



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES TRIPANOCIDAS DE 4-TIAZOLINONAS E SEUS
ANÁLOGOS ESTRUTURAIS DO TIPO 1,3-TIAZÓIS**

Gevanio Bezerra de Oliveira Filho

Recife, PE

2013

Gevanio Bezerra de Oliveira Filho

**PLANEJAMENTO ESTRUTURAL, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES TRIPANOCIDAS DE 4-TIAZOLINONAS E SEUS
ANÁLOGOS ESTRUTURAIS DO TIPO 1,3-TIAZÓIS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite
Co-orientador: Dr^o Diogo Rodrigo Magalhães Moreira

Recife, PE

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Recife, 25 de fevereiro de 2013.

Defesa de Dissertação de Mestrado de **Gevanio Bezerra de Oliveira Filho** defendido e **Aprovado**, por decisão unânime, em 25 de fevereiro de 2013 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite. (Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley. (Depto. de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Marcelo Zaldini Hernandes. (Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE).

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof.º Dr.º Dalci José Brondani

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof.^a Dr.^a Nereide Stela Santos Magalhães

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof.^a. Dr.^a. Ana Cristina Lima Leite

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem ele nada seria possível.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a. Ana Cristina Lima Leite, pela amizade, conselhos, ensinamentos, cobranças e pelo imenso respeito e ajuda ao longo deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Diogo Rodrigo Magalhães Moreira, acima de tudo um grande amigo, que me fez crescer bastante durante o desenvolvimento deste trabalho.

A toda minha família, em especial pai (Gevanio), mãe (Agentina) e irmão (Ulissinho), Tio Giva, Luciana e Tia Joci, pois são fonte de inspiração, e me dão forças para seguir correndo atrás dos objetivos.

Meus sinceros agradecimentos a Dr.^a Milena Botelho Pereira Soares (CPqGM, FIOCRUZ), Cássio Santana Meire (CPqGM, FIOCRUZ), pelo compromisso em avaliar as propriedades farmacológicas dos compostos no *T. cruzi*, e a Prof.^a Dr.^a Rafaela Salgado Ferreira (ICB, UFMG), Pollyanne Lacerda Coelho (ICB, UFMG), pelos ensaios com a cruzaina.

Aos funcionários da Central Analítica do DQF (UFPE), em especial a Eliete Barros e Abene Ribeiro, pelas análises espectroscópicas.

Aos meus amigos do LpQM (DCFAR, UFPE): Marcos, Wan, Paulo André, Arsênio, Daura, Miria, Elany, Lucianna, Dayanne, Lívia e Edna; pela convivência excelente.

Aos pesquisadores e funcionários do DCFAR e do PPGCF.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFPE).

Ao CNPq, FACEPE e INCT-Dengue, pelo suporte financeiro ao LpQM (DCFAR, UFPE).

A minha namorada Tallyta, pelo amor incondicional, pelo colo nos momentos difíceis e pelos sorrisos nos momentos de alegria.

A todos meus amigos, em especial a Alice, Charles Simões, Charles Mendes, Daniel da Mota, Danilo Cândido, Hellen, Jamerson, Kelvin, Lucas, Márcia, Marlene, Ronmilson, Wandson, alguns distantes, mas que estão sempre me dando força e me ajudando com palavras confortantes.

RESUMO

A doença de Chagas é uma infecção parasitária sistêmica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que afeta entre 8 a 10 milhões de pessoas em todo o mundo. O benznidazol é o único fármaco aprovado para o tratamento durante a fase aguda e crônica assintomática, contudo não é eficaz durante a fase crônica sintomática. Com isso, o desenvolvimento de novos fármacos úteis para o tratamento da doença de Chagas é necessário. Com o objetivo de identificar fármacos tripanocidas, o planejamento estrutural e a síntese de inéditas aril-4-tiazolinonas (**23a–o**) e seus análogos estruturais do tipo aril-1,3-tiazóis (**24a–v**) foi realizado. As aril-4-tiazolinonas (**23a–o**) foram planejadas com intuito de identificar compostos menos citotóxicos e mais potentes em inibir o parasito do que os compostos protótipos (tiossemicarbazonas **Int-1-3**). Almeja-se também compreender a relação estrutura-atividade anti-*T. cruzi* para essa classe de tiazolinonas e por isso, substituintes diversos foram inseridos nas posições N3 e C5 do anel heterociclo. Já o planejamento estrutural dos aril-1,3-tiazóis (**24a–v**) teve como objetivo comparar a atividade tripanocida entre 4-tiazolinonas e 1,3-tiazóis. A atividade tripanocida foi determinada em tripomastigostas da cepa Y, e a toxicidade foi estimada em **macrófagos J774**. Após a triagem das propriedades tripanocidas dos compostos (**23a–v**) e (**24a–o**), foi possível identificar os compostos (**23d** e **23l–m**) como agentes tripanocidas com potência similar ao benznidazol e com baixa toxicidade para macrófagos. Os compostos (**23l–m**) possuem em comum uma fenila em N3, sugerindo que a presença desse substituinte é importante para atividade anti-*T. cruzi*. Da mesma maneira nós observamos que os tiazóis contendo uma fenila na posição C4 também apresentaram propriedades tripanocidas *in vitro* tao potentes quanto o benznidazol tais como (**24a**, **24f**, **24q** e **24t**). Quando testados em macrófagos infectados, os compostos (**23l–m**) foram capazes de erradicar amastigotas intracelulares, enquanto que o benznidazol não curou a infecção. De uma maneira geral, demostramos que as tiazolinonas possuem atividade tripanocida superior a das tiossemicarbazonas (**Int-1-3**), sendo mais seletivas em relação a toxicidade para macrófagos, demonstrando assim que esses compostos são protótipos a fármacos anti-*T. cruzi*.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Doença de Chagas. Desenho de drogas. Fármacos. *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease is a parasitic infection caused by protozoan *T. cruzi*, which affects around 8 to 10 million people worldwide. Benznidazole is the sole drug approved for treatment during the acute and asymptomatic chronic phases, however it has not efficacy during the symptomatic chronic phase. Therefore, the development of new medicines is needed. To identify new trypanocidal compounds, we performed a structural planning and synthesis of new aryl-4-thiazolidines (**23a-o**) and their structurally-related analogs such as the aryl-1,3-thiazoles (**24a-v**). Aryl-4-thiazolidines (**23a-o**) were designed with the aim to identify less cytotoxic and more potent trypanocidal agents than the thiosemicarbazones (**Int1-3**). We also looked for understand most the structure-anti-*T. cruzi* activity relationships for this class of thiazolidines, thus several substituents were attached to the N3 and C5 position of the heterocyclic ring. Yet the aryl-1,3-thiazoles (**24a-v**) were chemically designed to compare the trypanocidal activity between thiazolidines and thiazoles. The trypanocidal activity was determined for Y strain trypomastigotes, while the toxicity was measured for J774 macrophages. After the screening for compounds (**23a-o**) and (**24a-v**), it was possible to identify the compounds (**23d** and **23l-m**) as trypanocidal agents as potent as benznidazole but with the advantage of these displayed low toxicity for macrophages. Compounds (**23l-m**) have as common structural feature a phenyl group attached at N3, suggesting this group is important for warrant anti-*T. cruzi* activity. Likewise, we observed that thiazolic compounds containing a phenyl group at C4 also presented trypanocidal properties as potent as benznidazole, such as compounds (**24a**, **24f**, **24q** and **24t**). When tested in infected macrophages, compounds (**23l-m**) were able to eradicate the intracellular amastigotes, while benznidazole did not. Overall, we have shown here that thiazolidones are endowed with trypanocidal activity greater than thiosemicarbazones (**Int1-3**), besides of being more selective in regard to toxicity in macrophages, therefore suggesting these thiazolidines are potential anti-*T. cruzi* drug prototypes.

