risco de vida após a primeira dose (anafilaxia) e nefrotoxicidade (efeito venenoso sobre os rins). A pentamidina é inativa oralmente e pode apresentar toxicidade renal, hepática e pancreática juntamente com hipotensão e disglucemia. Miltefosina, originalmente usada como anticâncer, é o primeiro leishmanicida ativo oral, que tem boa eficácia frente LV e LC, mas apresenta baixo índice terapêutico com meia-vida extremamente longa (6-8 dias) e em pacientes com HIV apresenta baixa eficiência, além da quimioresistência desenvolvida pelo parasita ao longo do tempo [43,40].



**Tabela 1.** Medicamentos empregados na terapia da leishmaniose e seus respectivos nomes químicos/comerciais [44]

Fórmula estrutural	Nome Químico/Comercial
	Antimoniato de N-metilglucamina / Glucantima®
	Isotionato de Pentamidina / Lomidina®
	Anfotericina B (AmB)/ Fungizona®
	Miltefosina®
	Paromomicina / Humatina®

### 3.1.2 Câncer

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, Segundo relatório publicado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), órgão especializado em câncer da Organização Mundial da Saúde, em 2012 os casos de câncer atingiram cerca de 14 milhões de pessoas, sendo que 8,2 milhões desses levaram a morte, um número que deverá subir para 22 milhões de novos casos por ano nas próximas duas décadas. O relatório apontou que os cânceres mais comuns diagnosticados foram os de pulmão (1,8 milhões de casos; 13,0% do total), de mama (1,7 milhões; 11,9%), e intestino grosso (1,4 milhões; 9,7%). As causas mais comuns de morte por câncer foram cânceres de pulmão (1,6 milhões; 19,4% do total), fígado (0,8 milhões; 9,1%), e estômago (0,7 milhões; 8,8%) [45].

Como consequência do crescimento e envelhecimento populacional, os países em desenvolvimento são desproporcionalmente afetados pelo aumento do número de casos. Mais de 60% do total de casos no mundo ocorrem na África, Ásia, América Central e América do Sul, e estas regiões são responsáveis por cerca de 70% das mortes por câncer no mundo, uma situação que é agravada pela falta de detecção precoce e acesso a tratamento [45].

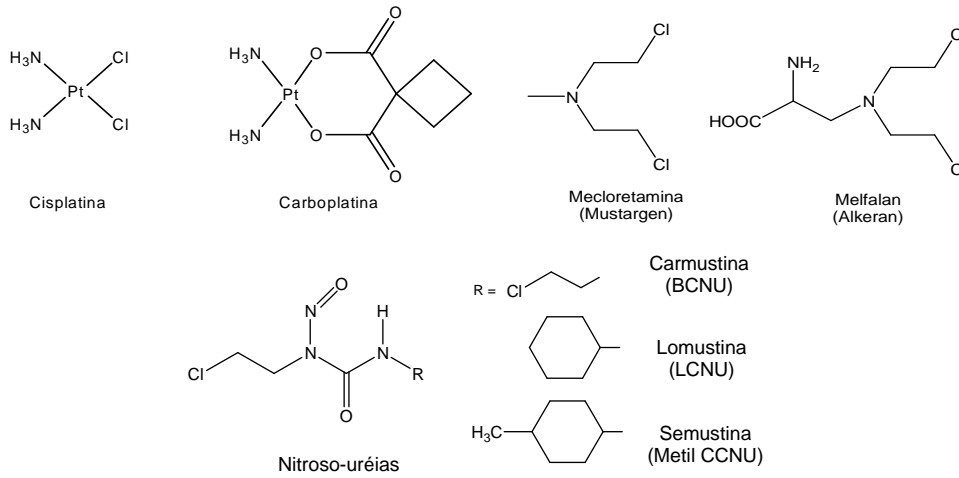
Ainda segundo o relatório do IARC, cerca de 30% das mortes por câncer deve-se a cinco principais riscos: alto índice de massa corporal, baixa ingestão de frutas e legumes, falta de atividade física, tabagismo e uso de álcool. O uso do tabaco é apontado como fator de risco mais importante, causando mais de 20% das mortes por câncer globais e cerca de 70% das mortes no mundo por câncer de pulmão [45,46].

O termo câncer, também chamado de tumor maligno ou neoplasia, é utilizado para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo, sendo caracterizado pela criação rápida de células anormais, que podem invadir partes adjacentes, espalhando-se para outros órgãos (metástase) [45,46].

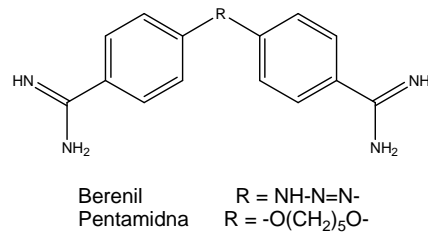
O tratamento quimioterápico leva a destruição das células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, o que explica os efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e imunidade baixa. Os antitumorais podem ser subclassificados em relação ao mecanismo de ação no DNA [47]:

- inibição da síntese de nucleotídeos: através do uso dos análogos das bases nitrogenadas;

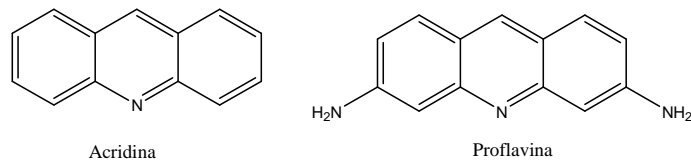
- efeito direto no DNA: agentes alquilantes como as mostardas nitrogenadas, nitrossurêias, complexos tipo cisplatina e outros;



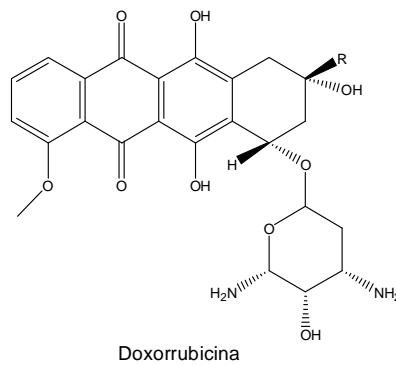
- ligantes que interagem na fenda menor do DNA: berenil, pentamidina e análogos;



- alterando as propriedades de pareamento das bases: intercalantes como a ascridina, e proflavina;



- inibindo a DNA-girase: doxorubicina;



### 3.1.3 Doença de Alzheimer (DA)

Doença de Alzheimer (DA), Mal de Alzheimer ou simplesmente Alzheimer é uma doença neurodegenerativa caracterizada por distúrbio progressivo da memória e de outras funções cognitivas, tais como atenção, linguagem, habilidades visoespaciais e funções executivas. Os sintomas ainda incluem alterações do comportamento (apatia, agressividade, desinibição), humor (depressão), sensopercepção e julgamento (delírios, alucinações). A demência torna-se assim uma das principais causas de dependência e incapacidade em idades mais avançadas.

Segundo os dados da Alzheimer's Association (2014) [48] estima-se que mais de 5,0 milhões de americanos apresentam DA. Segundo dados fornecidos pelo Relatório de 2012 da Organização Mundial da Saúde (OMS), realizado juntamente com a associação Internacional de Doença de Alzheimer (ADI), estima-se que a cada 4 segundos, um novo caso de demência é detectado no mundo e a previsão é de que em 2050, haverá um novo caso a cada segundo.

Estimativas do Instituto Alzheimer Brasil (IAB) apontam que 1,2 milhão de pessoas sofrem com a doença e por ano surgem cerca de 100 mil novos casos. Estes dados poderiam ser muito maiores uma vez que estes valores são tomados com base em pesquisas de outros países e dados do IBGE [49].

Atualmente, não existe cura para DA, sendo assim, o desafio para o futuro está no desenvolvimento de novas terapias e alvos terapêuticos para a prevenção e cura desta doença.

Através da combinação de critérios clínicos é possível realizar um diagnóstico prévio de DA. O diagnóstico definitivo se dá através da observação de alterações histológicas características da doença junto à biópsia cerebral (*exame post mortem*). A detecção da presença de placas neuríticas; presença de proteínas  $\beta$ -amilóide extracelular em placas difusas; emaranhados neurofibrilares, sobretudo nas regiões de hipocampo e neocórtex, caracterizam esta doença [50].

O neurotransmissor acetilcolina (ACh) é considerado o principal neurotransmissor envolvido em processos motores, cognitivos e de memória. A DA leva a degradação desses neurônios diminuindo a atuação da ACh que é degradada pela ação de enzimas.

A acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) são enzimas presentes no sistema nervoso e periférico responsáveis pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A inibição destas levaria a estabilização e restauração dos níveis de ACh no cérebro. Isto se caracteriza como uma das

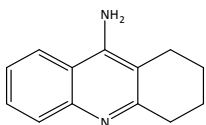
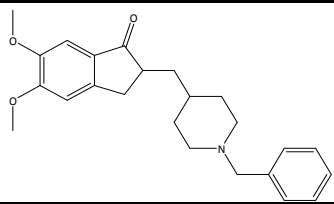
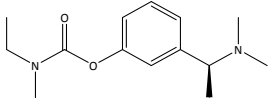
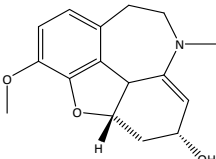
principais estratégias de tratamento da DA e é conhecida como “Hipótese Colinérgica”. A grande maioria dos fármacos disponíveis no tratamento de DA atuam no sentido do retardamento ou a amenização do déficit colinérgico, através da inibição parcial da atividade da AChE e BChE [51].

Anticolinesterásicos, ou inibidores das colinesterases (I-ChE), são considerados medicamentos eficazes no tratamento de DA; apresentam melhora nos sintomas cognitivos atuando na fenda sináptica e inibindo as enzimas AChE e BChE [52].

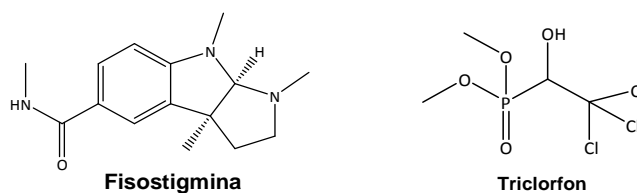
Atualmente existe uma série de fármacos comerciais bastante usados por pacientes com DA como a fisostigmina (primeiro inibidor da AChE; **Tabela 2** e **Figura 4**), porém seu emprego foi limitado pela meia-vida curta, cerca de 30 minutos, necessitando assim de administrações frequentes, além de causar efeitos colaterais [53]; Tacrina (THA, Cognex<sup>®</sup>), inibidor reversível da AChE com meia-vida mais longa que a fisostigmina, porém exige 4 doses diárias; Donepezil (Aricept<sup>®</sup>), inibidor reversível (segunda droga aprovada pela FDA – 1996) com vantagens em relação a tacrina com meia-vida longa de aproximadamente 70 horas; Rivastigmina (Exelon<sup>®</sup>), inibidor pseudo-irreversível (dissociação enzimática mais lenta) com eficácia semelhante à do donepezil e da tacrina; Galantamina (Reminyl<sup>®</sup>), que apresenta duas ações farmacológicas, atuando como inibidor de AChE e como agonista nicotínico e o Metrifonato (Triclorfon<sup>®</sup>), **Figura 4**), uma pró-droga que se torna um inibidor irreversível quando convertido em forma ativa.

As estruturas e suas classificações quanto à reversibilidade e duração da inibição das colinesterases estão apresentadas na **Tabela 2** [52,54].

**Tabela 2.** Características gerais dos inibidores das colinesterases.

				
<b>Nome</b>	Tacrina	Donepezil	Rivastigmina	Galantamina
<b>Disponível no ano</b>	1993	1997	1998	2000
<b>Classe química</b>	Acridina	Piperidina	Carbamato	Fenantreno (alcalóide)
<b>Seletividade cerebral</b>	Não	Sim	Sim	Sim
<b>Tipo de inibição da colinesterase</b>	Reversível	Reversível	Pseudo-irreversível	Reversível
<b>Enzimas inibidas</b>	AChE/BChE	AChE	AChE/BChE	AChE

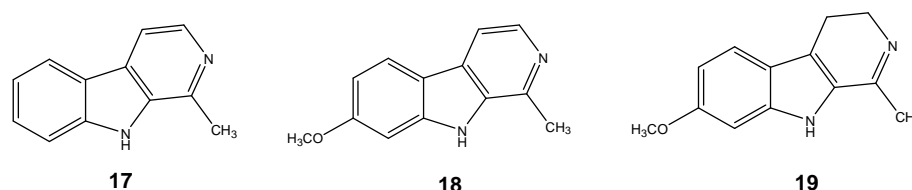
**Figura 4:** Fármacos comerciais usados no tratamento de Alzheimer



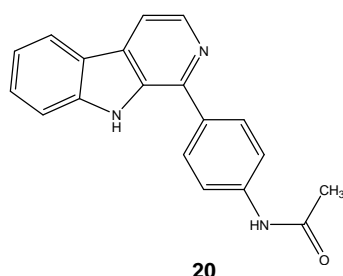
### 3.2 Atividades antileishmania, anticâncer e anticolinesterásica reportadas para derivados $\beta$ -carbolínicos

#### 3.2.1 Atividade antileishmania de alcalóides tetraido e $\beta$ -carbolínicos

Di Giorgio e col. (2004) [55] investigaram a atividade das  $\beta$ -carbolinas harmana (**17**), harmina (**18**) e harmalina (**19**) e os resultados mostraram a eficiência destas frente às formas promastigotas de *L. infantum* com  $IC_{50}$  de 19,2; 3,7 e 116,8  $\mu M$  respectivamente. O composto **19** mostrou atividade específica frente à forma amastigota com  $IC_{50}$  1,16  $\mu M$ .

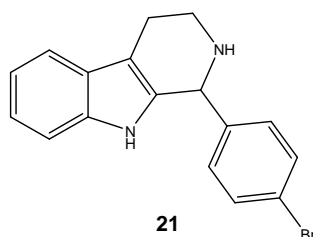


Gohil e col. (2012) [56] sintetizaram uma série de 22 novos derivados 1-aryl- $\beta$ -carbolínicos e avaliaram seu potencial *in vitro* frente *L. donovani* (causador da *L. visceral*). O derivado **20** foi o mais potente da série com valor de  $IC_{50}$  igual a  $2,16 \pm 0,26 \mu M$  quando comparado ao padrão mitelfosina ( $IC_{50}$   $12,07 \pm 0,82 \mu M$ ).



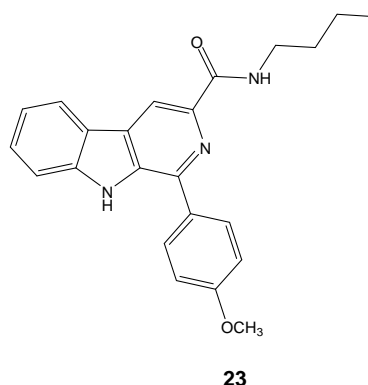
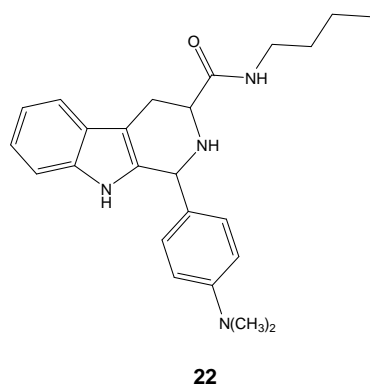
Gellis e col. (2012) [57] reportam a síntese de uma série de 20 novos derivados tetraidro- $\beta$ -carbolínicos 1-fenilssubstituídos e avaliaram sua atividade *in vitro* frente às formas promastigotas de *L. donovani*. Para os compostos testados, o melhor valor de  $IC_{50}$  foi obtido para o derivado **21** (6,1  $\mu M$ ), com o substituinte *p*-bromofenil na posição

-1 da unidade  $\beta$ -carbolina, sendo tão potente quanto à pentamidina ( $6,3 \mu\text{M}$ ). Ainda, os estudos de estrutura-atividade mostraram que os derivados com o grupo fenil *para*-substituído na posição-1 do anel  $\beta$ -carbolínico exibiram melhor perfil biológico.



Outro derivado tetraidro- $\beta$ -carbolínico, contendo na posição-1 o grupo fenil *para*-substituído e o grupo N-butilcarboxamida na posição-3 (**22**) foi sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa e estudos adicionais revelaram o potencial desse derivado, inibindo o crescimento das formas promastigotas do parasita além de causar alterações morfológicas e ultra-estruturais, especialmente nas mitocôndrias, confirmando o potencial farmacológico frente a *L. amazonensis* [29,58]

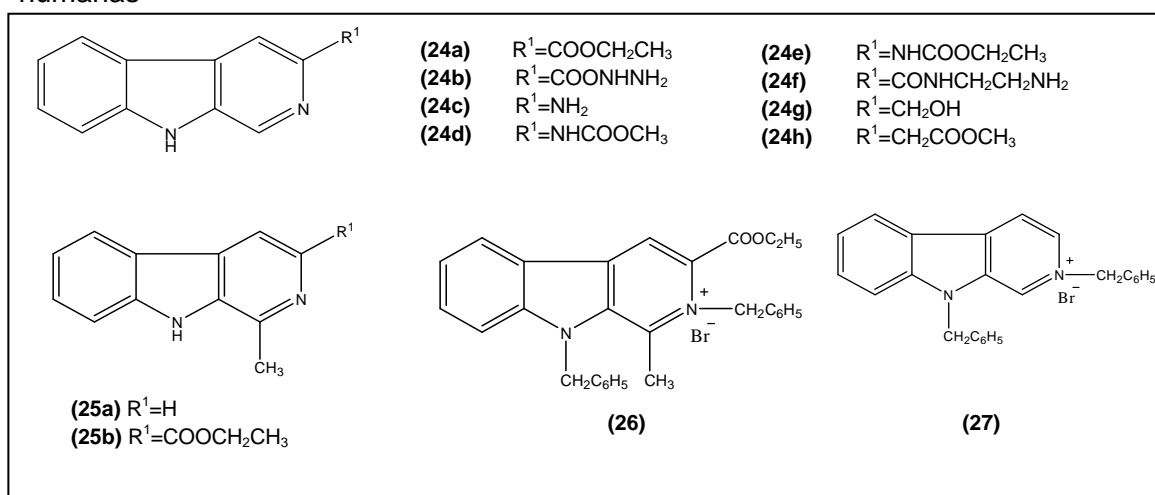
Nosso grupo de pesquisa sintetizou ainda outra série de novos derivados  $\beta$ -carbolínicos 1-fenilsubstituído- $\beta$ -carbolina-3-N-butilcarboxamida com potencial leishmanicida [30]. O derivado **23** apresentou menor valor de  $\text{IC}_{50}$  ( $0,25 \mu\text{M}$ ) frente à forma promastigota de *L. amazonensis* e estudos complementares revelaram o potencial contra as formas amastigotas axênicas e intracelulares, exibindo alta seletividade para o parasita, independente da forma evolutiva avaliada [59].



### 3.2.2 Atividade antitumoral de alcalóides $\beta$ -carbolínicos

A capacidade de intercalação com o DNA, juntamente com a inibição da enzima nuclear topoisomerase I pela harmina (**18**) e seus derivados foi reportada por Cao e col. (2005) [15], demonstrando o potencial de compostos  $\beta$ -carbolínicos frente à células tumorais humanas. A série de 3-carboxamidas (**24**) sintetizadas apresentou potente atividade antitumoral, com destaque para o derivado **24f**, ativo frente às células tumorais de fígado (HepG2), gástricas (BGC-823) e cervical (Hela). Outra série de compostos contendo uma metila na posição-1 e diferentes grupos na posição-3 (**25a-b**) foi também sintetizada, sendo que o mais ativo dos compostos foi o 3-carboetóxi **25b** com  $IC_{50}$  de 83  $\mu$ M frente células de colo (LOVO) e 86  $\mu$ M frente células de fígado (HepG2). Ainda, verificaram que a presença do grupo benzil nas posições -2 e -9, como nos casos de **26** e **27**, resultaram no aumento da atividade antitumoral (**Figura 5**).

**Figura 5:** Derivados sintetizados por Xiao e col [15] ativos frente à células tumorais humanas



Ishida e col. [14] também constataram o potencial *in vitro* desta classe de compostos frente às células de nasofaringe, pulmão, rim, ovário, entre outras, com valores de  $ED_{50}$  (dose efetiva: quantidade de droga requerida para produzir uma resposta em 50% das células testadas) entre 1,6-2,4  $\mu$ g/mL (7,6-11,3  $\mu$ M).

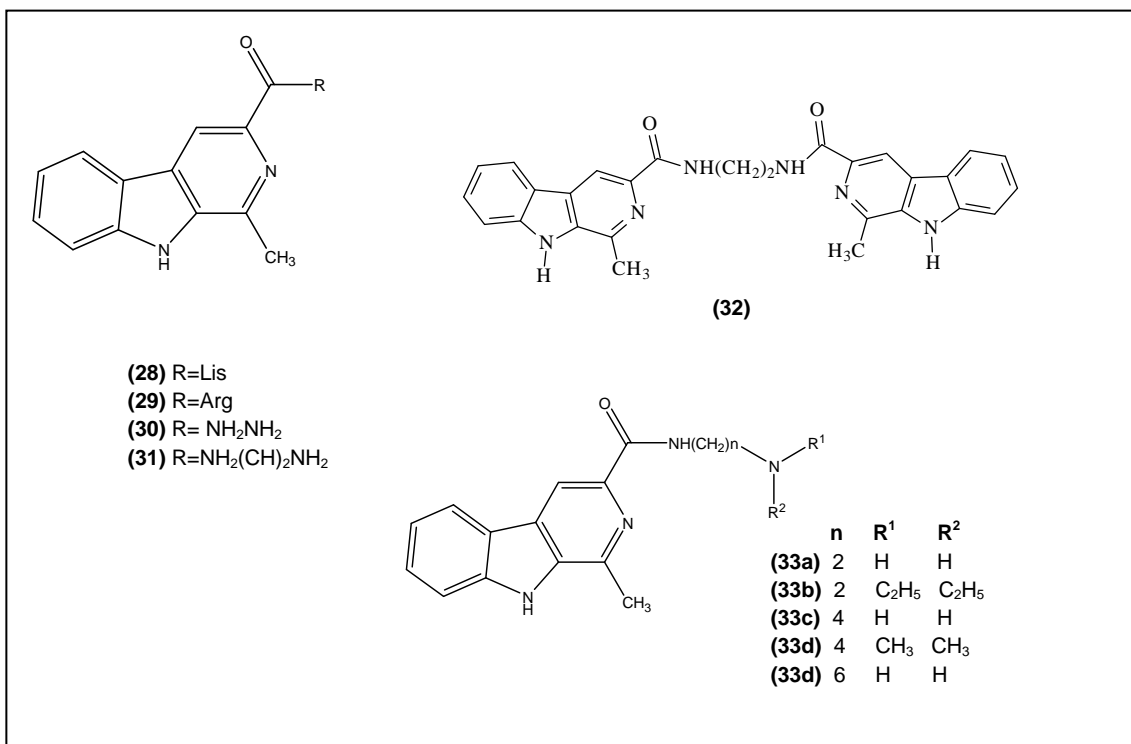
Os trabalhos reportados na literatura revelam ainda que diferentes grupos ligados no esqueleto  $\beta$ -carbolínico, geralmente envolvendo as posições C-1, N-2, C-3 e N-9, influenciam suas atividades farmacológicas.

Uma série de derivados  $\beta$ -carbolínicos com diferentes substituintes na posição -3, como grupos aminoácidos [16] (**28-29**) ou carboxamida (**30-33**) [17], foram sintetizados e avaliados frente a diferentes linhagens de células tumorais. Os



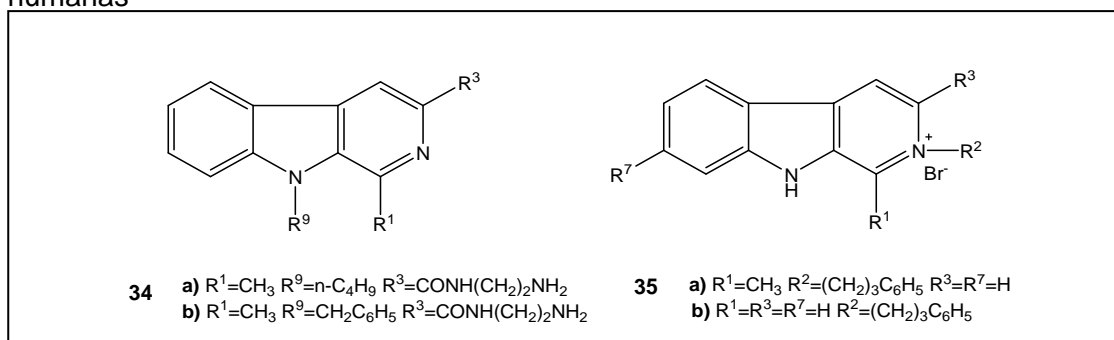
derivados **28 e 29** apresentaram potente atividade frente ao carcinoma cervical com valores de  $IC_{50}$  de 4 e 1  $\mu$ M. Da série das carboxamidas, o composto **33c** apresentou alta atividade frente às células humanas de câncer gástrico e leucemia. A introdução de grupos hidrofóbicos e volumosos na posição -3, no caso dos derivados **30, 31 e 32** não melhorou a atividade citotóxica para as linhagens de células testadas (**Figura 6**).

**Figura 6:** Derivados sintetizados por Cao e col. [16 e 17] ativos frente à células tumorais humanas

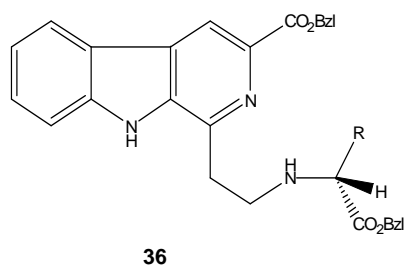


Estudos de 3D-QSAR auxiliaram na seleção dos compostos **34a e 34b** que foram sintetizados e avaliados, apresentando valores de  $IC_{50}$  de 7,5 e 4,7  $\mu$ M, respectivamente, frente às células tumorais de mama (MCF-7). Os compostos **35a e 35b** sem substituinte na posição-9 e com substituinte fenilpropil na posição-2, apresentaram  $IC_{50}$  de 3,5  $\mu$ M e 7,1  $\mu$ M para células tumorais gástricas (BGC-823) [21] (**Figura 7**).

**Figura 7:** Derivados sintetizados por Chen e col. [21] ativos frente à células tumorais humanas



A partir de docking molecular, Wu e colaboradores [60] sintetizaram e avaliaram a atividade de dezoito compostos 1,3,9-substituídos (**36a-r**). A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* frente 5 linhagens de células tumorais e testes *in vivo* (indução de tumor sólido com células S180 em ratos) indicaram que o composto **36o** apresentou  $IC_{50}$  de 11,1  $\mu$ M frente às células tumorais humanas de melanoma (B16) e no teste *in vivo* este foi mais eficiente que o padrão de referência, a citarabina. Além disso, a partir de análise de espectros de UV e fluorescência em ensaios com CT-DNA sugeriram que o mecanismo de ação desses compostos é de intercalação no DNA e a análise por estudos de 3D QSAR demonstram que a atividade *in vivo* tem significativa dependência eletrostática e estérica do aminoácido terminal [22,60].



- |   |   |
|---|---|
| a R = H   | j R = CH <sub>2</sub> OH  |
| b R = CH <sub>3</sub>                                       | k R = CH(OH)CH <sub>3</sub>   |
| c R = CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                     | l R = CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>                               |
| d R = CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>     | m R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>               |
| e R = CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | n R = p-OHCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>               |
| f R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>      | o R = CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Bz                              |
| g R = NH = NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> | p R = CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> |
| h R = CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>         | q R = imidazol-3-ilmetileno   |
| i R = indol-3-ilmetileno                                    | r R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Bz              |

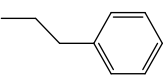
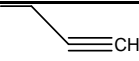
### 3.2.3 Atividade anticolinesterásica de alcalóides $\beta$ -carbolínicos

Apesar de DA ainda não ter cura, os tratamentos utilizados hoje, focados na inibição das colinesterases (I-ChE), tem sido eficazes no sentido de diminuição de sintomas da doença, porém os efeitos colaterais causados levam a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com baixa toxicidade.

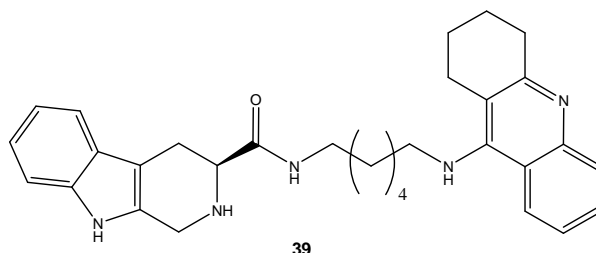
Nesse contexto podemos citar alguns trabalhos referentes à síntese de novos compostos contendo o núcleo  $\beta$ -carbolínicos que quando avaliados frente a I-ChE foram potencialmente ativos.

No trabalho recente apresentado por Otto e col. (2014) [61], o autor sintetiza nove derivados  $\beta$ - e  $\gamma$ -carbolínicos (**37** e **38**), contendo substituintes metil-, propargil- e feniletil. O derivado  $\beta$ -carbolínico sem substituinte na posição-9 (**37a**), não apresentou efeito de inibição considerável ( $IC_{50} >100$  mM para AChE e BChE) enquanto que o derivado  $\gamma$ -carbolínico (**38**) mostrou inibição de colinesterase moderada com  $IC_{50}$  de 19,8 e 1,2  $\mu$ M para AChE e BChE, respectivamente. A presença do grupo feniletil- no derivado  $\gamma$ -carbolínico **38b**, conduziu a um aumento de 10 vezes de inibição frente AChE e 2 vezes em relação a BChE, enquanto que a presença do grupo propargil- (**38c**) resultou numa perda de atividade para frente a AChE. A formação do sal quartenário em **38d** levou a uma potencialização no carácter inibitório, alcançando valores na ordem de nanomolar para inibição frente BChE (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Dados de inibição frente AChE e BChE publicados por Otto e col. (2014)

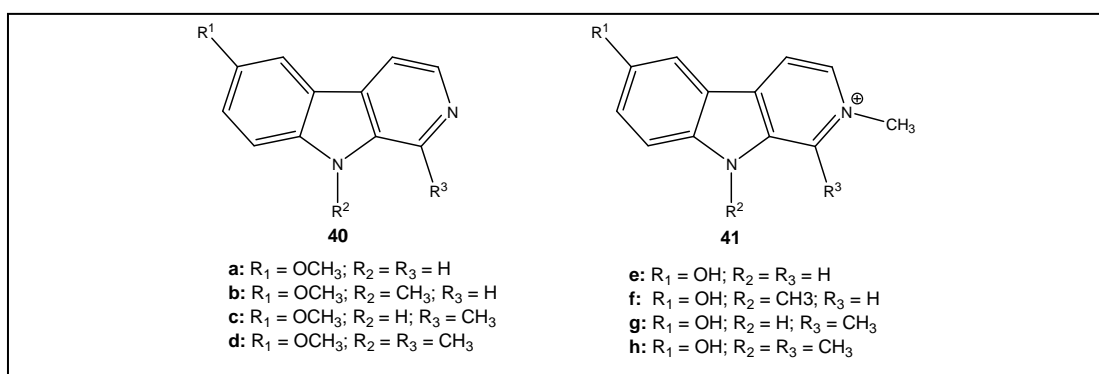
	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)			
	AChE	BChE	AChE	BChE
a) — H	>100	>100	19,8	1,2
b) 	4,2	3,8	1,6	0,7
c) 	2,0	7,2	>100	6,9
d) $N^{\oplus}-CH_3$	5,6	0,8	3,2	0,9

Lan e col. (2014) [62] apresentaram a síntese de uma série de novos derivados híbridos tacrina- $\beta$ -carbolina. O estudo apresenta significantes potenciais de inibição de colinesterases para os novos derivados em ensaios *in vitro*, especialmente para o derivado **39**, com valor na ordem de nanomolar para AChE ( $IC_{50} = 21,6$  nM) sendo ainda superior aos compostos de referência, como a própria tacrina ( $IC_{50} = 260$  nM) e galantamina ( $IC_{50} = 2670$  nM).



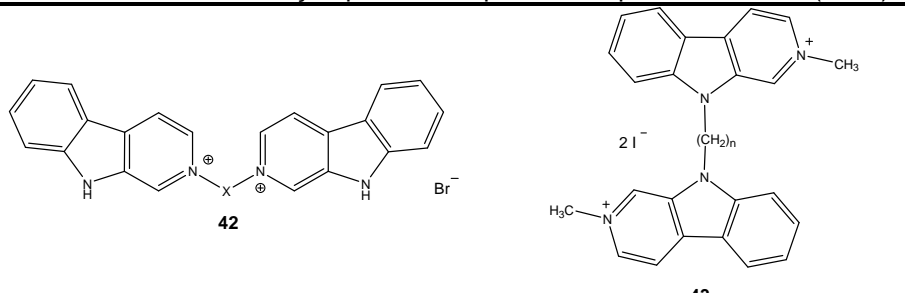
Contribuindo para os estudos de novos derivados  $\beta$ -carbolínicos com potencial inibição *in vitro* frente AChE e BChE, Schott e col (2006) [63] sintetizaram uma série de derivados da harmana (**40**) e norharmana (**41**), metoxilados e hidroxilados na posição -6 e metilados ou não na posição -9. Os sais  $\beta$ -carbolínicos quartenários (**41e-h**) foram os mais ativos dentro da série com valores de  $IC_{50}$  na faixa de 0,8-4,2  $\mu$ M para AChE, atingindo os valores próximos aos padrões galantamina e fisostigmina,  $IC_{50}$  0,6  $\mu$ M e 0,5  $\mu$ M, respectivamente. Cabe ressaltar ainda que não houve diferenças na atividade inibitória para a mudança do grupo metóxi/hidróxi na posição -6 da unidade  $\beta$ -carbolílica (**Figura 8**).

**Figura 8:** Derivados sintetizados por Shott e col. [63] com potencial inibição *in vitro* frente AChE e BChE



Derivados  $\beta$ -carbolínicos bivalentes (**42**), conectados com espaçadores alquílicos variando de 2-12 carbonos entre os átomos de nitrogênios piridínicos (N-2) e outros conectados via nitrogênio indólico (N-9) (**43**), exibiram valores de  $IC_{50}$  na ordem de nanomolar para inibição de colinesterases. O estudo mostrou que dependendo do espaçador entre as unidades  $\beta$ -carbolínicas, as propriedades de inibição variavam de forte para moderada. Compostos com espaçadores menores do que seis átomos de carbonos foram moderados, enquanto que mais do que seis átomos apresentavam melhores valores (**Tabela 4**) [64].

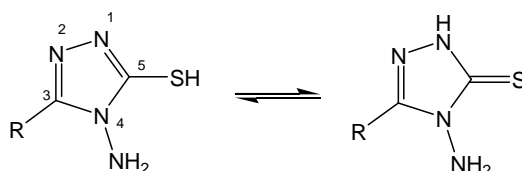
**Tabela 4:** Dados de inibição para AChE publicados por Rook e col. (2010)



n	IC <sub>50</sub> – AchE (nM)	n	IC <sub>50</sub> – AchE (nM)
2-6	248-7661	5	280
7-12	81-125	9; 12	5,7; 4,0

### 3.3 Derivados 1,2,4-triazólicos 4-5-dissubstituídos

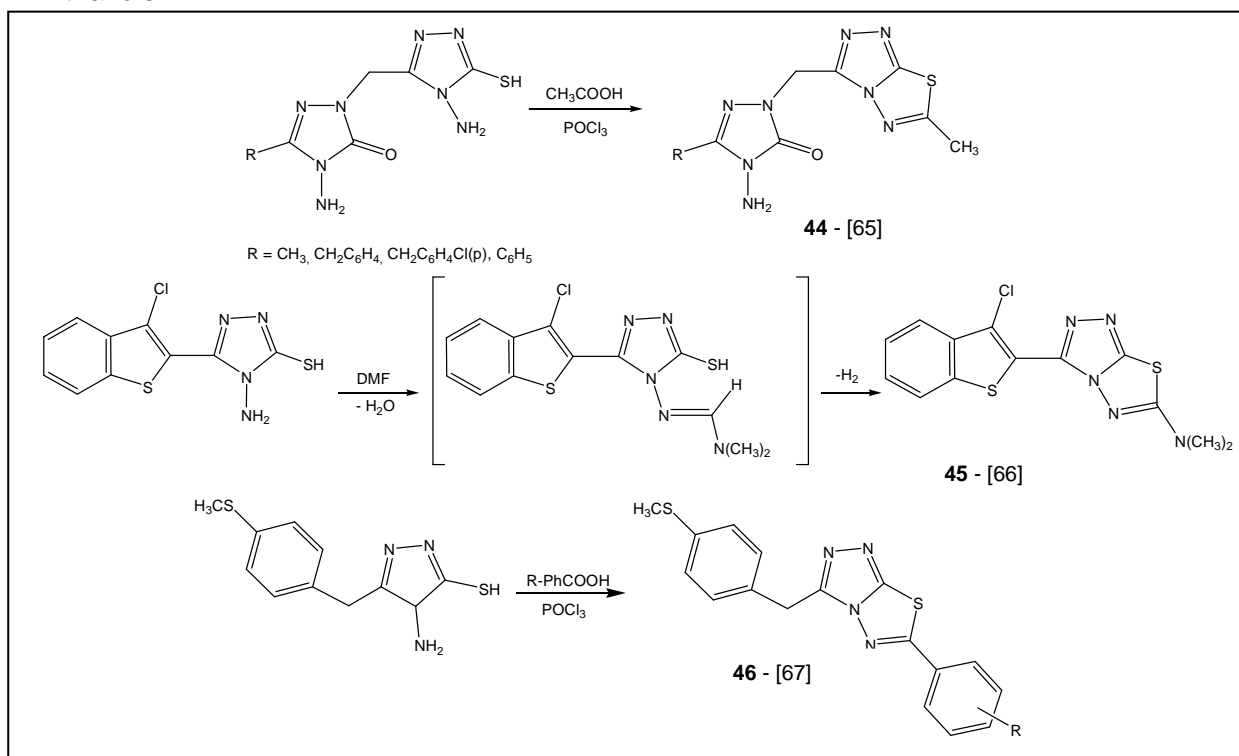
Derivados 1,2,4-triazólicos com substituintes nas posições -3 e -5 têm chamado a atenção dos pesquisadores nas últimas duas décadas. O núcleo heterocíclico 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis é considerado excelente material de partida para síntese de novos derivados menos tóxicos e com maior atividade biológica.



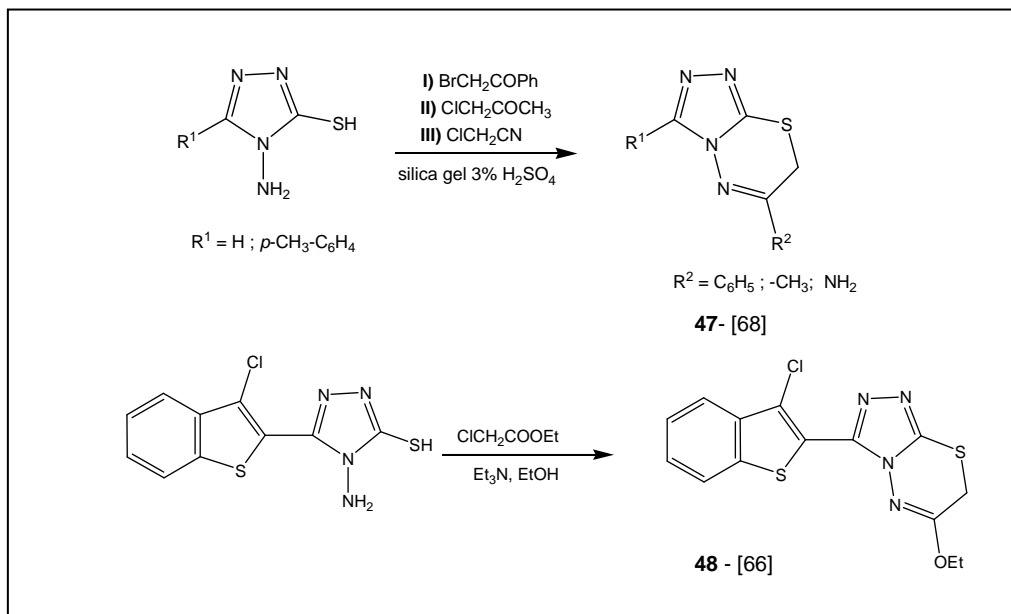
A presença dos grupos amino (posição-4) e mercapto (posição-5) no núcleo triazólico, como no caso dos compostos **11**, leva a possibilidade da construção de séries de novos derivados, contendo sistemas condensados (núcleos fundidos). Triazóis fundidos com outros heterociclos possuem diversas aplicações no campo da Química Medicinal.

A literatura relata a síntese de vários heterocícos N-ligados a partir do 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis, como triazolo-tiadiazóis (**44-46**) (**Esquema 2**) [65-67]; triazolo-tiadiazinas (**47, 48**) (**Esquema 3**) [68,65,66] e triazolo-tiadiazepinas (**49 e 50**) (**Esquema 4**) [69,70].