Keywords: Citotoxicidad. Chagas disease. Drug design. Drug. *Trypanosoma cruzi*.

Lista de Esquemas

Esquema 1: Obtenção das tiossemicarbazonas Int-1-3	59
Esquema 2: Obtenção dos acetatos α -halogenados.....	59
Esquema 3: Método de preparação de 1,3-tiazóis, segundo protocolo de Hantzsch.....	65
Esquema 4: Esquema de síntese dos 1,3-tiazóis 24a-c	65
Esquema 5: Esquema de síntese dos 1,3-tiazóis (24d-v).....	66
Esquema 6: Esquema de síntese dos 1,3-tiazóis 24e e 24g	67

Lista de Figuras

Figura 1: Doenças negligenciadas no mundo; Sobreposição das doenças [1]...	19
Figura 2: Estrutura química do benznidazol.....	20
Figura 3: Representação do desequilíbrio entre pesquisa e desenvolvimento de drogas [10].....	20
Figura 4: Aril-4-tiazolinonas.....	22
Figura 5: Estrutura do composto 3h.....	22
Figura 6: Carlos Chagas [3].....	26
Figura 7: <i>Trypanosoma cruzi</i> [39].....	27
Figura 8: Estimativa da população global afetada pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> , 2009.....	28
Figura 9: Estimativa do número de imigrantes infectados pelo <i>T. cruzi</i> vivendo em países não endêmicos [39].....	31
Figura 10: Desenvolvimento clínico da doença de chagas no paciente.....	32
Figura 11: Sinal de Romaña [3].....	33
Figura 12: Anatomia de um coração Chagásico e megacólon [52].....	34
Figura 13: (A) Forma cardíaca segmentar. (B) Forma global cardíaca dilatada. LV = Ventrículo esquerdo. RV = Ventrículo direito. LA = átrio esquerdo. RA = átrio direito. Reproduzida a partir de Rassi e colegas [46]; direitos autorais Editora Roca 2009.....	36
Figura 14: <i>Rhodnius prolixus</i> e <i>Triatoma infestans</i> , principais vetores da doença de Chagas [52].....	37
Figura 15: Ciclo Biológico do <i>T. cruzi</i>	40
Figura 16: Radanil (benznidazol). Embalagem comercial e estrutura tridimensional química.....	42
Figura 17: Estrutura cristalográfica da cruzaina de <i>T. cruzi</i> (PDB ID 1ME4). Inibidores da enzima alvo de diferentes classes químicas [85].....	48
Figura 18: Estrutura química do composto líder 17.....	50
Figura 19: Estrutura química do composto 6.....	50
Figura 20: Representativas tiossemicarbazonas que são inibidoras da cruzaina.....	52
Figura 21: Tiossemicarbazona (centro) e seu bioisómero clássico pirazolina	

(20), e seu bioisómero não clássico 4-tiazolinona (22).....	52
Figura 22: Estrutura de alguns dos principais protótipos a fármacos antichagásicos baseados em 4-tiazolinonas.....	53
Figura 23: Estrutura química do núcleo tiazol.....	54
Figura 24: Emprego do bioisosterismo para o planejamento das aril-4-tiazolinonas e dos aril-1,3-tiazóis (44).....	56
Figura 25: Rota sintética para obtenção das aril-4-tiazolinonas (23a–o) e aril-1,3-tiazóis (24a–v).....	57
Figura 26: Estrutura das tiossemicarbazidas substituídas, obtidas de fontes comerciais.....	58
Figura 27: Exemplo de espectro de IV da série 23 (composto 23e).....	61
Figura 28: Exemplo de espectro de RMN de ^1H da série 23 (composto 23e)...	62
Figura 29: Exemplo de espectro de RMN de ^{13}C da série 23 (composto 23e).	63
Figura 30: Dados espectroscópicos das aril-4-tiazolinonas (23e). Deslocamento químico em ppm.....	63
Figura 31: Posição da ligação C=N no carbono C2 do composto (23e).....	64
Figura 32: Exemplo de espectro de IV, série 24a-v (composto 24s).....	67
Figura 33: Exemplo de espectro de hidrogênio da série 24a-v (composto 24s).....	68
Figura 34: Exemplo de espectro de RMN de ^{13}C da série 24a-v (composto 24s).....	69
Figura 35: Posição da ligação C=N no carbono C2 do composto (24s).....	70
Figura 36: Comparação estrutural e das propriedades farmacológicas, entre a tiossemicarbazona (Int-1) e a 4-tiazolinona (23n) mais potentes.....	75
Figura 37: Estruturas e propriedades farmacológicas dos compostos líderes (23l-m).....	76
Figura 38: Comparação estrutural e das propriedades farmacológicas dos bioisómeros, tiossemicarbazona (Int-1), tiazolinona (23n) e tiazol (24f).....	80
Figura 39: Comparação das atividades biológicas do composto 24f com o observado na literatura.....	81
Figura 40: Inibição da enzima cruzaina do <i>T. cruzi</i> série 23a-o. Percentual de inibição ($\pm$ desvio padrão) calculado após 5 minutos de incubação com a enzima. Inativo significa que o composto não inibiu a enzima na concentração de 10 μM	84

Figura 41: Inibição da enzima cruzaina do *T. cruzi* série **23a-o**. Percentual de inibição ($\pm$ desvio padrão) calculado após 5 minutos de incubação com a enzima. Inativo significa que o composto não inibiu a enzima na concentração de 10 μ M..... 85

Figura 42: Inibição da enzima cruzaina do *T. cruzi* série **24a-v**. Percentual de inibição ($\pm$ desvio padrão) calculado após 5 minutos de incubação com a enzima. Inativo significa que o composto não inibiu a enzima na concentração de 10 μ M..... 86

Lista de Tabelas

Tabela 1: Prevalência da infecção pelo <i>T. cruzi</i> nos países da América Latina em 1980-85 e 2005, e efeitos das iniciativas para o controle ou eliminação da doença de Chagas [39].....	29
Tabela 2: Síntese das aril-4-tiazolinonas (23a-o) e descrição dos substituintes, rendimento (%) e propriedades físicas.....	60
Tabela 3: Avaliação farmacológica <i>in vitro</i> das propriedades tripanocidas e toxicidade em macrófagos, para as aril-tiossemicarbazonas (Int-1-3) e aril-4tiazolinonas (23a-o).....	73
Tabela 4: Avaliação farmacológica, <i>in vitro</i> , das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para os aril-1,3-tiazóis (24a-c).....	77
Tabela 5: Avaliação farmacológica, <i>in vitro</i> , das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para os aril-1,3-tiazóis (24d-t).....	78

Lista de Abreviaturas

))) - irradiação no ultrassom

AIDS - síndrome da imunodeficiência humana.

Ar - aromático

AVC - acidente vascular cerebral

Bdz (1) - benznidazol

CCD - cromatografia de camada delgada

CPqGM - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Salvador, Brasil).

d - dubleto

DALY - “disability-adjusted life year”

dd - duplo dupleto

dec - decomposição

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico.

DNDI - “Drugs for Neglected Diseases Initiative”

ECG - eletrocardiograma

ELISA - “Enzyme-linked immunosorbent assay”

EMAR - espectro de massas de alta resolução

ESI - técnica de ionização por electrospray

FDA - “Food and Drug Administration”

FIOCRUZ - Fundação Osvaldo Cruz

GPI - glicosilfosfatidilinositol

HIV - vírus da imunodeficiência humana.

Hz - Hertz

CI₅₀ - concentração inibitória para 50% da população

IgG - imunoglobulina G

IS - índice de seletividade

IV - Infravermelho

LAFEPE - Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

m - multipleto.

MAO - monoaminoxidase

MASPs - proteínas de superfície associadas à mucina

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Fundo Estratégico da Organização Pan-Americana de Saúde

P&D - Pesquisa & Desenvolvimento

PCR - reação em cadeia da polimerase

PF - ponto de fusão

Ph - fenil

ppm - partes por milhão

q - quarteto

REA - relações estruturas-atividades

Rend. - rendimento reacional

R_f - fator de retenção

RMN ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN ¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RPMI - "Roswell Park Memorial Institute"

s - singleto

SBF - soro bovino fetal

SNC - sistema nervoso central

t - tripleto

T. - *Trypanosoma*

ta - temperatura ambiente

TOF - detecção no modo "time-of-flight"

TS - *trans*-sialidase

TZHs - Tiazolilhidrazonas

WIPO - "World Intellectual Property Organization"

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
2. Objetivos.....	23
3. Revisão da Literatura.....	25
3.1 Doença de Chagas.....	25
3.1.1 Histórico e Características.....	25
3.1.2 Epidemiologia.....	28
3.1.3 Sinais e Sintomas.....	31
3.1.3.1 Fases, Formas e Evolução Clínica.....	31
3.1.3.2 Fase Aguda.....	33
3.1.3.3 Fase Crônica.....	34
3.1.4 Transmissão do <i>T. cruzi</i>.....	37
3.1.4.1 Transmissão pelo Vetor.....	37
3.1.4.2 Outras Formas de Transmissão.....	38
3.1.5 Ciclo de Vida do <i>T. cruzi</i>.....	39
3.1.6 Diagnóstico.....	40
3.1.6.1 Diagnóstico na Fase Aguda.....	41
3.1.6.2 Diagnóstico na Fase Crônica.....	42
3.1.7 Tratamento Clínico.....	42
3.1.7.1 Complicações.....	44
3.1.8 Desenvolvimento de Novas Drogas.....	44
3.1.9 Alvos Terapêuticos.....	46
3.1.10 Cisteína Protease.....	47
3.1.11 Núcleos de Interesse.....	49
3.1.12 Tiossemicarbazonas e 4-tiazolinonas.....	51
3.1.13 1,3-tiazóis.....	53
4. Resultados e Discussão.....	55
4.1 Planejamento Estrutural.....	56
4.2 Síntese dos Compostos.....	58
4.2.1 Síntese das aril-4-tiazolinonas (23a-o).....	58
4.2.2 Síntese dos aril-1,3-tiazóis (24a-v).....	65
4.3 Avaliação farmacológica.....	71

4.3.1 Avaliação farmacológica das aril-4-tiazolinonas (23a–o).....	72
4.3.1.1 Avaliação <i>in vitro</i> das propriedades tripanocidas.....	72
4.3.2 Avaliação farmacológica dos aril-1,3-tiazóis (24a–v).....	77
4.3.3 Triagem dos compostos em ensaios, <i>in vitro</i> , de infecção pelo <i>T. cruzi</i>	82
4.3.4 Inibição da Atividade Catalítica da Cruzaína.....	84
5. Parte Experimental.....	89
5.1 Generalidades.....	90
5.2 Metodologias Sintéticas e Dados Espectroscópicos.....	91
5.2.1 1-(3,4-diclorofenil)-etilideno-tiossemicarbazida (Int-1; GT-01)...	91
5.2.2 1-(3,4-diclorofenil)etilideno-4-metiltiossemicarbazida (Int-2; GT-03).....	92
5.2.3 1-(3,4-diclorofenil)-etilideno-4-feniltiossemicarbazida (Int-3; GT-02).....	93
5.2.4 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]tiazolidina-4-ona (23a; GT-04).....	94
5.2.5 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-metiltiazolidina-4-ona (23b; GT-04B).....	95
5.2.6 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-etiltiazolidin-4-ona (23c; GT-04A).....	96
5.2.7 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-isopropiltiazolidin-4-ona (23d; GT-04C).....	97
5.2.8 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-feniltiazolidin-4-ona (23e; GT-04D).....	98
5.2.9 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-metiltiazolidin-4-ona (23f; GT-06).....	99
5.2.10 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3,5-dimetiltiazolidin-4-ona (23g; GT-06B).....	100
5.2.11 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-etil-3-metiltiazolidin-4-ona (23h; GT-06A).....	101
5.2.12 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-isopropil-3-metiltiazolidin-4-ona (23i; GT-06C).....	102
5.2.13 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-metil-5-feniltiazolidin-4-ona (23j; GT-06D).....	103