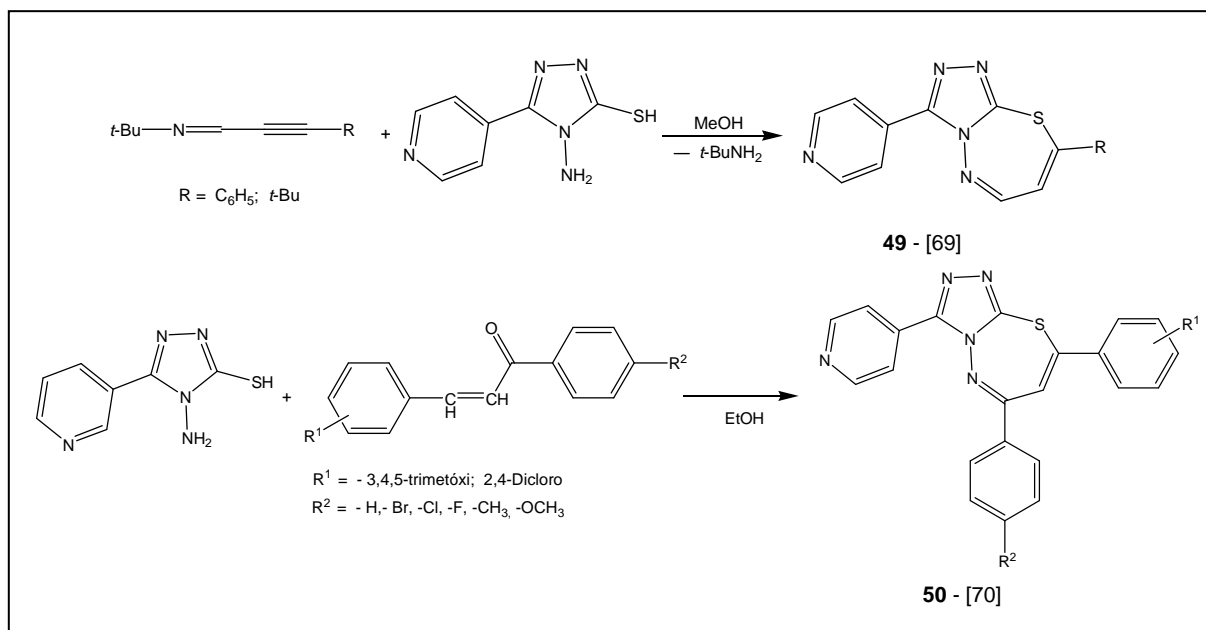
**Esquema 2.** Síntese de triazolo-tiadiazóis a partir do 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis



**Esquema 3.** Síntese de triazolo-tiadiazinas a partir do 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis



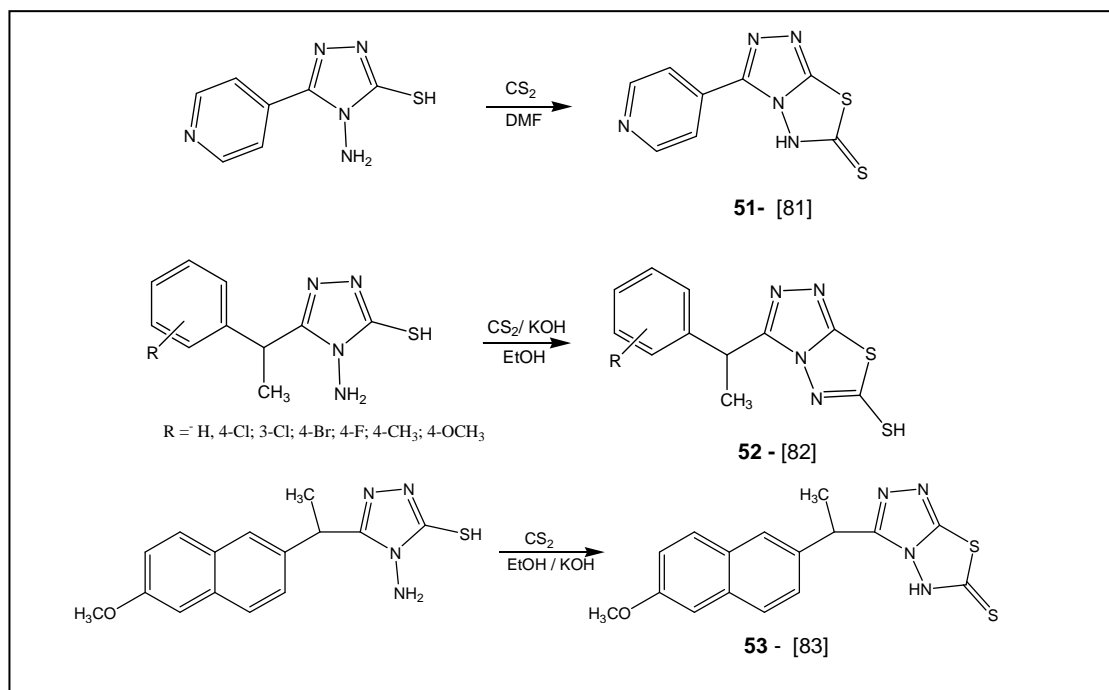
**Esquema 4.** Síntese de triazolo-tiadiazepinas a partir do 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis



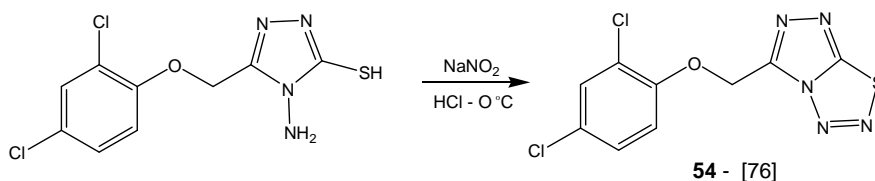
Derivados contendo esses núcleos, quando avaliados biologicamente, apresentaram um amplo espectro de atividades como: antituberculose [71], antitumoral [72-75], propriedades moluscicidas [76], anti-inflamatória [76-78], analgésica [79], anticonvulsiva [80] e antimicrobiana [67,65].

A inserção de mais um grupo tiol no heterociclo 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol, originando um novo núcleo fundido, como nos casos dos derivados 1,2,4-triazol-1,3,4-tiadiazólicos (**51-53**) (**Esquema 5**) também tem sido reportada. Esses novos derivados quando avaliados apresentaram potencial: antimicrobiano [81], anti-inflamatório [82] e antifúngico [83].

**Esquema 5.** Síntese de 1,2,4-triazol-1,3,4-tiadiazólicos a partir do 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis



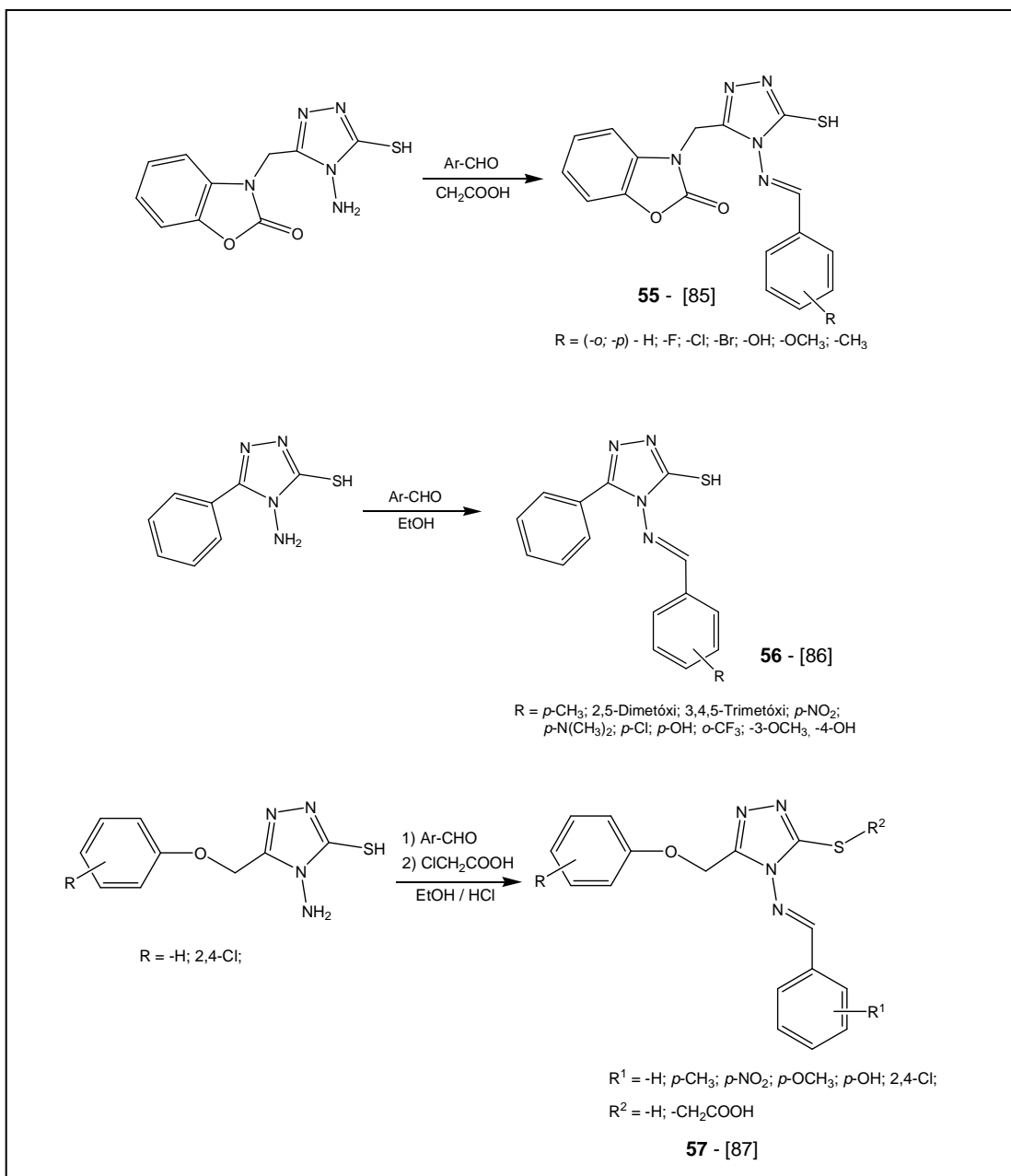
Compostos contendo o esqueleto triazol-tiadiazol, como o caso do composto **54** induziram melhoras nas atividades moluscidas frente ao caramujo *Biomphalaria alexandrina* quando comparados com os precursores contendo o heterociclo 1,2,4-triazol [76].



Além de derivados triazólicos contendo sistemas fundidos, 4-benzilidenoamino-substituídos-1,2,4-triazóis, como por exemplo, os compostos **55-57**, também denominados bases de Schiff (**Esquema 6**) [84,85,86], tem recebido um grande interesse químico e biológico, tanto pela facilidade de síntese, como por suas propriedades, incluindo atividades biológicas como: antibacteriana [85], antiproliferativa [86], anti-inflamatória e analgésica [87].

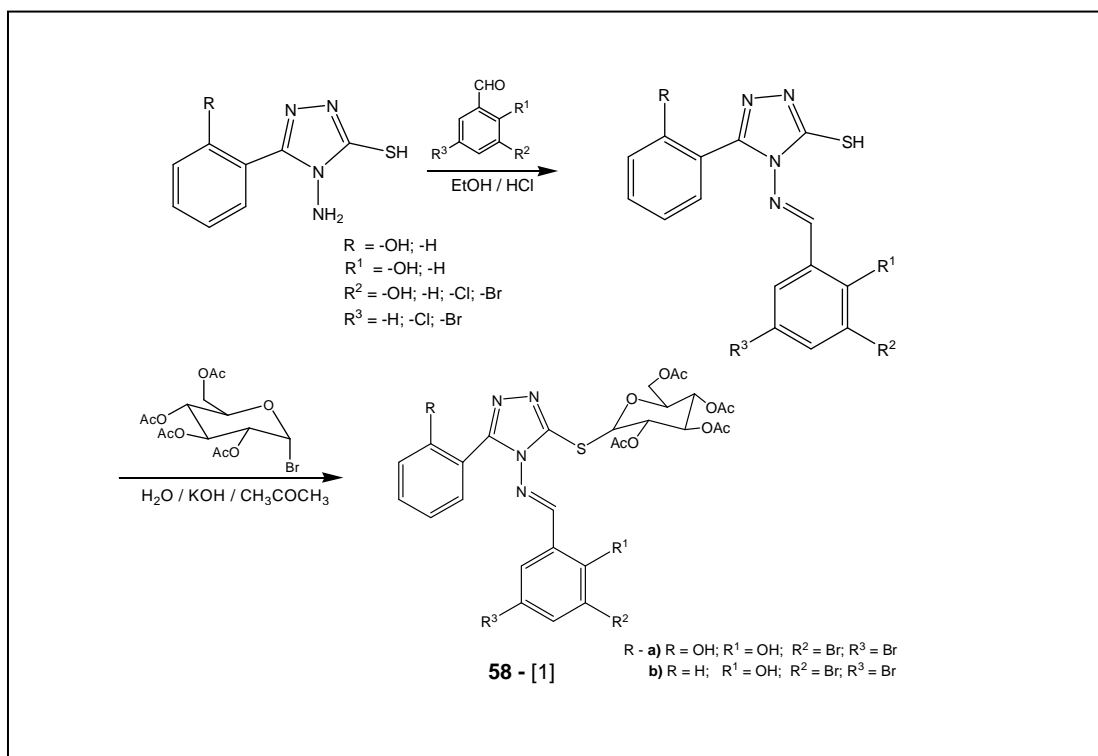


**Esquema 6.** Síntese de 1,2,4-triazol-tiadiazóis a partir do 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis

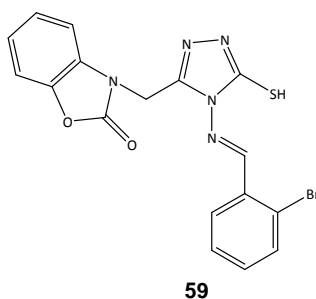


Ji e col. (2013) [1] publicaram a síntese e avaliação biológica de uma série de 4-benzilidenoamino-1,2,4-triazóis (**58**) (**Esquema 7**) com significativas atividades antimicrobianas, antibacterianas e antifúngicas, destacando **58a- b**, com valores de MIC (concentração mínima inibitória) igual a 16  $\mu\text{g/mL}$  frente ao fungo *Monilia albicans*.

**Esquema 7.** Síntese descrita por Ji e col. (2013) [1] para obtenção de benzilidenoamino-1,2,4-triazóis

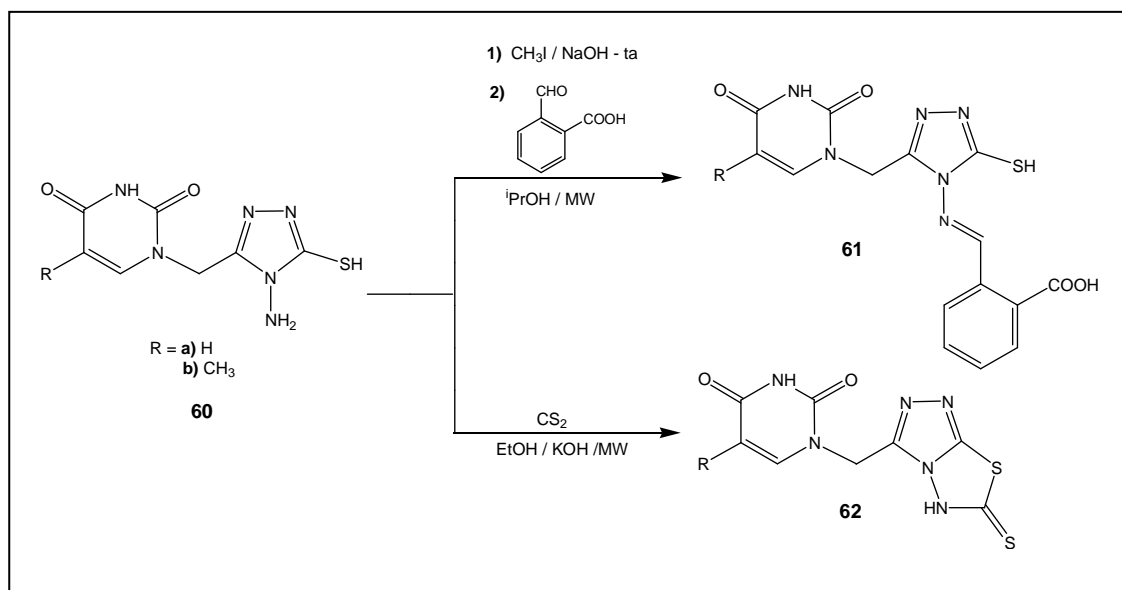


Ciceklim e col. [85] mostram em seus trabalhos o potencial antibacteriano para uma série de bases de Schiff, destacando-se o derivado **59** com valor de MIC=128  $\mu\text{g/mL}$  frente à *Mycobacterium tuberculosis*.



Recentemente, Al-Harbi [2] reportou uma série de e benzilidenoamino-triazóis (**61**) e de 1,2,4,-triazol[3,4,-b][1,3,4]tiadiazol-6-tiol (**62**) (**Esquema 8**), a partir de **60**, empregando micro-ondas, o que resultou nos compostos desejados de forma rápida e com bons rendimentos.

**Esquema 8.** Síntese descrita por Al-Harbi [2] para obtenção benzilidenoamino-triazóis (**61**) e de 1,2,4,-triazol[3,4,-b][1,3,4]tiadiazol-6-tiol (**62**)



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em Resultados e Discussão abordamos a preparação, caracterização e ensaios biológicos dos novos derivados 1-fenilsubstituído- $\beta$ -carbolínicos contendo na posição-3 o grupo triazolo-4,5-substituído.

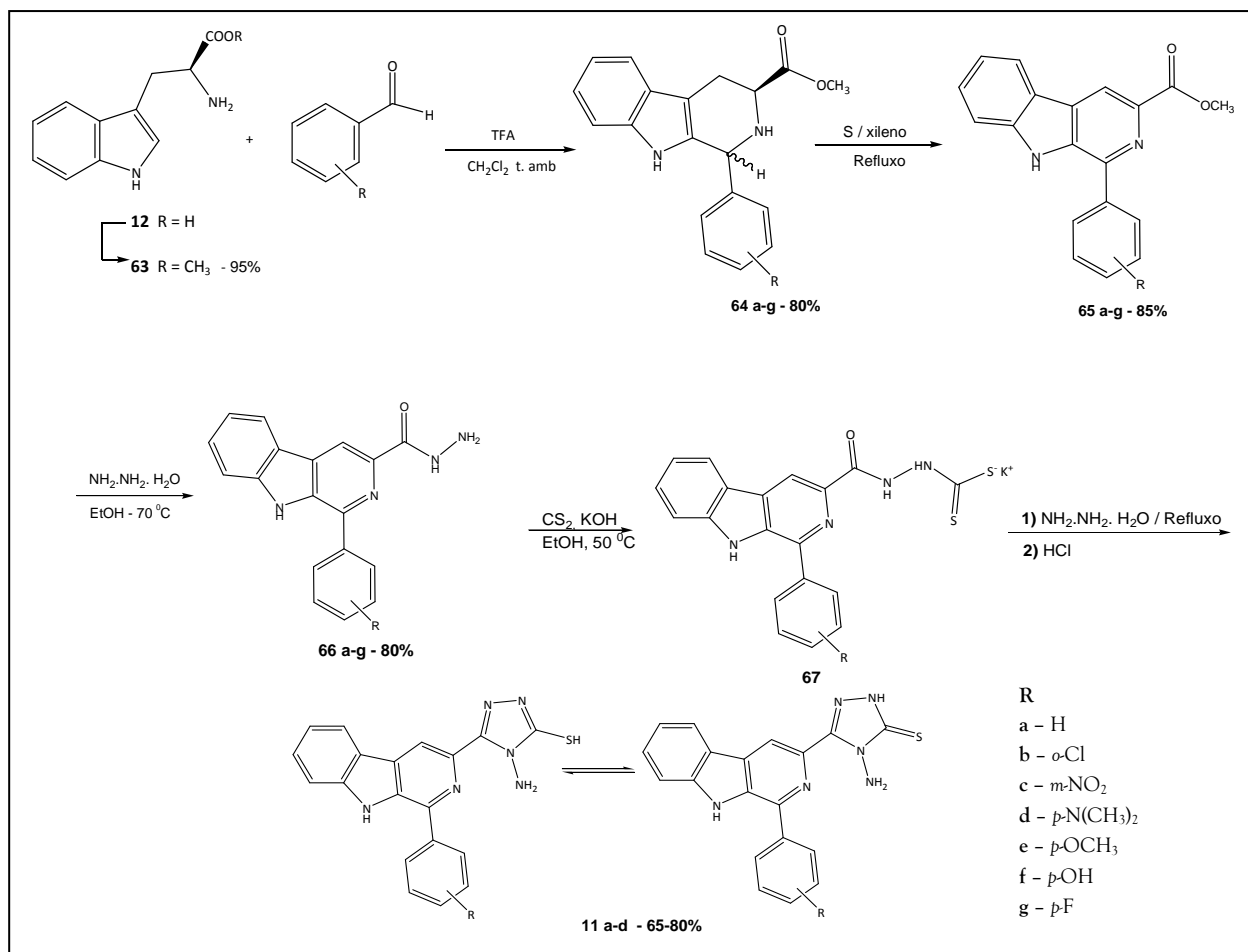
### 4.1 Síntese e caracterização dos novos derivados 1-fenilsubstituído 3-(1,2,4-triazolo-4,5-dissubstituído) $\beta$ -carbolínicos

Inicialmente foram preparados os intermediários **11a-d**, contendo na posição-3 o grupo 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazol, que constituem o material de partida para a síntese dos novos derivados propostos no **Esquema 1**. A partir dos intermediários **11** foram empregadas diferentes metodologias para a preparação das 3-(4-benzilidenoaminosubstituídas-5-tio/tioxo-1,2,4-triazolil)  $\beta$ -carbolinas (**13**); 3-[1,2,4-triazolo-(3,4-*d*)-1,2,3,4-tiatriazolil]  $\beta$ -carbolinas (**14**); 3-[1,2,4-triazolo-(3,4-*b*)-1,3,4-tiadiazol-6-tiol]  $\beta$ -carbolinas (**15**) e 3-[1,2,4-triazolo-(3,4-*b*)-1,3,4-tiadiazin-6-ona]  $\beta$ -carbolinas (**16**).

#### 4.1.1 Síntese dos intermediários 11a-d

A rota sintética para preparação dos derivados 1-fenilsubstituídos-3-(4-amino-5-tioxo-1,2,4-triazolil)- $\beta$ -carbolínicos (**11**) está mostrada no **Esquema 9**.

**Esquema 9.** Rota para a síntese dos derivados 1-fenilsubstituídos-3-(4-amino-5-tiol-1,2,4-triazolo-3-il)- $\beta$ -carbolina (**11**)



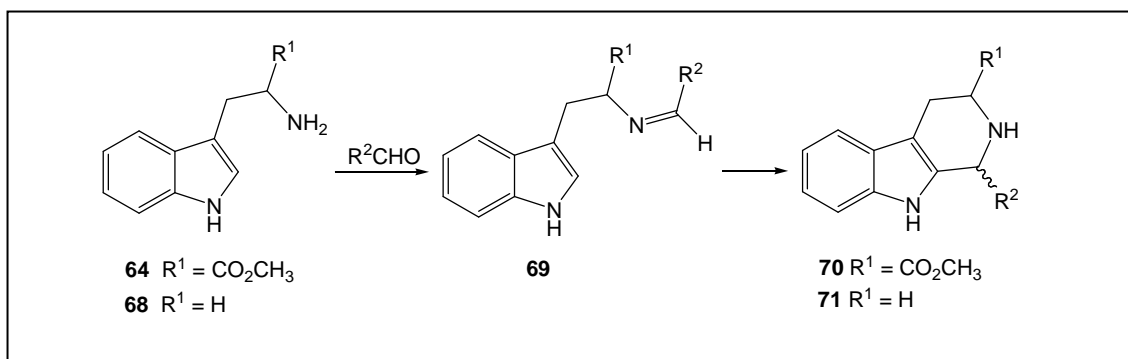
Para a síntese dos 1,2,4-triazóis **11** utilizou-se o procedimento descrito por Formagio e col. [32]. O L-triptofano comercial (**12**), utilizado como substrato, foi esterificado com metanol, na presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, obtendo-se o L-triptofano metil éster (**63**).

Para a formação do núcleo  $\beta$ -carbolínico 1-fenilsubstituído, o L-triptofano metil éster (**63**) foi submetido à reação de condensação de Pictet-Spengler, catalisada por ácido, com benzaldeído (**a**) e, também, com outros aldeídos aromáticos contendo diferentes substituintes no anel benzênico, como: *o*-clorobenzaldeído (**b**), *m*-nitrobenzaldeído (**c**), *p*-dimetilaminobenzaldeído (**d**), *p*-metóxi-benzaldeído (**e**), *p*-hidróxi-benzaldeído (**f**) e *p*-fluorbenzaldeído (**g**). Esta reação forneceu as 1-fenilsubstituído-3-carbometóxi-1,2,3,4-tetraidro- $\beta$ -carbolinas (**64a-g**), como misturas de diastereoisômeros, que não foram separados.

A reação de Pictet-Spengler é o método mais utilizado para síntese de  $\beta$ -carbolinas, na qual, a condensação do triptofano metil éster (**63**) ou da triptamina (**68**)

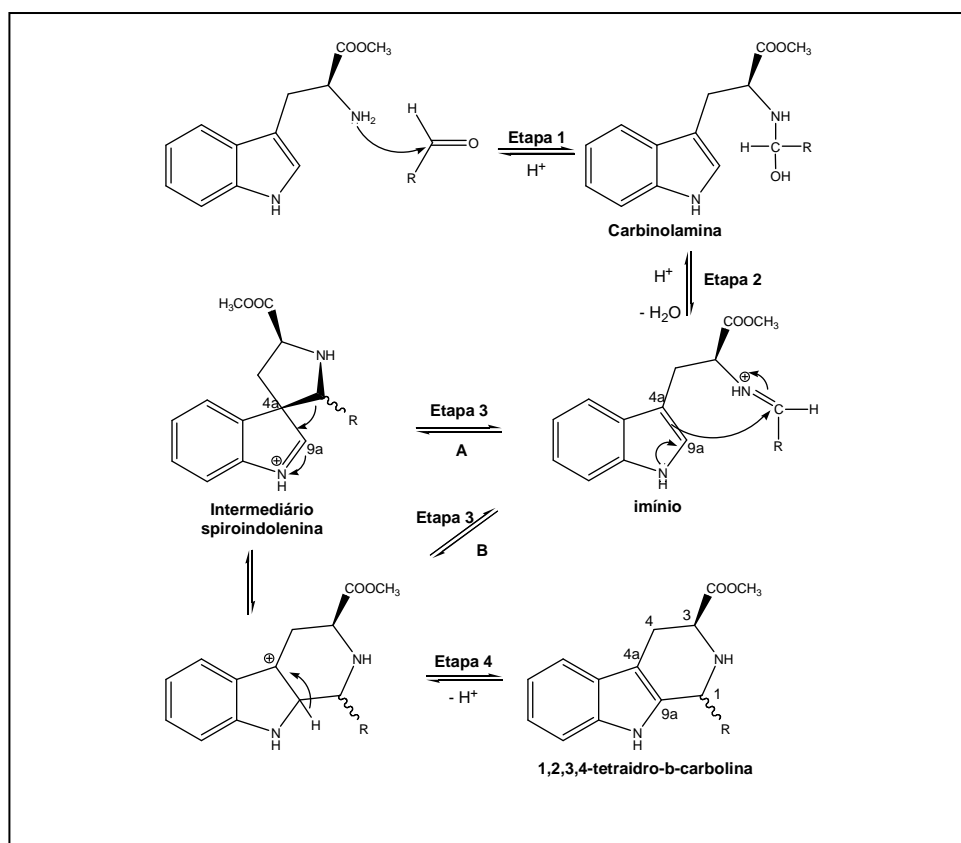
com aldeídos, leva a formação de tetraidro- $\beta$ -carbolinas **70** e **71**, respectivamente, via formação de uma imina **69** como intermediário da reação [88] (**Esquema 10**).

**Esquema 10.** Obtenção de tetraidro- $\beta$ -carbolinas via condensação de Pictet-Spengler.



O mecanismo da reação de condensação de Pictet-Spengler [89,90,91] já é bem descrito na literatura. Nas publicações mais recentes, o mecanismo é proposto por dois caminhos distintos. Segundo Kusrkar e col. [90] este envolve um intermediário do tipo spiroindolenina como apresentado no **caminho A** (**Esquema 11**). Maresh e col. [91], utilizando cálculos computacionais, demonstraram que a ciclização ocorre preferencialmente por ataque direto do C-9a do indol ao carbono imínico (**caminho B**). Ambos os caminhos propõe a formação de um íon imínio como intermediário.

**Esquema 11.** Mecanismo para síntese das tetraidro- $\beta$ -carbolinas via reação de Pictet-Spengler.

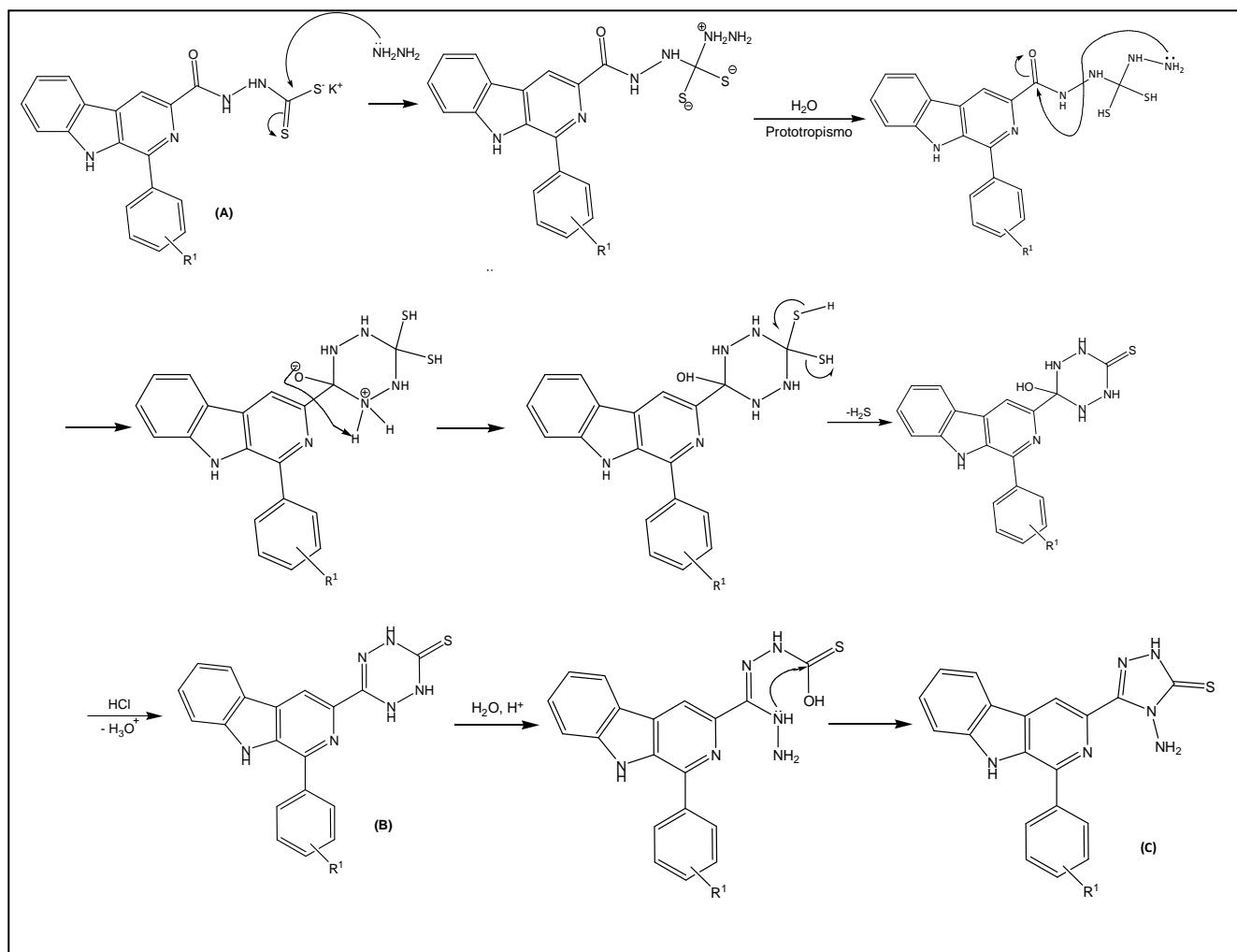


Em seguida, as tetraidro- $\beta$ -carbolinas **64a-g** foram submetidas à reação de oxidação com enxofre em xileno, resultando nos compostos 3-carbometóxi- $\beta$ -carbolínicos (**65a-g**). A partir do tratamento desses intermediários com hidrazina hidratada foram obtidas as correspondentes carboidrazidas (**66a-g**) (**Esquema 9**). Como esses compostos já foram sintetizados e caracterizados por nosso grupo de pesquisa a caracterização dos mesmos foi feita através de comparações com os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  publicados anteriormente por Formagio e colaboradores [92].

Na seqüência, as carboidrazidas **66a-g** foram submetidas à reação com dissulfeto de carbono, em meio básico, para conversão destes nas correspondentes 1-fenilssubstituído-3-(4-amino-5-tio/tioxo-1,2,4-triazolo-3-il)- $\beta$ -carbolinas (**11**) (**Esquema 9**). Esta metodologia tem sido amplamente empregada na literatura [93,94,95,96,97] e já foi utilizada em trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa [32].

A reação de  $\beta$ -carbolina-3-carboidrazidas com dissulfeto de carbono em meio básico leva à formação de ditiocarbazatos de potássio (**A**), que sofre posterior ciclização com excesso de hidrazina hidratada e tratamento com ácido clorídrico, formando inicialmente intermediários 3-(1,2,4,5)-tetrazil- $\beta$ -carbolinas (**B**) (**Esquema 12**). Posterior rearranjo destes intermediários resulta na formação do heterociclo 4-amino-5-tioxo-1,2,4-triazolico (**C**).

## Esquema 12. Mecanismo proposto para formação do núcleo 4-amino-5-tioxo-1,2,4-triazólico



Assim, os ditiocarbazatos de potássio (**67**) formados pela reação de **66a-g** com dissulfeto de carbono foram submetidos, sem purificação prévia, a tratamento com hidrazina hidratada sob refluxo, seguida de adição de ácido clorídrico. Com o emprego desta metodologia foi possível a obtenção dos 1,2,4-triazóis **11a-d**. A formação dos derivados **11e-g**, com os grupos *p*-metóxilfenil, *p*-hidróxilfenil e *p*-fluorfenil, na posição-1, não foi observada. Nestes casos verificou-se apenas formação de produtos intermediários e recuperação dos precursores.

Como os compostos **11a**, **11b** e **11d** já foram sintetizados e caracterizados pelo nosso grupo de pesquisa, a identificação foi feita através de comparações com os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , HSQC publicados anteriormente por Formagio (2008) [32]. Os espectros estão apresentados em anexo (**Anexo A.1-A.6** - Pgs. 98-104)

A síntese do novo derivado **11c** foi evidenciada através dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 9**) em  $\delta_{\text{H}}$  13,9 e  $\delta_{\text{H}}$  6,53 atribuídos aos hidrogênios ligados ao



grupo mercapto e amino e no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 10) em  $\delta_{\text{C}}$  149,2 e  $\delta_{\text{C}}$  163,7 para os carbonos 3'' e 5'' do anel triazol. O singlete em  $\delta_{\text{H}}$  13,9, juntamente com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  163,7 para o grupo C=S, caracteriza o equilíbrio tautomérico tiona-tiol do derivado **11c** em solução (Tabela 5).

Figura 9. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para **11c**.

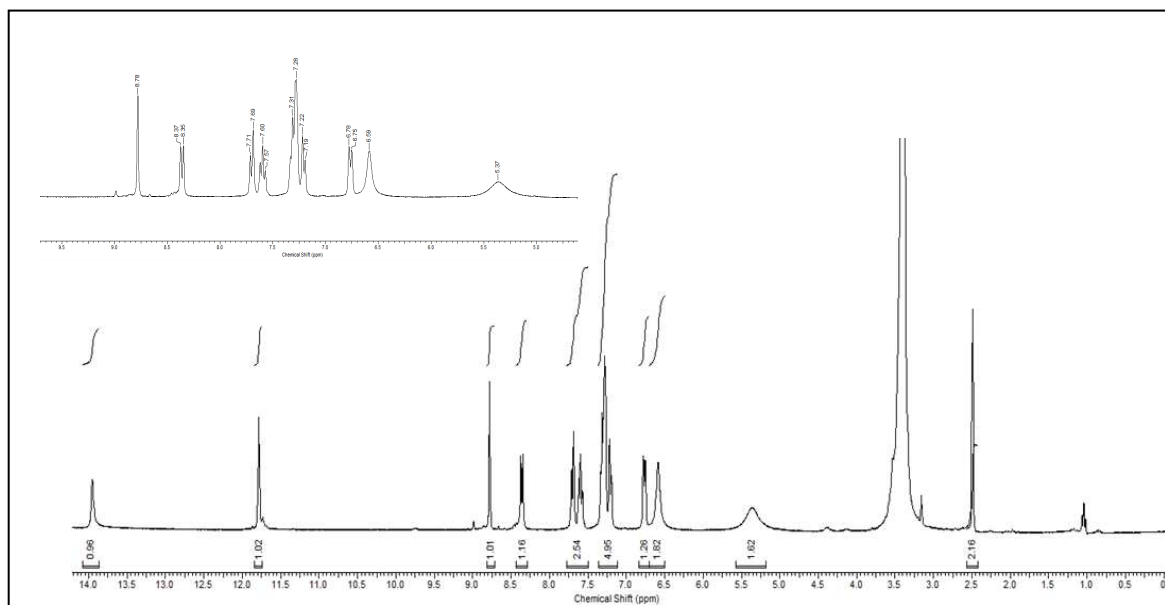
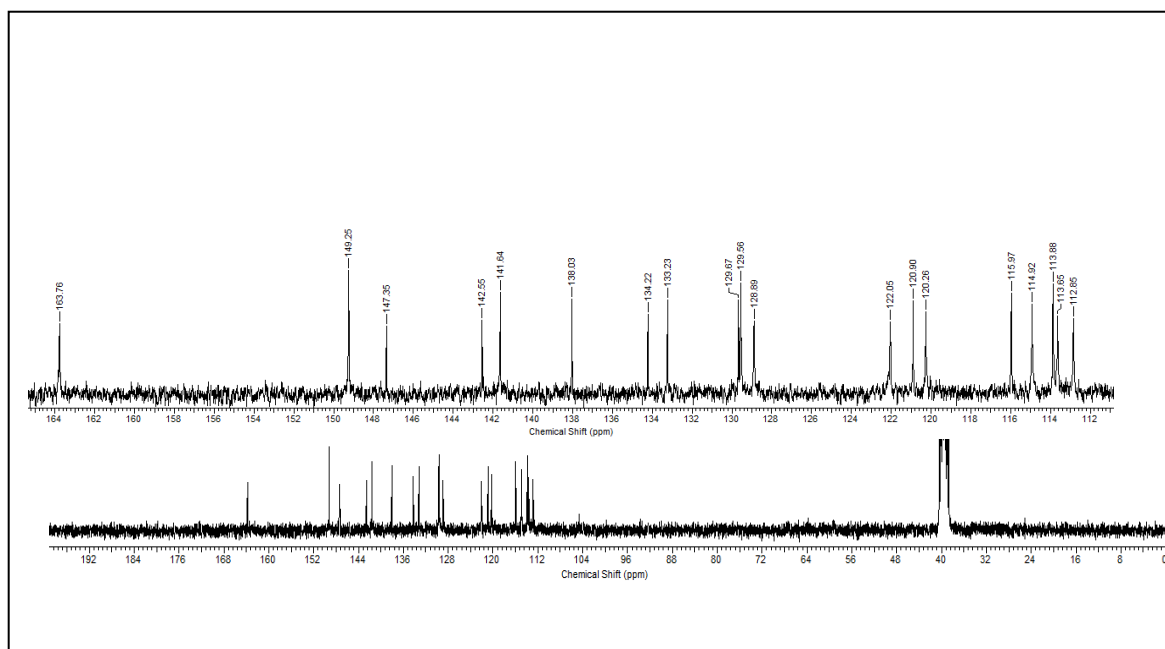


Figura 10. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para **11c**.



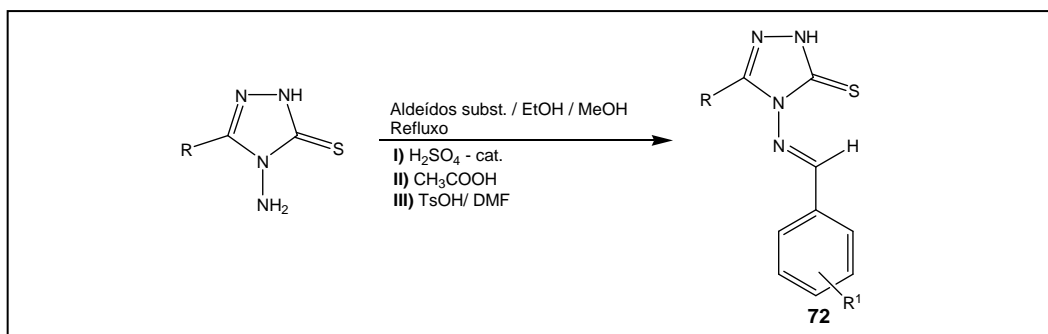
**Tabela 5.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300/75,5 MHz) para 3-(4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol-3-il)-3-nitro- $\beta$ -carbolina (**11c**)

C/H	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, J em Hz)
1	142,5	-
3	138,0	-
4	113,6	8,78 (s)
4a	129,6	-
4b	120,9	-
5	122,0	8,36 (d – 6,0)
6	120,2	7,19-7,31 (m)
7	128,9	7,60 (m)
8	112,8	7,68 (d – 6,0)
8a	141,6	-
9a	134,2	-
1'	133,2	-
2'	114,9	6,76 (d)
3'	147,3	-
4'	129,5	7,19-7,31 (m)
5'	113,8	7,19-7,31 (m)
6'	115,9	7,19-7,31 (m)
3''	149,2	-
5''	163,7	-
SH	-	13,90 (s)
NH <sub>2</sub>	-	6,59 (s)
NH	-	11,70 (s)

#### 4.1.2 Preparação e caracterização das 1-fenilsubstituído-3-(4-benzilidenoamino-5-tio/metiltio-1,2,4-triazolil) $\beta$ -carbolinas (**13**).

A literatura relata diferentes metodologias para preparação das bases de Schiff de (4-benzilidenoamino-5-mercapto-1,2,4-triazóis) (**72**) a partir dos 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis. Dentre estas, podemos citar a reação do 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis com diferentes aldeídos, em etanol ou metanol, sob refluxo [97,98,99]. Em alguns casos emprega-se catálise ácida com ácido sulfúrico [98,100], ácido acético sob refluxo [101,102,103] ou ácido p-toluenossulfônico em DMF [104] (**Esquema 13**).

**Esquema 13.** Metodologias para síntese de derivados 4-benzilidenoamino-substituídos a partir de 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazóis



Bai e col.(2008) [105] e Tabatabae e col.(2007) [106] sintetizaram uma série de derivados, a partir de 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazóis e aldeídos apropriados, na ausência de solventes empregando micro-ondas. Outros autores por sua vez fazem o uso de ácido acético [85] ou DMF/ácido acético [2].

Com o objetivo de obter as bases de Schiff a partir das 1-fenilsubstituído-3-(4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazolil) β-carbolinas **11a-d**, em nosso trabalho submetemos inicialmente o intermediário **11a** a reação com benzaldeído, sob diferentes condições descritas na literatura e apresentadas na **Tabela 6**. No entanto, em nenhum dos casos foi possível a obtenção dos produtos esperados. Os resultados obtidos, com a discussão dos possíveis produtos formados, estão apresentados na sequência.

**Tabela 6.** Condições testadas nas tentativas de obtenção dos derivados **13**

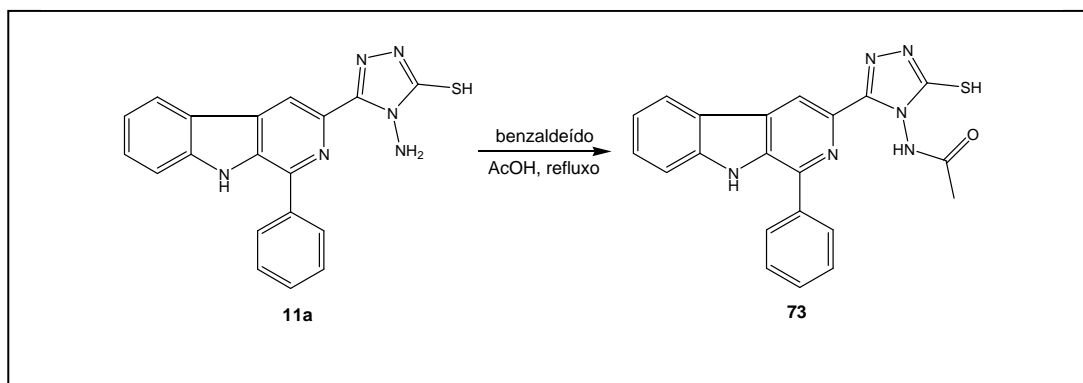
The reaction scheme shows the attempted synthesis of Schiff base **13** from **11a** and benzaldehyde. The reaction is crossed out with a large 'X' and labeled 'a'.

Entrada	<sup>a</sup> (Condições)	Ref.
1	<b>11a</b> + benzaldeído (1eq), AcOH, refluxo	[101]
2	<b>11a</b> + benzaldeído (1eq), EtOH/H <sub>2</sub> O, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> cat., refluxo	[100]
3	<b>11a</b> + benzaldeído (1 eq), EtOH, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH 4-5), refluxo	[100]
4	<b>11a</b> + Benzaldeído (1 eq), DMF, TsOH cat., refluxo	[104]

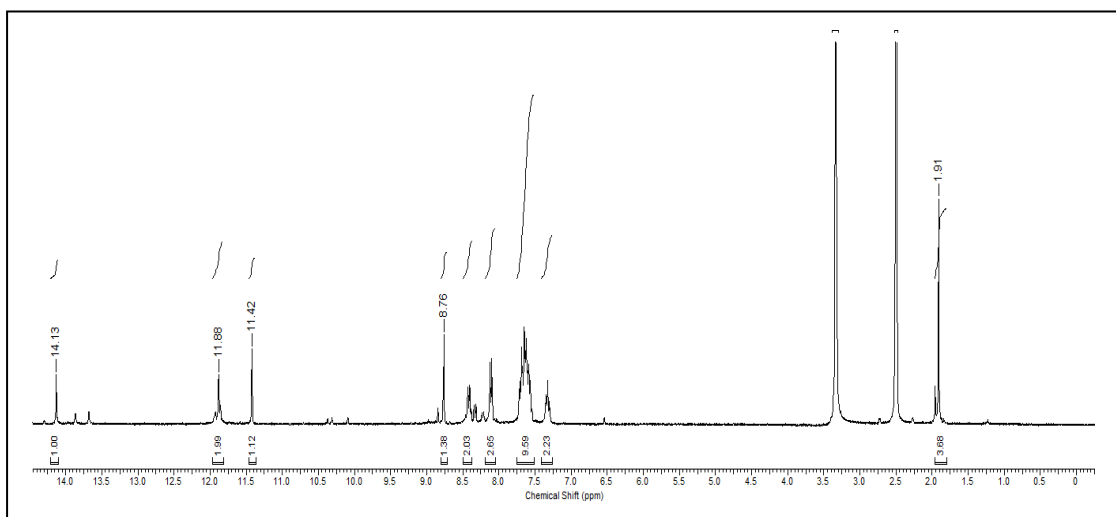
A condição empregada na **Entrada 1 (Tabela 6)** levou a uma N-acetilação do grupo amino do anel triazólico, resultando na formação do derivado **73 (Esquema 14)**.

A presença do singlete em  $\delta_H$  1,91, com integração para três hidrogênios, atribuído a uma metila, juntamente com a ausência do singlete em  $\delta_H$  6,52 referente ao grupo  $-NH_2$ , no espectro de RMN de  $^1H$  (**Figura 11**), confirmaram a N-acetilação do derivado **11a**.

**Esquema 14.** Obtenção do produto N-acetilado **73** a partir de **11a**.

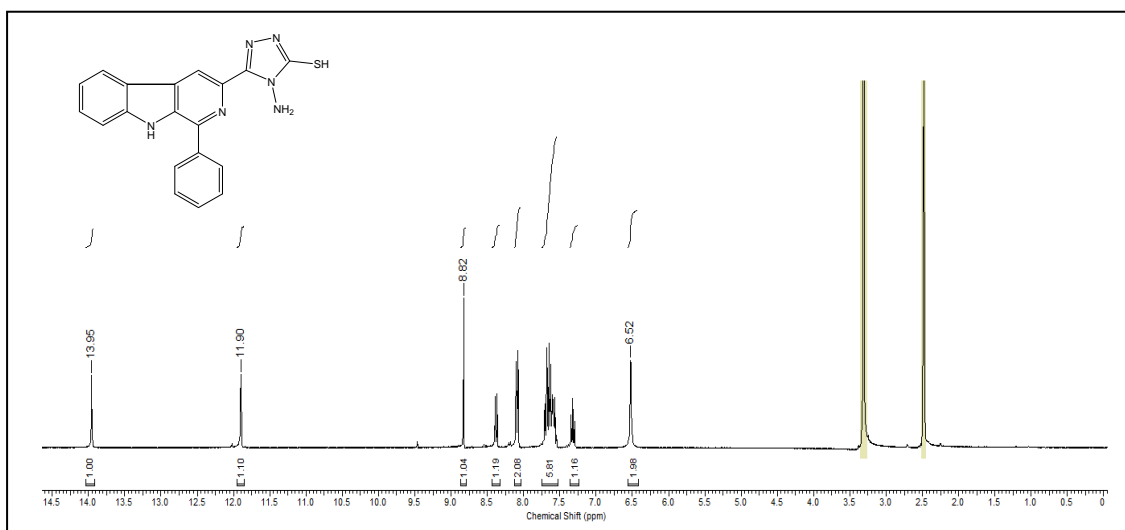


**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^1H$  (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para **73**.



Outra condição empregada e mostrada na **Entrada 2 (Tabela 6)** levou a recuperação do material de partida **11a**, evidenciado através do singlete em  $\delta_H$  6,52, com integração para 2 hidrogênios, referente ao  $NH_2$ , juntamente com o singlete em  $\delta_H$  13,95 para o SH no espectro de RMN de  $^1H$  (**Figura 12**).

**Figura 12.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz –  $\text{DMSO-}d_6$ ) para o produto obtido na **Entrada 2**.



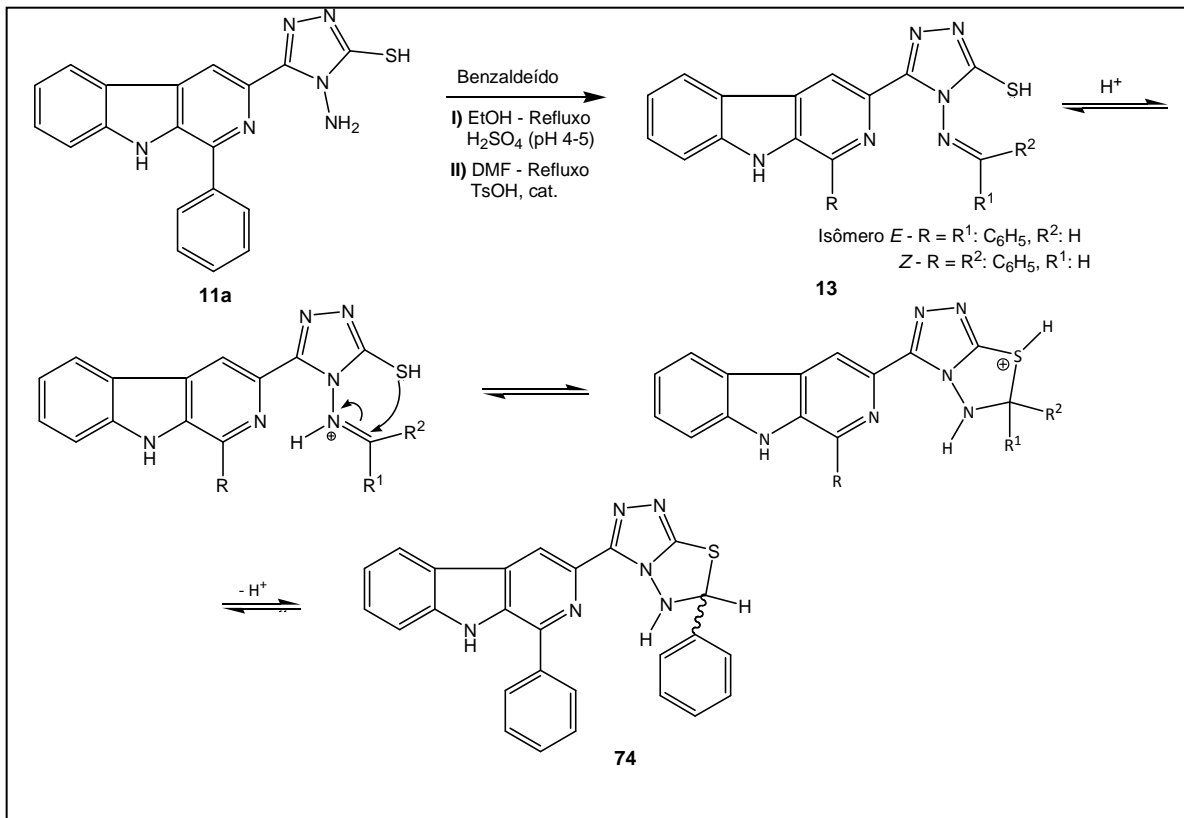
Para as condições apresentadas nas **Entradas 3 e 4**, observou-se a formação de uma mistura complexa de produtos que não puderam ser separados por cromatografia em coluna. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dos produtos brutos obtidos (**Figuras 13 e 14**) não foi observada a presença dos singletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,50 e  $\delta_{\text{H}}$  13,95 correspondentes aos hidrogênios dos grupos  $-\text{NH}_2$  e  $-\text{SH}$  do material de partida **11a**. A presença de multipletos na região entre  $\delta_{\text{H}}$  2,5-4,5 sugere a formação de produtos de ciclocondensação, provavelmente resultantes do ataque do átomo de enxofre do grupo 5-SH ao carbono imínico da 3-(4-feniletilenoamino-5-tio-1,2,4-triazolil)  $\beta$ -carbolicinas (**13**) inicialmente formadas (**Esquema 15**).

A possibilidade da formação dos isômeros **13-E** e **13-Z** pode levar a mistura de produtos na etapa de ciclização, originando mistura dos 1,2,4-triazolo-1,3,4-tiadiazóis **74**, o que pode ser evidenciado pela quantidade de sinais na faixa de  $\delta_{\text{H}}$  2,5-4,5 nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos produtos brutos obtidos (**Figuras 13 e 14**).

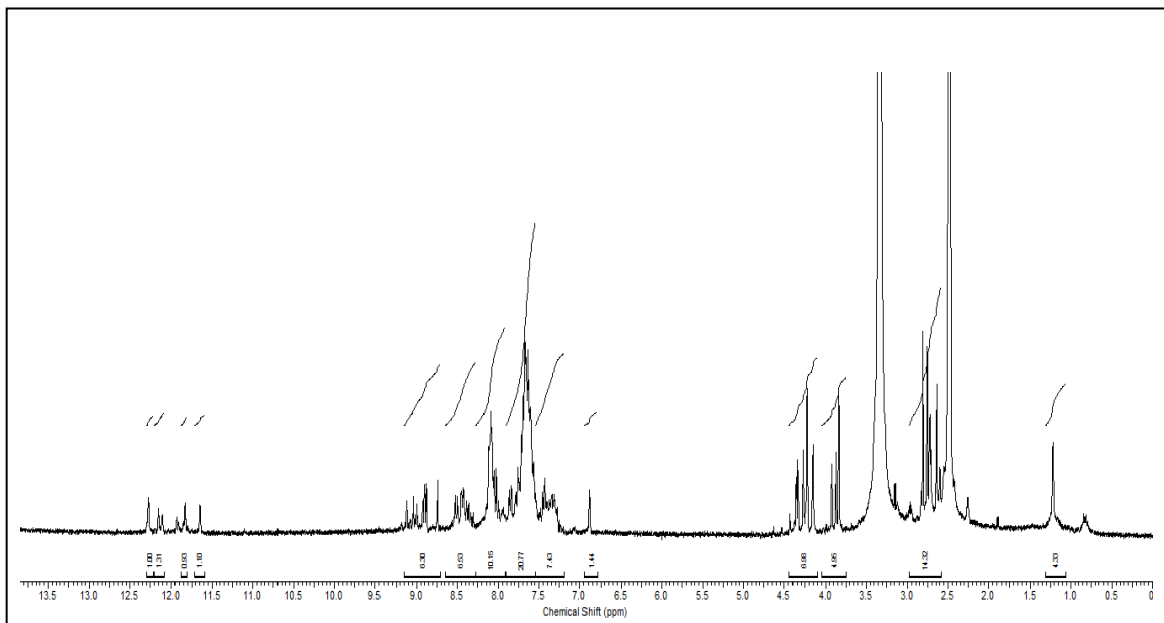
Esses dados estão de acordo com os valores apresentados por Shiradkar e col. (2007) [107] para o C-H (C-6'') ( $\delta_{\text{H}}$  3,7-4,7), assim como para os valores de N-H no heterociclo 1,2,4-triazolo-1,3,4-tiadiazol [108].

Segundo Chidananda e col. (2012) [104] os grupos 4-benzilidenoamino de 4-benzilidenoamino-5-mercapto-1,2,4-triazóis podem sofrer reações intramoleculares de Mannich, na presença catalítica de ácido *p*-tolueno sulfônico (TsOH), fornecendo derivados 1,2,4-triazolo-1,3,4-tiadiazólicos.

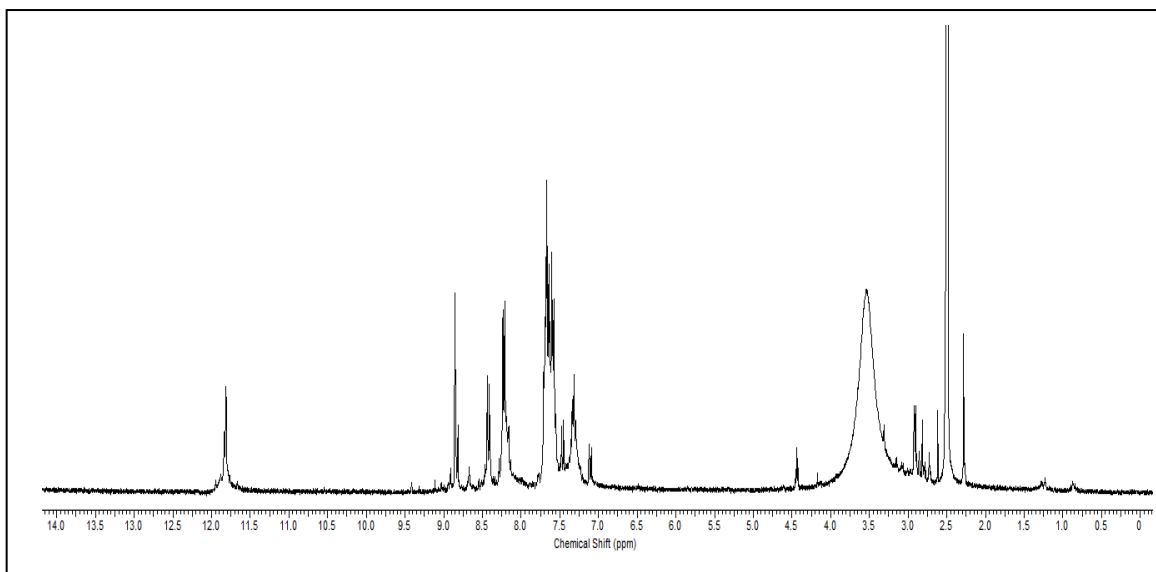
**Esquema 15.** Produtos de ciclocondensação resultantes da reação de **11a** com benzaldeído, sob catálise ácida (**Entradas 3 e 4**).



**Figura 13.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300,0 MHz – DMSO-*d*<sub>6</sub>) da reação de **11a** com benzaldeído, sob catálise ácida –H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Figura 14.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz –  $\text{DMSO-}d_6$ ) da reação de **11a** com benzaldeído, sob catálise ácida – TsOH.

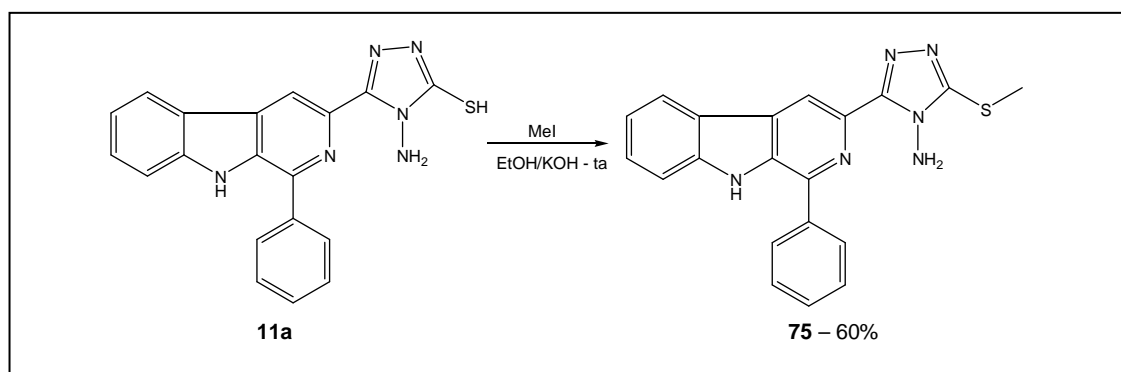


Como mencionado anteriormente, as metodologias apresentadas acima foram inviáveis para a síntese das bases de Schiff desejadas **13**, assim como, para formação dos heterociclos fundidos 1,2,4-triazol-1,3,4-tiadiazóis puros.

Na tentativa de se evitar a formação de produtos de ciclocondensação realizamos uma S-alkilação do derivado **11a**, para posterior obtenção das bases de Schiff 5-S-alkiladas.

Desta forma o 1,2,4-triazol **11a** foi tratado com iodeto de metila em meio básico, o que forneceu a 1-fenil-3-(4-amino-5-metil-1,2,4-triazol-5-iltio)- $\beta$ -carbolina (**75**) (**Esquema 16**).

**Esquema 16.** Síntese do produto S-metilado **75** a partir de **11a**.



A formação do composto **75** foi evidenciada pelos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 15**) em  $\delta_{\text{H}}$  6,74 ( $\text{NH}_2$ ), pela presença de um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  2,66 com

integração para 3 hidrogênios atribuída ao grupo S-metil do anel triazólico e ausência do sinal do SH em  $\delta_H$  13,95. Além disso, os sinais no espectro de RMN de  $^{13}C$  (Figura 14) em  $\delta_C$  151,7 (C-3''),  $\delta_C$  152,9 (C-5'') e  $\delta_C$  13,2 (S-CH<sub>3</sub>) confirmaram a obtenção de **75** (Tabela 7).

Figura 15. Espectro de RMN de  $^1H$  (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para **75**

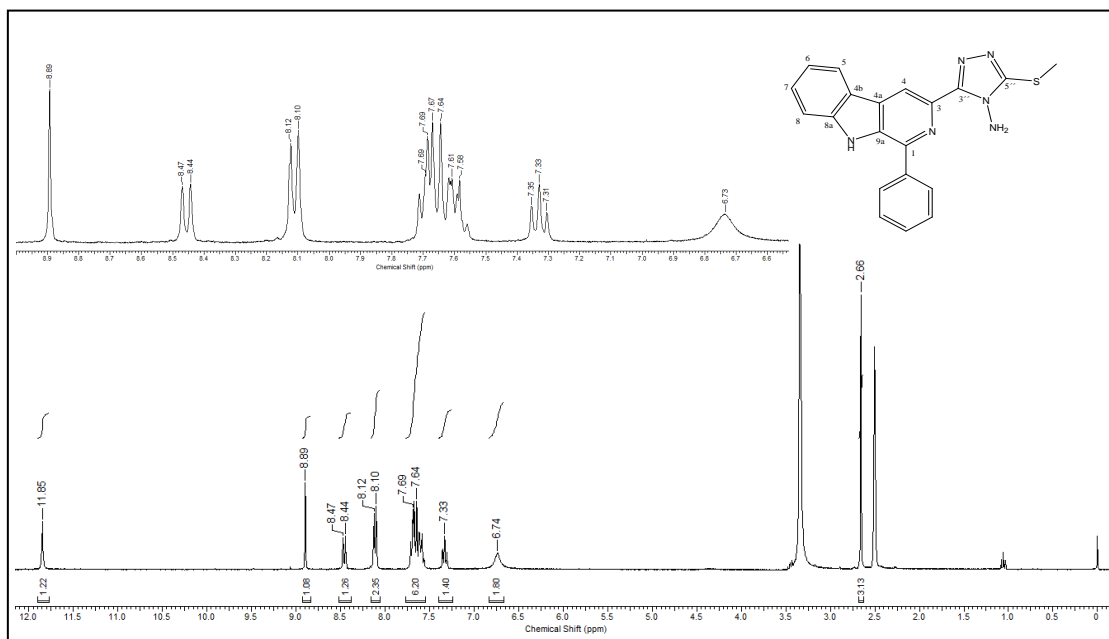
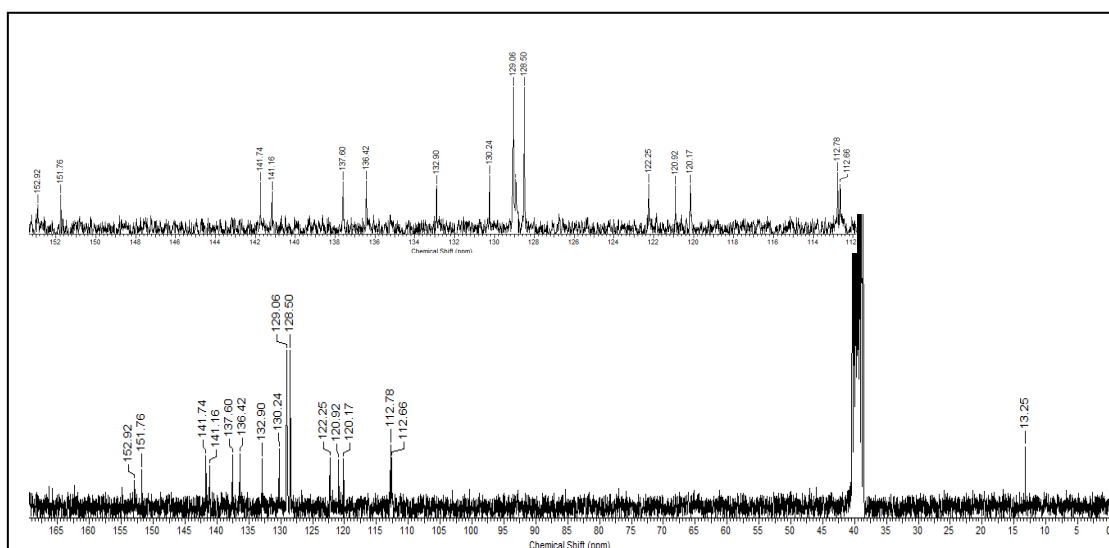


Figura 16. Espectro de RMN de  $^{13}C$  (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para **75**.





**Tabela 7.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300/75,5 MHz) para **75**.

C/H	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, J=Hz)
<b>1</b>	141,7	-
<b>3</b>	137,6	-
<b>4</b>	112,6	8,89 (s)
<b>4a</b>	130,2	-
<b>4b</b>	120,9	-
<b>5</b>	122,2	8,45 (d - 9,0)
<b>6</b>	120,2	7,33 (t - 6,0)
<b>7</b>	129,0	7,58-7,70 (m)
<b>8</b>	112,8	7,58-7,70 (m)
<b>8a</b>	141,2	-
<b>9a</b>	136,4	-
<b>1'</b>	132,9	-
<b>2'/6'</b>	128,5	8,11 (d - 6,0)
<b>3'/5'</b>	129,0	7,58-7,70 (m)
<b>4'</b>	128,5	7,58-7,70 (m)
<b>3''</b>	151,8	-
<b>4''</b>	NH <sub>2</sub>	6,74 (s)
<b>5''</b>	152,9	-
<b>SCH<sub>3</sub></b>	13,2	2,66 (s)
<b>NH</b>	-	11,85 (s)

A seguir, para a preparação das bases de Schiff S-metiladas, o produto **75** contendo o grupo 1,2,4-triazol S-metilado, foi inicialmente submetido à reação com o 2-clorobenzaldeído e benzaldeído, utilizando-se diferentes metodologias. As condições empregadas e resultados estão mostrados na **Tabela 8**.

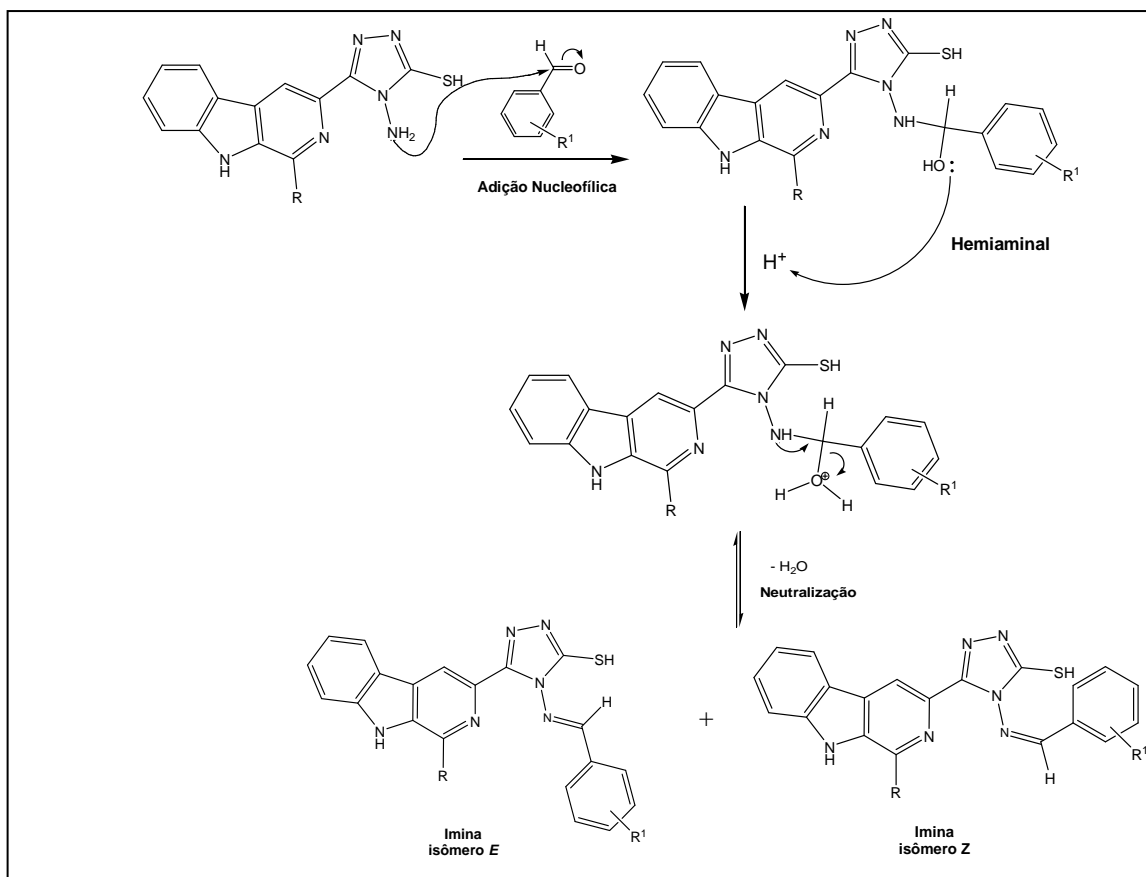
**Tabela 8.** Condições testadas e resultados obtidos nos procedimentos usados para preparação das bases de Schiff 5-S-metiladas

Entrada	a (condições)	Resultados
<b>1</b>	<b>75</b> + 2-Cl-PhCHO, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> cat, pH 4-5, EtOH, refluxo, 72 h	Mistura de <b>76-(E)</b> + <b>76-(Z)</b>
<b>2</b>	<b>75</b> + 2-Cl-PhCHO, DMF, refluxo, 48	<b>76-(E)</b> purificação em CC
<b>3</b>	<b>75</b> + PhCHO, DMF, MW doméstico, P-80-160W, 240 min	<b>75</b> + <b>77-(E)</b>
<b>4</b>	<b>75</b> + RCHO, DMF, MW laboratorial, P-50-100W, 90-100 min	Produtos <b>77-(E)</b> , <b>78</b> e <b>79</b> após purificação em CC

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 17**) do produto obtido nas condições da **Entrada 1** indicou a formação de dois produtos principais, sendo eles as bases de Schiff desejadas **76-E** e **76-Z**.

Segundo a literatura, a reação de condensação de aminas com aldeídos leva a formação de iminas, no caso, as denominadas bases de Schiff, conforme o mecanismo apresentado no **Esquema 17**.

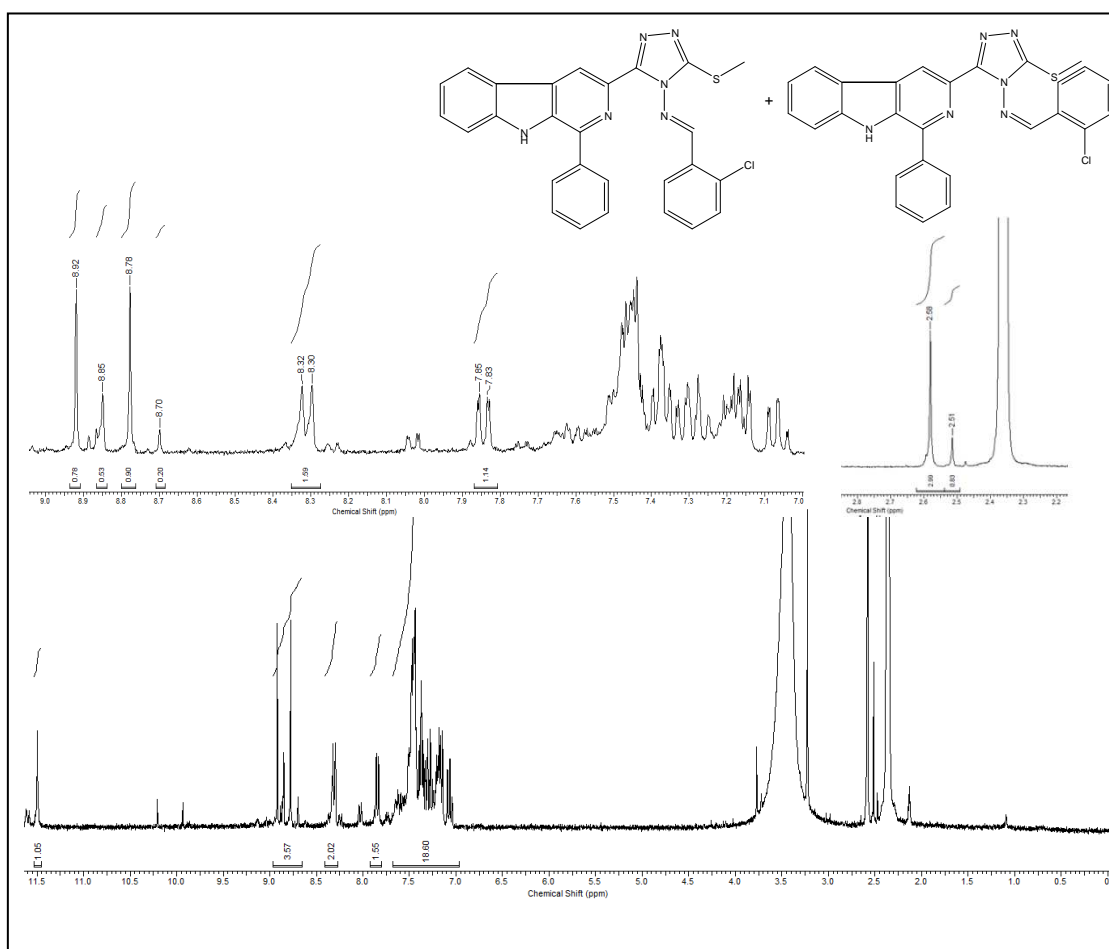
**Esquema 17.** Mecanismo para formação de bases de Schiff a partir 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis



A literatura relata a possibilidade de basee Schiff, existirem como forma dos isômeros geométricos *E/Z* sobre a dupla ligação (-N=C-). Estudos revelaram que esses compostos, quando em solução de  $\text{DMSO-}d_6$ , estarão presentes na forma do isômero geométrico *E* na percentagem mais elevada, enquanto que o isômero *Z* pode ser estabilizado em solventes menos polares [109,110,111].

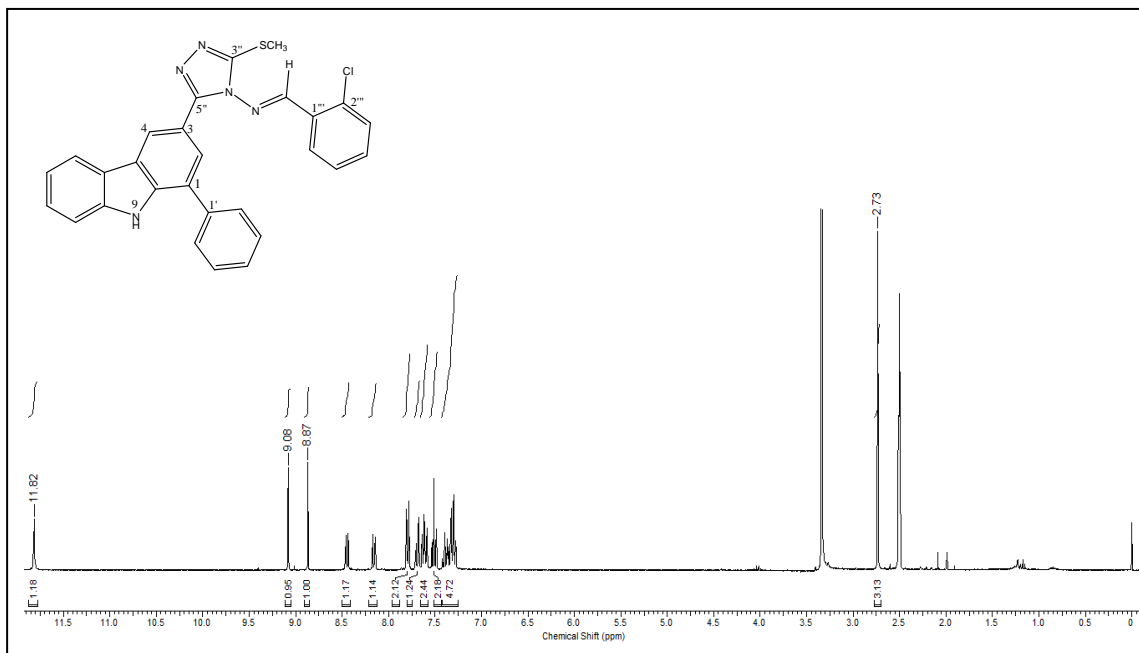
Sendo assim, os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  8,92 (maior intensidade) e em  $\delta_{\text{H}}$  8,85 (menor intensidade) foram atribuídos aos hidrogênios imínicos dos isômeros *E*-2-clorobenzilidenoamino (**76-E**) e *Z*-2-clorobenzilidenoamino (**76-Z**), respectivamente. A presença de dois conjuntos de singletos em  $\delta_{\text{H}}$  8,78 e  $\delta_{\text{H}}$  8,70, relativos ao N-H da posição-9 da unidade  $\beta$ -carbolina, e em  $\delta_{\text{H}}$  2,58 e  $\delta_{\text{H}}$  2,51 atribuídos para os grupos S-metil referente aos compostos **76-E** e **76-Z**, indicam a formação dos isômeros em mistura (**Figura 17**).

Figura 17. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz –  $\text{DMSO-d}_6$ ) para

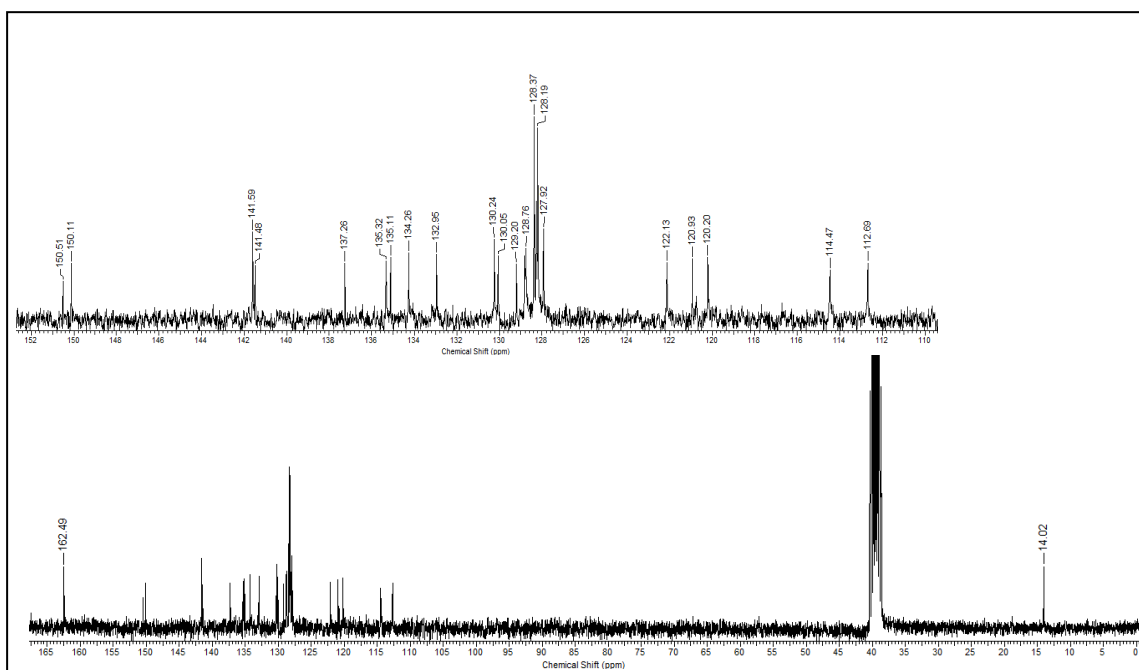


O emprego de refluxo em DMF (**Entrada 2, Tabela 8**) na reação de condensação de **75** com 2-clorobenzaldeído forneceu o derivado **76-(E)**, cuja formação foi confirmada pela ausência do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,74 (grupo 4-amino) e presença do singlete em  $\delta_{\text{H}}$  8,87 referente ao hidrogênio imínico do grupo aminobenzilideno, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 18**), juntamente com a presença do carbono imínico em  $\delta_{\text{C}}$  162,4 ( $\text{CH}=\text{N}$ ) e carbonos aromáticos ( $\delta_{\text{C}}$  110-135) no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 19**) (**Tabela 9**).

**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do produto **76-(E)**, obtido da condensação **75** com *o*-clorobenzaldeído.



**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) **76-(E)**, obtido da condensação **75** com *o*-clorobenzaldeído.



**Tabela 9.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300/75,5 MHz) para 1-fenil-3-[4-(2-clorobenzilidenoamino)-[1,2,4]-triazolo-5-metil-tio]- $\beta$ -carbolina (**76-E**).

C/H	$\delta_c$	$\delta_H$ (multiplicidade, J=Hz)
<b>1</b>	141,5	-
<b>3</b>	137,2	-
<b>4</b>	114,4	8,87 (s)
<b>4a</b>	130,0	-
<b>4b</b>	120,9	-
<b>5</b>	122,1	8,44 (d – 6,0)
<b>6</b>	120,2	7,30 (t – 7,5)
<b>7</b>	129,2	7,51 (t - 7,5)
<b>8</b>	112,6	7,68 (d – 6,0)
<b>8a</b>	141,4	-
<b>9a</b>	135,1	-
<b>1'</b>	132,9	-
<b>2'/6'</b>	128,3	7,79 (d – 9,0)
<b>3'/5'</b>	128,8	7,30 (t – 7,5)
<b>4'</b>	128,7	7,37-7,42 (m)
<b>3''</b>	150,1	-
<b>5''</b>	150,5	-
<b>SCH<sub>3</sub></b>	14,0	2,73 (s)
<b>1'''</b>	135,3	-
<b>2'''</b>	134,2	-
<b>3'''</b>	128,1	7,50 (d – 9,0)
<b>4'''</b>	130,2	7,51 (t - 7,5)
<b>5'''</b>	128,2	7,37-7,42 (m)
<b>6'''</b>	127,9	7,37-7,42 (m)
<b>CH=N</b>	162,4	9,08 (s)
<b>NH</b>		11,82 (s)

O 1,2,4-triazol-S-metilado **75** foi também submetido à reação com benzaldeído, sob as mesmas condições da Entrada 2, o que forneceu o produto **77-E** após purificação por cromatografia em coluna (CC).

A formação deste produto foi evidenciada no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 20**) pela ausência do sinal em  $\delta_H$  6,89 (grupo 4-amino) e presença do singlete em  $\delta_H$  8,98, além do sinal no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ /HSQC (**Figuras 21 e 22**) em  $\delta_c$  169,1 (CH=N) referentes ao hidrogênio e carbono imínico. Os sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  na região entre  $\delta_H$  7,0-8,0, bem como os sinais no espectro de  $^{13}\text{C}$  para região de carbonos aromáticos, confirmaram a formação da base de Schiff **77-E** (**Tabela 10**).

Figura 20. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz –  $\text{DMSO-}d_6$ ) para 77-(E).

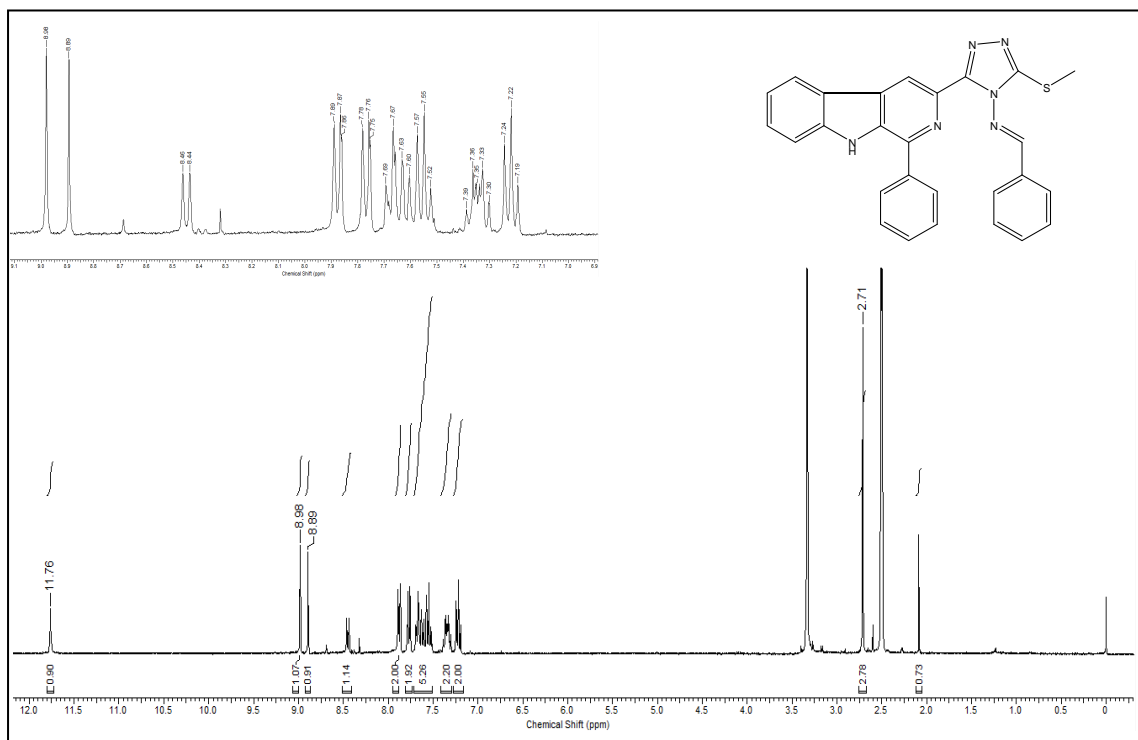


Figura 21. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz –  $\text{DMSO-}d_6$ ) para 77-(E).