5.2.14	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-feniltiazolidin-4-ona (23k; GT-05).....	104
5.2.15	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-metil-3-feniltiazolidin-4-ona (23l; GT-05B).....	105
5.2.16	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-etil-3-feniltiazolidin-4-ona (23m; GT-05A).....	106
5.2.17	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-isopropil-3-feniltiazolidin-4-ona (23n; GT-05C).....	107
5.2.18	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3,5-difeniltiazolidin-4-ona (23o; GT-05D).....	108
5.2.19	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-metil-1,3-tiazol (24a; GT-07).....	109
5.2.20	4-(clorometil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24b; GT-20).....	110
5.2.21	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4,5-dimetil-1,3-tiazol (24c; GT-21).....	111
5.2.22	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-fenil-1,3-tiazol (24d; GT-12).....	112
5.2.23	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-metil-4-fenil-1,3-tiazol (24e; GT-28).....	113
5.2.24	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-5-metil-4-fenil-1,3-tiazol (24f; GT-16).....	114
5.2.25	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3,4-difenil-1,3-tiazol (24g; GT-27).....	115
5.2.26	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(piridin-2-il)-1,3-tiazol (24h; GT-24).....	116
5.2.27	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(piridin-4-il)-1,3-tiazol (24i; GT-23).....	117
5.2.28	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-p-toluil-1,3-tiazol (24j; GT-25).....	118
5.2.29	2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(4-fluorofenil)-1,3-tiazol (24k; GT-19).....	119
5.2.30	4-(4-clorofenil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24l; GT-10).....	120

5.2.31 4-(2,4-diclorofenil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24m; GT-11).....	121
5.2.32 4-(3,4-diclorofenil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24n; GT-08).....	122
5.2.33 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(2,3,4-triclorofenil)-1,3-tiazol (24o; GT-22).....	123
5.2.34 4-(4-bromofenil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24p; GT-09).....	124
5.2.35 4-(4-bromofenil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-5-metil-1,3-tiazol (24q; GT-17).....	125
5.2.36 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol (24r; GT-13).....	126
5.2.37 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(3-nitrofenil)-1,3-tiazol (24s; GT-15).....	127
5.2.38 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(4-metoxifenil)-1,3-tiazol (24t; GT-14).....	128
5.2.39 4-(bifenil-4-il)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24u; GT-26).....	129
5.2.40 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(naftalen-2-il)-1,3-tiazol (24v; GT-18).....	130
5.3 Protocolos da Avaliação Farmacológica.....	131
5.3.1 Animais.....	131
5.3.2 Células, Enzimas e Inibidores Químicos.....	131
5.3.3 Inibição da Enzima Cruzaína.....	132
5.3.4 Toxicidade para Macrófagos j774.....	132
5.3.5 Toxicidade para a Forma Tripomastigota.....	133
5.3.6 Infecção de Tripomastigotas em Macrófagos.....	133
5.3.7 Análise Estatística.....	134
6. Conclusões.....	135
Referências.....	138

1. Introdução

1. Introdução

De acordo com a Organização mundial de Saúde (OMS), estima-se que as doenças causadas por parasitas afetam um quarto do mundo, sendo responsável por considerável morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento (**Figura 1**). Entre estas doenças incluem-se malária, leishmaniose, tripanossomíase, giardíase e tricomoníase ^[1]. Diariamente, mais de 35 mil pessoas morrem de doenças infecciosas e negligenciadas, como leishmaniose, esquistossomose, doença de Chagas, filariose e doença do sono ^[2].

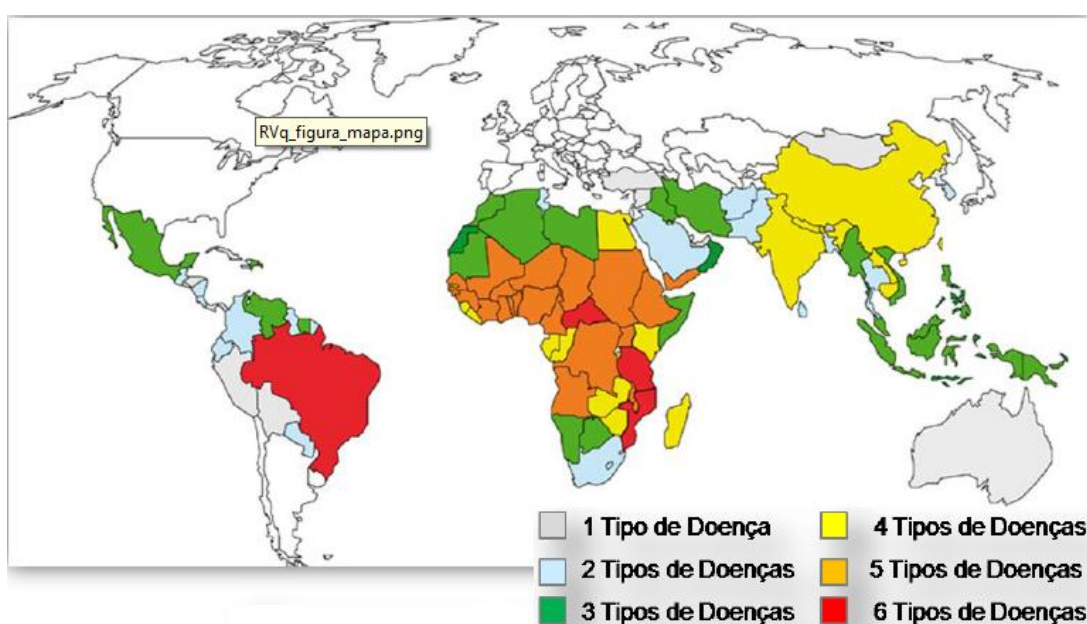


Figura 1: Doenças negligenciadas no mundo; Sobreposição das doenças ^[1].

A doença de Chagas, também chamada tripanossomíase americana, é uma doença potencialmente fatal, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É transmitida aos seres humanos, principalmente através das fezes de insetos triatomíneos conhecidos como barbeiros ^[3].

Ao nível mundial, cerca de dez milhões de pessoas estão infectadas, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas é endêmica. Mais de 25 milhões de pessoas estão em risco de adquirir a doença. Estima-se que em 2008 a doença matou mais de 10.000 pessoas ^[1,3].

A quimioterapia específica atual restringe-se a apenas um fármaco nitro-heterociclo: o benznidazol (**1**) - descoberto no ano de 1970 - associado com longo tempo de tratamento que dá origem a efeitos colaterais graves (**Figura 2**) ^[4].

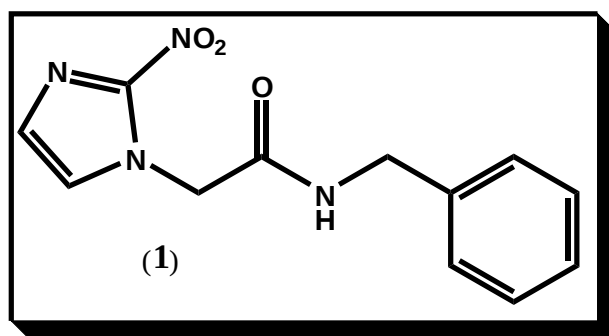


Figura 2: Estrutura química do benznidazol.