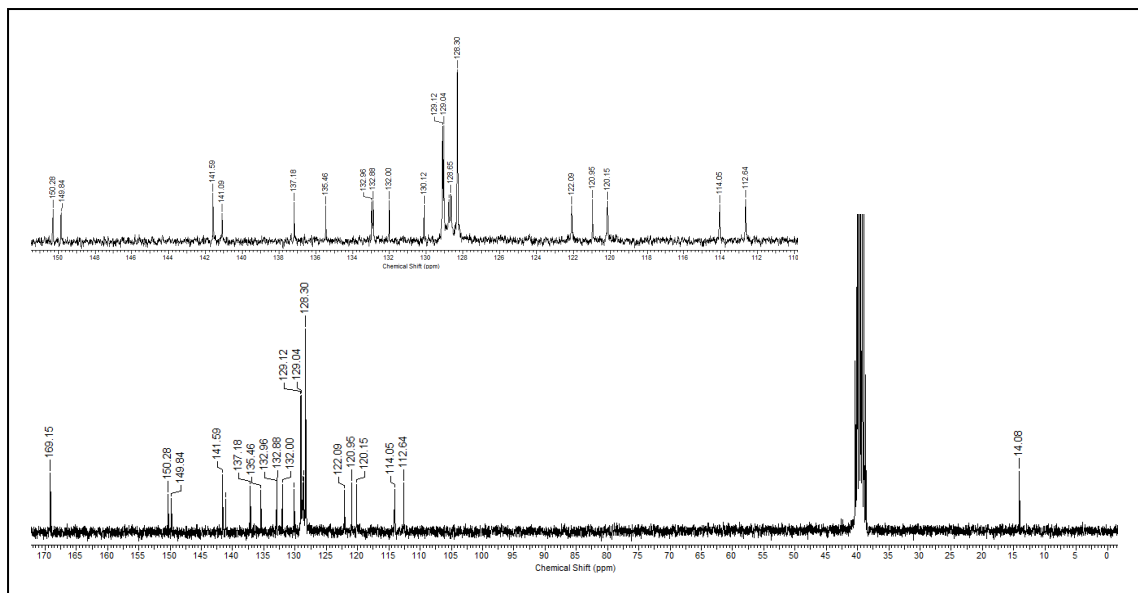


Figura 22. Mapa de contorno de HSQC para 77-(E).

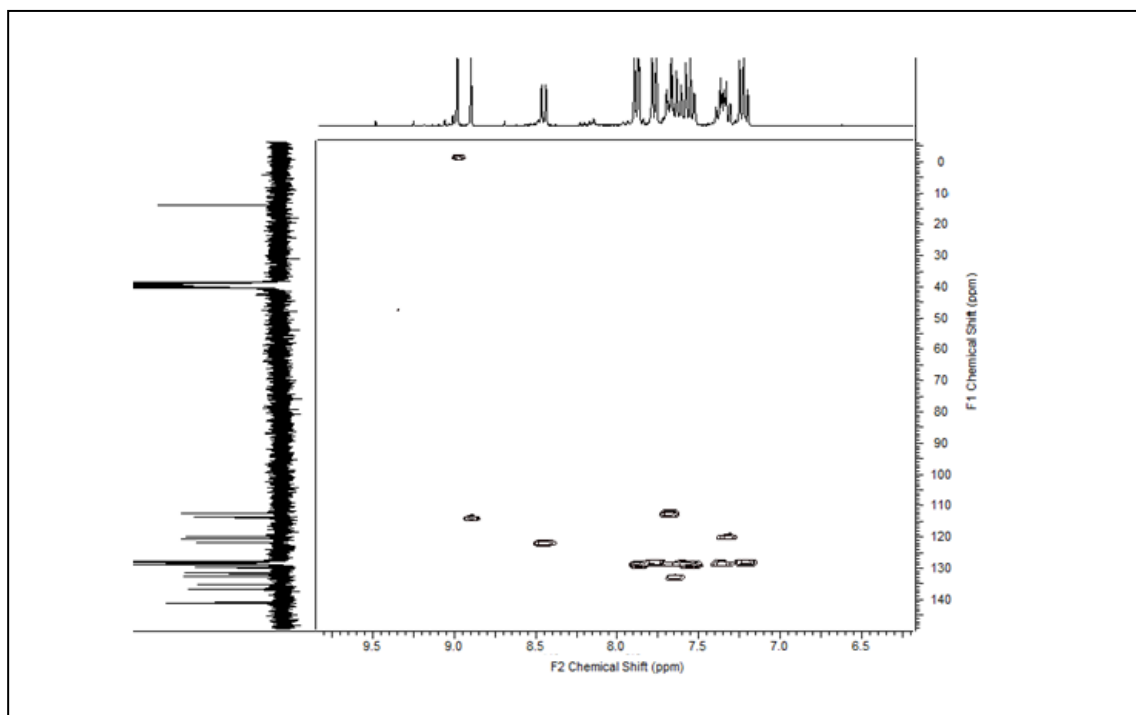


Tabela 10. Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300/75,5 MHz) para 1-fenil-3[4-(benzilidenoamino-5-metiltio-[1,2,4]-triazolo-)]- $\beta$ -carbolina 77-(E)

C/H	$\delta_c$	$\delta_H$ (multiplicidade, J=Hz)
1	141,5	-
3	137,1	-
4	114,0	8,89 (s)
4a	130,1	-
4b	120,9	-
5	122,0	8,45 (d – 6,0)
6	120,1	7,30-7,39 (m)
7	129,1	7,19-7,24 (m)
8	112,6	7,52-7,69 (m)
8a	141,0	-
9a	135,4	-
1'	132,9	-
2'/6'	128,3	7,77 (d, 6,0)
3'/5'	129,0	7,30-7,39 (m)
4'	128,6	7,30-7,39 (m)
3''	149,8	-
5''	150,2	-
1'''	132,0	-
2'''/6'''	129,1	7,88 (d, 6,0)
3'''/5'''	132,8	7,52-7,69 (m)
4'''	128,7	7,19-7,24 (m)
CH=N	169,1	8,98 (s)
SCH <sub>3</sub>	14,0	2,71 (s)
NH		11,7 (s)

A mesma metodologia foi empregada para a reação de **75** com *m*-nitrobenzaldeído e com *p*-hidroxibenzaldeído, porém não foi possível a obtenção das correspondentes bases de Schiff.

Devido ao elevado tempo de reação pelo uso de condições normais, como refluxo e dificuldade de se obter os compostos puros, optamos em realizar a síntese em micro-ondas, como mostrado nas **Entradas 3 e 4**.

A literatura tem relatado muitas vantagens relacionadas ao uso de micro-ondas em síntese orgânica tais como, aumento da seletividade e melhora no rendimento e tempo reacional [105,112].

Com o emprego de irradiação de micro-ondas doméstico (Consul), nas condições especificadas na **Entrada 3 (Tabela 8)**, observamos através de CCDA a formação da base de Schiff **77-(E)**, sem que houvesse consumo total do precursor.

Utilizando-se micro-ondas laboratorial e as condições empregadas na **Entrada 4 (Tabela 8)**, observamos a formação de dois produtos, com o consumo total do material de partida. Os produtos obtidos foram separados por cromatografia em coluna (CC). O produto majoritário obtido corresponde à base de Schiff 1-fenil-3-[4-feniletillidenoamino-(1,2,4)-triazolo-5-metil-tio]- $\beta$ -carbolina **77-(E)**.

O produto minoritário foi identificado como 1-fenil-3-(5-metiltio-1-H-1,2,4-triazolo-3-il)- $\beta$ -carbolina (**78**) (**Esquema 18**).

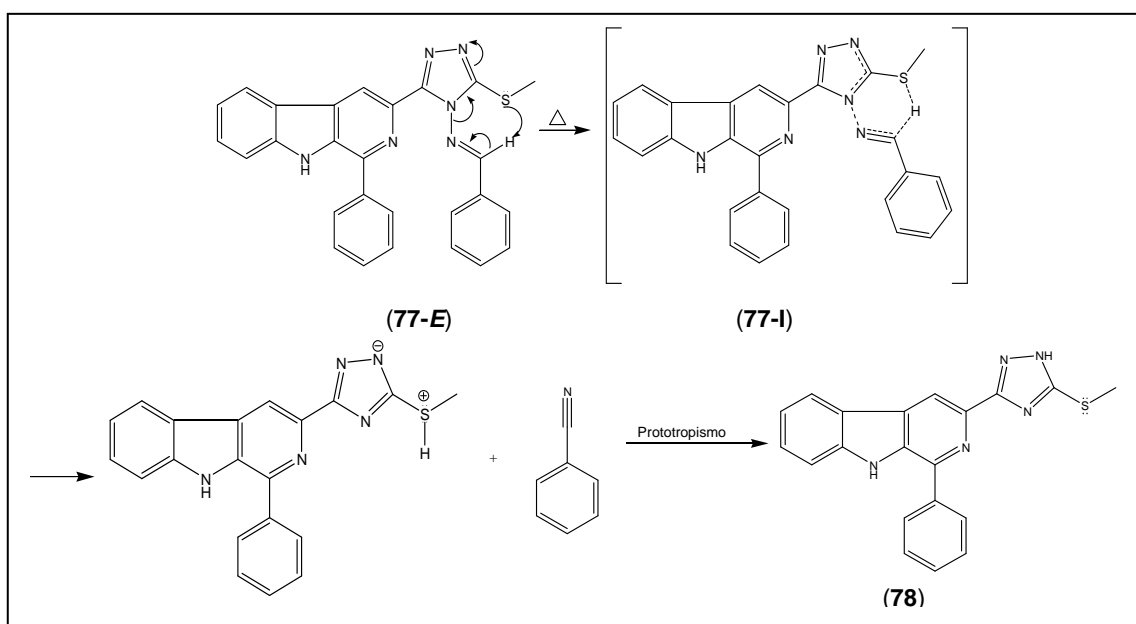
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 23**) de **78** observa-se o desaparecimento do singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,89 referente ao grupo 4-amino e na região entre  $\delta_{\text{H}}$  7,2-9,0; os valores de integral para hidrogênios aromáticos permaneceram os mesmos em relação ao precursor. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  14,3 e em  $\delta_{\text{H}}$  2,63 foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos N-H e S-metil do núcleo 1,2,4-triazol confirmando a formação de **78** (**Figura 23, Tabela 11**).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 24**) apresentou mudanças nos valores dos carbonos C-3'' e 5'' do anel 1,2,4-triazol ( $\delta_{\text{C}}$  156,0 e  $\delta_{\text{C}}$  160,1).

A partir dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC (**Figuras 23-25**), sugere-se que o derivado formado seja produto de termólise a partir da base de Schiff **77-(E)**. O mecanismo proposto demonstra o ataque do par de elétrons do átomo de enxofre ao hidrogênio imínico levando a um estado de transição cíclico de 6 membros, seguido de eliminação concertada de uma molécula de arilidenonitrila ( $\text{Ar-C}\equiv\text{N}$ ) (**Esquema 18**).



**Esquema 18.** Mecanismo proposto para formação de **78**



O trabalho realizado por Al-Awadii e col.(2001) [113] relata estudos cinéticos de pirólise em fase gasosa de 4-arilidenoimino-1,2,4-3-(2H)-onas e suas correspondentes 3(2H)-tionas mostrando a importância desse tipo de metodologia para síntese de nitrilas funcionalmente substituídas (instáveis em condições básicas e ácidas) como uma abordagem alternativa para conversão de aldeídos em nitrilas (**Esquema 19**).

**Esquema 19.** Proposta de pirólise em fase gasosa de 4-arilidenoimino-1,2,4-3-(2H)-onas

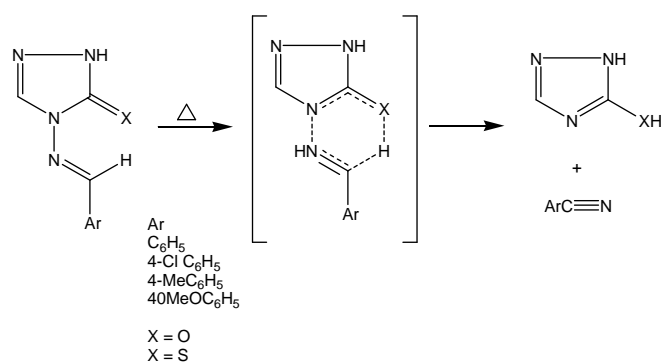


Figura 23. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para **78**.

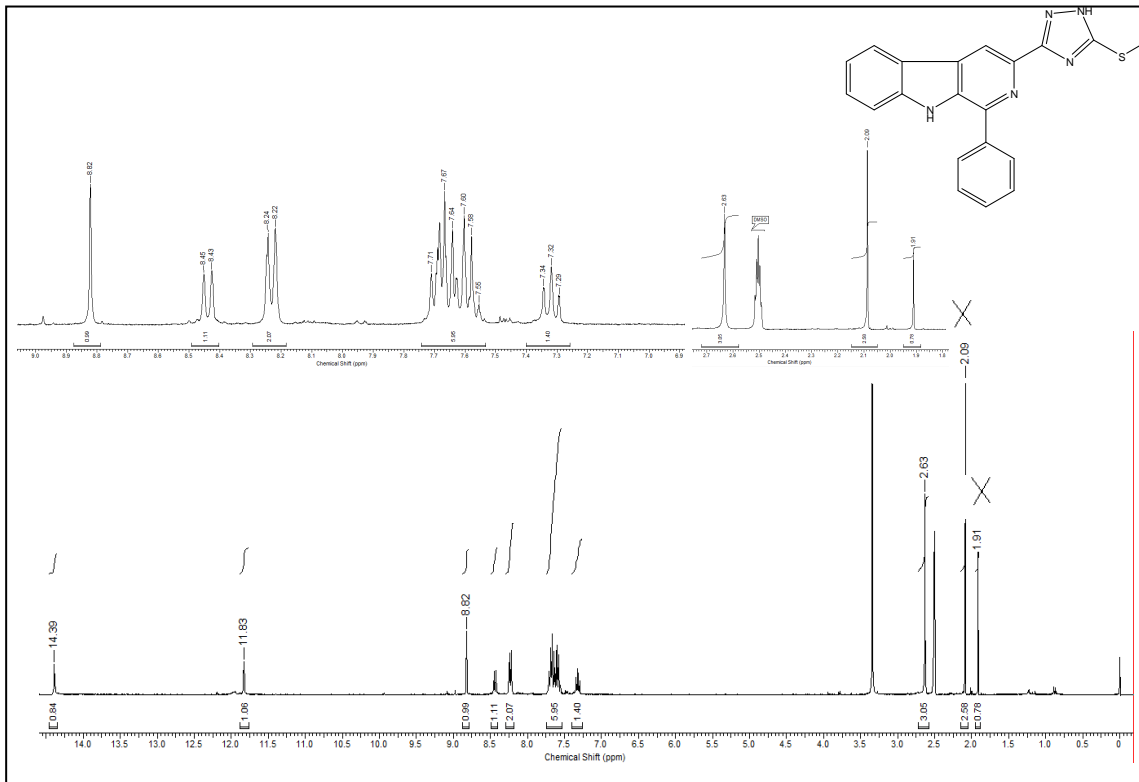


Figura 24. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para **78**.

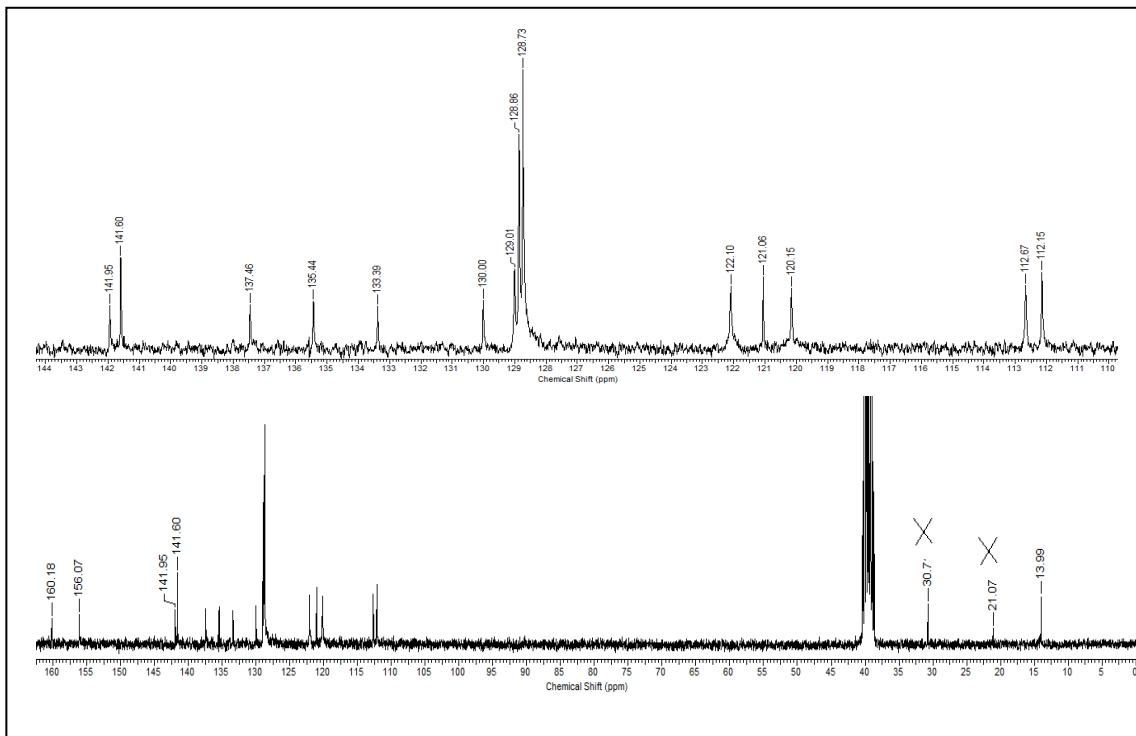


Figura 25. Mapa de contorno de HSQC para **78**.

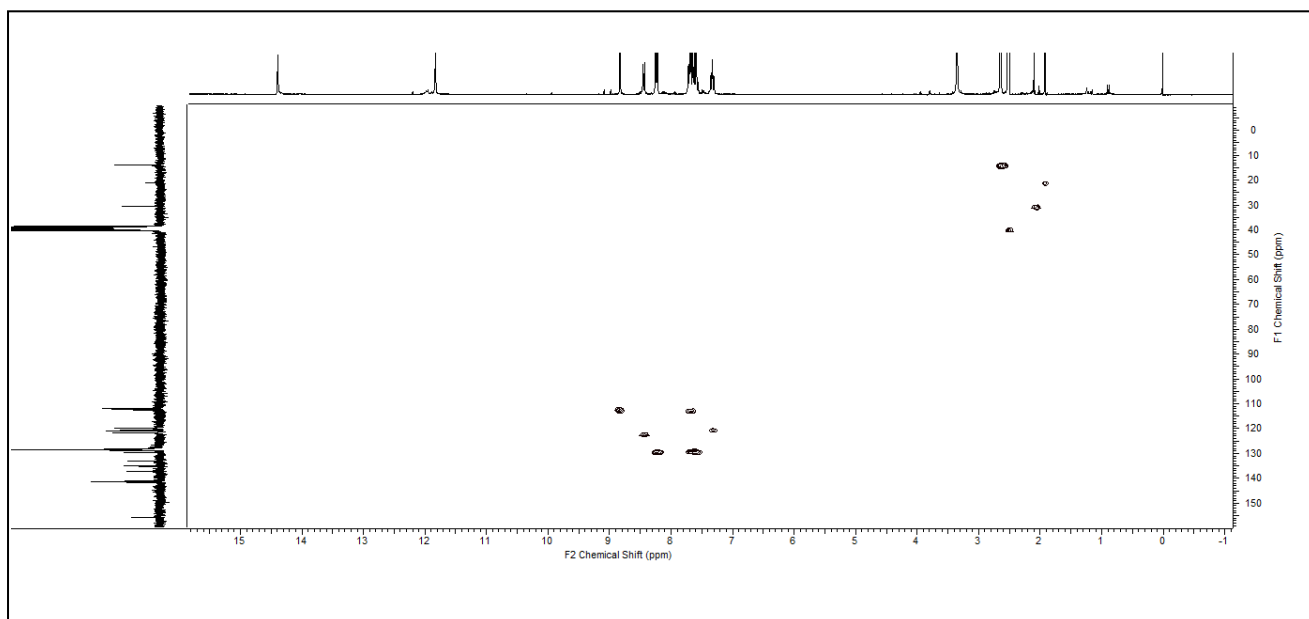
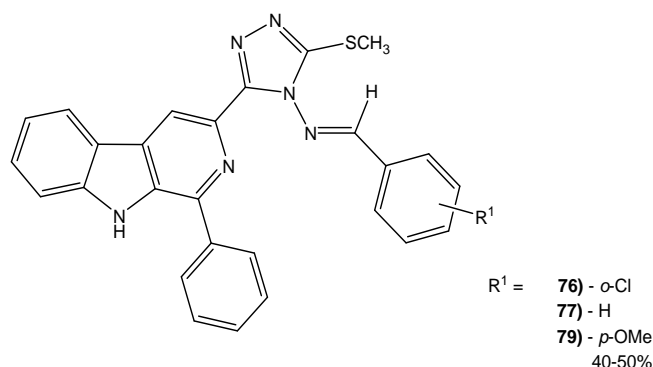


Tabela 11. Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300/75,5 MHz) para 1-fenil-3-(5-metil-1,2,4-triazolo-3-il)- $\beta$ -carbolina (**78**).

C/H	<b>78</b>	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, J=Hz)
<b>1</b>	141,9	
<b>3</b>	137,4	
<b>4</b>	112,7	8,82 (s)
<b>4a</b>	130,0	-
<b>4b</b>	121,1	-
<b>5</b>	122,1	8,44 (d, 6,0)
<b>6</b>	120,1	7,32 (t, 7,5)
<b>7</b>	129,1	7,55-7,71 (m)
<b>8</b>	112,1	7,55-7,71 (m)
<b>8a</b>	141,6	-
<b>9a</b>	135,4	-
<b>1'</b>	133,4	-
<b>2'/6'</b>	128,7	8,24 (d - 6,0)
<b>3'/5'</b>	128,8	7,55-7,71 (m)
<b>4'</b>	128,8	7,55-7,71 (m)
<b>3''</b>	156,0	-
<b>5''</b>	160,1	-
<b>SCH<sub>3</sub></b>	13,9	2,63
<b>NH</b>		11,83 (s)

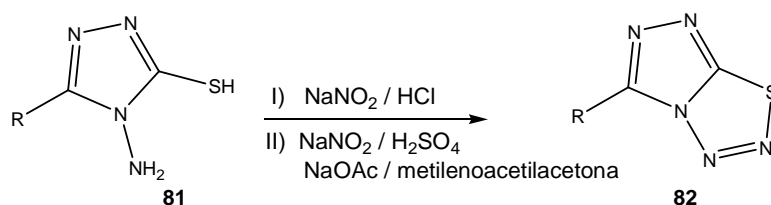
Otimizada as condições reacionais para preparação de **77-(E)**, aplicou-se a metodologia descrita na **Entrada 4** para a reação do intermediário **75** com 2-clorobenzaldeído, *p*-metoxibenzaldeído e *m*-nitrobenzaldeído, o que levou a formação das bases de Schiff **76** e **79**, respectivamente. A formação do produto minoritário **78**, também foi observada na síntese de cada composto. As identificações foram feitas através dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Anexos A.7 e A.8, Pgs 105 e 106**).



#### 4.1.3 Preparação e caracterização 3-(1-substituído-9H-β-carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazóis(14)

Na literatura são descritas duas metodologias principais para a síntese do heterociclo 1,2,4-triazolo-[4,3-*d*]-1,2,3,4-tiatriazol (**82**) a partir de 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis (**81**). Uma delas envolve a reação de **81** com nitrito de sódio, na presença de ácido clorídrico (Metodologia I) [114] e a outra, utiliza ácido sulfúrico, nitrito de sódio, seguido da adição de solução etanólica de acetato de sódio e metileno acetil acetona (Metodologia II) [115] (**Esquema 20**).

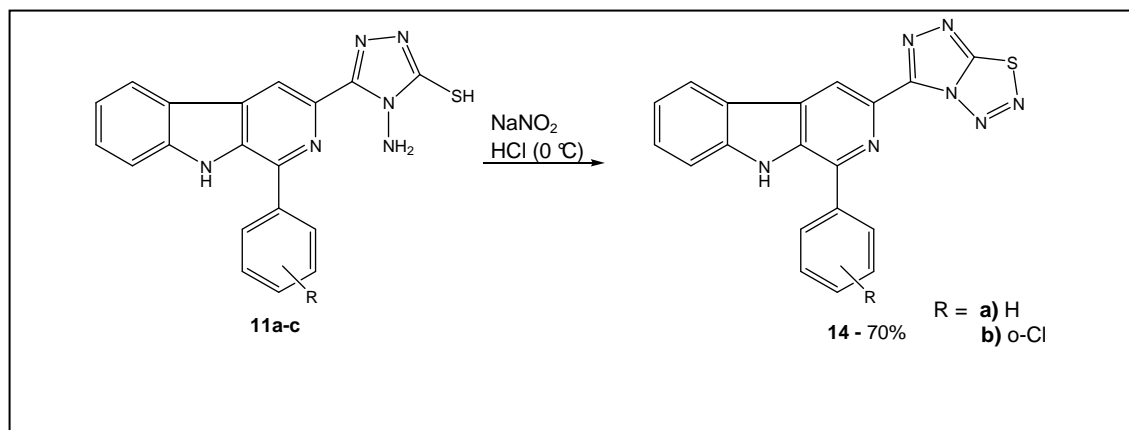
**Esquema 20.** Metodologias descritas para a obtenção de 1,2,4-triazolo-[4,3-*d*]-1,2,3,4-tiatriazol (**82**)



A obtenção dos 3-(1-substituído-9H-β-carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-*d*]-1,2,3,4-tiatriazóis (**14a-b**) foi realizada segundo a metodologia I (**Esquema 13**) descrita por El Shehry, 2010 [114]. Para isto, as 1-fenilsubstituído-3-(4-amino-5-tiol-1,2,4-triazolo-3-il)-β-carbolinas (**11a-b**) foram tratadas com nitrito de sódio, em ácido clorídrico, ocorrendo então a reação de diazotação, com posterior ciclização e

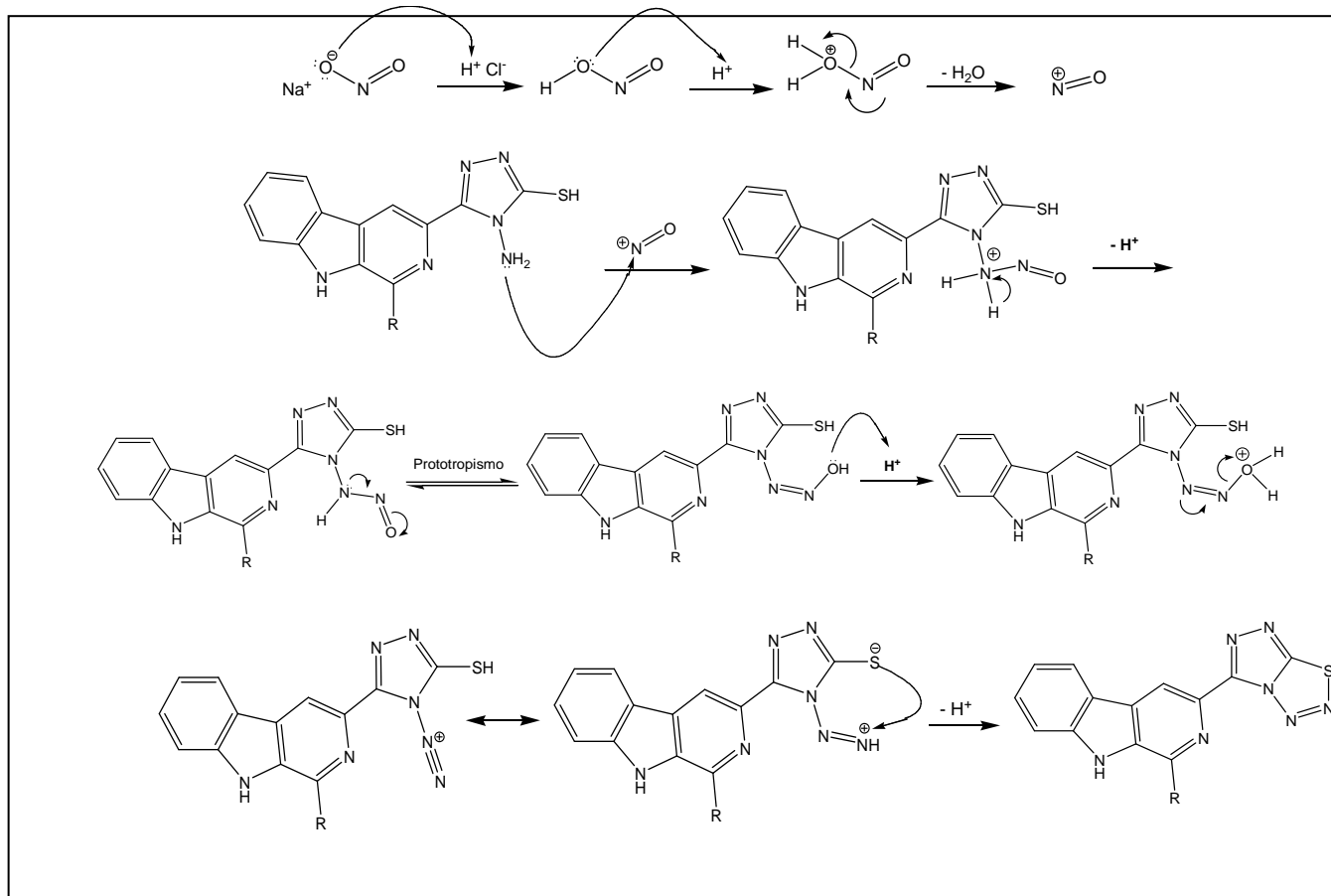
formação dos derivados com o heterociclo fundido 1,2,4-triazolo-[3,4-d]-1,2,3,4-tiazol (**14a-b**) (**Esquema 21**).

**Esquema 21.** Síntese de 3-(1-substituído-9H-β-carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiazóis (**14a-b**)



O mecanismo para formação dos derivados **14a-b** está apresentado no **Esquema 22**.

**Esquema 22.** Mecanismo proposto para formação dos derivados **14a-b**



A formação dos derivados **14a-b** foi evidenciada através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 26** e **Anexo A.11-10, Pgs 109-110**) pela ausência dos singletos na região de  $\delta_{\text{H}}$  6,47-7,06 e 13,90-14,01 referentes aos hidrogênios dos grupos 4-amino e 5-mercaptop, respectivamente, do núcleo 1,2,4-triazol de **11a-c**.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 27** e **Anexo A.12, Pg 110**) apresentaram mudanças nos deslocamentos dos carbonos C-3'' e 5'' do núcleo 1,2,4-triazol, devido à inserção do grupo azo (N=N) e formação do heterociclo 1,2,4-triazolo-[3,4-d]-1,2,3,4-tiatiazolil. Para o derivado **14a**, os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  147,3 e 163,8, referentes aos carbonos C-3'' e 5'' do precursor foram deslocados para  $\delta_{\text{C}}$  157,4 e 158,3, respectivamente (**Figura 27 – Tabela 12**). O mesmo comportamento foi verificado para o derivado **14b** (**Anexos A.9 e 10, Pg 108 e 109**).

**Figura 26.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz –  $\text{DMSO-}d_6$ ) para **14a**.

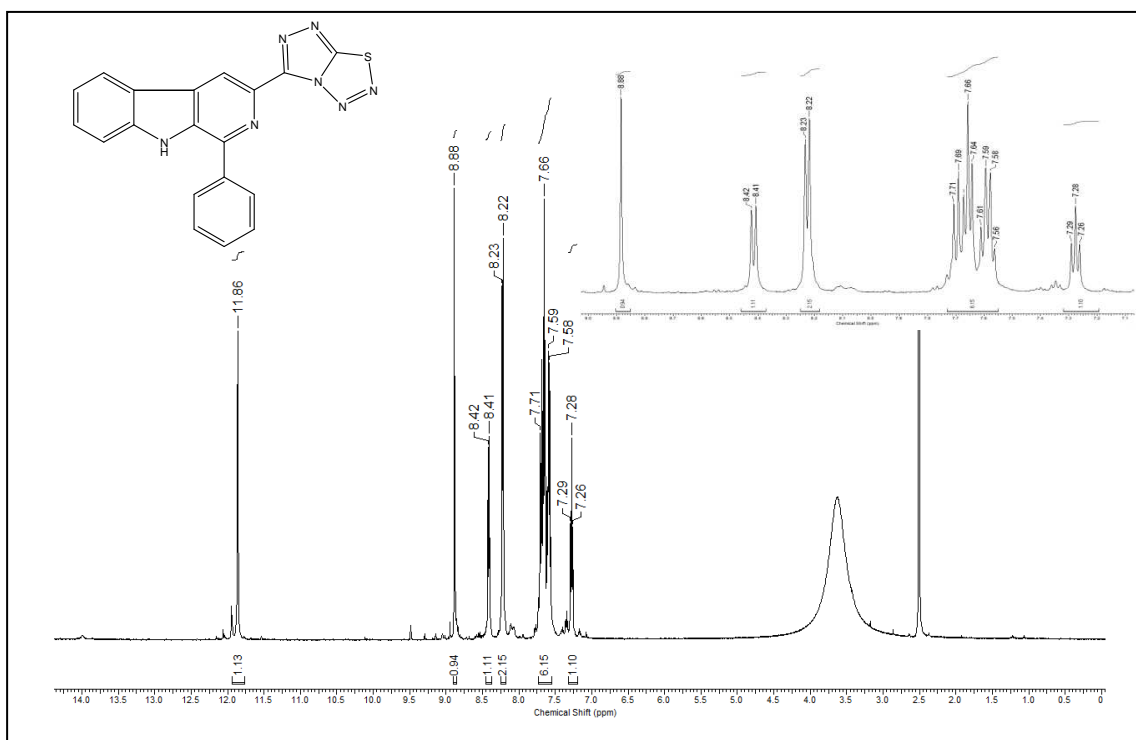


Figura 27. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para **14a**.

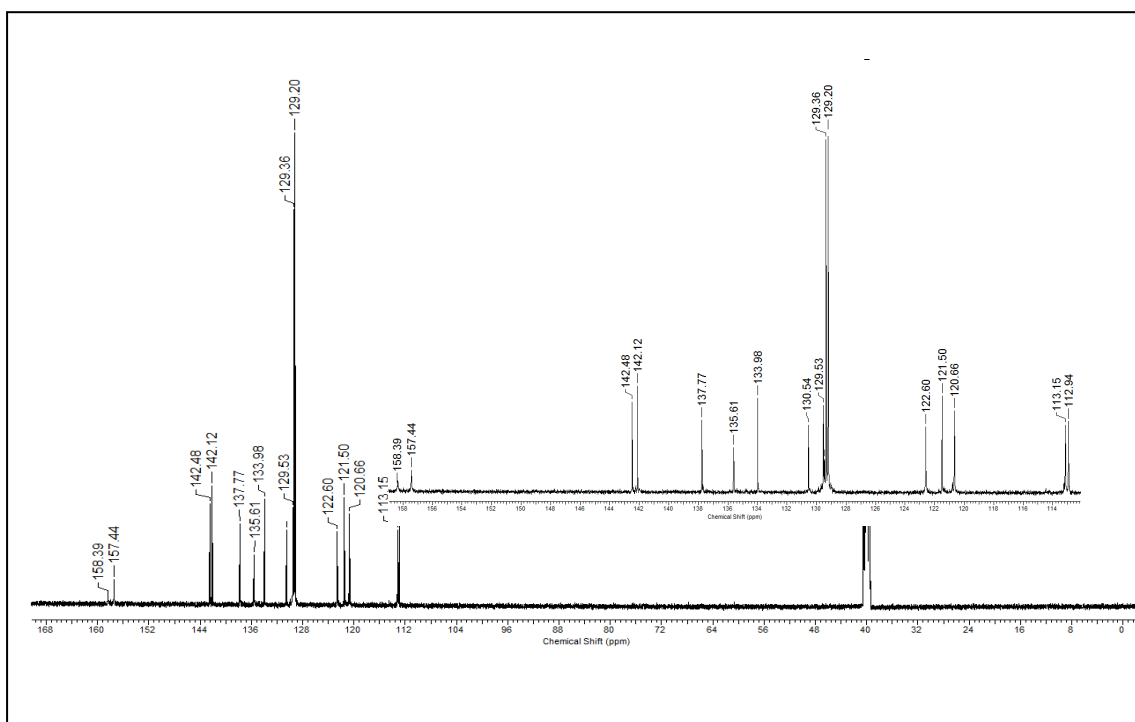
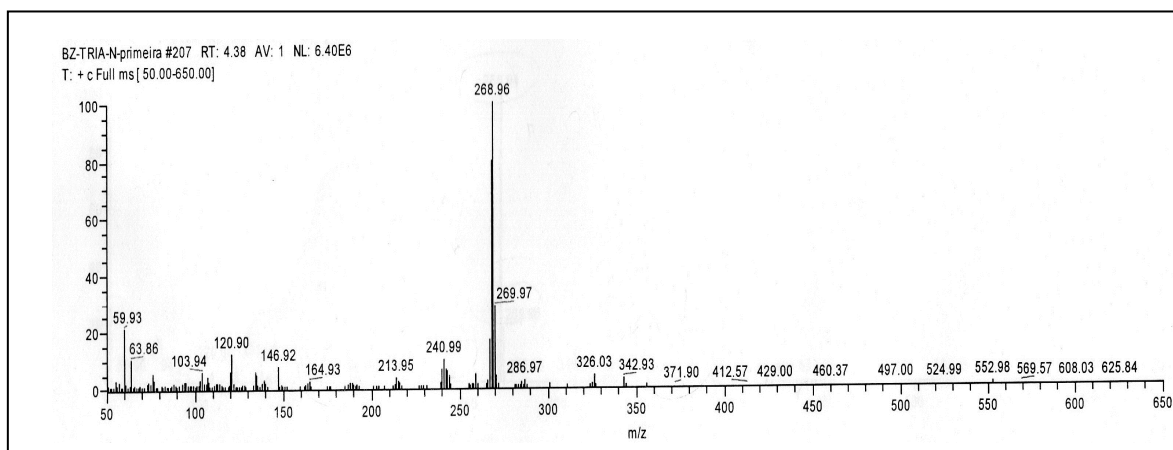


Tabela 12. Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300/75,5 MHz) para 3-(1-fenil-9H- $\beta$ -carbolin-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazole (**14a**)

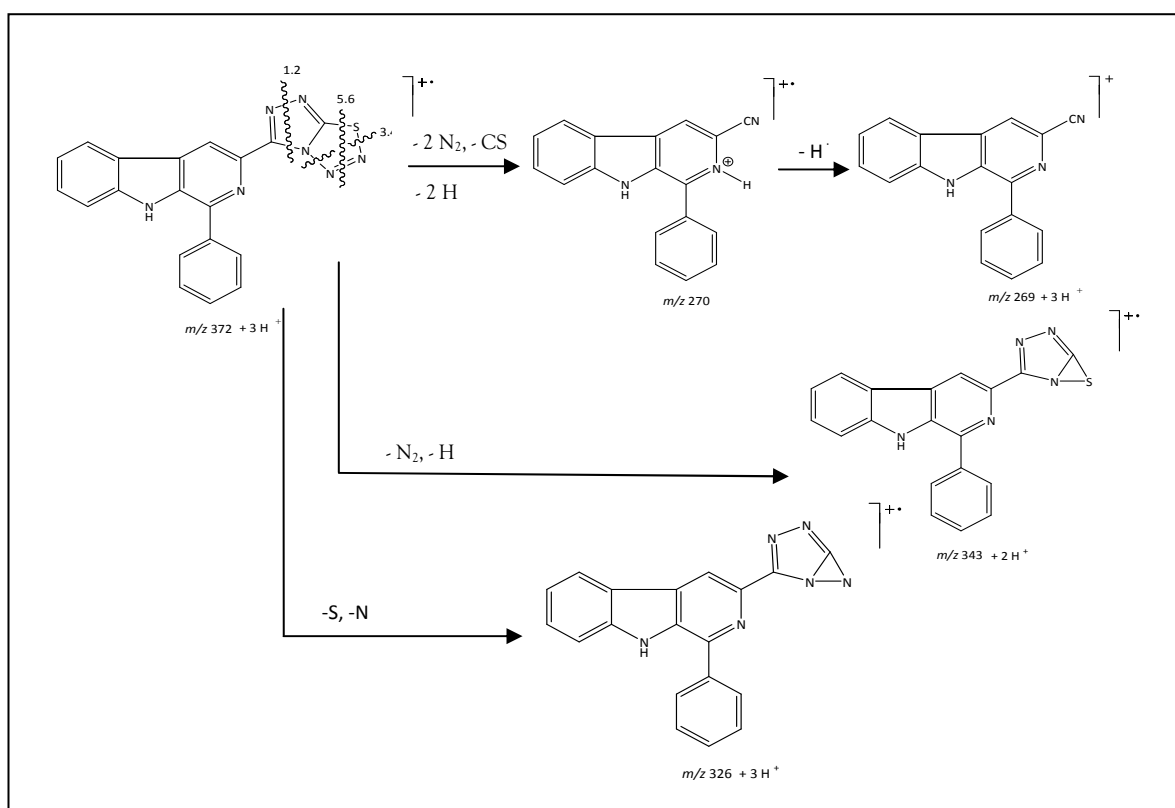
C/H	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, J=Hz)
1	142,4	-
3	137,7	-
4	113,1	8,88 (s)
4a	130,5	-
4b	121,5	-
5	122,6	8,41 (d – 3,0)
6	120,6	7,28 (t – 6,0)
7	129,4	7,56 – 7,71 (m)
8	112,9	7,56 – 7,71 (m)
8a	142,1	-
9a	135,6	-
1'	133,9	-
2'/6'	129,2	8,22 (d – 3,0)
3'/5'	129,3	7,56 – 7,71 (m)
4'	129,5	7,56 – 7,71 (m)
3''	157,4	-
5''	158,3	-
NH	-	11,86 (s)

análise do espectro de massas CG-MS (70 eV) para 3-(1-fenil-9*H*-β-carbolin-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazole **14a** (**Figura 28**) possibilitou confirmar a formação do heterociclo fundido através do pico do íon molecular em  $m/z$  372, correspondente a 369 (massa molar) + 3H<sup>+</sup>, referente ao produto protonado, e pelos fragmentos em:  $m/z$  (rel. int.%) 343 [MM - N<sub>2</sub> + 2H<sup>+</sup>], 10]; 326 [MM - (S+N) = 3H<sup>+</sup>, 10]; 269 [MM - CSN<sub>4</sub> + 3H<sup>+</sup>, 100] (**Esquema 23**).

**Figura 28.** Espectro de massas (IE, 70eV) para **14a**.



**Esquema 23.** Proposta de fragmentação para 3-(1-fenil-9*H*-β-carbolin-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazole (**14a**).





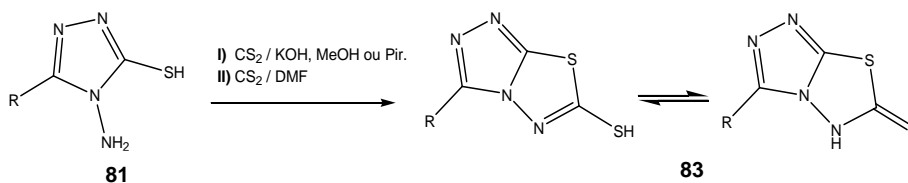
#### 4.1.4 Preparação e caracterização das 3-(1-substituído-9H-β-carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-6-tiol/tiones (15)

A partir de um levantamento bibliográfico verificou-se que duas principais metodologias são utilizadas para a obtenção do núcleo 1,2,4-triazolo-[3,4-*b*]-1,3,4-tiadiazol-6-tiol (**83**), a partir de 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis (**81**) (**Esquema 24**):

**Metodologia I)** a partir da reação de 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis (**81**) com dissulfeto de carbono, em meio básico, utilizando-se como bases solução metanólica de hidróxido de potássio [116-118] ou piridina [119,120].

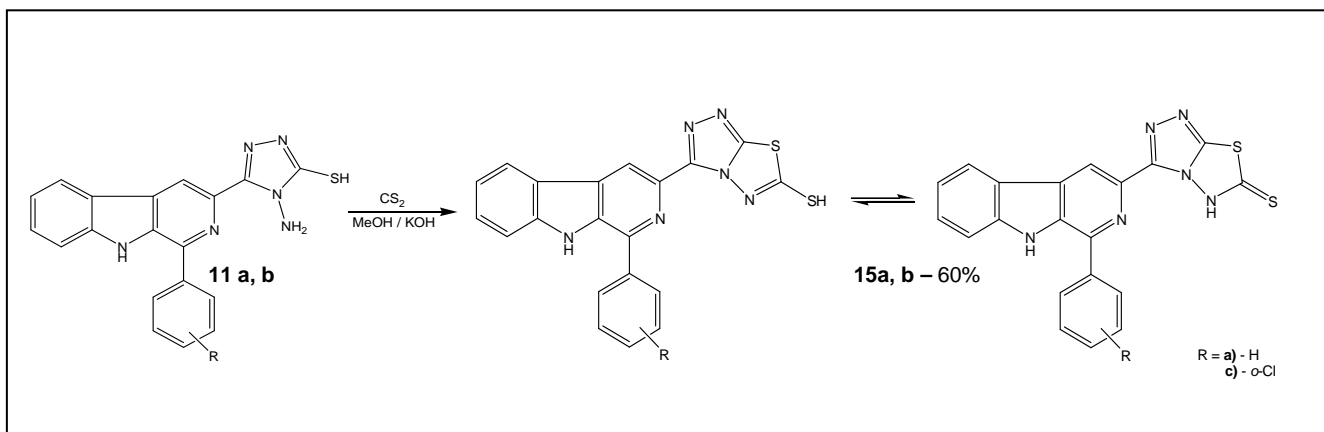
**Metodologia II)** a partir da reação de 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis (**81**) com dissulfeto de carbono, em DMF, na ausência de base [81] .

**Esquema 24.** Metodologias descritas para a obtenção de 1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazol-6-tiol/tiones (**83**).



Para obtenção das 3-(1-substituído-9H-β-carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazol-6-tiol/tiones (**15**), utilizou-se como precursores os 1,2,4-triazóis e a Metodologia I, empregando-se como base hidróxido de potássio, em metanol (**Esquema 25**). Inicialmente foram utilizados 1,2 equivalentes de dissulfeto de carbono, porém o consumo do reagente não foi observado através de cromatografia em camada delgada (CCD). Sendo assim, empregou-se maior quantidade de dissulfeto de carbono (2,0 equivalentes), aumentando-se também o tempo reacional de 48 horas para 72 horas.

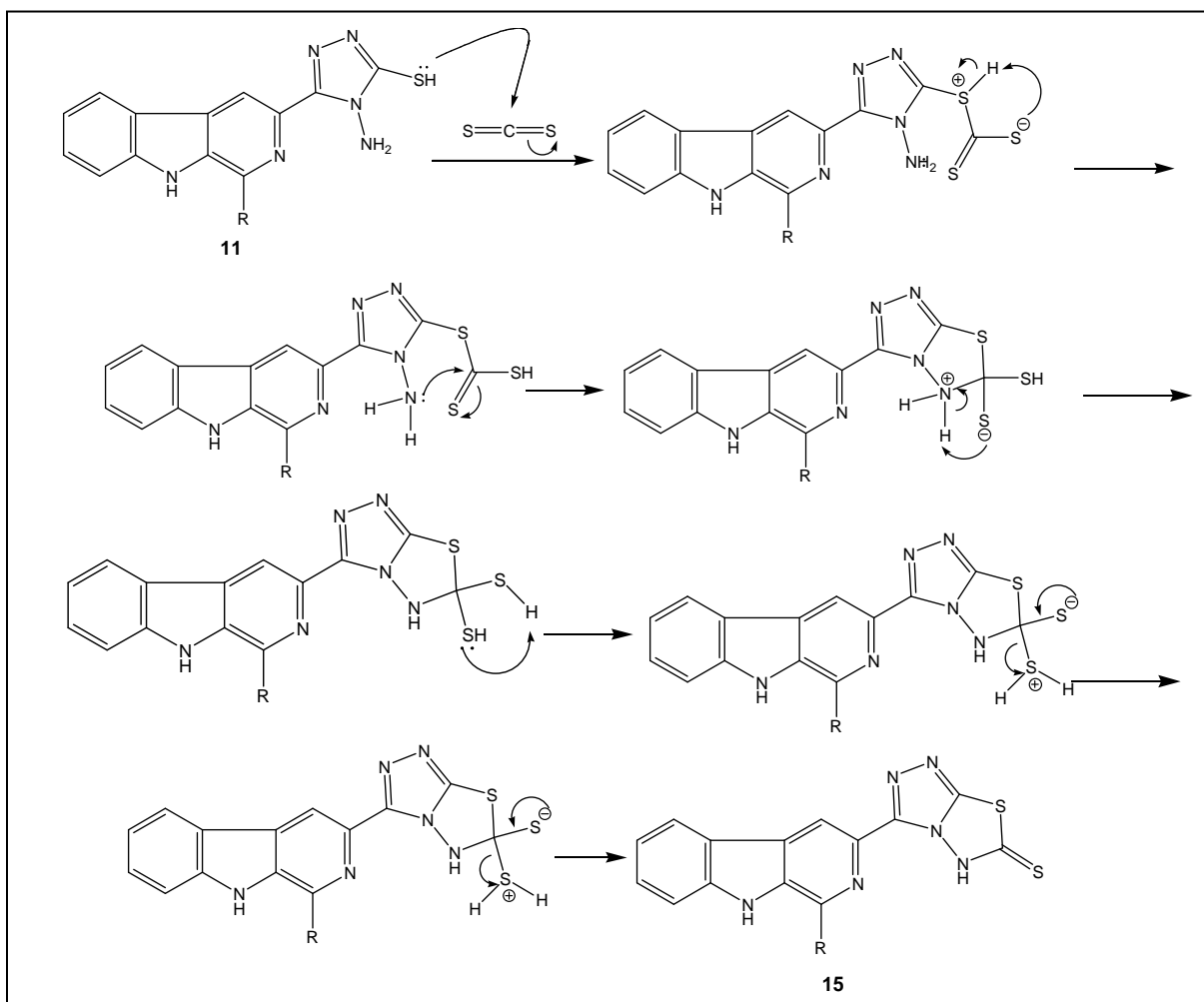
**Esquema 25.** Rota para síntese dos derivados **15a - b**.



O mecanismo para formação dos derivados **15** está apresentado no **Esquema 26**.

26.

**Esquema 26.** Mecanismo proposto para formação dos derivados **15**.



A formação do heterociclo 1,2,4-triazol-[3,4-*b*]-1,3,4-tiadiazol-6-tiol nos derivados **15** foi evidenciada pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 29**) do produto obtido (**15a**) não foi observado o singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,89, referente aos hidrogênios do grupo 4-amino do precursor **11a**. Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  7,30-9,18) e do hidrogênio ligado ao nitrogênio do sistema indólico ( $\delta_{\text{H}}$  11,9 e 12,1) estão duplicados, sugerindo o equilíbrio tautomérico para **15a**. O singlete em  $\delta_{\text{H}}$  13,9, atribuído ao hidrogênio do grupo S-H, evidencia esse equilíbrio em solução. Isto também pode ser confirmado pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  143,2 ( $\text{C6}''\text{-C=SH}$ ) e em  $\delta_{\text{C}}$  155,5 ( $\text{C6}''\text{-C=S}$ ) no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 29**).

**Figura 29.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz –  $\text{DMSO-}d_6$ ) para **15a**.

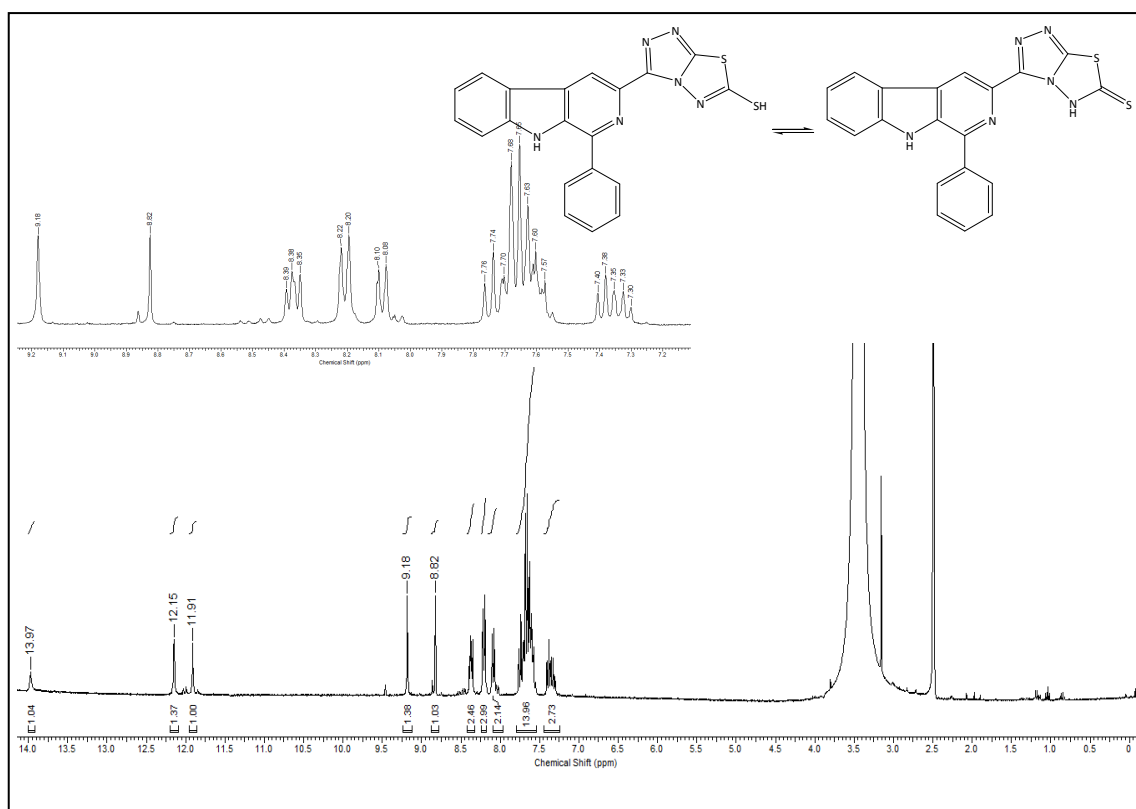


Figura 30. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (300,0 MHz – DMSO- $d_6$ ) para 15a.

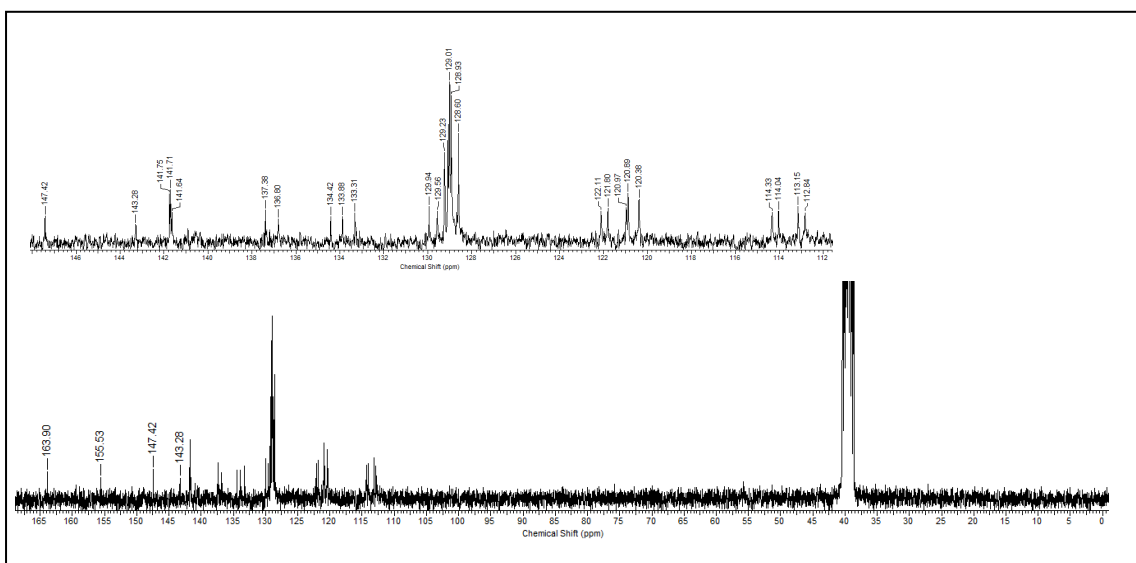


Tabela 13. Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300/75,5 MHz) para 3-(1-fenil-9H- $\beta$ -carbolin-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazole-6-tiol/tiona (15a).

C/H	$\delta_{\text{C}}$ (15a)	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, J=Hz)
1	141,71	-
	141,75	-
3	136,8	-
	137,8	-
4	114,0	8,82 (s)
	114,3	9,18 (s)
4a	129,9	-
	129,5	-
4b	120,8	-
	120,9	-
5	121,8	8,38 (d, 6,0)
	122,1	-
6	120,3	7,30-7,40 (m)
7	129,0	7,57-7,76 (m)
8	112,8	7,57-7,76 (m)
	113,1	-
8a	141,6	-
9a	133,8	-
	134,2	-
1'	133,3	-
2'/6'	128,6	8,09 (d, 6,0)
	128,9	8,21 (d, 6,0)
3'/5'	129,1	7,57-7,76 (m)
	129,2	-
4'	129,2	7,55-7,71 (m)
3''	147,4	-
5''	163,9	-
C6''-SH	155,5	13,97 (s)
	143,2	-
NH	-	11,91 (s)
	-	12,15 (s)

A síntese do derivado **15b** foi também realizada, porém, neste caso, pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Anexos A.11 e 12, Pg 110 e 111**), não foi observado o equilíbrio tautomérico presente em **15a**. A ausência do singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,89, referente aos hidrogênios do grupo 4-amino do precursor **11a** e, a presença do singlete em  $\delta_{\text{H}}$  13,98, que pode ser atribuído ao hidrogênio do grupo  $-\text{SH}$  ligado ao C-6 do heterociclo 1,2,4-triazol-(3,4-*b*)-1,3,4-tiadiazol-6-tiol, mostram a formação de **15b**.

#### 4.1.5 Preparação e caracterização das 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazin-6-ona (**16**).

As principais metodologias descritas para a preparação do heterociclo fundido triazolo-tiadiazinona (**84**) a partir de 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis (**81**) (**Esquema 27**) consistem em:

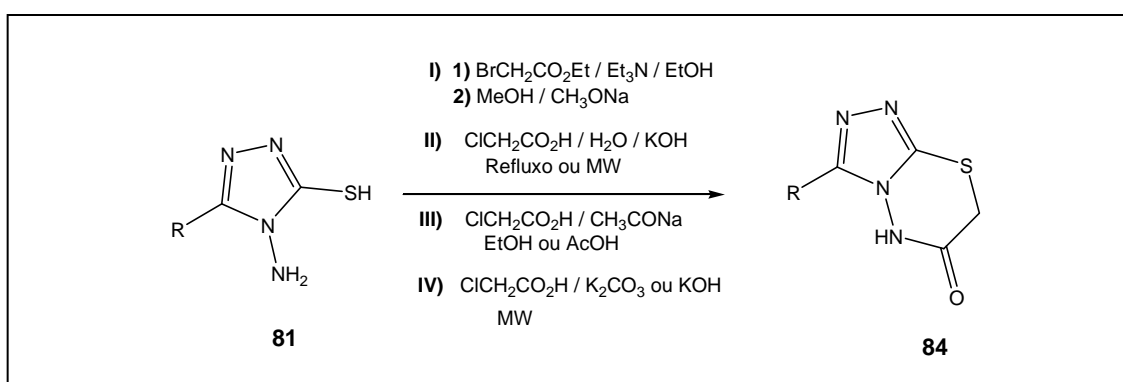
**Metodologia I)** reação com bromoacetato de etila/trietilamina, em etanol, seguido de ciclização na presença de metóxido de sódio, em metanol [121];

**Metodologia II)** reação com ácido cloroacético, na presença de hidróxido de potássio, usando água como solvente [122];

**Metodologia III)** reação com ácido cloroacético em etanol/refluxo ou ácido acético na presença de acetato de sódio anidro (**III**) [119,114];

**Metodologia IV)** reação com ácido cloroacético, na presença de base (carbonato de potássio ou hidróxido de potássio) em micro-ondas, em água ou na ausência de solventes [123,122].

**Esquema 27.** Metodologias descritas para a preparação de 1,2,4-triazolo-[3,4-*b*]-1,3,4-tiadiazin-6-onas (**84**).

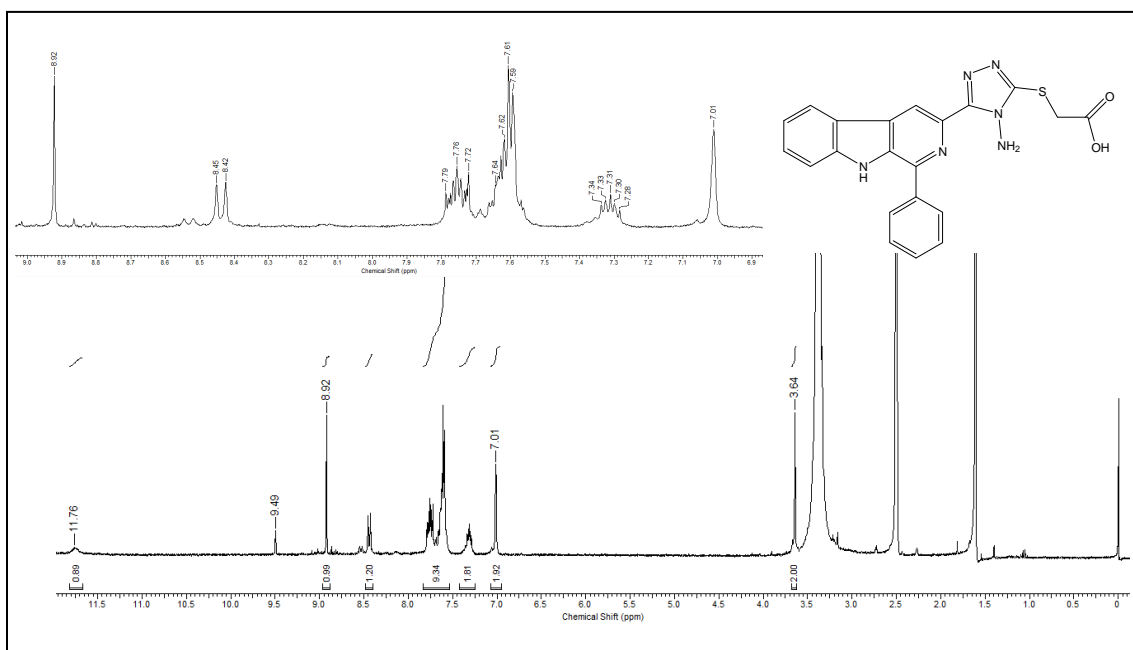


Para da síntese dos derivados 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazin-6-ona (**16**), empregamos inicialmente a **Metodologia III**

descrita na literatura [114]. O derivado triazólico **11a** foi submetido à reação com ácido cloroacético e acetato de sódio, utilizando-se etanol, sob refluxo por 48 horas, não sendo possível a obtenção de **16**, ocorrendo a formação do intermediário não ciclizado **85**.

A formação do intermediário **85** foi confirmada pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 31**), onde notou-se a ausência do singlete em  $\delta_{\text{H}}$  14,00, referente ao hidrogênio do grupo  $-\text{SH}$  do núcleo triazol, e presença de singletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,64, atribuídos à hidrogênios metilênicos, além de um singlete largo em  $\delta_{\text{H}}$  7,01, referente aos hidrogênios do grupo 4-amino do anel 1,2,4-triazol. Com estas informações evidenciou-se apenas a formação do intermediário **85** (**Esquema 28**), ou seja, não ocorreu ciclização para o heterociclo desejado.

**Figura 31.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz –  $\text{DMSO}-d_6$ ) para **85**.

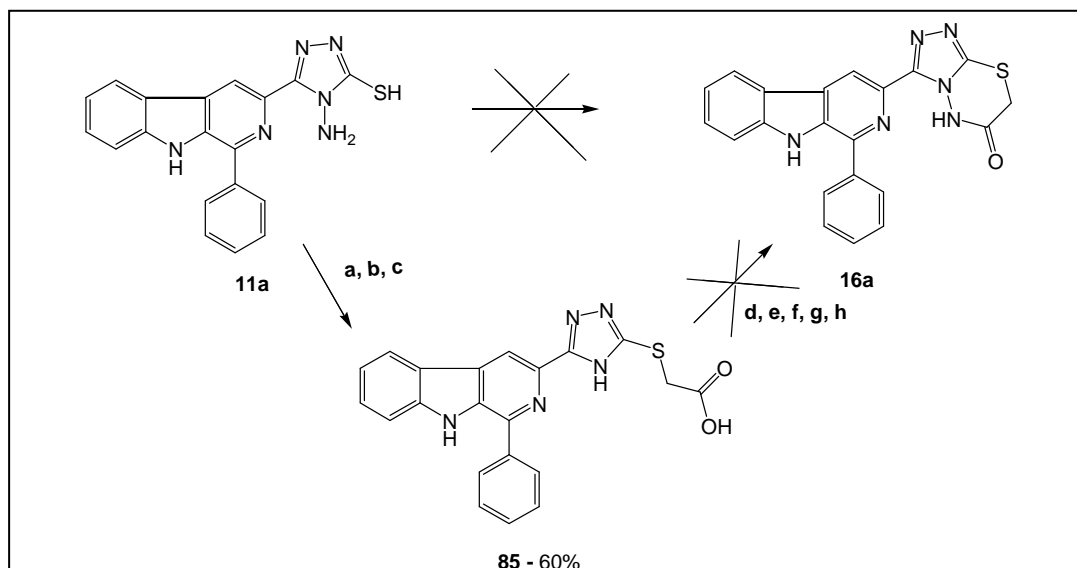


Outras tentativas foram realizadas para obtenção do produto ciclizado, como o emprego das condições apresentadas na **Metodologia II**, ou seja, ácido cloroacético e hidróxido de potássio como base, em etanol. O produto formado, evidenciado através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , se tratava também do intermediário aberto **85**. O mesmo comportamento pode ser observado ao realizarmos as condições proposta na **Metodologia I**, tendo como base a  $\text{Et}_3\text{N}$ , ácido cloroacético em DMF (**Esquema 20**).

Assim, na tentativa de obtenção do produto ciclizado **16a**, a partir do intermediário **85**, este foi tratado inicialmente com acetato de sódio, em DMF sob refluxo, porém não foi possível a ciclização do mesmo (**Esquema 20**). Outras

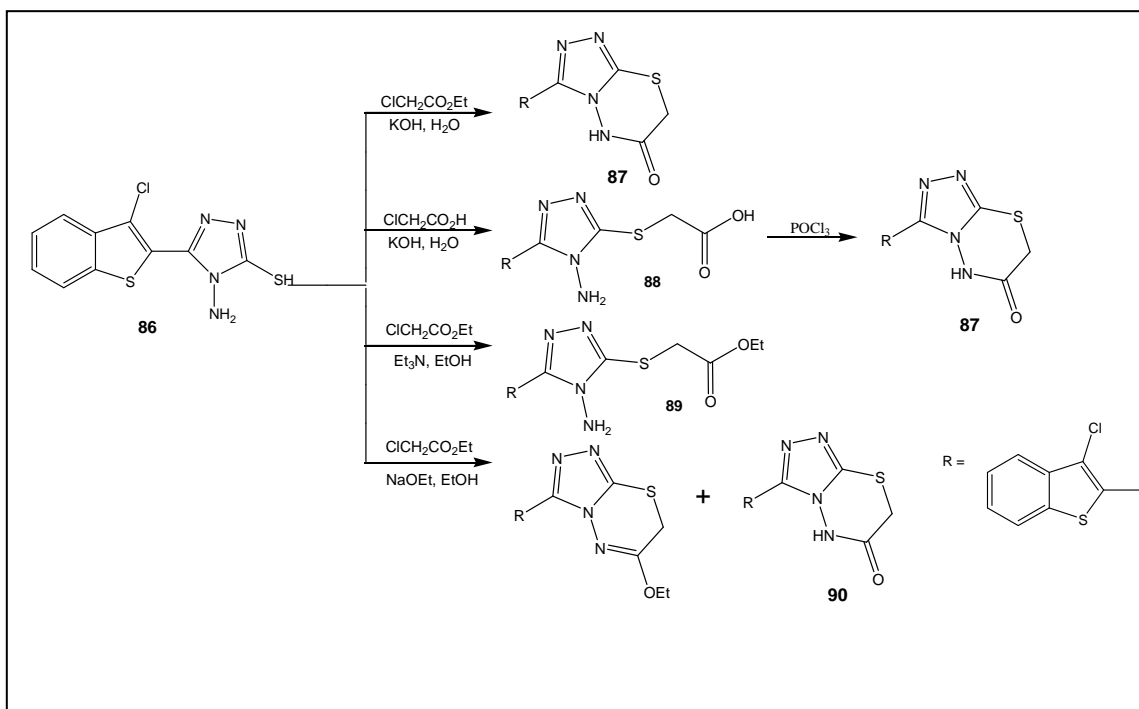
condições apresentadas no **Esquema 21** foram também testadas, mas, nenhuma delas levou à formação do produto desejado.

**Esquema 28.** Condições testadas para a preparação de 16a: a) ClCH<sub>2</sub>COOH, AcONa, EtOH, refluxo; b) ClCH<sub>2</sub>COOH, KOH, EtOH, refluxo; c) ClCH<sub>2</sub>COOH, Et<sub>3</sub>N, DMF; d) AcOH, DMF; e) TsOH, DMF; f) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, MW; g) DCC, THF; h) AcONa, DMSO



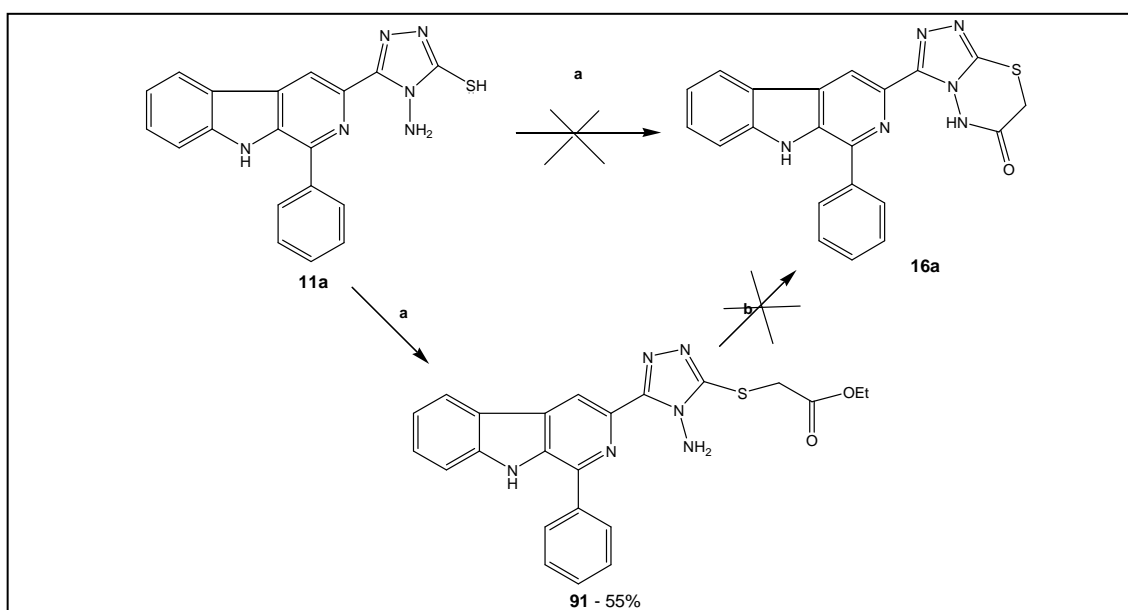
A formação de intermediários S-alkilados não-ciclizados já foi relatada na literatura. El Ashry e col. (2006) [122] e Farghaly e col. (2006) [78] descrevem a obtenção dos intermediários não-ciclizados **88** e **89**, que em alguns casos, também podem ser posteriormente ciclizados para o núcleo 1,2,4-triazolo-(3,4-*b*)-1,3,4-tiadiazin-6-ona (**87**) (**Esquema 29**).

**Esquema 29.** Síntese reportadas para obtenção de 1,2,4-triazolo-[3,4-*b*]-1,3,4-tiadiazin-6-onas (**87**) e/ou intermediários não-ciclizados a partir de 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis.



sequência foi realizado um tentativa de ciclização em  $\text{KOH}$  e  $\text{DMF}$  porém a metodologia foi inviável para formação do produto desejado. (**Esquema 30**).

**Esquema 30.** Metodologia empregada para síntese de **16**: **a**)  $\text{BrCH}_2\text{COOEt}$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{EtOH}$ , refluxo; **b**)  $\text{KOH}$ ,  $\text{DMF}$ .



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Figuras 32 e 33**) para o produto o formado na primeira etapa (**a**) indica também a formação do intermediário na forma aberta **91**. A



ausência do singlete em  $\delta_H$  13,95 (-SH) no espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 25), juntamente com a presença de um multipletto em  $\delta_H$  4,12 – 4,19 (4H) e um triplete em  $\delta_H$  1,22 confirmam a inserção do grupo metil-etóxicarbonil no átomo de enxofre do núcleo 1,2,4-triazolico de **91**. Os sinais em  $\delta_C$  169,03 (C=O);  $\delta_C$  61,66 (-OCH<sub>2</sub>);  $\delta_C$  33,03 (-SCH<sub>2</sub>);  $\delta_C$  14,51 (-CH<sub>3</sub>), no espectro de RMN de  $^{13}C$ /HSQC (Figuras 32 e 33) de **91**, também evidenciam o produto de S-alquilação. Os dados de RMN de **91** estão apresentados na Tabela 14.

Figura 32. Espectro de RMN de  $^1H$  (300,0 MHz – DMSO-*d*<sub>6</sub>) para **91**

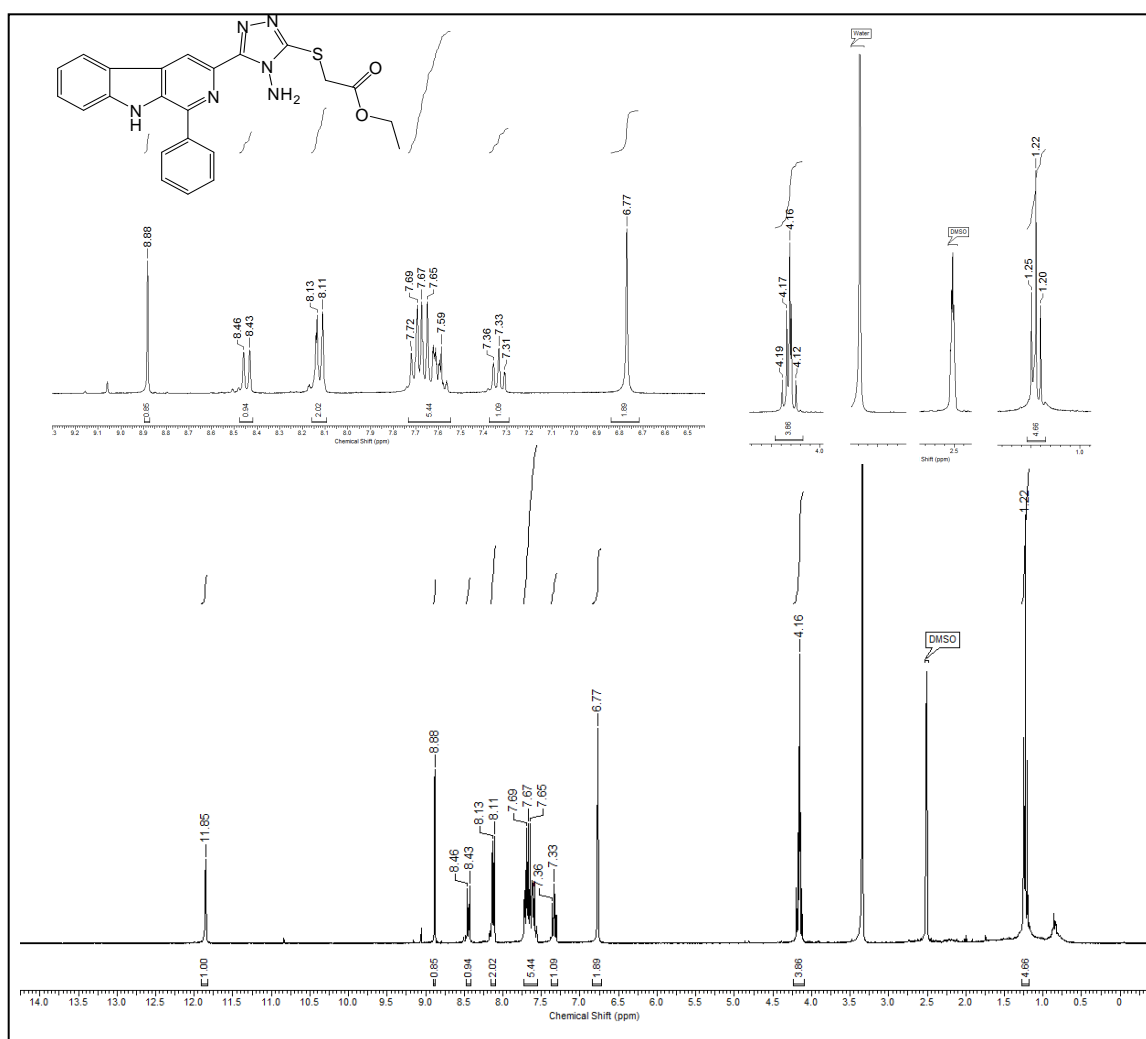


Figura 33. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para **91**

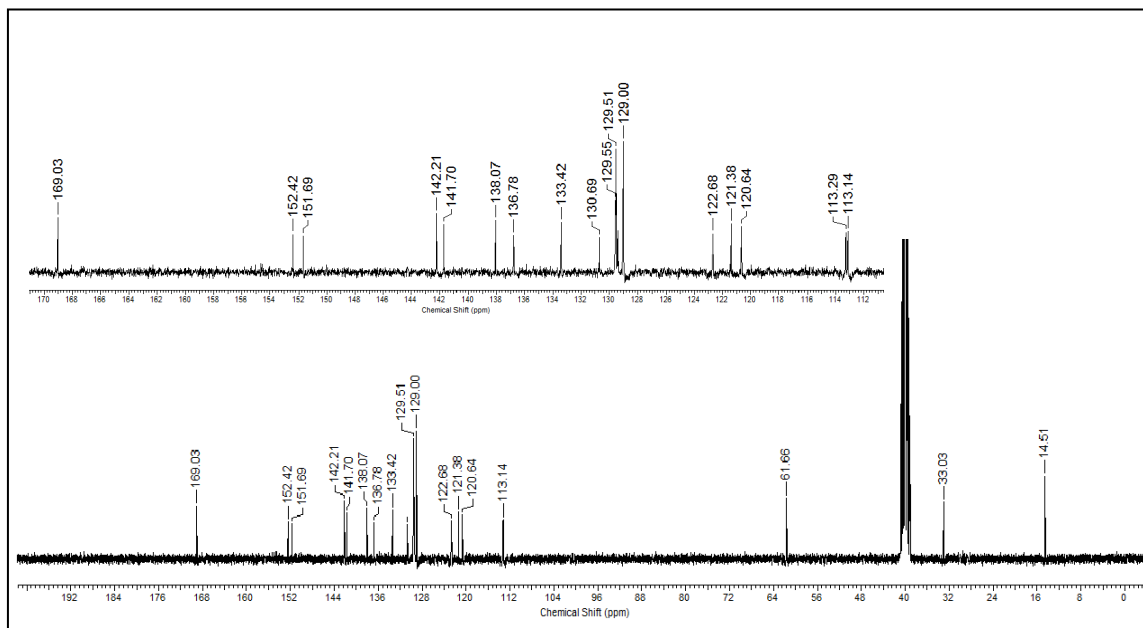


Tabela 14. Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (300/75,5 MHz) para 1-fenil-3-[4-amino-5--tiometiletóxicarbonil-1,2,4-triazol-3-il]- $\beta$ -carbolina **91**.

C/H	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, J=Hz)
1	141,21	-
3	138,07	-
4	113,29	8,88 (s)
4a	130,69	-
4b	120,64	-
5	122,68	8,44 (d – 9,0)
6	121,38	7,33 (t – 6,0)
7	129,51	7,59 – 7,72 (m)
8	113,14	7,59 – 7,72 (m)
8a	141,70	-
9a	136,78	-
1'	133,42	-
2'/6'	129,00	8,12 (d – 6,0)
3'/5'	129,55	7,59 – 7,72 (m)
4'	129,39	7,59 – 7,72 (m)
3''	151,69	-
4''	-	6,77 (s)
5''	152,4	-
SCH <sub>2</sub>	33,03	4,12 – 4,19 (m)
OCH <sub>2</sub>	61,66	4,12 – 4,19 (m)
CH <sub>3</sub>	14,51	1,22 (t – 7,5)
C=O	169,03	-
NH	-	11,85 (s)

Devido as dificuldades encontradas no presente trabalho para a obtenção das 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-ona (**16**), novas metodologias serão testadas em trabalhos futuros para a síntese dos derivados desejados.

## 4.2 Ensaios biológicos

### 4.2.1 Avaliação da atividade antitumoral

A avaliação da atividade antitumoral dos derivados  $\beta$ -carbolínicos contendo os grupos 4-benzilidenoamino-substituído-5-metiltio-1,2,4-triazolo (**76**, **77**, **79**) e 1,2,4-triazolo-(3,4-*d*)-1,2,3,4-tiatriazol (**14**), na posição-3, foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob responsabilidade dos professores Dr. João Ernesto de Carvalho e Dra. Mary Ann Foglio. As linhagens de células utilizadas na avaliação da atividade anticâncer foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos Estados Unidos da América (EUA). Todos os procedimentos foram realizados segundo metodologia descrita por Monks e col [124]. As culturas de células tumorais humanas utilizadas foram: pulmão (NCI-460), colo (HT-29), próstata (PC-3), mama (MCF-7), rim (786-0), glioma (U-251), ovário resistente (NCI/ADR-RES), ovário (OVCAR-3) sendo que todos os tipos de culturas são aderidas. Compostos com valores de IC<sub>50</sub> iguais ou superiores a 100  $\mu$ M foram considerados inativos.

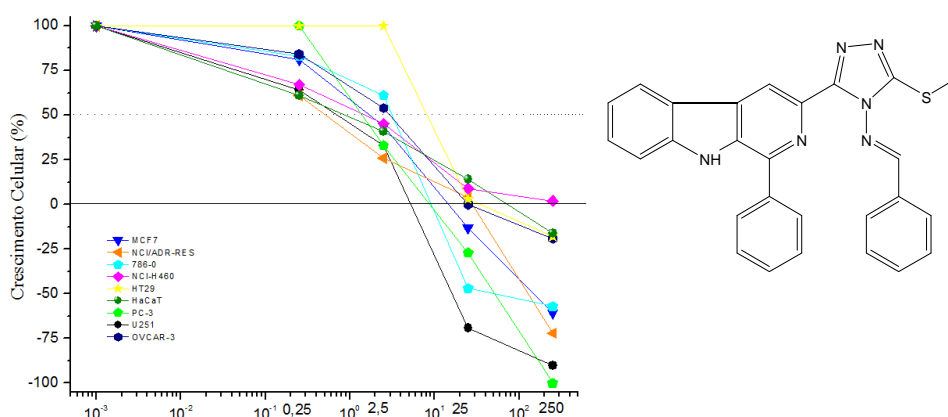
Na **Tabela 15** encontram-se os dados de GI<sub>50</sub> dos derivados 1-fenilsubstituído-3-(4-benzilidenoamino-5-metiltio-1,2,4-triazolo)- $\beta$ -carbolinas (**76**, **77** e **79**) e das 1-fenilsubstituído-3-[1,2,4-triazolo-(3,4-*b*)-1,3,4-tiadiazin-6-ona]- $\beta$ -carbolinas (**14a-c**) e do padrão doxorubicina.

**Tabela 15.** Valores de GI<sub>50</sub> (em  $\mu$ M) obtidos nos ensaios de atividade antitumoral *in vitro* para os derivados  $\beta$ -carbolínicos **76**, **77**, **79** e **14a-c**.

Comp.	Linhagens de células tumorais							
	Pulmão NCI-H460	Cólo HT-29	Próstata PC-3	Mama MCF-7	Rim 786-0	Glioma U-251	Ovário Res. NCI/ADR-res	Ovário OVCAR-3
<b>Doxo</b>	0,014	0,32	0,058	0,045	0,034	0,015	0,11	0,17
<b>76</b>	7,84	>100	4,21	2,07	8,52	13,75	5,06	21,92
<b>77</b>	3,19	17,77	3,02	3,73	6,87	1,53	1,11	6,43
<b>79</b>	14,80	>100	9,40	4,75	12,90	10,98	23,46	20,81
<b>14a</b>	1,16	1,98	2,70	2,76	2,88	3,45	3,47	12,63
<b>14b</b>	2,97	12,28	7,98	4,58	9,16	5,74	3,99	12,35
<b>14c</b>	30,38	75,82	34,65	4,45	12,84	63,75	84,94	>100

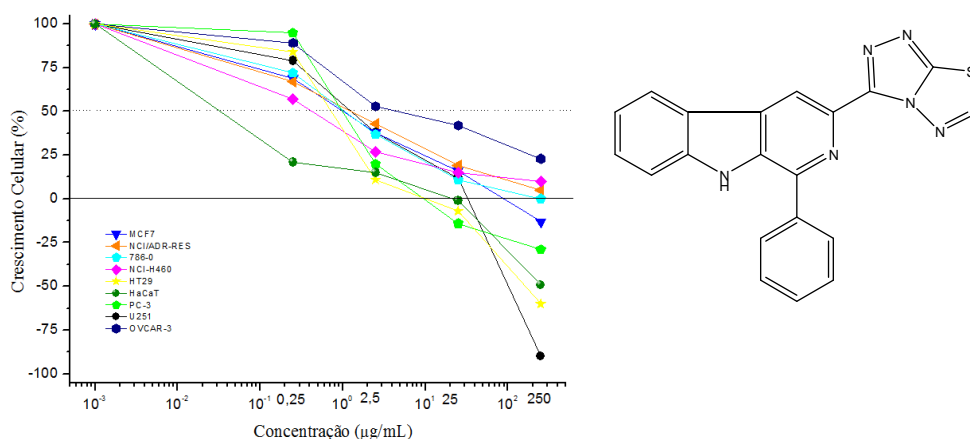
A análise dos valores de  $GI_{50}$  mostrou que, de uma forma geral, os compostos **76**, **77**, **79** e **14a-c** apresentaram uma potente atividade frente à linhagem de células tumorais de mama (MCF-7), com  $GI_{50}$  na faixa de 2,07-4,75  $\mu$ M.