De fato, embora o benznidazol seja capaz de eliminar a parasitemia em pacientes com infecções na fase aguda e na fase crônica inicial ^[5,6], esse composto demonstra uma eficácia significativamente mais baixa ou mesmo ineficácia em infecções na fase crônica avançada. Somado a isso estão os efeitos secundários deste fármaco que resultam em danos oxidativos nos tecidos do hospedeiro e levam a descontinuação e não adesão do tratamento pelos pacientes ^[7,8]. Por isso, existe uma necessidade urgente do desenvolvimento de novas drogas mais seguras e efetivas para o tratamento da doença de Chagas ^[9].

Muito pouco investimento é dedicado a pesquisar e desenvolver medicamentos para tratar doenças negligenciadas, as quais afetam em sua maioria populações pobres. A falta de interesse de empresas farmacêuticas em desenvolvimento de novos medicamentos para certas doenças, entre elas o mal de Chagas está diretamente ligada ao baixo poder aquisitivo dessas populações (Figura 3) ^[10].

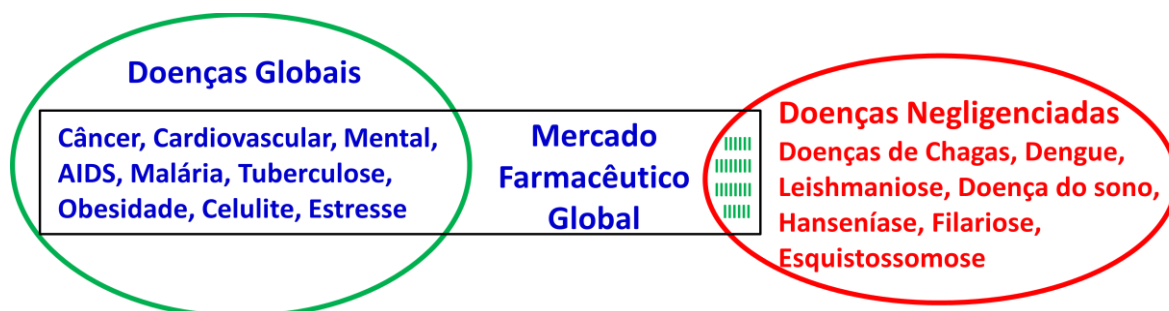


Figura 3: Representação do desequilíbrio entre pesquisa e desenvolvimento de drogas [10].

De acordo com um estudo realizado pela Organização Não-Governamental de âmbito internacional, chamado Médicos Sem Fronteiras, o poder de compra é o principal fator na definição de prioridades de pesquisa, o que significa que as

necessidades de saúde da população pobre não vêm sendo atendidas. O maior poder aquisitivo, explica o alto investimento nos produtos farmacêuticos que são um segmento de mercado altamente lucrativo nos países desenvolvidos, por exemplo, remédios para celulite, alopecia, estresse, distúrbios do sono e obesidade ^[10].

O crescente conhecimento da biologia básica de *T. cruzi*, permite o desenvolvimento de novas abordagens racionalmente desenvolvidas para uma quimioterapia específica. Cisteinil proteases são comuns na natureza ^[11]. Regulam vários processos vitais de inúmeros parasitas, o que as torna alvos altamente atrativos para desenho de drogas ^[12]. A catepsina L-cisteína protease, também conhecida como cruzipaína ou cruzaína, é a principal cisteinil protease do parasita *Trypanosoma cruzi*. Ela é expressa em todas as fases do ciclo de vida do parasita e desempenha um papel fundamental durante a infecção de células hospedeiras, replicação e de metabolismo ^[13]. Por esse motivo é considerada um alvo importante para o desenvolvimento de novos agentes anti-trypanosoma cruzi ^[14].

Tiossemicarbazonas e seus bioisósteros cíclicos (4-tiazolinonas e 1,3-tiazóis) tem apresentado atividade contra *T. cruzi* e cruzaína ^[9, 15-20]. Por essa razão, muitas tentativas têm sido feitas para explorar as relações estrutura-atividade (SAR), com intuito de conceber compostos menos tóxicos e com efeito tripanocida melhorado ^[20-26].

Ao longo dos anos, nosso grupo descreveu a síntese e atividade anti-*T. cruzi* de várias aril-4-tiazolinonas ^[9, 21, 22, 27]. Nas primeiras tentativas, as aril-4-tiazolinonas mostraram apenas atividade moderada contra ambas as formas epimastigota e tripomastigota do parasita ^[21]. Entretanto, trabalhos posteriores despertaram grande interesse no núcleo 4-tiazolinona (**Figura 4**), pois comprovaram boa atividade apresentada frente ao *T. cruzi* e a cruzaína ^[9, 22, 27].

Tiazolilhidrazonas (TZHs) têm despertado o interesse dos químicos medicinais por causa de suas atividades biológicas. Elas têm se destacado com passar dos anos devido as suas ações: antibacteriana ^[28, 29, 31], antifúngica ^[30], anti-inflamatória ^[29] e como inibidores seletivos das isoformas A e B da monoaminoxidase (MAO) ^[32-34]. Recentemente, Caputto e colaboradores desenvolveram uma série de compostos com função de tiazolilhidrazonas na sua estrutura, os quais apresentaram excelente atividade *in vitro* contra cepas de epimastigota, tripomastigota e amastigota do *T. cruzi* ^[15, 16].

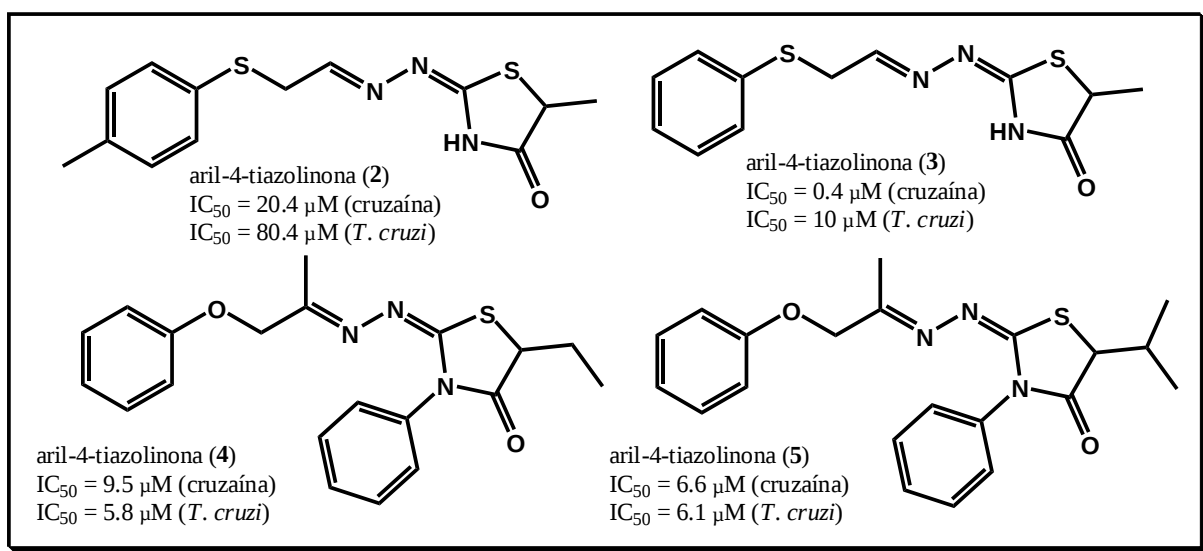


Figura 4: Aril-4-tiazolinonas.

Em 2002, Du e colaboradores ^[17] descreveram alguns derivados tiossemicarbazônicos com potente atividade antichagásica *in vitro*, dos quais destaca-se o composto **6** (3',4'-dicloroacetofenona-tiossemicarbazona) (**Figura 5**).

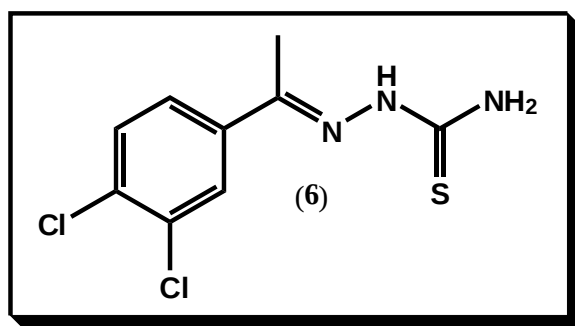


Figura 5: Estrutura do composto (6).

Face aos resultados apresentados, este composto foi escolhido como protótipo estrutural para o desenvolvimento de uma nova série de compostos candidatos a fármacos mais seguros e efetivos para o tratamento da doença de Chagas. Por outro lado, em função da semelhança estrutural e funcional entre tiossemicarbazonas e 4-tiazolidinonas, este trabalho descreve o planejamento estrutural, a síntese, a avaliação farmacológica e as REAs de inéditas 4-tiazolinonas e análogos estruturais.

2. Objetivos

2. Objetivos

Diante da necessidade de identificar novos fármacos úteis para o tratamento da doença de Chagas, os objetivos deste trabalho englobam o planejamento estrutural e a síntese de inéditas 4-tiazolinonas e 1,3-tiazóis, bem como a avaliação farmacológica das propriedades tripanocidas e o estudo das relações estrutura-atividade. De maneira mais específica tem-se:

- O planejamento estrutural e a síntese de 15 4-tiazolinonas (**23a-o**) inéditas;
- O planejamento estrutural e a síntese de uma série de 22 1,3-tiazóis (**24a-v**) inéditos;
- A avaliação da atividade tripanocida em tripomastigotas e a determinação da citotoxicidade em macrófagos;
- Avaliação da eficácia dos compostos em reduzir a parasitemia em modelos de infecção *in vitro* (macrófagos);
- A determinação da afinidade destes compostos frente a enzima cruzaina do *T. cruzi*;
- Realização de estudo comparativo das atividades tripanocidas e das relações estrutura-atividade entre as classes de moléculas estudadas.

3. Revisão da Literatura

3. Revisão da Literatura

3.1 Doença de Chagas

3.1.1 Histórico e Características

Tripanossomíase americana é uma grave doença, que leva de 20 a 40% das pessoas infectadas à forma crônica cardíaca progressiva da doença. Conhecida como doença de Chagas, tendo sido nomeada desta maneira por causa do médico brasileiro Carlos Chagas (**Figura 6**), que foi quem primeiro a descreveu em 1909. O trabalho de Chagas é único na história da medicina, porque ele foi o único pesquisador até agora a descrever completamente uma nova doença infecciosa: seu patógeno, o vetor, o hospedeiro, as manifestações clínicas e epidemiologia ^[35].



Figura 6: Carlos Chagas [3].

Resultados de estudos de paleoparasitologia recuperou DNA do *T. cruzi* em múmias de humanos, esses relatos demonstram que a doença de Chagas afligiu o homem tão cedo quanto 9000 anos atrás ^[36]. Notavelmente, o primeiro caso da doença de Chagas pode ter precedido a descoberta de Carlos Chagas - Charles Darwin, muito possivelmente contraiu *T. cruzi* durante a sua expedição à América do Sul em 1835, como sugerido por sua expressiva descrição de contato com o barbeiro (triatomíneo), e por alguns de seus sintomas na vida adulta ^[37].

O mal de Chagas é uma doença tropical parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (**Figura 7**). O *T. cruzi* é geralmente transmitido aos seres humanos e outros mamíferos por um inseto vetor, os insetos hematófagos da subfamília *Triatominae* (família *Reduviidae*), espécies mais comuns pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* ^[35]. A doença também pode ser transmitida através da transfusão de sangue ou transplante de órgãos, de uma mãe para o seu feto, e há relatos que também pela ingestão de alimentos contaminados por parasitas ^[38].



Figura 7: *Trypanosoma cruzi* [39].

Os sintomas da doença de Chagas variam durante o curso da infecção. No estágio inicial, conhecido como fase aguda, os sintomas são suaves e produzem geralmente não mais do que um inchaço local, no sítio da infecção. A fase aguda é sensível aos tratamentos com antiparasitários, com as taxas de cura de 60 a 90%. Depois de 4 a 8 semanas, os indivíduos com infecções ativas entram na fase crônica da doença de Chagas, que é assintomática para 60 a 80% dos indivíduos durante quase toda vida ^[39].

O único fármaco atualmente disponível para o tratamento da doença de Chagas é o antiparasitário benznidazol (**Figura 2**, pág. 20), o qual é eficaz apenas na fase aguda da doença e está associado a um longo período de tratamento, que pode causar efeitos colaterais graves em muitos pacientes, incluindo doenças de pele, toxicidade cerebral, e irritação do sistema digestivo ^[40].

A doença de Chagas é contraída principalmente nas Américas, particularmente em áreas pobres e rurais do México, América Central, América do Sul e, muito raramente, a doença tem origem no sul dos Estados Unidos. Os insetos que transmitem a doença são conhecidos por vários nomes nos diferentes locais, incluindo “vinchuca” na Argentina, Bolívia, Chile e Paraguai, “barbeiro” no Brasil,

“pito” na Colômbia, “chinche” na América Central, “chipo” na Venezuela, e ainda “chupança”, “chinchorro”, e “besouro do beijo” [39].

Estima-se que aproximadamente 8 a 10 milhões de pessoas distribuídas entre México, América Central e América do Sul tenham a doença de Chagas, a maioria dessas não sabem que estão infectadas. Movimentos da população em grande escala de áreas rurais para áreas urbanas da América Latina e de outras regiões do mundo aumentaram a distribuição geográfica da doença de Chagas (**Figura 8**), e por isso foram identificados casos em muitos países, particularmente na Europa [39].