Dentre os derivados da série das 3-(4-benzilidenoamino-5-metil-1,2,4-triazolo)- $\beta$ -carbolicinas, o composto **77**, contendo o grupo fenilmetilenoamino ligado ao Nitrogenio ( $N^4$ ) do núcleo triazólico, foi o mais ativo para todas as células testadas com valores de  $GI_{50}$  na faixa de 1,11-17,7  $\mu$ M, destacando-se o seu potencial de inibição frente à células de ovário resistente (NCI/ADR-RES) e glioma (U-251) com  $IC_{50}$  igual a 1,11 e 1,53  $\mu$ M, respectivamente (**Gráfico 1**).

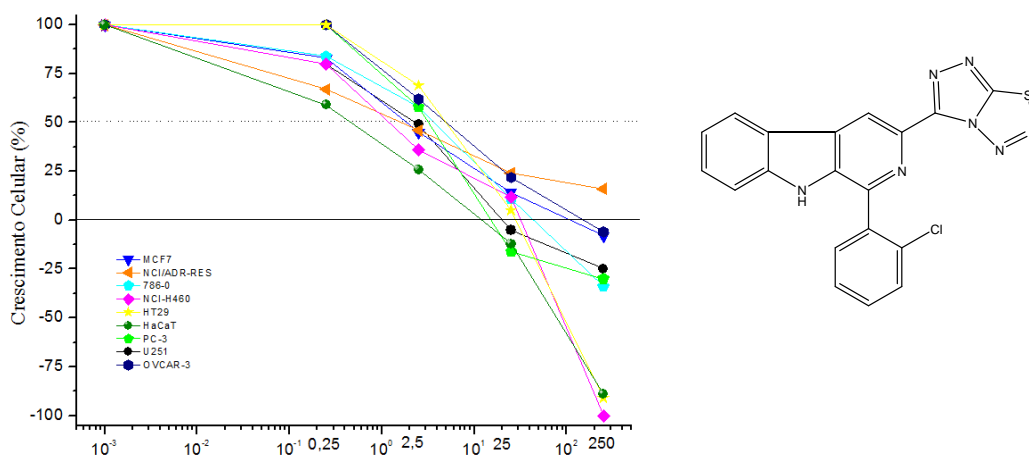


**Gráfico 2.** Gráfico da concentração ( $\mu$ g/mL) versus crescimento celular para o ensaio da avaliação da atividade antitumoral do composto **77**.

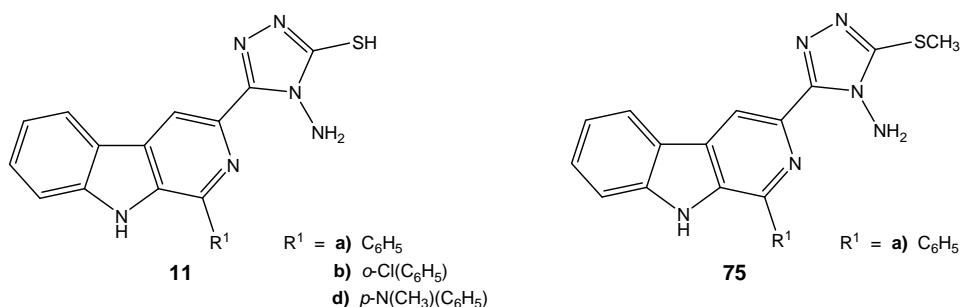
Para a série das 1-fenilsubstituído-3-[1,2,4-triazolo-(3,4-d)-1,2,3,4-tiazolil]- $\beta$ carbolicinas **14a-c**, os compostos **14a** e **14b**, contendo os grupos fenil (**Gráfico 2**) e *o*-Cloro (**Gráfico 3**), respectivamente, na posição -1, apresentaram significativa inibição do crescimento celular para todas as células tumorais testadas com valores de  $GI_{50}$  menores que 15  $\mu$ M.



**Gráfico 2.** Gráfico da concentração ( $\mu$ g/mL) versus crescimento celular para o ensaio da avaliação da atividade antitumoral do composto **14a**.



Como um dos objetivos deste trabalho foi o de verificar a influência da funcionalização dos grupos 4-amino e 5-mercapto do anel triazólico, comparamos os valores de  $\text{GI}_{50}$  dos produtos obtidos neste trabalho (**Tabela 15**) com os reportados anteriormente por Formagio e col., 2008) (**Tabela 16**) [32].



**Tabela 16.** Valores de  $\text{GI}_{50}$  (em  $\mu\text{M}$ ) obtidos nos ensaios de atividade antitumoral *in vitro* para os derivados  $\beta$ -carbolínicos **11a,b,d** e **75**.

Comp.	Linhagens de células tumorais					
	Pulmão NCI-H460	Colon HT-29	Prostata PCO-3	Mama MCF-7	Rim 786-0	Ovario OVCAR
<b>11a</b>	1,59	15,0	10,9	15,0	10,9	12,0
<b>11b</b>	15,4	33,0	24,7	70,1	39,5	6,80
<b>11d</b>	0,20	>100	>100	>100	0,97	>100
<b>75</b>	>100	>100	>100	>100	>100	>100

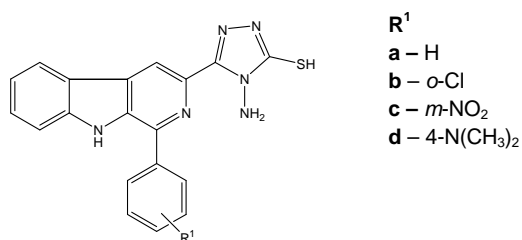
A partir desta comparação observamos que, com exceção de **14c**, tanto a formação das bases de Schiff (**76**, **77** e **79**) quanto de sistema fundido 1,2,4-triazolo-(3,4-*d*)-1,2,3,4-tiatiazolil (**14a-c**) nos derivados  $\beta$ -carbolínicos contendo o grupo 4-amino-5-metiltio-1,2,4-triazolil na posição -3, levou a uma melhora significativa na atividade antitumoral.

Especificamente no caso do precursor 1-fenil-3-(4-amino-5-metiltio-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (**75**) (Formagio e col. (2008) [32]), com valor de  $GI_{50} > 100 \mu M$  para as células testadas, todos os derivados sintetizados neste trabalho apresentaram maior atividade.

#### 4.2.2 Avaliação da atividade antileishmania

A avaliação da atividade anti-leishmania frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* foi realizada no Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá sob responsabilidade dos Professores Doutores Celso Vataru Nakamura e Tânia Ueda Nakamura. Para cada composto testado foram obtidos os  $IC_{50}$ , em  $\mu M$ , que corresponde à concentração do composto que inibe 50% do crescimento do parasita, sendo considerados inativos os compostos com  $IC_{50}$  superiores a  $100 \mu M$ .

Os valores de  $IC_{50}$  (em  $\mu M$ ) obtidos para **11a-d** estão apresentados na **Tabela 17**.



**Tabela 17:** Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) frente a *L. amazonensis* para os compostos **11a-d**.

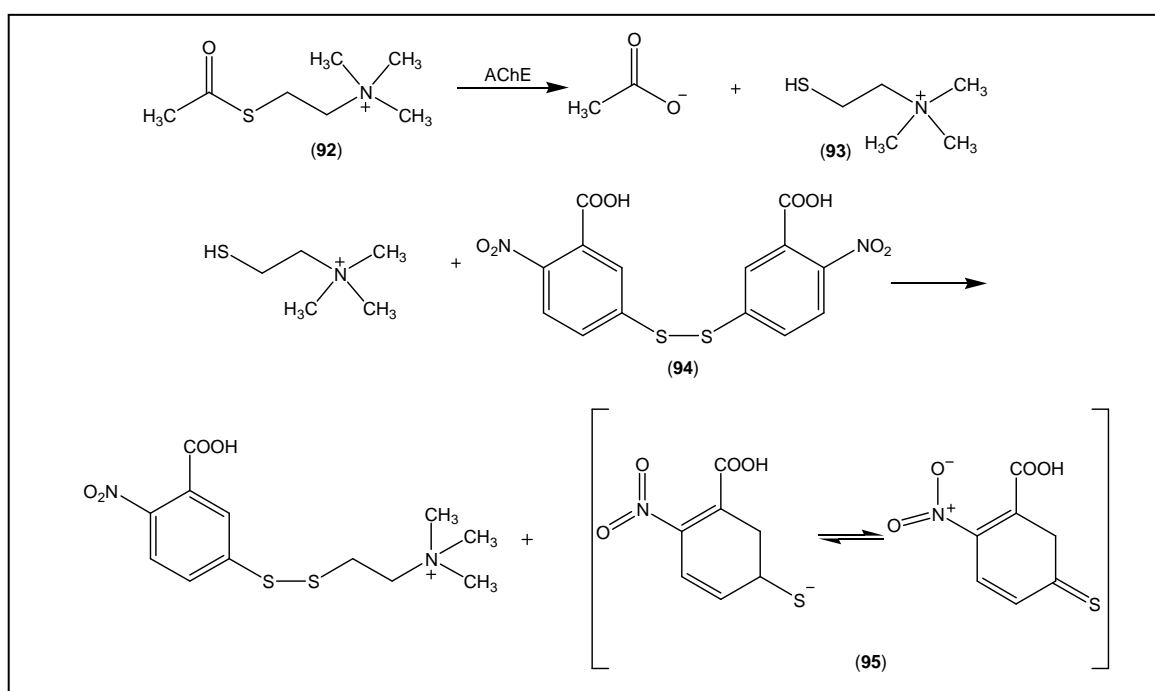
Composto	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
11a	21,3
11b	6,98
11c	74,9
11d	28,2

Comparando os resultados obtidos para os compostos 1-fenilsubstituídos-3-(4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolinas (**11**), observou-se que todos os compostos desta série foram ativos frente *Leishmania amazonense* valores de  $IC_{50}$  na faixa de 6,98 a 74,9. O composto **11b** com  $IC_{50}$  igual a  $6,98 \mu M$ , foi o mais ativo dentre os compostos testados, mostrando que a presença do cloro, como substituinte no grupo fenila, é importante para a atividade.

### 4.2.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica

A capacidade de inibição dos compostos sobre a acetilcolinesterase foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Ellman e col. (1961) [125] modificado. O método se baseia na medição da taxa de produção de tiocolina (**93**) à medida que a acetiltiocolina (**92**) é hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE). Isto ocorre pela continuação da reação da tiocolina (**93**) com reagente de Ellman (**94**), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), produzindo o ânion amarelo (**95**) como mostrado no **Esquema 31**. A medida da taxa da produção do composto colorido (**95**) é realizada em espectrofotômetro UV/VIS em 412 ou 405 nm.

**Esquema 31.** Reações envolvidas na avaliação da atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman.

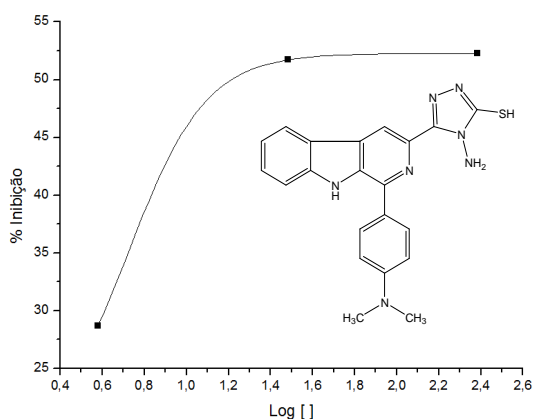


Os valores de  $IC_{50}$  (concentração necessária para 50% de inibição da enzima acetilcolinesterase) foram obtidos através do gráfico plotado de porcentagem de inibição (%) *versus* logaritmo da concentração (**Gráfico 4**) e comparados com os valores obtidos pelo controle positivo, no caso a rivastigmina (**Gráfico 5**). Os valores de  $IC_{50}$  para a rivastigmina e para os derivados 1-fenilsubstituído 3-(1,2,4-triazolo-4,5-substituído)  $\beta$ -carbolínicos (**11a-d**) testados estão apresentados na **Tabela 18**.

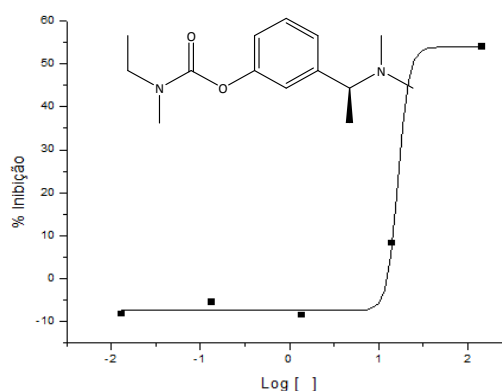


**Tabela 18:** Valores de IC<sub>50</sub> (μM) para inibição frente AChE, compostos **11 a-d**

Compostos	IC <sub>50</sub> (μM)
Rivastigmina	25,29
<b>11a</b>	59,12
<b>11b</b>	97,7
<b>11c</b>	59,08
<b>11d</b>	17,78



**Gráfico 4.** Gráfico da % de inibição versus Log [ ] para a **11d**



**Gráfico 5.** Gráfico da % de inibição versus Log [ ] para a Rivastigmina

A comparação dos dados obtidos revela o potencial de inibição da acetilcolinesterase desses derivados, destacando-se o derivado **11d** (IC<sub>50</sub> = 17,78 μM, **Gráfico 4**) com potencial de inibição menor que a Rivastigmina (25,29 μM - **Gráfico 5**) padrão avaliado.

Devemos destacar que neste trabalho estamos reportando os resultados preliminares dos ensaios de atividade anticolinesterásica para os compostos **11a-d**, empregados como precursores para os 4,5-substituídos-1,2,4-triazóis sintetizados. A metodologia empregada permitiu uma avaliação prévia de inibição frente à acetilcolinesterase, indicando quais dos compostos apresentam melhor atividade inibitória. No entanto, será necessária a otimização da metodologia empregada, uma vez que o valor de IC<sub>50</sub> obtido em nossos ensaios para o padrão rivastigmina é maior que os encontrados em trabalhos da literatura, que variaram na faixa de (0,62 ± 0,01 a 86,45 ± 0,71) [126,127,128,129]

A partir deste estudo preliminar podemos constatar o potencial dos compostos **11a-d** como anticolinesterásicos e a necessidade de estudos mais detalhados visando,

além da otimização dos valores de  $IC_{50}$ , estudos de cinética e de determinação de seus mecanismos de ação.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Instrumentação

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em espectrofotômetro VARIAN modelo Mercury Plus BB, operando a 300,0MHz para  $^1\text{H}$  e 75,5 MHz para  $^{13}\text{C}$  tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou sinal do solvente. Os deslocamentos químicos foram obtidos em ppm e os solventes utilizados foram  $\text{CDCl}_3$  e DMSO. A interpretação dos dados foi realizada com ajuda da técnica de DEPT, em  $\text{CH}_3/\text{CH}$  = sinal positivo (+),  $\text{CH}_2$  = sinal negativo (-),  $\text{C}_0$  (não ligado a hidrogênio) = sinal de intensidade zero e técnicas bidimensionais de COSY e HSQC.

O espectro de massas (EI-MS, 70eV) foi realizado em um espectrômetro de massas do tipo Q-ToF (Micromass) em modo de íon positivo.

As reações em micro-ondas foram realizadas em micro-ondas doméstico, marca Consul e micro-ondas laboratorial, marca CEM (modelo Discovery-SP W/Activent).

As leituras de absorvância em microplacas foram realizadas numa leitora de microplaca (Molecular Devices), modelo Flexstation 3 Multi-Detection Reader.

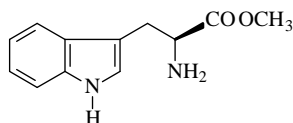
### 5.2 Materias e Métodos

As cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em lâminas de vidro, utilizando-se sílica gel 60 (GF 254) (0,063-0,200 mm) da Merck e placas de sílica gel (250  $\mu\text{m}$  –  $\text{UV}_{254}$ ) suspensas em alumínio (20x20 cm) da Whatman. As eluições foram feitas em solventes orgânicos puros ou combinados. As revelações das placas foram obtidas por irradiação com lâmpada ultravioleta em 254/366 nm, iodo ressublimado e reagente de Dragendorff.

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas em coluna de vidro, utilizando-se sílica gel (0,063-0,200 mm) da Merck. O diâmetro interno e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material a ser cromatografado. As eluições foram feitas em solventes orgânicos puros ou combinados em ordem crescente de polaridade e as frações coletadas foram evaporadas, à pressão reduzida, em evaporador rotativo.

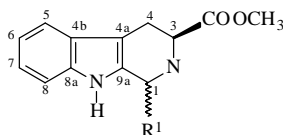
## 5.3 Sínteses

### 5.3.1 Triptofano metil éster (63)



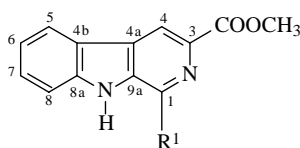
A uma suspensão de 10 mmol de L-triptofano comercial (**12**) em 50 mL de MeOH foi adicionado, gota a gota, ácido sulfúrico concentrado até completa solubilização. A mistura foi mantida sob refluxo e agitação por 48 horas e a seguir, resfriada, neutralizada com uma solução de carbonato de sódio a 5% e extraída com acetato de etila (3 x 35 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e após filtração, o solvente foi removido em evaporador rotatório. O produto foi obtido puro em 95% de rendimento.

### 5.3.2 Preparação das 1-(fenilssubstituído)-3-carbometóxi-tetraidro-β-carbolinas (**64**)



A uma solução de triptofano metil éster (**63**; 5 mmol), em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, foram adicionados 5 mmol dos seguintes aldeídos: benzaldeído (**a**), *o*-clorobenzaldeído (**b**), *m*-nitrobenzaldeído (**c**), *p*-dimetilaminobenzaldeído (**d**), *p*-metóxi-benzaldeído (**e**), *p*-hidróxi-benzaldeído (**f**) e *p*-fluorobenzaldeído (**g**) e ácido trifluoroacético (2 equivalentes). O meio reacional foi neutralizado com uma solução de carbonato de sódio 5% e posteriormente extraído com acetato de etila (3 x 35 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e, após filtragem, o solvente foi removido em evaporador rotatório. O sólido obtido foi filtrado sob vácuo e lavado exaustivamente com metanol, fornecendo as *cis* e *trans* 1-(fenil-susbtituído)-3-carbometóxi-tetraidro-β-carbolinas (**64**), com rendimentos de 80%.

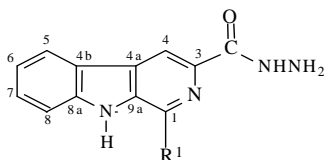
### 5.3.3 Preparação das 1-(fenilssusbtituído)-3-carbometóxi-β-carbolinas (**65**)



Uma suspensão da correspondente mistura de *cis+trans* 1-(fenil-susbtituído)-3-carbometóxi-tetraidro-β-carbolinas (**64**) (5 mmol) e enxofre (15 mmol), em xileno (50

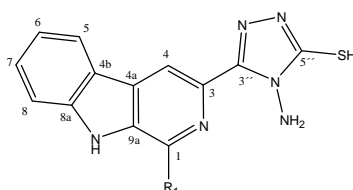
mL), foi mantida sob refluxo por 48 horas e posteriormente a 0 °C por 3 horas. O precipitado formado foi então filtrado sob vácuo e lavado com éter de petróleo fornecendo as  $\beta$ -carbolinas **65**.

#### 5.3.4 Preparação das 1-(fenilssubstituído)- $\beta$ -carbolina-3-carboidrazidas (**66**)



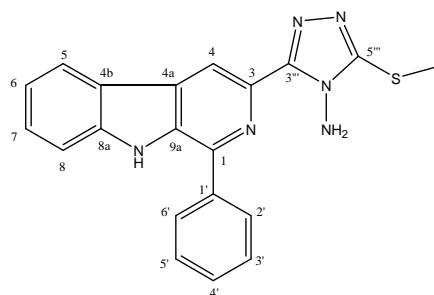
A uma da suspensão das  $\beta$ -carbolinas (**65**; 4,0 mmol) em etanol (50 mL) foram adicionados hidrazina hidratada 51% (53 mmol). Esta mistura foi mantida sob refluxo por 72 horas e, a 0°C por 3 horas, para a completa precipitação. O precipitado formado foi filtrado sob vácuo e lavado com etanol, o que forneceu as carboidrazidas (**66**) em 80% de rendimento.

#### 5.3.5 Procedimento geral para a preparação de 1-fenilsubstituído-3-(4-amino-5-tiol-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolinas (**11**).



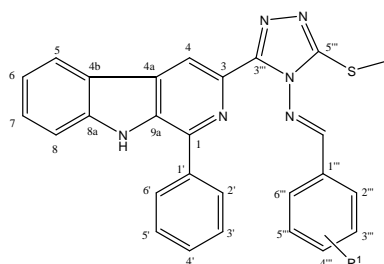
A uma solução da correspondente 1-fenilssubstituído- $\beta$ -carbolina-3-carboidrazida (1,0 mmol) (**66a-d**) e hidróxido de potássio (1,5 mmol), em etanol (20 mL), foi adicionado dissulfeto de carbono (1,5 mmol) a 0°C. A mistura foi mantida a 50 °C por 48 horas e, a seguir, resfriada. O precipitado do intermediário ditiocarbazato de potássio formado foi filtrado, e após seco, tratado com hidrazina hidratada (10 mL). A mistura foi mantida sob agitação e refluxo por 96 horas. A coloração da reação mudou para verde, devido à liberação de sulfeto de hidrogênio. A solução foi diluída com água gelada e acidificada com ácido clorídrico. O produto sólido formado foi filtrado sob vácuo, lavado com água gelada e recristalizado em etanol, fornecendo as 1-fenilssubstituído-3-(4-amino-5-tiol-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (**11a-d**) com rendimentos na faixa de 65-80%.

### 5.3.6 Preparação da 1-fenil-3-(4-amino-5-metiltio-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (75)



A uma suspensão da 1-fenil-3-(4-fenilmetilenoamino-5-tiol-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (**11a**) (0,5 mmol) em etanol foi adicionado gota-a-gota, a 0 °C, uma solução aquosa de KOH (2M 0,5 mmol). À esta mistura foi adicionado gota-a-gota iodeto de metila (1 mmol) e a solução mantida sob agitação a temperatura ambiente por 48 horas. Após este tempo a mistura reacional foi vertida sob água gelada e o precipitado formado foi separado por filtração e lavado com água gelada, rendimento 60%, fornecendo a 1-fenil-3-(4-amino-5-metiltio-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (**75**).

### 5.3.7 Preparação das 1-fenilsubstituídos-3-(4-benzilidenoamino-substituído-5-metiltio-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina **76**, **77**, **79** e **80**.



#### Procedimento A

À uma solução da 1-fenil-3-(4-fenilmetilenoamino-5-metiltio-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (**75**) (1,0 mmol), em etanol, foi adicionado 2-clorobenzaldeído (1,0 mmol) e ácido sulfúrico concentrado até pH em torno de 4-5. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 72 h, em seguida resfriada, vertida sob água gelada e neutralizada com uma solução de carbonato de sódio 10%. O precipitado foi filtrado sob vácuo e lavado com água, o que forneceu uma mistura dos produtos **76-(E)** e **76-(Z)** com 47% de rendimento.

### **Procedimento B**

À uma solução da 1-fenil-3-(4-fenilmetilenoamino-5-metiltio-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (**75**) em DMF foi adicionado 1,2 equivalentes de 2-clorobenzaldeído. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 48 horas. A mistura reacional foi vertida em água, e o precipitado foi filtrado sob vácuo e lavado com água. Os produtos foram purificados em CC (sílica gel; hex:AcOEt-40% à 100%), o que forneceu o derivado **76**-(E) com rendimento de 30%. O mesmo procedimento foi realizado utilizando benzaldeído, fornecendo o derivado **77**-(E) (38%).

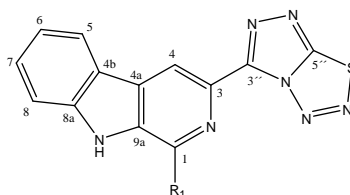
### **Procedimento C**

A mistura reacional foi irradiada em forno de micro-ondas doméstico numa potência de 80w por 18 minutos, logo em seguida a potência foi aumentada para 160 W e submetida a ciclos de 5 minutos totalizando em 240 minutos. A mistura reacional foi vertida em água, neutralizada com uma solução de carbonato de sódio 10% e extraída com acetato de etila (3 x 35 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada, o solvente foi removido em evaporador rotatório. Os produtos foram purificados em CC (sílica gel; hex:AcOEt-40% à 100%), o que forneceu o derivado **75** (15%) e **77**-(E) com rendimento de 30%.

### **Procedimento D**

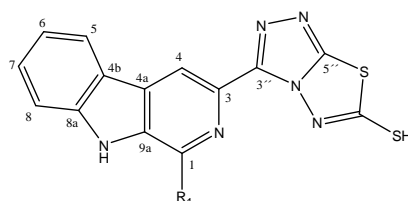
A uma solução da 1-fenil-3-(4-fenilmetilenoamino-5-metiltio-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolinas (**75**) em 5 ml DMF foi adicionado 1,2 equivalentes de aldeído (**a-d**). A solução foi submetida à irradiação em micro-ondas laboratorial (potência ajustada para 100W e temperatura em 160 °C) por 90-100 minutos. O desenvolvimento da reação foi monitorado por CCD (Hex.:AcOEt 60%). A mistura reacional foi vertida em água gelada e o precipitado filtrado a vácuo e seco. Os produtos foram purificados em CC (sílica gel; hex:AcOEt-40% à 100%), o que forneceu os derivados **76**, **77**, **79** e **80** em rendimentos na faixa de 15-47%.

### 5.3.8 Preparação das 3-(1-substituído-9H-β-carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[4,3-d]-1,2,3,4-tiatriazóis (14)



Uma solução das 1-fenilsubstituído-3-(4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol-3-il)-β-carbolinas (**11a-c**) (1,0 mmol) em ácido clorídrico (5 mL) foi resfriada a 0 °C. Adicionou-se a seguir, lentamente, 0,5 mL de solução aquosa de nitrito de sódio (1,0 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação por duas horas a temperatura de 0-5 °C e, a seguir, em geladeira por 12 h. O precipitado foi filtrado e recristalizado em etanol, obtendo-se **14a-c** em 70% de rendimento.

### 5.3.9 Preparação das 3-(1-substituído-9H-β-carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-6-tiol/tionas (15)



À uma solução metanólica de hidróxido de potássio (0,45 mmol) das 1-fenilsubstituídos-3-(4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol-3-il)-β-carbolinas (**11a-b**) (0,3 mmol) foi adicionado dissulfeto de carbono (0,4 mmol), gota a gota, sob constante agitação, a 0°C. A mistura foi mantida em refluxo por 48 horas e, a seguir, adicionou-se mais 0,9 mmol de dissulfeto de carbono nas mesmas condições anteriores. A solução foi mantida por agitação por 72 horas. A mistura reacional foi resfriada e vertida sob água com gelo e neutralizada com ácido clorídrico diluído. O precipitado formado foi filtrado sob vácuo e recristalizado em etanol, obtendo-se **15a-b** em 60% de rendimento.



### 5.3.10 Obtenção do composto 85

#### Procedimento A

À uma solução de 1-fenil-3-(4-amino-5-tiol-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (**11a**) (0,8 mmol) e acetato de sódio (0,8 mmol), em etanol (20 mL), foi adicionado 0,8 mmol de ácido cloroacético, a 0°C. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 48 horas, o solvente orgânico evaporado sob vácuo e o sólido obtido filtrado e lavado com água, o que forneceu o composto **85** em 48% de rendimento.

#### Procedimento B

À uma solução de 1-fenil-3-(4-amino-5-tiol-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (**11a**) (0,8 mmol) e hidróxido de potássio (1,2 mmol), em etanol (15 mL), foi adicionado 0,8 mmol de ácido cloroacético, a 0°C. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 14 horas, o solvente orgânico evaporado sob vácuo e o sólido obtido filtrado e lavado com água, o que forneceu o composto **85** em 60% de rendimento.

#### Procedimento C

À uma solução de 1-fenil-3-(4-amino-5-tiol-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (**11a**) (0,8 mmol) e trietilamina (1,2 mmol), em dimetilformamida (8 mL), foi adicionado 0,8 mmol de ácido cloroacético, a 0°C. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 20 horas. A mistura reacional foi vertida em água gelada e o precipitado filtrado a vácuo e seco, fornecendo o composto **85** em 68% de rendimento.

### 5.3.11 Obtenção dos compostos 91

A uma solução de 1-fenil-3-(4-fenilmetilenoamino-5-tiol-1,2,4-triazol-3-il)- $\beta$ -carbolina (**11a**) (0,8 mmol) em etanol (15 mL) foram adicionados hidróxido de potássio (1,2 mmol) e bromo acetato de etila (0,8 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação por 18 horas a 30 °C. O sistema foi resfriado a 10 graus em banho de gelo e o precipitado foi filtrado e lavado com água gelada, fornecendo o derivado **88** com 55 % de rendimento.

## **5.4 Ensaios Biológicos**

### **5.4.1 Determinação da atividade antitumoral**

As células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementando com 5% de soro fetal bovino inativo (SFB) e penicilina: estreptomicina (meio RPMI/SFB/pen:strep).

Foram plaqueados 100  $\mu$ L das células tumorais, nas suas respectivas densidades de inoculação, nos compartimento das placas de 96 compartimentos. Estas placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. Para cada linhagem foi utilizado um número estipulado de placas, além da placa T<sub>0</sub> (placa controle), dependendo da quantidade de células obtidas na contagem.

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g/ml resultando em soluções estoques. Estas soluções foram diluídas 40 vezes em RPMI/SFB/pen:strep. Foram adicionadas 100  $\mu$ L da solução dos compostos nos compartimento das placas de 96 compartimentos, exceto na T<sub>0</sub>, nas doses de 0,25; 2,5; 25; 250  $\mu$ g/ml. Neste mesmo momento foi realizada a fixação da placa T<sub>0</sub>, determinando-se assim a quantidade de células presentes no momento em que os compostos foram colocados. As demais placas foram incubadas por 48 horas. Após este período, foram realizadas as leituras pelo ensaio do SRB.

### **Ensaio da Sulforrodamina B (SRB)**

As placas de 96 compartimentos foram fixadas com 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 50% (TCA) em cada compartimento. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C. Após esse tempo, foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Estas placas foram mantidas a temperatura ambiente até a secagem completa. Em seguida, as placas foram coradas pela adição de 50  $\mu$ L/compartimento de SRB a 0,4% (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1%. Estas foram incubadas a 40°C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base, na concentração de 10  $\mu$ L e pH 10,5,

por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas.

### **Análise dos resultados**

Foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e através das seguintes fórmulas, foi determinado o crescimento celular.

Se  $T > C$  a substância estimulou o crescimento.

Se  $C > T \geq T_0$ , a substância foi citostática,  $\text{Cresc.(\%)} = 100 * [(T - T_0) / (C - T_0)]$ .

Se  $T < T_0$  a substância foi citocida,  $\text{Cresc.(\%)} = 100 * [(T - T_0) / (T_0)]$ ;

Onde: T é a média da absorbância da célula tratada;

C é o controle de célula;

T<sub>0</sub> é o controle das células no dia da adição das substâncias.

#### **5.4.2 Determinação atividade frente a *Leishmania amazonensis***

O ensaio biológico para avaliação da atividade frente à *Leishmania amazonensis* foi realizado no Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, sob a responsabilidade dos Professores Doutores Celso Vataru Nakamura e Tânia Ueda Nakamura. Os protozoários ( $1 \times 10^6$  protozoário/ml) foram introduzidos em uma placa de 24 poços, contendo 1 mL dos compostos diluídos em cada poço. Foram utilizadas cepas de formas promastigotas (WHOM/BR/75/JOSEFA strain) mantidas em meio Warren, em pH=7.0, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 5 ml de gentamicina a 28 °C. Para os experimentos, cepas de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram incubadas em meio Warren suplementado com 10% de soro bovino fetal na presença de diferentes concentrações dos compostos testados (5, 10, 50, e 100 mg/ml) ou no meio sem a presença dos compostos. O crescimento das células foi feito em uma placa de 24 poços com cada poço contendo 1 mL do meio.

A padronização dos inóculos em  $1 \times 10^6$  células/mL foi feita através da contagem em câmara hematocitométrica de Neubauer (Improved Double Neubauer). A sobrevivência dos parasitas foi estimada contando-se as formas viáveis em uma câmara hematocitométrica de Neubauer. Em todos os testes, os compostos foram dissolvidos em DMSO, de forma que a concentração final de DMSO não excedeu a

1%. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos em porcentagem de inibição do crescimento.

#### **5.4.3 Determinação da atividade anticolinesterásica**

A capacidade de inibição dos compostos sobre a acetilcolinesterase foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Ellman e col. (1961) modificado.

Foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços (300 µL/cada) e equipamento leitor de microplacas, para medir as absorvâncias (412 nm) e realizar a incubação a 30 °C durante o ensaio em microplaca.

Preparo das soluções:

##### **1) Enzima:**

- Acetilcolinesterase de peixe elétrico (Tipo VI-S, pó liofilizado, 500 U/mg sólido, proteína, Sigma, lote: 041M7009V).

A enzima liofilizada foi dissolvida em tampão de fosfato (pH 8,0) para preparar uma solução estoque 50 U/ml e, posteriormente diluída em tampão, para obter uma solução de enzima 0,226 U/ml utilizada no ensaio em microplaca.

##### **2) Substrato:**

- Iodeto de acetiltioclina (ACTI) (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado nos ensaios em microplaca nas concentrações de 15 mM em água ultrapura.

##### **3) Reagentes colorimétricos:**

- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®) ou reagente de Ellman foi utilizado nos ensaios em microplaca na concentração de 3 mM em tampão de fosfato (pH 8,0).

##### **4) Amostra**

- Para o ensaio em microplaca foi preparado, uma solução mãe do composto a ser avaliado, dissolvidos num volume mínimo de DMSO (1%) e diluídos em solução tampão de fosfato (1mg/mL) e as diluições subsequentes foram feitas nos poços (0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml). Cada concentração foi analisada em triplicata e a porcentagem de inibição calculada. Como controle positivo foi utilizado a Rivastigmina (xM)

**Ensaio:**

Em cada poço, foram adicionados os reagentes a seguir:

- 125 µL da solução do reagente de Ellman (DTNB);
- 50 µL de tampão;
- 25 µL da solução de amostra;
- 25 µL da solução enzimática;

A incubação foi realizada durante um período de 15 minutos em agitação, a 30 °C. Foram realizadas leituras a cada 1 minuto em 412 nm. Logo em seguida foram adicionados 25 µL de substrato e a absorbância novamente monitorada em intervalos de 1 minuto, durante 4 minutos no mesmo comprimento de onda.

O mesmo procedimento foi realizado com o controle (na ausência de amostra) e para o branco (sem solução enzimática e amostra)

As taxas das reações foram calculadas utilizando software apropriado (Origin 7.0). As porcentagens de inibição foram calculadas comparando-se as taxas das reações das amostras com a taxa de reação do controle (solvente utilizado para solubilizar cada amostra) através da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{taxa da reação controle} - \text{taxa da reação amostra}}{\text{taxa da reação controle}} \times 100$$

A concentração de cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados avaliados através dos valores médios. A curva de inibição foi obtida plotando a % de inibição versus o logaritmo da concentração do inibidor presentes nas soluções do ensaio.

## 6 CONCLUSÕES

No presente trabalho descrevemos a síntese de avaliação da atividade biológica de 1-fenilsubstituído- $\beta$ -carbolinas, contendo na posição -3 o grupo 1,2,4-triazol-4, 5- substituído. A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- a preparação das 1-fenilsubstituído-3-(4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol)  $\beta$ -carbolinas **11**, intermediários para a síntese dos triazóis 1,2,4-triazol 4-N, 5-S-substituídos, foi realizada com bons rendimentos (65-80%) a partir da ciclização intramolecular em meio básico dos correspondentes ditiocarbazatos (**67**) das  $\beta$ -carbolina-3-carboidrazidas (**66**).
- condensação dos intermediários 1-fenilsubstituído-3-(4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol)  $\beta$ -carbolinas (**11**) com diferentes aldeídos aromáticos forneceu misturas de produtos de ciclocondensação, sendo inviável para obtenção das bases de Schiff propostas (**13**).
- a S-metilação das 1-fenilsubstituído-3-(4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazol)  $\beta$ -carbolinas (**11**) e posterior condensação com aldeídos aromáticos levou a obtenção das bases de Schiff **76**, **77**, **79** e **80**.
- o emprego de micro-ondas na síntese das 1-fenil-3[4-(benzilidenoamino-5-metil-tio-[1,2,4]-triazolo-)]- $\beta$ -carbolina permitiu melhoras no rendimento e diminuição do tempo reacional.
- a reação de **11** com nitrito de sódio, em ácido clorídrico, levou a formação dos derivados beta-carbolínicos contendo o núcleo 1,2,4-triazolo-[3,4-*d*]-1,2,3,4-tiatiazolico (**14a-b**) na posição-3, em bons rendimentos (60-70%)
- a obtenção dos derivados 3-(1-substituído-9H- $\beta$ -carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-6-tiol/tionas (**15**) foi realizada com rendimentos na faixa de 60% através da reação do intermediário **11** com excesso de dissulfeto de carbono em meio básico.

- as metodologias empregadas não foram eficazes para a síntese das 3-(1-substituído-9H-β-carbolina-3-il)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazin-6-ona (**16**) propostas, levando a produtos de S-alquilação (**85** e **88**). As condições testadas como emprego de diferentes bases, solventes e em alguns casos catálise ácida, não levaram ao produto desejado.
- os ensaios de atividade antitumoral mostraram que de uma forma geral, os compostos **11a-c** e **14a-c** apresentaram uma potente atividade frente à linhagem de células tumorais de mama (MCF-7), com IC<sub>50</sub> na faixa de 2,07-4,75 μM.
- o composto **77**, contendo o grupo fenilmetilenoamino ligado ao Nitrogênio (N<sup>4</sup>) do núcleo triazólico, sendo o mais ativo para todas as células testadas com valores de IC<sub>50</sub> na faixa de 1,11-17,7 μM.
- a formação das bases de Schiff (**76**, **77** e **79**) e do sistema fundido 1,2,4-triazolo-(3,4-d)-1,2,3,4-tiatriazolil (**14a-c**), levou a uma melhora significativa na atividade antitumoral, quando comparadas aos 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazóis reportados em trabalho anterior.
- os compostos **14a** e **14b**, contendo os grupos fenil e 2-Cl na posição -1 da unidade β-carbolina e na posição -3 o grupo, 1,2,4-triazolo-(3,4-d)-1,2,3,4-tiatriazolil, apresentaram significativa inibição do crescimento celular para todas as células tumorais testadas com valores de IC<sub>50</sub> menores que 15 μM.
- dentre os compostos avaliados frente *L. amazonensis*, o **11b** foi o mais ativo com IC<sub>50</sub> igual a 6,98 μM, mostrando a importância do cloro como substituinte no grupo fenila, para a atividade testada.
- o estudo preliminar da atividade frente a AChE mostrou que, para os derivados **11a-d**, o composto **11d**, contendo o grupo N,N-dimetilamino na posição -1, foi o derivado mais ativo da série, com IC<sub>50</sub> = 17,78 μM, menor do que o padrão avaliado, no caso, a Rivastigmina - IC<sub>50</sub> = 25,29 μM.
- os resultados dos ensaios apontaram significativa atividade antitumoral, atileishmaniana e anticolinérgica, confirmando o potencial dos novos derivados sintetizados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAO, R.; PENG, W.; WANG, Z.; XU, A. Beta-Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, p. 479-500., 2007.
2. YU, X.; LIN, W.; LI, J.; YANG, M.. Synthesis and biological evaluation of novel beta-carboline derivatives as Tat-TAR interaction inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** , v. 14, p. 3127-3130, 2004.
3. YU, X.; LIN, W.; LI, J.; YANG, M.. Design, synthesis and bioactivities of TAR RNA targeting beta-carboline derivatives based on Tat-TAR interaction. **Eur. J. Med. Chem.** , v. 40, p. 831-839, 2005.
4. ISHIDA, J.; WANG, H. K.; OYAMA, M.; COSENTINO, M. L.; HU, C. Q.; LEE, K, H.. Anti-AIDS agents. 46. Anti-HIV activity of harman, an anti-HIV principle from *Symplocos setchuensis*, and its derivatives. **Tetrahedron**, v. 66, p. 3433-3440, 2010.
5. WANG, Y. H.; TANG, J. G.; WANG, R. R.; YANG, L. M.; DONG, Z. J.; DU, L.; SHEN, X.; LIU, J. K.; ZHENG, Y. T.. Flazinamide, a novel beta-carboline compound with anti-HIV actions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, p. 1091, 2007.
6. MAARSEVEEN, J. H. V.; SCHEEREN, H. W.; CLEREQ, E. D.; BALZARINI, J.; KRUSE, C. G.. Antiviral and tumor cell antiproliferative SAR studies on tetracyclic eudistomins—II. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 5, p. 955-970, 1997.
7. BRAHMBHATT, K. G.; AHMED, M.; SABDE, S.; MITRA, D.; SINGH, I. P.; BHUTANI, K. K. Synthesis and evaluation of beta-carboline derivatives as inhibitors of human immunodeficiency virus. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 20, p. 4416, 2010.
8. CAVIN J. C.; KRASSNER, S. M.; RODRIGUEZ, E.; J.. Plant-derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*. **Ethnopharmacol.** , v. 19, p. 89-94, 1987.
9. RIVAS, P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.. Effects of some beta-carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 122, p. 27-31, 1999.
10. DODD, R. H.; OUANNES, C.; ROBERT-GÉRO, M.; POTIER, P. Hybrid molecules: growth inhibition of *Leishmania donovani* promastigotes by thiosemicarbazones of 3-carboxy-beta-carbolines. **J. Med. Chem.** , v. 32, p. 1272, 1989.
11. KUMAR, A.; KATIYAR, S. B.; GUPTA, S.; CHAUHAN, P. M. S. Syntheses of new substituted triazino tetrahydroisoquinolines and  $\beta$ -carbolines as novel antileishmanial agents. **Eur. J. Med. Chem.** , v. 41, p. 106-113, 2006.
12. ISHIDA, J.; WANG, H. K.; BASTOW, K. F.; HU, C. Q.; LEE, K. H.. Antitumor agents 201. Cytotoxicity of harmine and beta-carboline analogs. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, v. 9, p.



3319-3324, 1999.

13. CAO, R.; CHEN, H.; PENG, W.; MA, Y.; HOU, X.; GUAN, H.; LIU, X.; XU, A. Design, synthesis and in vitro and in vivo antitumor activities of novel  $\beta$ -carboline derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 40, p. 991-1001, 2005.
14. ZHAO, M.; BI, L.; WANG, W.; WANG, C.; BAUDY-FLOCH, M.; JUC, J.; PENG, S. Synthesis and cytotoxic activities of  $\beta$ -carboline amino acid ester conjugates. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, p. 6998-7010, 2006.
15. XIAO, S.; LIN, W.; WANG, C.; YANG, M.. Synthesis and biological evaluation of DNA targeting flexible side-chain substituted  $\beta$ -carboline derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, p. 437-411, 2011.
16. CAO, R.; PENG, W.; CHEN, H.; HOU, X.; GUAN, H.; CHEN, Q.; MA, Y.; XU, A. Synthesis and in vitro cytotoxic evaluation of 1,3-bisubstituted and 1,3,9-trisubstituted beta-carboline derivatives., v. 40, p. 249-257, 2005.
17. CAO, R.; YI, W.; WU, Q.; GUAN, X.; FENG, M.; MA, C.; CHEN, Z.; SONG, H.; PENG, W.. Synthesis and cytotoxic activities of 1-benzylidene substituted  $\beta$ -carboline derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 6558-6661, 2008.
18. GUAN, H.; CHEN, H.; PENG, W.; MA, Y.; CAO, R.; LIU, X.; XU, A. Design of  $\beta$ -carboline derivatives as DNA-targeting antitumor agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 41, p. 1167-1179, 2006.
19. CAO, R.; GUAN, X.; SHI, B.; CHEN, Z.; REN, Z.; PENG, W.; SONG, H. Design, synthesis and 3DQSAR of  $\beta$ -carboline derivatives as potent antitumor agents. **Eur. J. Med. Chem.** , v. 45, p. 2503-2515, 2010.
20. WU, J., LI, C., ZHAO, M., WANG, W. Y., PENG, S. A class of novel carboline intercalators: Their synthesis, in vitro anti-proliferation, in vivo anti-tumor action, and 3D QSAR analysis. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 18, p. 6220-6229, 2010.
21. CHEN, Z.; CAO, R.; SHI, B.; YI, W.; YU, L.; SONG, H.; REN, Z. Synthesis and Biological Evaluation of Novel  $\beta$ -Carbolines as Potent Cytotoxic and DNA Intercalating Agents. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 58, p. 901, 2010.
22. HERRAIZ, T.; D., GONZÁLEZ; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; ARÁN, V.J.; GUILLÉN, H. b-Carboline alkaloids in Peganum harmala and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, p. 839-845, 2010.
23. HERRAIZ, T.; GALISTEO, J. Hydroxyl radical reactions and the radical scavenging activity of b-carboline alkaloids. **Food Chem.**, v. 172, p. 640-649, 2015.
24. JIN-SHUAI, L.; SAI-SAI, X.; SU-YU, L.; LONG-FEI, P.; XIAO-BING, W.; LING-YI, K.. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-(b-carboline) hydrids as multifunctional agents

for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 6089-6104, 2014.

25. REINERS, J.; ROBERT, S.; FREDERICK, R.; MASEREEL, B.; VINCENT, S.; WOUTERS, J.. Synthesis and evaluation of b-carboline derivatives as potential monoamine oxidase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 19, p. 134-1344, 2011.
26. TONIN, L.T.D.; BARBOSA, V.A.; BOCCA, C.C.; RAMOS, E.R.F.; NAKAMURA, C.V.; COSTA, W.F.; BASSO, E.A.; NAKAMURA, T.U.; SARRAGIOTTO, M.H. Comparative study of the trypanocidal activity of the methyl 1-nitrophenyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylate derivatives and benzimidazole using theoretical calculations and cyclic voltammetry. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 1745-1750, 2009.
27. VALDEZ, R.H.; TONIN, L.T.D.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; MORGADO-DIAZ, J.A.; SARRAGIOTTO, M.H.; NAKAMURA, C.V. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.**, v. 110, p. 7-14, 2009.
28. TONIN, L. T. D.; PANICE, M. R.; NAKAMURA, C. V.; ROCHA, K. J. P.; SANTOS, A. O. DOS; UEDA-NAKAMURA, T.; COSTA, W. F. DA; SARRAGIOTTO, M. H. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted- $\beta$ -carboline)-3-carboxamides. **Biomed.Pharm.**, v. 64, p. 386, 2010.
29. PEDROSO, R.B.; TONIN, L.T.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; SARRAGIOTTO, M.H.; NAKAMURA, C.V. Beta-carboline-3-carboxamide derivatives as promising antileishmanial agents. **An. Trop. Medicine and Parasitol.**, v. 105, n. 8, p. 549-557, 2011.
30. FORMAGIO, A.S.; TONIN, L. T. D.; FOGLIO M.A.; MADJAROF, C.; CARVALHO, J.E.; COSTA, W.F.; CARDOSO, F.P.; SARRAGIOTTO, M.H. Synthesis and antitumor activity of novel 3-(2-substituted-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(5-substituted-1,2,4-triazol-3-yl) beta-carboline. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 9660-9667, 2008.
31. SAVARIZ, F. C.; FORMAGIO, A. S. N.; BARBOSA, V. A.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. DE; DUARTE, M. C. T.; FILHO DIAS, B. P.; SARRAGIOTTO, M. H. S. Synthesis, Antitumor and Antimicrobial Activity of Novel 1-Substituted Phenyl-3-[3-alkylamino(methyl)-2-thioxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl]  $\beta$ -Carboline Derivatives. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, p. 288-298, 2010.
32. BARBOSA, V.A.; FORMAGIO, A.S.N.; SAVARIZ, F.C.; FOGLIO, M.A.; SPINDOLA, H.M.; CARVALHO, J.E.; MEYER, E.; SARRAGIOTTO, M.H. Synthesis and antitumor activity of  $\beta$ -carboline 3-(substituted-carbohydrazide) derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 19, p. 6400-6408, 2011.
33. SAVARIZ, F.C.; FOGLIO, M.A.; RUIZ, A.L.; COSTA, W.F.; SILVA, M. M.; SANTOS, J.C.; FIGUEIREDO, I.M.; MEYER, E.; CARVALHO, J.E.; SARRAGIOTTO, M.H. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl)  $\beta$ -carbolines and their Mannich bases. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 22, p. 6867-6875, 2014.

34. BARBOSA, V.A.. Síntese, caracterização e avaliação biológica de carboidrazidas e de complexos metálicos contendo o esqueleto beta-carbolínico. **Universidade Estadual de Maringa**, 2009.
35. PANICE, M. R. Síntese e avaliação da atividade antitumoral e antiprotozoária de derivados 1-fenilsubstituídos beta-carbolínicos contendo grupos imido-carboxamida na posição-3. **Dissertação de Mestrado**, Maringa, 2012.
36. ORGANIZATION, W. H. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 02 dez. 2014.
37. BIBLIOTECA de Ciências Biomédias. **FioCruz**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/bibcb/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=102&sid=106>>. Acesso em: 04 dez. 2014.
38. TIUMAN, S.T.; SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS, B.D.F.; NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment (Review). **Int. J. Inf. Dis.**, v. 15, p. 525-532, 2011.
39. MINISTERIO DA SAÚDE, B. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2, 3 reimpr. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
40. SAÚDE, M. D. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de Situação - Paraná**. 5. ed. Brasília: MS, 2011.
41. KUMAR, R.; KHAN, S.; VERMA, A.; SRIVASTAVA, S.; VISWARKARMA, P.; GUPTA, S.; MEENA, S.; SINGH, N.; SARKAR, J.; CHAUHAN, P.M.S. Synthesis of 2-(pyrimidin-2-yl)-1-phenyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-b-carbolines as antileishmanial agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 3274-3280, 2010.
42. RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da arte. **Quím. Nova**, v. 26, p. 550-555, 2003.
43. ORGANIZATION, W. H. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <[http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2014/pdfs/pr224\\_E.pdf](http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2014/pdfs/pr224_E.pdf)>. Acesso em: 08 jan. 2015.
44. INCA, I. N. D. C.-. INCA - o que é câncer? Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 08 jan. 2015.
45. ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos quem interagem com o DNA: um introdução. **Quím. Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
46. **Alzheimer's Association**. Disponível em: <<http://www.alz.org>>. Acesso em: 03 dezembro

2014.

47. **Instituto Alzheimer Brasil**. Disponível em: <<http://www.institutoalzheimerbrasil.org.br/>>. Acesso em: 04 dezembro 2014.
48. DUYCKAERTS, C.; DELATOUR, B. Classification and basic pathology of alzheimer disease. **Acta Neuro.**, v. 118, p. 5-36, 2009.
49. VIEGAS, F. P. D.; SIMÕES, M. C. R.; ROCHA, M. D.; CASTELLI, M. R.; MOREIRA, M. S.; VIEGAS JUNIOR, C. Doença de Alzheimer: Caracterização, Evolução e Implicações do Processo Neuroinflamatório. **Rev. Vir. Quím.**, v. 286-306, 2011.
50. MINETT, T.S.C.; BERTOLUCCI, P.H.F. Terapia Colinérgica na Doença de Alzheimer. **Rev. Neuro.**, v. 8, p. 11-14, 2000.
51. PETERS, B.H.; LEVIN, H.S.. Effects of physostigmine and lecithin on memory in Alzheimer's disease. **Ann. Neur.**, v. 24, p. 140-145, 1979.
52. FORLENZA, O.V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Rev.Psiqui. Clin.**, v. 32, p. 137-148, 2005.
53. DI GIORGIO, C.; DELMAS, F.; OLLIVIER, E.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; TIMON-DAVID, P. In vitro activity of the b-carboline alkaloids harmane, harmine and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. **Exp. Parasitol.**, v. 106, p. 67-74, 2004.
54. GOHIL, M.V.; BRAHMBHATT, K.G.; LOISEAU, P.M.; BHUTANI, K.K. Synthesis and anti-leishmanial activity of 1-aryl-b-carboline derivatives against *Leishmania donovani*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 3905-3907, 2012.
55. GELLIS, A.; DUMÉTRE, A.; LANZADA, G.; HUTTER, S.; OLIVER, E.; VANELLE, P.; AZAS, N. Preparation and antiprotozoal evaluation of promising b-carboline alkaloids. **Biomed. Pharmacol.**, v. 66, p. 339-347, 2012.
56. VOLPATO, H.; DESOTI, V.C.; COGO, J.; PANICE, M.R.; SARRAGIOTTO, M.H.; SILVA, S.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. The Effects of N-Butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxamide against *Leishmania amazonensis* Are Mediated by Mitochondrial Dysfunction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-7, 2013. ISSN 874367.
57. STEFANELLO, T.F.; PANICE, M.R.; UEDA-NAKAMURA, T.; SARRAGIOTTO, M.H.; AUZÉLY-VELTY, R.; NAKAMURA, C.. N-butyl-[1-(4-methoxy)phenyl-9H-b-carboline]-3-carboxamide prevents cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 12, p. 7112-7120, 2014.
58. WU, S.; FU, Y.; YAN, R.; WU, Y.; LEI, X.; YE, X.. Synthesis of neamine-carboline conjugates for RNA binding and their antibacterial activities. **Tetrahedron**, v. 66, p. 3433-3440, 2010.

59. OTTO, R.; PENZIS, R.; GAUBE, F.; WINCKLER, T.; APPENROTH, D.; FLECK, C.; TRÄNKLE, C.; LEHMANN, J.; ENZENSBERGER, C. Beta and gamma carboline derivatives as potential anti-Alzheimer agents: A comparison. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 87, p. 63-70, 2014.
60. LAN, J.S.; XIE, S.S.; LI, S.Y.; PAN, L.F.; WANG, X.B.; KONG, L.Y. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-( $\beta$ -carboline) hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 22, p. 6089-6104, 2014.
61. SCHOTT, Y.; DECKER, M.; ROMMELSPACHER, H.; LEHMANN, J. 6-Hydroxy- and 6-methoxy-b-carbolines as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 16, p. 5840-5843, 2006.
62. ROOK, Y.; SCHMIDTKE, K. U.; GAUBE, F.; SCHEPMANN, D.; WÜNSCH, B.; HEILMANN, J.; LEHMANN, J.; WINCKLER, T. Bivalent  $\beta$ -Carbolines as Potential Multitarget Anti-Alzheimer Agents. **J. Med. Chem.**, v. 53, p. 3611-3617, 2010.
63. DEMIRBAS, N.; DEMIRBAS, A.; KARAOGLU, S.A.; ÇELİK, E.. Synthesis and antimicrobial activities of some new [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles and [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazines. **ARKIVOC**, v. i, p. 75-91, 2005.
64. EL ASHRY, E.S.H.; KASSEM, A.A.; ABDEL-HAMID, H.; LOUIS, F.F.; KHATTAB, SH.A.N.; AOUD, M.R. Synthesis of 4-amino-5-(3-chlorobenzo[b]thien-2-yl)-3-mercapto-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles and triazolo[3,4,b][1,3,4]thiadiazines under classical and microwave conditions. **ARKIVOC**, v. XIV, p. 119-132, 2006.
65. PRASAD, D.J.; ASHOK, M.; KAREGOUDAR, P.; POOJARY, B.; HOLLA, B.S.; KUMARI, N.S. Synthesis and antimicrobial activities of some new triazolothiadiazoles bearing 4-methylthiobenzyl moiety. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 551-557, 2009.
66. HERAVI, M.M.; BAKHERAD, M.; RAHIMZADEH, M.; BAKAVOLI, M. Solid Acid induced cyclocondensation: A facile, one-pot synthesis of 7H-[1,2,4]Triazolo[3,4-b][1,3,4]Thiadiazines. **Phosphorus, Sulfur Silicon**, v. 177, p. 2403-2407, 2002.
67. KARPOV, M.V.; KHRAMCHIKHIN, A.V.; STADNICHUK, M.D. Synthesis of 3-Pyridin-4-yl-1,2,4-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazepines. **Russ. J. Gen. Chem.**, v. 81, p. 573-575, 2011.
68. GEETHA, A.S.; VIAJAYARAJ, R.; KUMAR, T.R.; ANAND, R.S. Synthesis of Certain 3-Pyridyl[1,2,4]Triazolo[3,4-B][1,3,4]Thiadiazepines and Evaluation of their Possible Biological Activities. **Int. J. of Res. Pharm. Biomed. Sci.**, v. 2, Jan-Mar 2011.
69. KUMAR, G.V.S.; PRASAD, Y.R.; MALLIKARJUNA, B.P.; CHANDRASHEKAR, S.M.; KISTAYYA, C. Synthesis of some novel 2-substituted-5-[isopropylthiazole] clubbed 1,2,4-triazole and 1,3,4-oxadiazole as potential antimicrobial and antitubercular agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 2063-2074, 2010.
70. GILANI, J.S.; SUROOR, A.K. Synthesis and pharmacological evaluation of condensed

heterocyclic 6-substituted 1,2,4-triazolo-[3,4-b]-1,3,4-thiadiazole and 1,3,4-oxadiazole derivatives of isoniazid. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 20, p. 4762-4765, 2010.

71. MATYSIAK, J.; NASULEWICZ, A.; PEŁCZYŃSKA, M.; ŚWITALSKA, M.; JAROSZEWICZ, I.; OPOLSKI, A. Synthesis and antiproliferative activity of some 5-substituted 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazoles. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 41, p. 475-482, 2006.
72. CHOUA, J.Y.; LAIA, S.Y.; PANB, S.L.; JOWC, G.M.; CHERNA, J.W.; GUH, J.H. Investigation of anticancer mechanism of thiadiazole-based compound in human non-small cell lung cancer A549 cells. **Biochem. Pharm.**, v. 66, p. 115-124, 2003.
73. HOLLA, B.S.; POOJARY, K.N.; RAO, B.S.; SHIVANANDA, M.K.. New bis-aminomercaptotriazoles and bis-triazolothiadiazoles as possible anticancer agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 37, p. 511-517, 2002.
74. EL SHEHRY, M.F.; ABU-HASHEM, A.A.; EL-TELBANI, E.M. Synthesis of 3-(2,4-dichlorophenoxy)methyl)-1,2,4-triazolo(thiadiazoles and thiadiazines) as anti-inflammatory and molluscicidal agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 40, p. 607-613, 2010.
75. KAREGOUDAR, P.; PRASAD, D.J.; ASHOK, M.; MAHALINGA, M.; POOJARY, B.; HOLLA, B.S. Synthesis, antimicrobial and anti-inflammatory activities of some 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles and 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazines bearing trichlorophenyl moiety. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 43, p. 808-815, 2008.
76. FARGHALY, A.R.; CLERCQ, E.; EL-KASHEF, H. Synthesis and antiviral activity of novel [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles, [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazines and [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazepines. **Gen. Pap.**, p. 137-151, 2006.
77. GEORGE, T. D. V.; MEHTA, R.; TAHILRAMANI, J.D.; TALWALKER, P.K. Synthesis of some s-triazoles with potential analgetic and antiinflammatory activities. **J. Med. Chem.**, v. 40, p. 607-613, 2005.
78. DENG, X.Q.; DONG, Z.Q.; SONG, M.X.; SHU, B.; WANG, S.B.; QUAN, Z.S. Synthesis and anticonvulsant activities of some triazolothiadiazole derivatives. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.** 2012, 345, 565-573, v. 345, p. 565-573, 2012.
79. ABDEL-RAHMAN, R.M.; AL-FOOTY, K.O.; AQLAN, F.M. Synthesis and antiinflammatory evaluation of some more new 1,2,4-triazolo[3,4-b]thiadiazoles as an antimicrobial agent: Part-I. **Int. J. Chem. Tech. Res.**, v. 3, p. 423-434, 2011.
80. METWALLY, K.A.; YASEEN, S.H.; LASHINE, E.M.; EL-FAYOMI, H.M.; EL-SADEK, M.E. Non-carboxylic analogues of arylpropionic acids: Synthesis, Anti-inflammatory activity and ulcerogenic potential. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 42, p. 152-160, 2007.
81. AMMAR, Y.A.; GHORAB, M.M.; EL-SHARIEF, A.M.SH.; MOHAMMED, SH.I. Naproxen in Heterocyclic Chemistry: Novel Syntheses of Triazoles, Triazolothiadiazines,

- Triazolothiadiazoles, and Triazolothiadiazepine Bearing an Asymmetric Carbon Atom and Radiostability of the Biologically Active Compounds. **Heteroat. Chem.**, v. 13, p. 199-206, 2002.
82. KUMAR, M.S.; KUMAR, S.L.A.; SREEKANTH, A. Anticorrosion Potential of 4-Amino-3-methyl-1,2,4-triazole-5-thione derivatives (SAMTT and DBAMTT) on Mild Steel in Hydrochloric Acid Solution. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 51, p. 5408-5418, 2012.
83. CICEKLI, S.U.; ONKOL, T.; OZGEN, S.; SAHINA, F. Schiff bases of 3-[(4-amino-5-thioxo-1,2,4-triazole-3-yl)methyl]-2(3H)-benzoxazolone derivatives: synthesis and biological activity. **Rev. Roum. Chim.**, v. 57, p. 187-195, 2012.
84. SIDDIQUI, S.M.; SALAHUDDIN, A.; AZAM, A. Thiosemicarbazone fragment embedded within 1,2,4-triazole ring as inhibitors of *Entamoeba histolytica*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 2768-2771, 2012.
85. HUNASHAL, R.D.; RONAD, P.M.; MADII, V.S; SATYNARAYANA, D.; M.A.; KAMADOD. Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity of 2-[4-(substituted benzylideneamino)-5-(substituted phenoxyethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl thio] acetic acid derivatives. **Arab. J. Chem.**, v.7, p-1070-1078, 2014.
86. JI, D.; LU, J.R.; LU, B.W.; XIN, C.W.; MU, J.B.; LI, J.F.; PENG, C.Y.; BAO, X.R. Efficient synthesis and antimicrobial activity of some novel S-β-D-glucosides of 5-aryl-1,2,4-triazole-3-thiones derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 23, p. 1997-2000, 2013.
87. AL-HARBI, R.A.K.; ABDEL-RAHMAN, A.A.H.. Synthesis of new 1-(4-amino-1,2,4-triazol-3-ylmethyl)-pyrimidinedione derivatives under microwave irradiation and their antimicrobial evaluation. **Der. Pharm. Chem.**, v. 5, p. 286-293, 2013.
88. BAILEY, P.D.; HOLLINSHEAD, S.; MCLAY, N.R. Exceptional stereochemical control in the Pictet-Spengler reaction. **Tetrahedron Lett.**, v. 28, p. 5177-5180, 1987.
89. COX, E. D.; COOK, J.M.. The Pictet-Spengler condensation: a new direction for an old reaction. **Chem. Rev.**, v. 16, p. 1797-1842, 1995.
90. BAILEY, P. D.; COCHRANE, P. J.; FORSTER, A. H.; MORGANA, K. M.; PEARSON D. P.J.. Synthesis of Polycyclic Indolic Structures. **Tetrahedron Lett.**, v. 40, p. 4597-4600, 1999.
91. KUSURKAR, R. S.; ALKOBATI, N. A. H.; GOKULE, A. S.; PURANIK. G. V. Use of the Pictet-Spengler reaction for the synthesis of 1,4-disubstituted-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolines and 1,4-disubstituted-β-carbolines: formation of β-carbolines. **Tetrahedron**, 2008, 64, 1654-1662, v. 64, p. 1654-1662, 2008.
92. MARESH, J. J.; GIDDINGS, LESLEY-A.; FRIEDRICH, A.; LORIS, E. A.; PANJIKAR, S.; TROUT, B. L.; STOCKIGT, J.; PETERS, B.; O'CONNOR, S. E. Strictosidine Synthase: Mechanism of a Pictet-Spengler Catalyzing Enzyme. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 130, p. 710-723, 2008.

93. FORMAGIO, A. S. N., SANTOS, P. R., ZANOLI, K., UEDA-NAKAMURA, T., TONIN, L. T. D., NAKAMURA, C. V., SARRAGIOTTO, M. H. Synthesis and antiviral activity of beta-carboline derivatives bearing a substituted carbohydrazone at C-3 against poliovirus and herpes simplex virus (HSV-1). **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 4695-4701, 2009.
94. AGGARWAL, N.; KUMAR, R.; DUREJA, P.; KHURANA, J.M.. Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR analysis of novel nalidixic acid based 1,2,4-triazole derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, p. 4089-4099, 2011.
95. CANSIZ, A.; KOPARIR, M.; DEMIRDAG, A. Synthesis of Some New 4,5-Substituted-4H-1,2,4-triazole-3-thiol Derivatives. **Molecules**, p. 204-212, 2004.
96. CHHABRIA, M.T.; SUHAGIA, B.N.; BRAHMKSHATRIYA, P.S.; RAVAL, P.M. Synthesis and antihyperlipidemic activity of some novel 4-(substitutedamino)-5-substituted-3-mercaptop-(4H)-1,2,4-triazoles. **Arzneimittelforschung**, v. 8, p. 452-457, 2011.
97. JI, D.; LU, J.R.; LU, B.W.; XIN, C.W.; MU, J.B.; LI, J.F.; PENG, C.Y.; BAO, X.R. Efficient synthesis and antimicrobial activity of some novel S-b-D-glucosides of 5-aryl-1,2,4-triazole-3-thiones derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 23, p. 1997-2000, 2013.
98. DING, Q.; ZHANG, L.; ZHANG, H. Synthesis and biological activities of some novel triazolothiadiazines and schiff bases derived from 4-amino-3-(4-hydroxyphenyl)-1H-1,2,4-triazole-5-(4H)-Thione. **Phosphorus, Sulfur, Silicon**, v. 185, p. 567-572, 2010.
99. YU, H.X.; MA, J.F.; XU, G.H.; LI, S.L.; YANG, J.; LIU, Y.Y.; CHENG, Y.X. Syntheses and crystal structures of four new organotin complexes with Schiff bases containing triazole. **J Organomet. Chem.**, v. 691, p. 3531-3539, 2006.
100. SEN, A.K.; SINGH, R.N.; HANDA, R.N.; SURENDRA N.D.; PHILIP J.S. A structural comparison of some amine- and thione-substituted triazole. **J. Mol. Struct.**, v. 470, p. 61-69, 1998.
101. JUBIE, S.; SIKDAR, P.; KALIRAJAN, R.; GOWRAMMA, B.; GOMATHY, S.; SANKAR, S.; ELANGO, K. Synthesis and antimicrobial activity of some novel ciprofloxacin analogues. **J. Pharm. Res.**, n. 3, p. 511-513, 2010.
102. FOROUGHIFAR, N.; MOBINIKHALEDI, A.; EBRAHIMI, S. Efficient and convenient protocol for the synthesis of novel 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazines. **Synth. Commun.**, v. 40, p. 2421-2428, 2010.
103. KHALIL, N.S.A.M. Efficient synthesis, structure, and antimicrobial activity of some novel N- and S-b-D-glucosides of 5-pyridin-3-yl-1,2,4-triazoles. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 2187-2199, 2006.
104. VASIL'CHENKO, I.S.; BURLOV, A.S.; SHESTAKOVA, T.E.; IKORSKII, V.N.; KUZ'MENKO, T.A.; VLASENKO, V.G.; BOZHENKO, K.V.; DIVAEVA, L.N.; MORKOCNIK, A.S. Copper Complexes with N-Aminotriazolethione azomethines: Structures and Magnetochemical properties.



**Russ. J. Coord. Chem.**, v. 36, p. 189-197, 2010.

105. CHIDANANDA, N.; POOJARY, B.; SUMANGALA, V.; KUMARI, N.S.; SHETTY, P.; ARULMOLI, T. Facile synthesis, characterization and pharmacological activities of 3,6-disubstituted 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles and 5,6-dihydro-3,6-disubstituted-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 51, p. 124-136, 2012.
106. BAI, Y.; ZHAO, G.; LI, C.; ZHAO, S.; SHI, Z. Microwave-enhanced reactions of 4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazoles with benzoyl chloride and aromatic aldehydes. **Synth. Commun.**, v. 38, p. 3311-3319, 2008.
107. TABATABAEE, M.; GHASSEMZADEH, M.; ZARABI, A.; NEUMÜLLER, B. Solvent-Free Microwave Synthesis of (Aryl and Heteroaryl-methylene)-amino Derivatives of 4-Amino-6-methyl-5-oxo-3-thioxo-2H-1,2,4-triazine and 4-Amino-5-methyl-3-thioxo-2H-1,2,4-triazole: Crystal Structure of 6-Methyl-4-(3-nitrobenzylideneamino)5-thioxo-2H. **Phosphorus, Sulfur, Silicon**, v. 182, p. 677-686, 2007.
108. SHIRADKAR, M.R.; PADHALINGAPPA, M.B.; BHETALABHOTLA, S.; AKULA, K.C.; TUPE, D.A.; PINNINTI, R.R.; THUMMANAGOTI, S. A novel approach to cyclin-dependent kinase 5/p25 inhibitors: A potential treatment for Alzheimer's disease. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 25, p. 6397-6406, 2007.
109. VORA, J.J.; PATEL, D.R.; BHIMANI, N.V.; AJUDIA, P.V. Synthesis, Characterization and biological evaluation of triazole and fused triazole derivatives. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 56, 2011.
110. BEKTAS, H.; KARAALI, N.; SAHIN, D.; DEMIRBAS, A.; KARAOGLU, S.A.; DEMIRBAS, N. Synthesis and Antimicrobial Activities of Some New 1,2,4-Triazole Derivatives. **Molecules**, v. 15, p. 2427-2438, 2010.
111. SHARMA, V.; SHRIVASTAVA, B.; BHATIA, R.; BACHWANI, M.; KHANDELWAL, R.; AMETA, J.. Exploring potential of 1,2,4-triazole: A brief review. **Pharmacology online**, v. 1, p. 1192-1222, 2011.
112. WYRZYKIEWICZ, E.; PRUKAIA, D. New Isomeric N-Substituted Hydrazones of 2-, 3- and 4-Pyridinecarboxaldehydes. **J. Heterocycl. Chem.**, v. 35, p. 381-387, 1998.
113. BENTISS, F.; LAGRENÉE, M.; BARBRY, D. Accelerated synthesis of 3,5-disubstituted 4-amino-1,2,4-triazoles under microwave irradiation. **Tetrahedron Lett.**, v. 41, p. 1539-1541, 2000.
114. AL-AWADI, N.; IBRAHIM, Y.; KAUL, K.; DIB, H. Gas-phase elimination reactions of 4-arylideneimino-1,2,4-triazol-3(2H)-ones and their 3(2H)-thione analogues. **J. Phys. Org. Chem.**, v. 14, p. 521-525, 2001.
115. EL SHEHRY, M.F.; ABU-HASHEM, A.A.; TELBANI E.M. Synthesis of 3-((2,4-

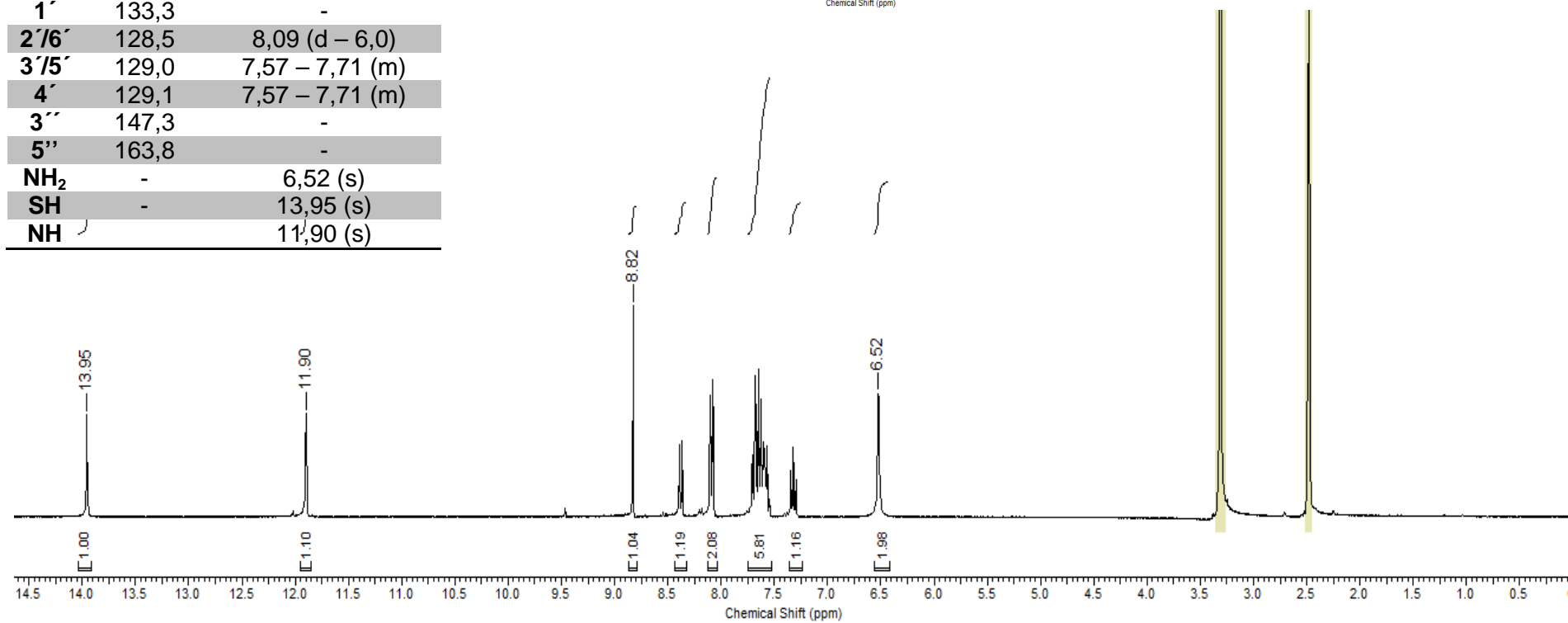
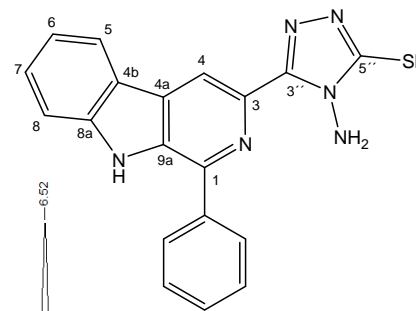
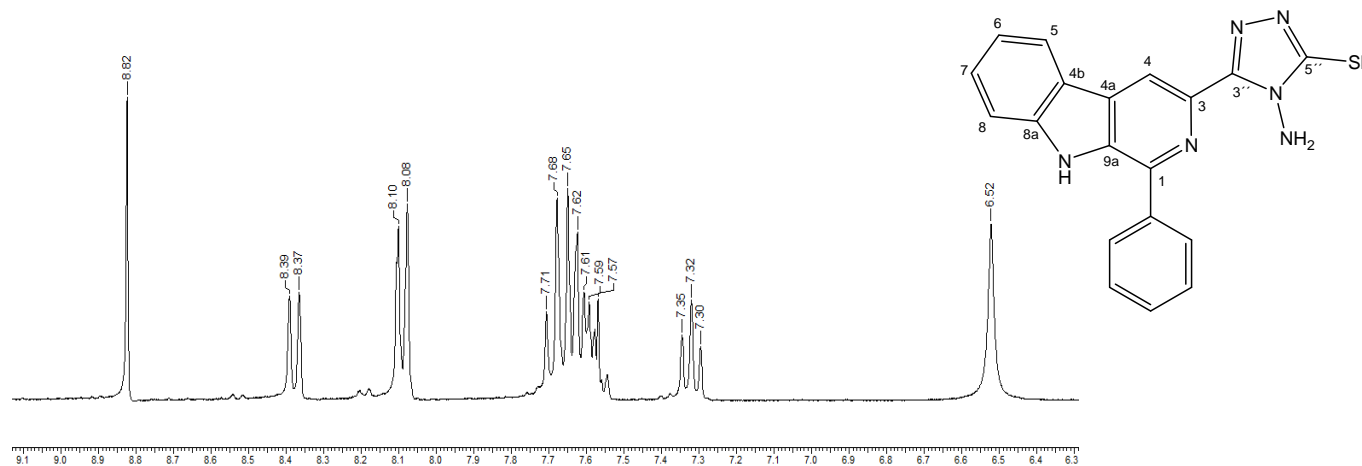
- dichlorophenoxy)methyl)-1,2,4-triazolo(thiadiazoles and thiadiazines) as anti-inflammatory and molluscicidal agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 1906-1911, 2010.
116. XU, P.F.; ZHANG, Z.H.; HUI, X. P.; ZHANG, Z. Y.; ZHENG, R.L. Synthesis of triazoles, oxadiazoles and condensed heterocycle compounds containing cinchopheny and studies on biological activity of representative compounds. **J. Chin. Chem. Soc.**, v. 51, p. 315-319, 2004.
117. KUMAR, G.V.S.; RAJENDRAPRASAD, Y.; MALLIKARJUNA, B.P.; CHANDRASHEKAR, S.M.; KISTAYYA, C. Synthesis of some novel 2-substituted-5-[isopropylthiazole] clubbed 1,2,4-triazole and 1,3,4-oxadiazole as potential antimicrobial and antitubercular agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 2063-2074, 2010.
118. EL-SAYED, W.A.; HEGAB, M.I.; TOLAN, H.E.M.; ABDEL-RAHMAN, A.A.H. Synthesis and characterization of mono- and bicyclic heterocyclic derivatives containing 1,2,4-triazole, 1,3,4-thia-, and -oxadiazole rings. **Monatsh. Chem.**, v. 139, p. 1055-1060, 2008.
119. METWALLY, K.A.; YASEEN, S.H.; LASHINE, E.S.; EL-FAYOMI, H.M.; EL-SADEK, M.E. Non-carboxylic analogues of arylpropionic acids: Synthesis, anti-inflammatory activity and ulcerogenic potential. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 42, p. 152-160, 2007.
120. OMPRAKASH, G.; ANJANEYULU, Y.; SUBRAMANIAN, N.S.; RAMADEVI, M.; GUPTA, V.R.M.; G VIJAYALAKSHMI. Synthesis, characterization and anti-microbial screening of novel heterocyclic system containing bridgehead nitrogen atom. **Res. J. Pharm. Bio. Chem. Scien.**, v. 2, p. 410-418, 2011.
121. IBRAHIM, D.A.. Synthesis and biological evaluation of 3,6-disubstituted [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole derivatives as a novel class of potential anti-tumor agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 2776-2781, 2009.
122. EL-SERWY, W.; MOHAMED, N.A.; ABBAS, E.M.; ABDEL-RAHMAN, R.F. Synthesis and anti-inflammatory properties of novel 1,2,4-triazole derivatives. **Res. Chem. Intermed.**, v. 39, p. 2543-2554, 2013.
123. EL ASHRY, E.S.H.; KASSEM, A.A.; ABDEL-HAMID, H.; LOUIS, F.F.; KHATTAB, SH.A.N.; AOUAD, M.R. Synthesis of 4-amino-5-(3-chlorobenzo[b]thien-2-yl)-3-mercapto-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles and triazolo[3,4,b][1,3,4]thiadiazines under classical and microwave conditions. **ARKIVOC 2006**, v. 14, p. 119-132, 2006.
124. KIDWAY, M.; MOTHSRA, P. Microwave-assisted neat reaction technology for the synthesis of s-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazines. **J. Sulfur Chem.**, 2007, v. 28, p. 149-153.
125. MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 83, p. 757-766, 1991.

126. ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.
127. LUO, W.; LI, Y.P.; TAN, J.H.; GU, L.Q.; HUANG, Z.S. Synthesis and biological evaluation of novel N,N'-bismethylenedioxybenzyl-alkylenediamines as bivalent anti-Alzheimer disease ligands. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v. 26, p. 706-711, 2011.
128. YANOVSKY, I.; FINKIN-GRONER, E.; ZAIKIN, A.; LERMAN, L.; SHALOM, H.; ZEELI, S.; WEILL, T.; GINSBURG, I.; NUDELMAN, A.; WEINSTOCK, M. Carbamate Derivatives of Indolines as Cholinesterase Inhibitors and Antioxidants for the Treatment of Alzheimer's Disease. **J. Med. Chem.**, v. 55, p. 10700-10715, 2012.
129. GULCAN, H.O.; UNLU S.; ESIRINGU, I.; ERCETIN, T.; SAHIN, Y.; DEMET, O.; SAHIN, M.F. Design, synthesis and biological evaluation of novel 6H-benzo[c]chromen-6-one, and 7,8,9,10-tetrahydro-benzo[c]chromen-6-one derivatives as potential cholinesterase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 22, p. 5141-5154, 2014.
130. LUO, W.; WANG, J.; ZHANG, X.; HONG, C.; WANG, C.J. Design, Synthesis and Evaluation of Genistein-polyamine Conjugates as Multi-functional Anti-Alzheimer Agents. **Med. Chem.**, v. 4, p. 617-622, 2014.