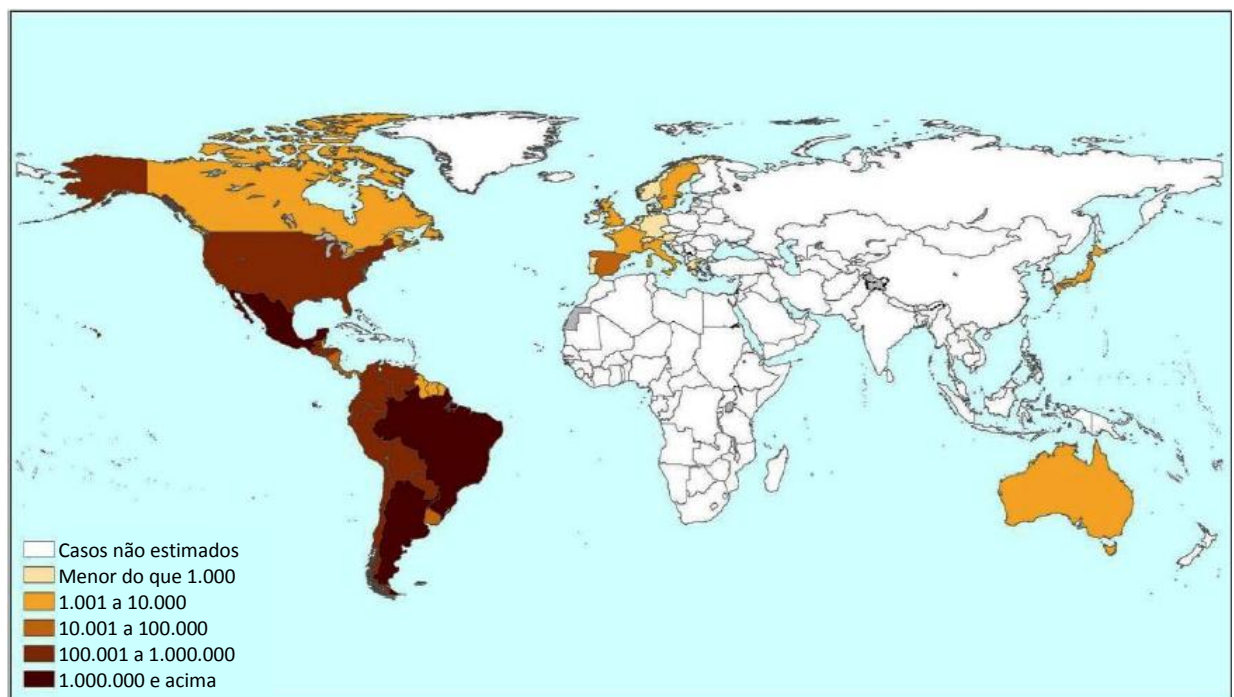


Figura 8: Estimativa da população global afetada pelo *Trypanosoma cruzi*, 2009 [39].

3.1.2 Epidemiologia

A doença de Chagas foi originalmente limitada a áreas pobres e rurais da América Central e do Sul, em que a transmissão para o homem ocorre através de insetos vetores. Nos últimos 30 anos, o aumento dos programas de controle do vetor (como a Iniciativa do Cone Sul, a Iniciativa Pacto Andino e a Iniciativa América Central, todos com objetivo de controlar / eliminar a doença de Chagas) e a triagem obrigatória nos bancos de sangue reduziram substancialmente novos casos de infecção e diminuíram a carga da doença de Chagas na América Latina [41].

Em pesquisas feitas em vários países na década de oitenta, 100 milhões de pessoas (ou seja, 25% de todos os habitantes da América Latina) foram estimados em risco de infecção, e 17,4 milhões foram infectados em 18 países endêmicos em 1980-1985 (**Tabela 1**) ^[1]. De acordo com estimativas da Organização Pan Americana de Saúde ^[42], 20% da população da América Latina estava em risco (109 milhões de indivíduos) e cerca de 7,7 milhões pessoas foram infectadas em 2005 (**Tabela 1**) ^[42].

Tabela 1: Prevalência da infecção pelo *T. cruzi* nos países da América Latina em 1980-85 e 2005, e efeitos das iniciativas para o controle ou eliminação da doença de Chagas [39].

	1980-85		2005	
	Indivíduos infectados	Indivíduos em risco de infecção	Indivíduos infectados	Indivíduos em risco de infecção
Iniciativa do Cone Sul (lançada em 1991)				
Argentina	2.640.000 (10,0%)	23%	1.600.000 (4,1%)	19%
Bolívia	1.300.000 (24,0%)	32%	620.000 (6,8%)	35%
Brasil	6.180.000 (4,2%)	32%	1.900.000 (1,0%)	12%
Chile	1.460.000 (16,9%)	63%	160.200 (1,0%)	5%
Paraguai	397.000 (21,4%)	31%	150.000 (2,5%)	58%
Uruguai	37.000 (3,4%)	33%	21.700 (0,7%)	19%
Iniciativa Pacto Andino (lançada em 1997)				
Colômbia	900.000 (30,0%)	11%	436.000 (1,0%)	11%
Equador	30.000 (10,7%)*	41%	230.000 (1,7%)	47%
Peru	621.000 (9,8%)	39%	192.000 (0,7%)	12%
Venezuela	1.200.000 (3,0%)	72%	310.000 (1,2%)	18%
Iniciativa América Central (lançada em 1997)				
Belize	-	-	2.000 (0,7%)	50%
Costa Rica	130.000 (11,7%)	45%	23.000 (0,5%)	23%
El Salvador	9.000.000 (20,0%)	45%	232.000 (3,4%)	39%
Guatemala	1.100.000 (16,6%)	54%	250.000 (2,0%)	17%
Honduras	300.000 (15,2%)	47%	220.000 (3,1%)	49%
Nicarágua	-	-	58.000 (1,1%)	25%
Panamá	2.000.000 (17,7%)	47%	21.000 (0,01%)	31%
México	-	-	1.100.000 (1,0%)	28%
Total	17.395.000 (4,3%)	33%	7.694.500 (1,4%)†	20%

- dados não avaliados. * Prevalência de indivíduos infectados foi subestimada. † Inclui aproximadamente 150.000 indivíduos infectados que vivem nos EUA e 18.000 nas Guianas, mas os dados para estas regiões não são mostrados na Tabela.

Atualmente, o mal de Chagas afeta de 8 a 10 milhões de pessoas que vivem em países endêmicos da América Latina, com um adicional de 300 a 400 mil vivendo em países não endêmicos, tais como Espanha e Estados Unidos. Estima-se que 41.200 novos casos ocorrem anualmente nos países endêmicos, e que 14.400 crianças nascem com doença de Chagas congênita por ano. Cerca de 13.000 mortes são atribuídas à doença de Chagas a cada ano ^[39].