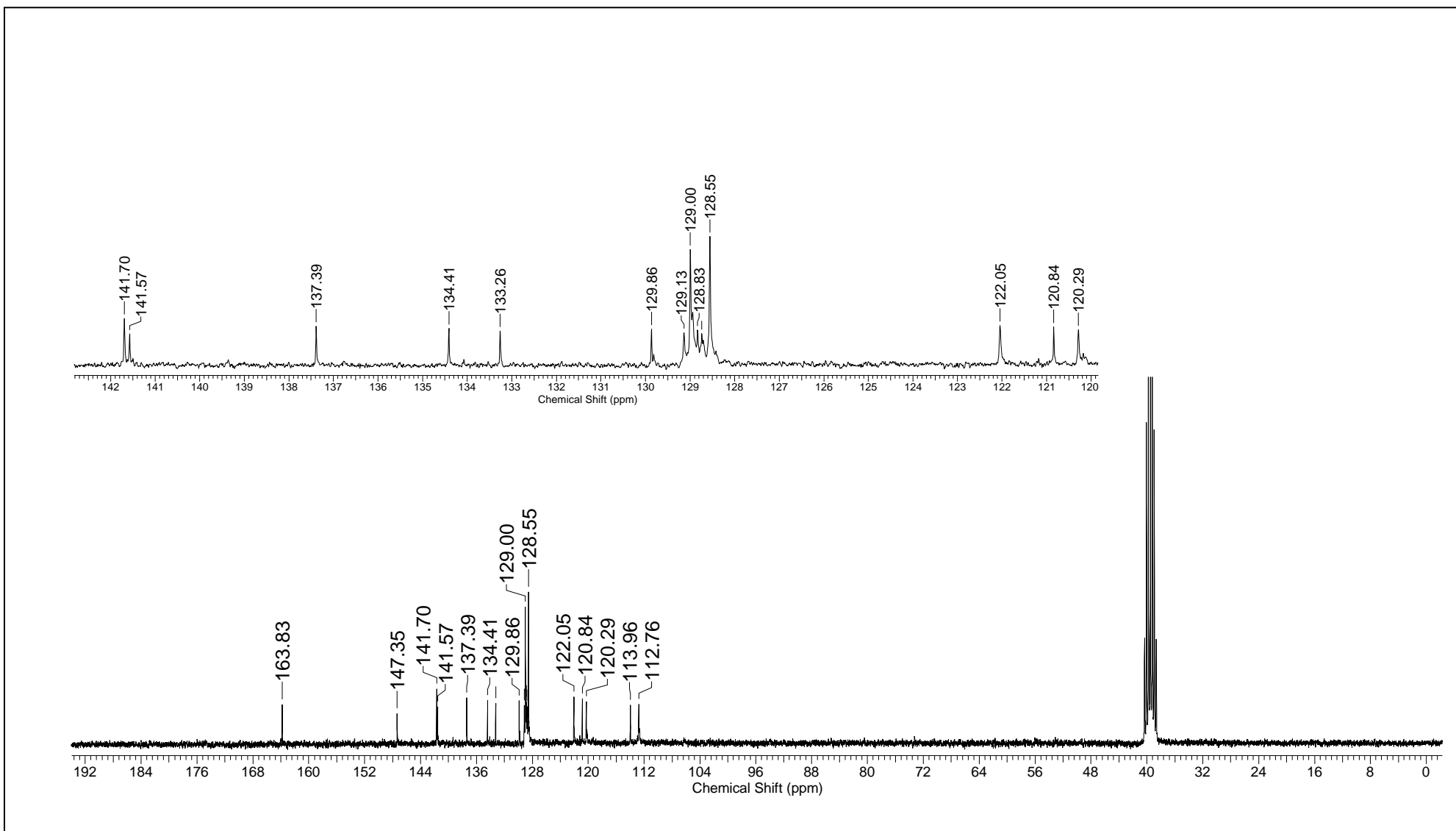
## ANEXOS

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC dos compostos sintetizados

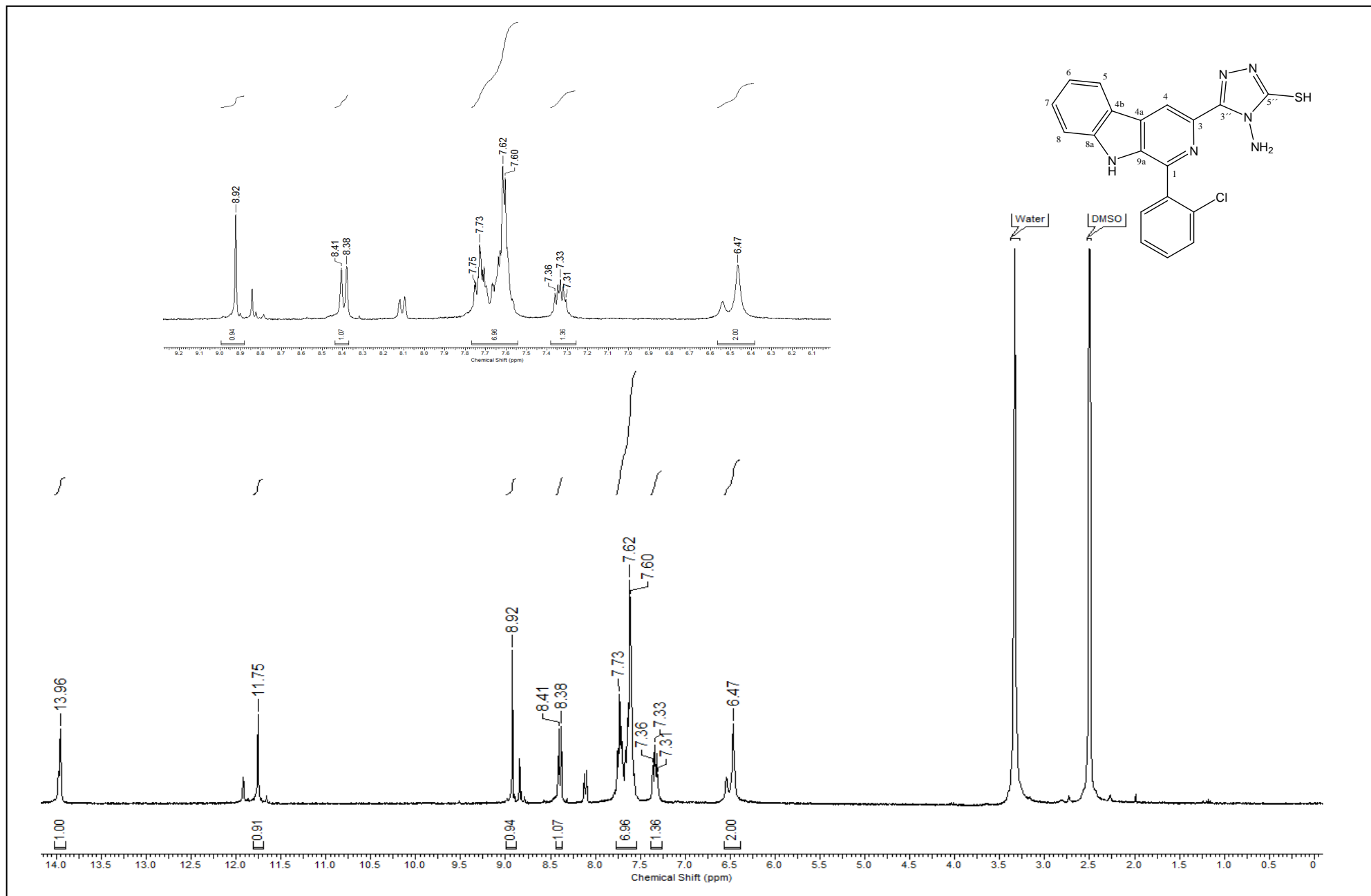
C/H	$\delta_C$	$\delta_H$ (multiplicidade, J=Hz)
1	141,7	-
3	137,4	-
4	113,9	8,82 (s)
4a	129,9	-
4b	120,8	-
5	122,0	8,38 (d – 6,0)
6	120,3	7,32 (t – 7,5)
7	128,3	7,57 – 7,71 (m)
8	112,7	7,57 – 7,71 (m)
8a	141,6	-
9a	134,4	-
1'	133,3	-
2'/6'	128,5	8,09 (d – 6,0)
3'/5'	129,0	7,57 – 7,71 (m)
4'	129,1	7,57 – 7,71 (m)
3''	147,3	-
5''	163,8	-
NH <sub>2</sub>	-	6,52 (s)
SH	-	13,95 (s)
NH	-	11,90 (s)



Anexo A.3 Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300,0 MHz – DMSO-d<sub>6</sub>) para 11a

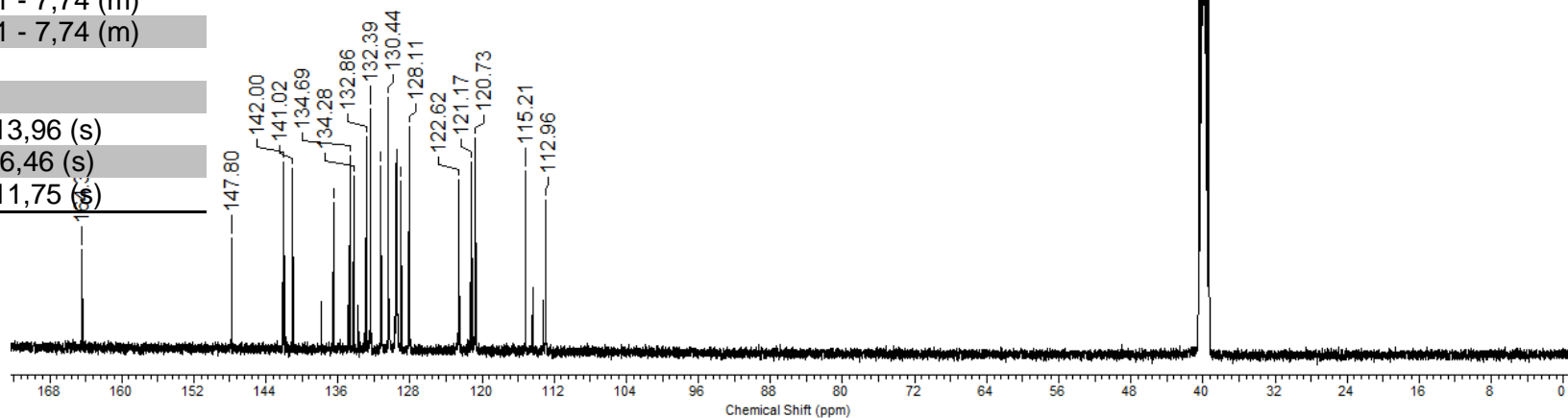
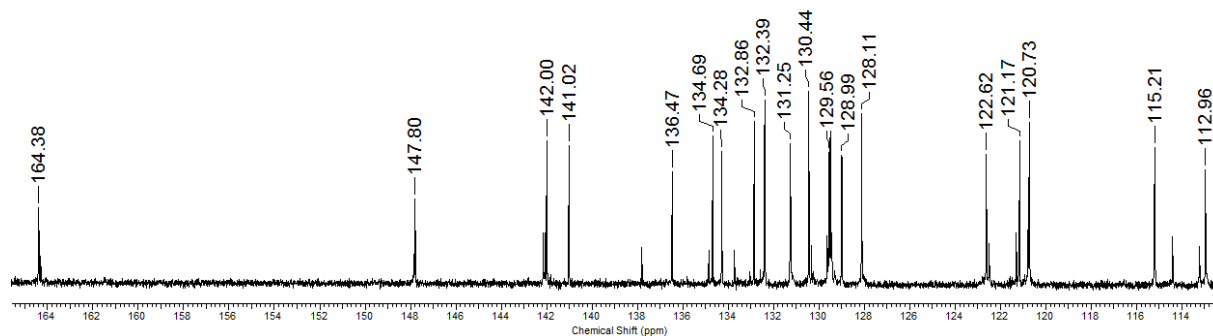


Anexo A.4 Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75,5 MHz – DMSO-d<sub>6</sub>) para 11a



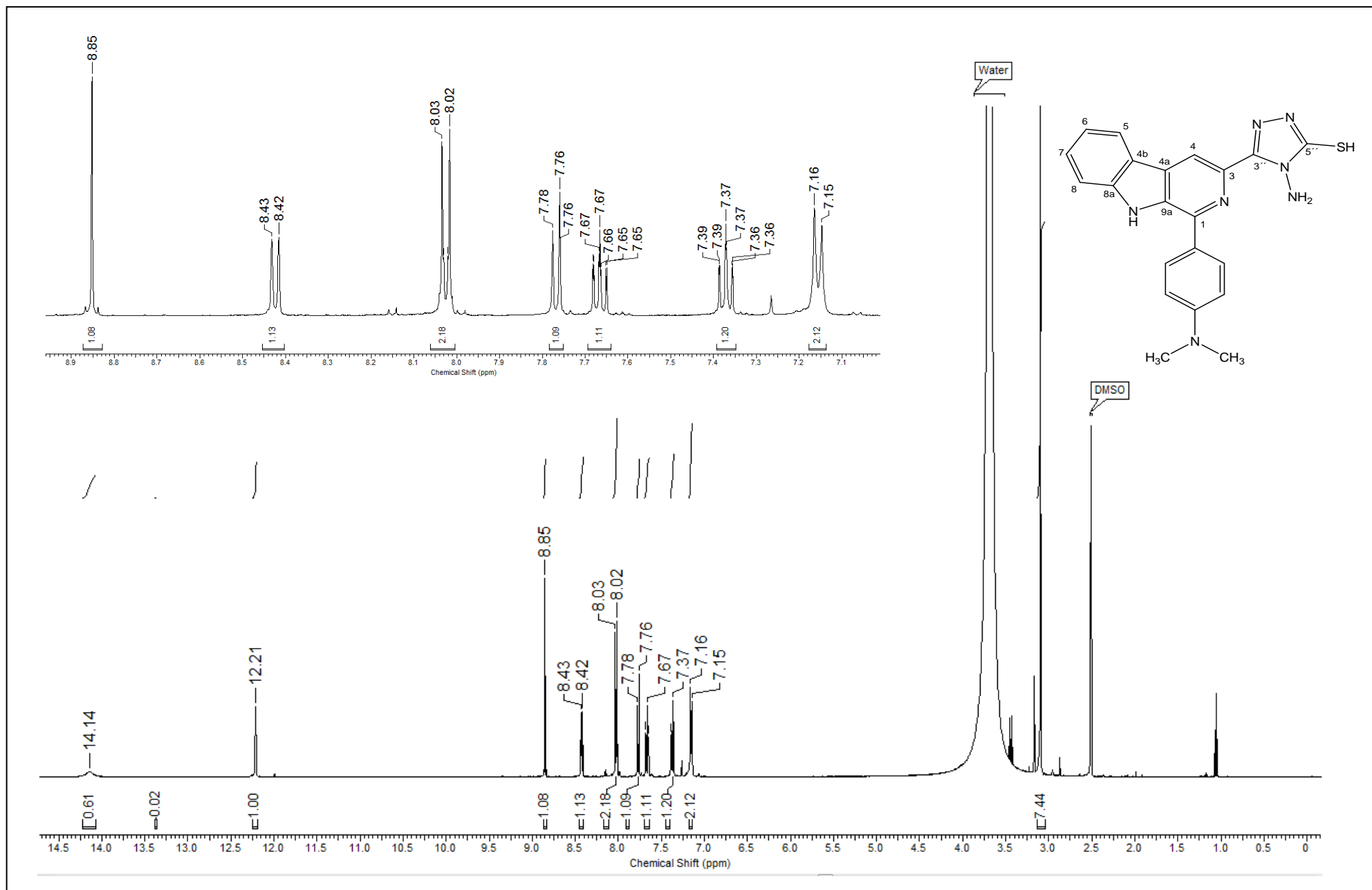
Anexo A.3 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz –  $\text{DMSO-}d_6$ ) para **11b**

C/H	$\delta_c$	$\delta_H$ (multiplicidade, J=Hz)
1	142,0	-
3	136,5	-
4	115,2	8,92 (s)
4a	129,0	-
4b	121,2	-
5	122,6	8,39 (d – 6,0)
6	120,7	7,32-7,35 (m)
7	128,1	7,58 - 7,67 (m)
8	113,0	7,71-7,74 (m)
8a	141,0	-
9a	134,7	-
1'	134,3	-
2'	132,9	-
3'	130,4	7,71 - 7,74 (m)
4'	132,3	7,58 - 7,67 (m)
5'	129,6	7,71 - 7,74 (m)
6'	131,2	7,71 - 7,74 (m)
3''	147,8	-
5''	164,4	-
SH	-	13,96 (s)
NH <sub>2</sub>	-	6,46 (s)
NH	-	11,75 (s)



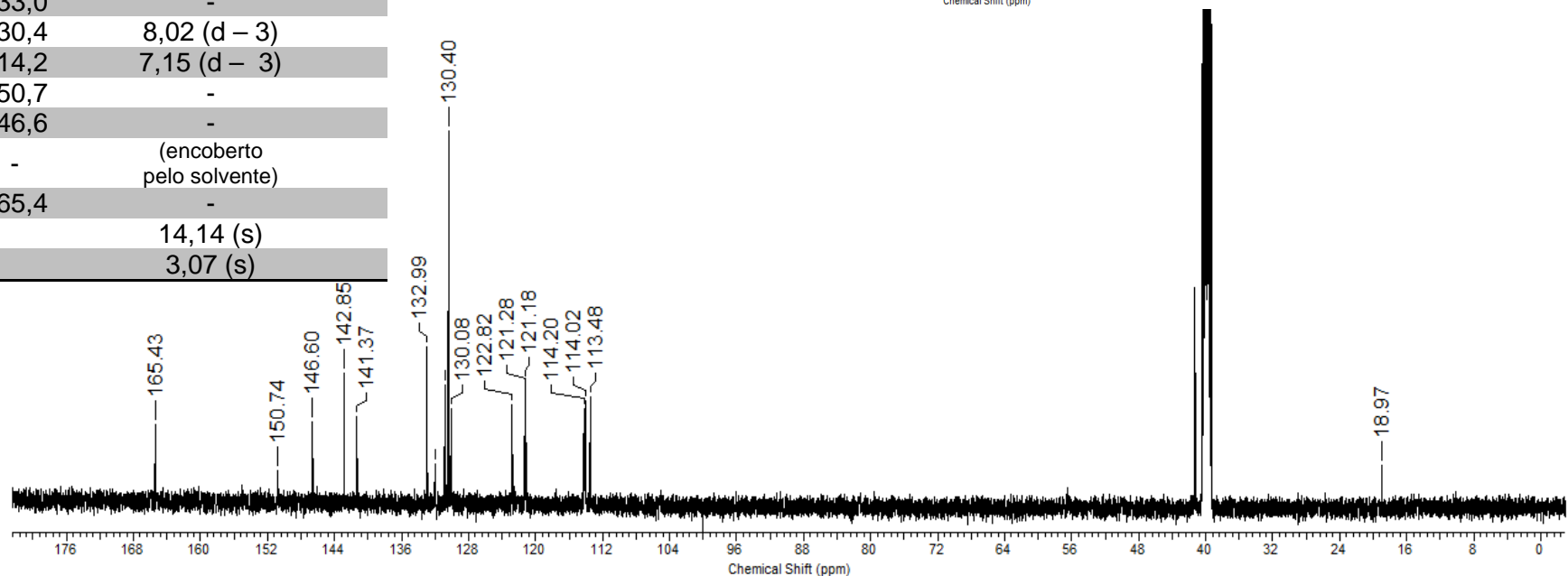
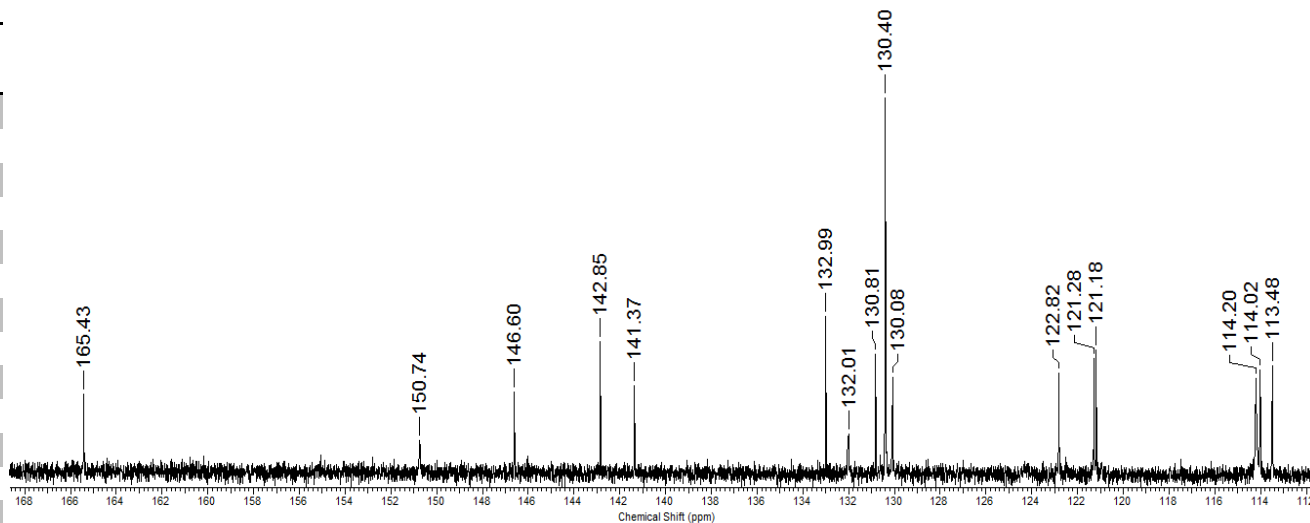
Anexo A.4 Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75,5 MHz – DMSO-d<sub>6</sub>) para 11b



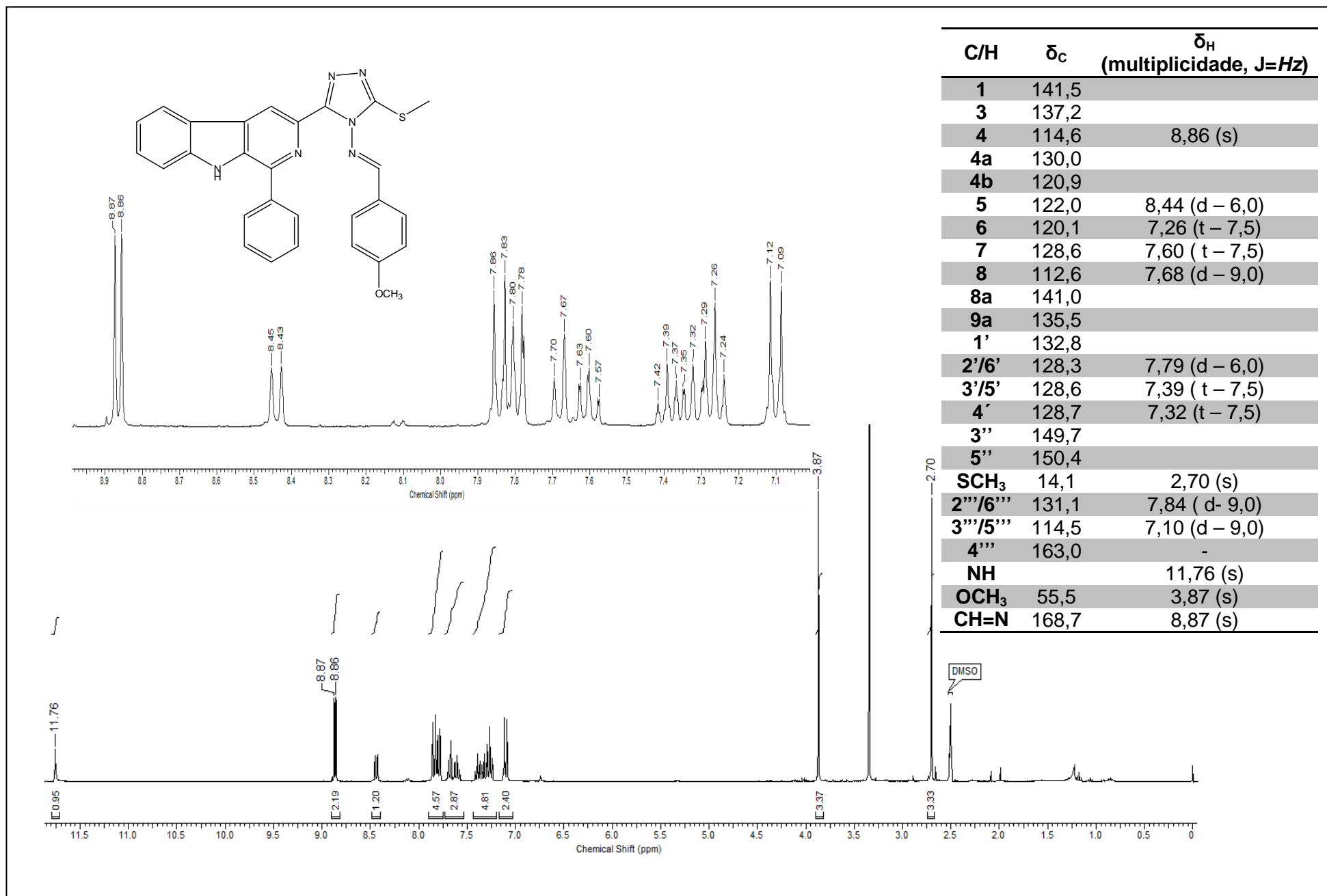


Anexo A.5 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz –  $\text{DMSO-}d_6$ ) para **11d**

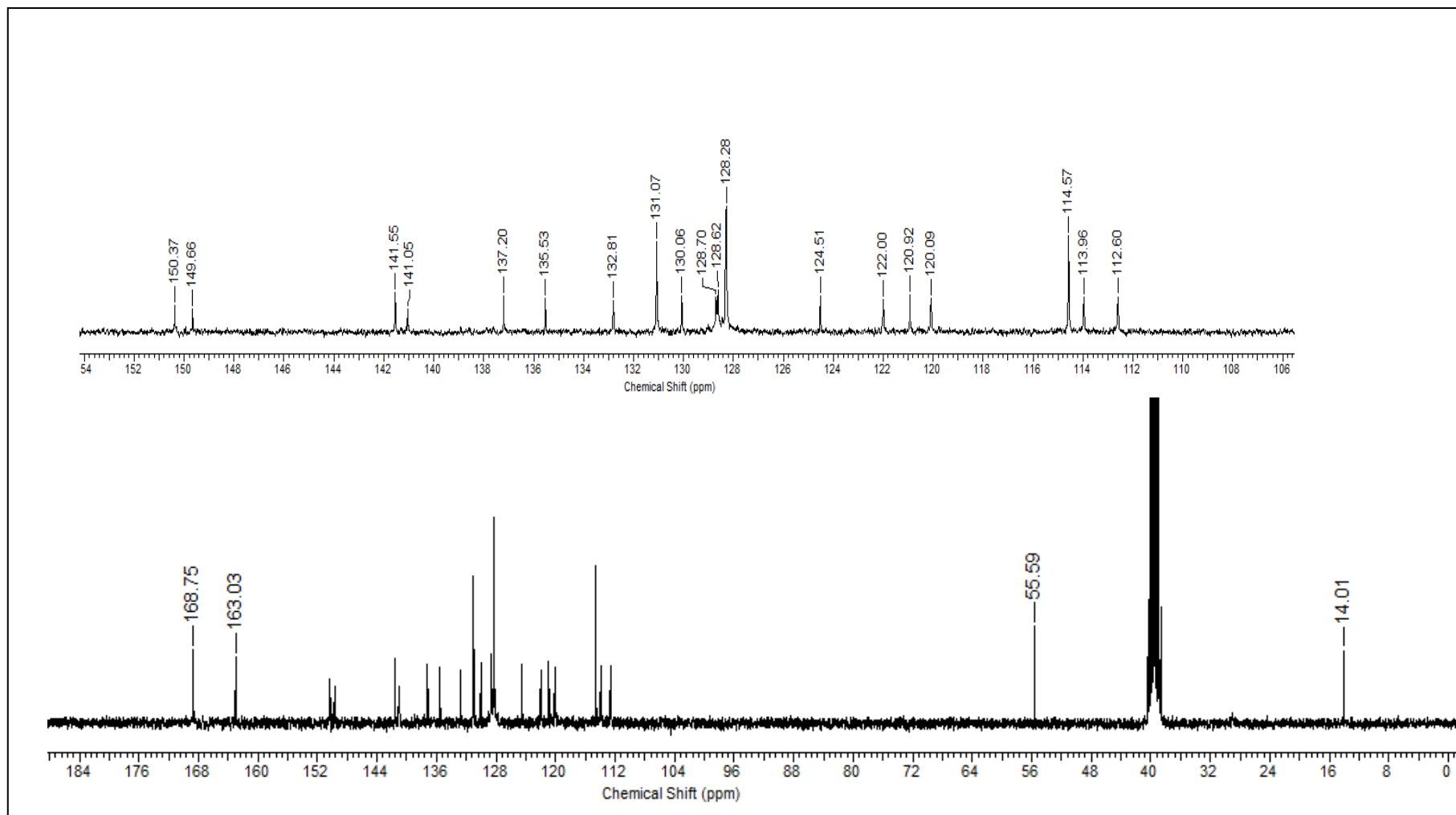
C/H	$\delta_c$	$\delta_H$ (multiplicidade, J=Hz)
1	141,4	-
3	-	-
4	114,0	8,85 (s)
4a	130,8	-
4b	121,2	-
5	122,8	8,42 (d - 3)
6	121,3	7,37 (t - 6)
7	130,1	7,67 (t - 6)
8	113,4	7,77 (d - 6)
8a	142,8	-
9	-	12,21 (s)
9a	132,0	-
1'	133,0	-
2'/6'	130,4	8,02 (d - 3)
3'/5'	114,2	7,15 (d - 3)
'	150,7	-
3''	146,6	-
NH <sub>2</sub>	-	(encoberto pelo solvente)
5''	165,4	-
SH	-	14,14 (s)
N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	3,07 (s)



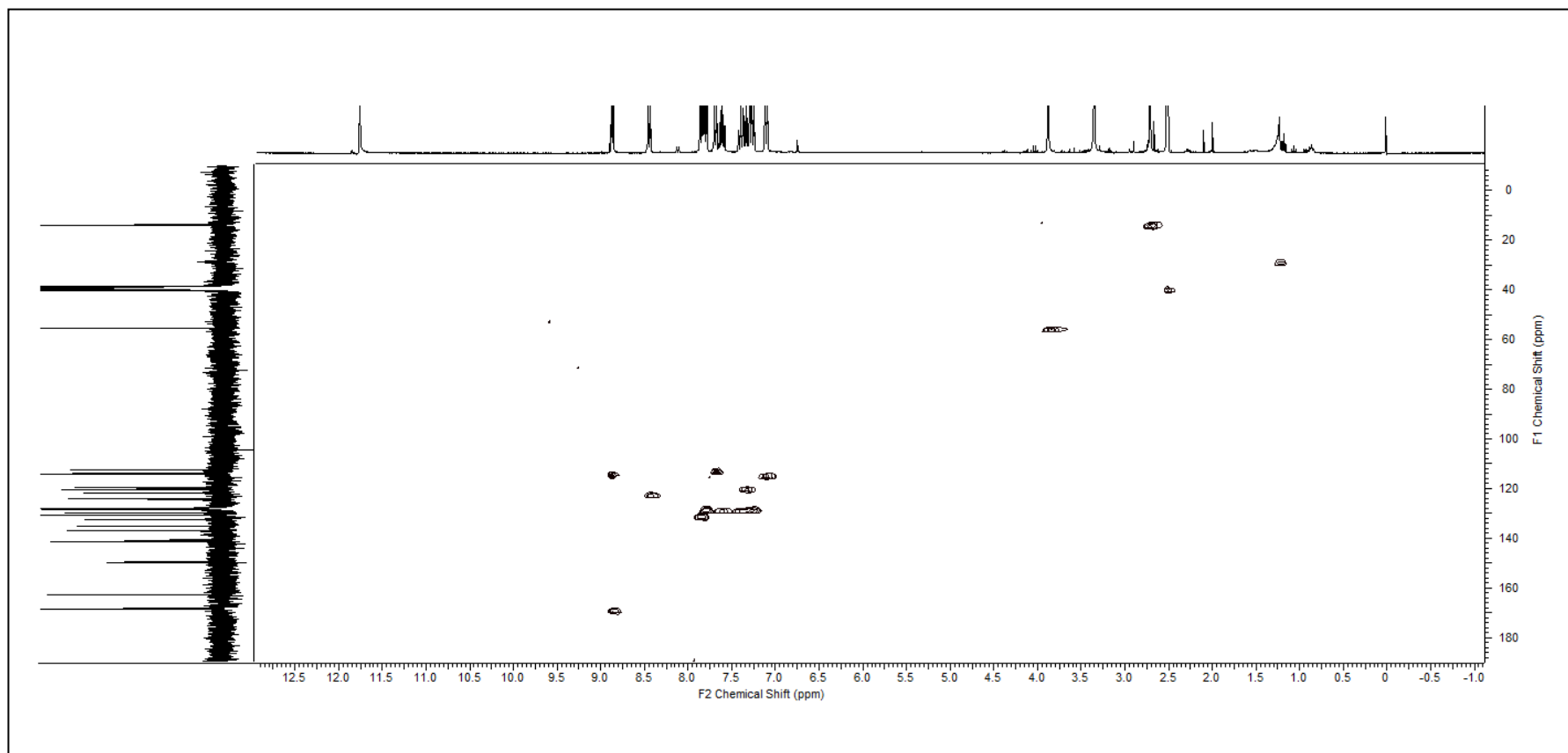
Anexo A.6 Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75,5 MHz – DMSO-d<sub>6</sub>) para 11d



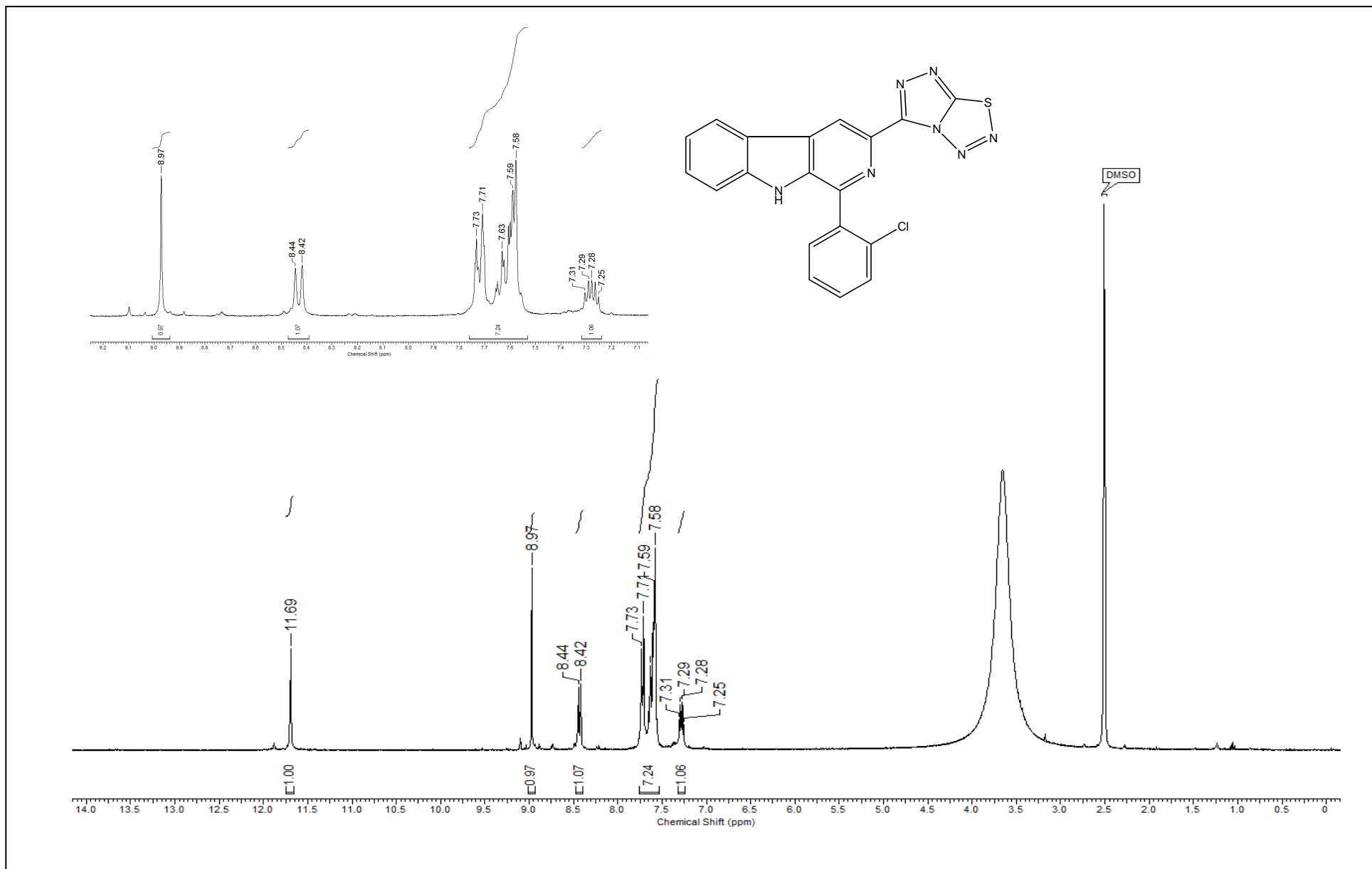
Anexo A.7 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz –  $\text{DMSO-}d_6$ ) para 79.



Anexo A.8 Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz –  $\text{DMSO-}d_6$ ) para **79**.

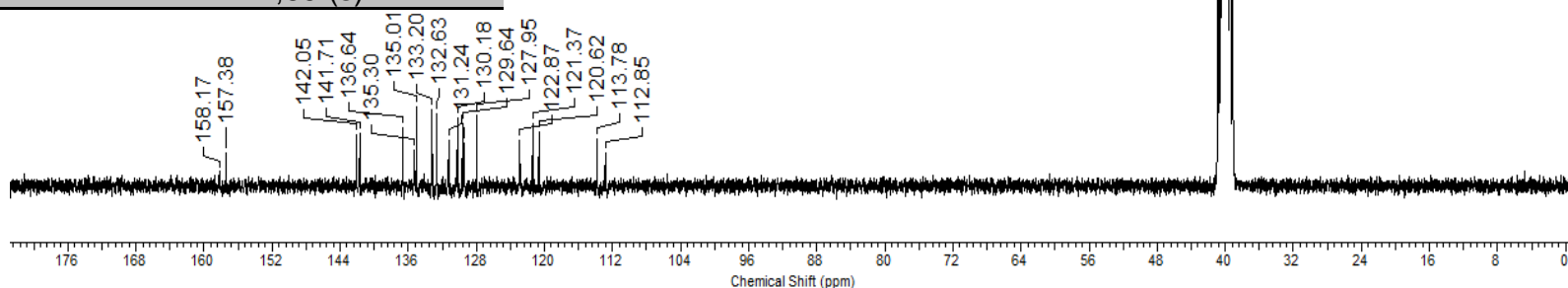
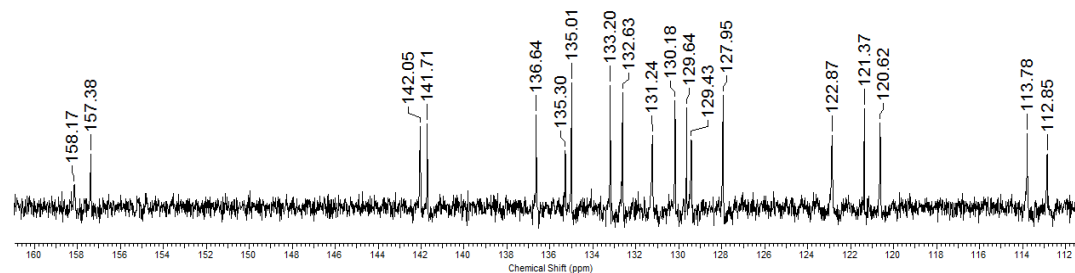


Anexo A.9 Mapa de Contorno de HSQC para 79.

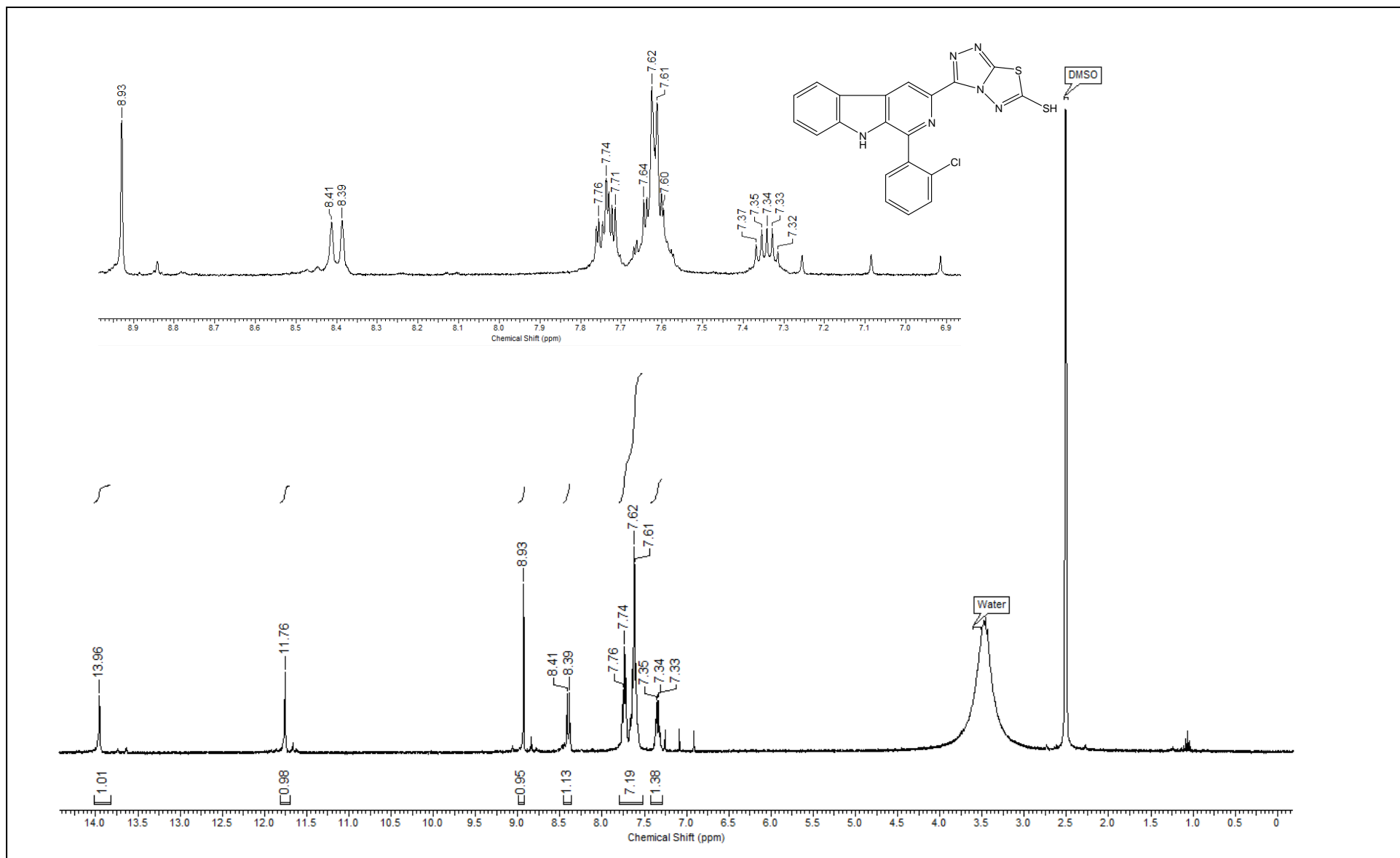


Anexo A.10 Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300,0 MHz –  $\text{DMSO-}d_6$ ) para **14b**.

C/H	$\delta_C$	$\delta_H$ (multiplicidade, J=Hz)
1	142,0	-
3	136,6	-
4	113,8	8,97 (s)
4a	129,4	-
4b	121,4	-
5	122,9	8,43 (d – 6,0)
6	120,6	7,25-7,31 (m)
7	127,9	7,58-7,63 (m)
8	112,8	7,58-7,63 (m)
8a	141,7	-
9a	135,3	-
1'	133,2	-
2'	135,0	-
3'	130,18	7,72 (d – 6,0)
4'	132,6	7,58-7,63 (m)
5'	129,6	7,58-7,63 (m)
6'	131,2	-
3''	157,4	-
5''	158,2	-
NH		11,69 (s)

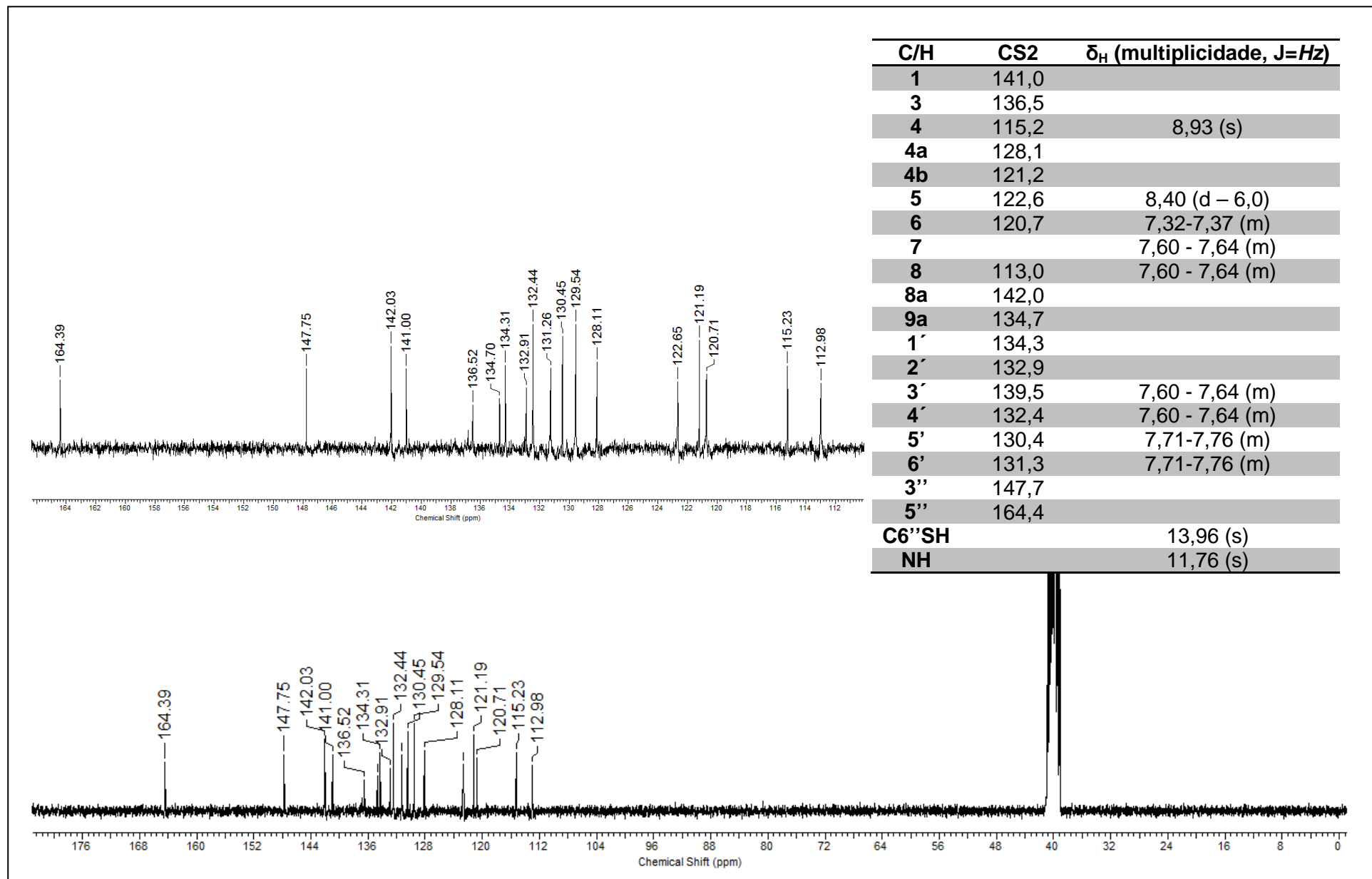


Anexo A. 11 Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para 14b.



Anexo A.12 Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300,0 MHz – DMSO-d<sub>6</sub>) para **15b**.





Anexo A.13 Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz – DMSO- $d_6$ ) para 15b