A fase crônica da doença de Chagas continua a ser um dos principais problemas de saúde em muitos países latino-americanos, apesar das medidas preventivas tomadas, como a eliminação dos insetos transmissores em alguns países. No entanto, vários marcos históricos foram alcançados na luta contra a doença de Chagas, incluindo uma redução de 72% na incidência de infecção em humanos (crianças e adultos-jovens) nos países da Iniciativa do Cone Sul, e pelo menos três países (Uruguai, em 1997, no Chile, em 1999, e o Brasil em 2006) foram certificados como livres da transmissão pelo inseto vetor e por transfusão ^[1, 38].

Na Argentina a transmissão vetorial foi interrompida em 13 das 19 províncias endêmicas ^[1]. Grandes progressos nesse sentido também foram feitos tanto no Paraguai como na Bolívia. Em todos os países endêmicos é obrigatória a análise para *T. cruzi* dos órgãos, sangue, células e tecidos doados ^[43].

No entanto, o recente influxo de imigrantes de países endêmicos está fazendo com que a doença de Chagas se torne um importante problema de saúde nos EUA, no Canadá, em muitas partes da Europa e no Pacífico ocidental, onde um crescente número de pessoas infectadas foram identificadas (**Figura 9**) ^[44]. O destino mais comum para os imigrantes da América Latina são os EUA, onde cerca de 300.167 pessoas (principalmente do México) estão infectadas com o *T. cruzi* ^[44].

Como os movimentos da população aumentaram, a possibilidade de transmissão por transfusão sanguínea tornou-se a causa mais importante de infecção nos Estados Unidos. Em razão disso, a transfusão de sangue e os enxertos de tecidos estão agora ativamente monitorados nos EUA, buscando desta forma minimizar este risco ^[44].

A Espanha tem o segundo maior número de imigrantes infectados, estima-se que de 47.738 a 67.423 pessoas estejam infectadas, com a maioria proveniente de Equador, Argentina, Bolívia e Peru ^[44].

As manifestações da fase aguda da doença resolvem-se espontaneamente em cerca de 90% dos indivíduos infectados, mesmo se a infecção não for tratada com drogas tripanocidas. Cerca de 60 a 70% desses pacientes nunca irão desenvolver a doença clínica evidente. Esses pacientes têm a forma indeterminada da doença crônica, que se caracteriza pela positividade para anticorpos contra o *T. cruzi* no soro, um eletrocardiograma (ECG) normal, e exame radiológico normal do tórax, esôfago e cólon. O restante, 30 a 40% das pessoas infectadas irão desenvolver subsequentemente a doença crônica na sua forma determinada – ou seja, cardíaca, digestiva (megaesôfago e megacólon), ou cardiodigestiva – isso ocorre geralmente de 10 a 30 anos após a infecção inicial (**Figura 10**) ^[46].

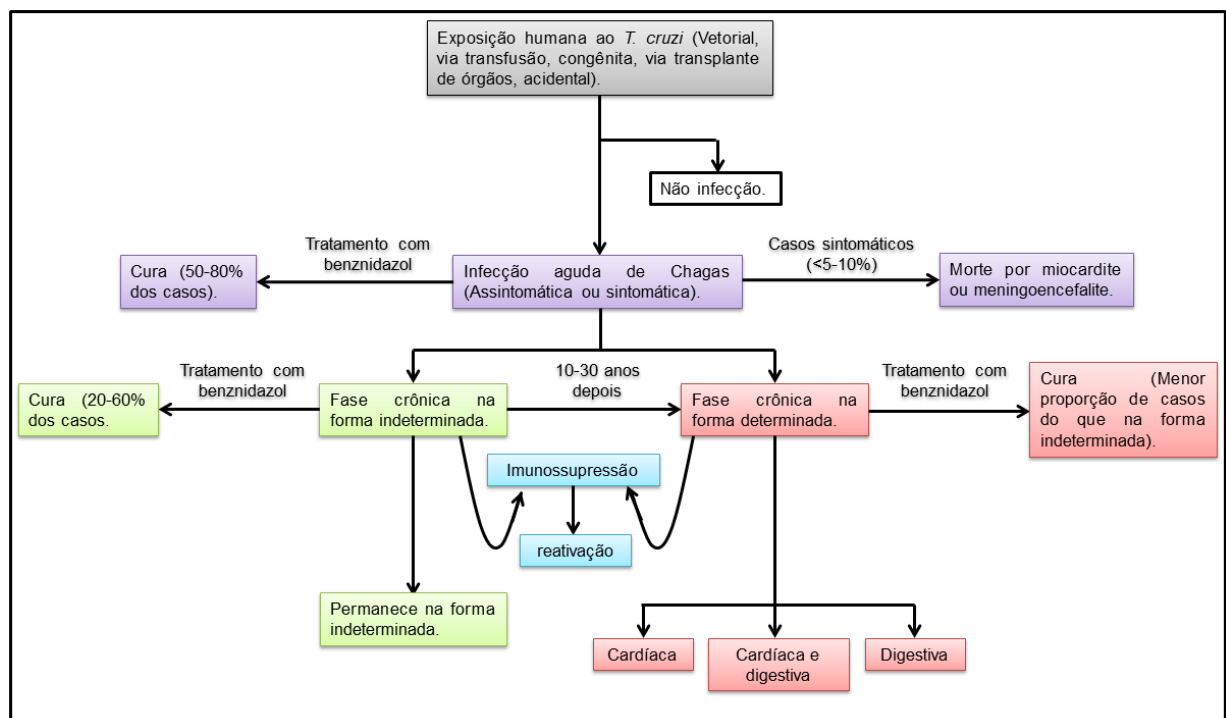


Figura 10: Desenvolvimento clínico da doença de Chagas no paciente.

Uma evolução direta da fase aguda para uma forma clínica da doença de Chagas tem sido relatada em alguns pacientes (5 a 10%). A reativação da doença também pode ocorrer em pacientes com infecção crônica, depois que esses se tornam imunologicamente comprometidos, tais como pessoas que estão co-infectadas com HIV ou que estão recebendo drogas imunossupressoras ^[45].

3.1.3.2 Fase Aguda

Na maioria dos indivíduos, independentemente do mecanismo de transmissão, a fase aguda ocorre geralmente despercebida, pois é livre de sintomas ou apresenta apenas sintomas leves que não são únicos para a doença de Chagas; isso ocorre provavelmente porque a carga parasitária é relativamente pequena. Entre estes sintomas estão: fadiga, febre, dores no corpo, dor de cabeça, erupção cutânea, perda de apetite, diarreia e vômitos. Os sinais detectados no exame físico podem incluir discreto aumento do fígado, baço e nódulos linfáticos, edema subcutâneo (localizado ou generalizado), e, no caso particular de transmissão vetorial, os sinais de entrada do *T. cruzi* através da pele (chagoma) ou através das membranas mucosas oculares (sinal de Romaña; **Figura 11**), inclui inchaço das pálpebras, no lado da cara perto da ferida ^[47].



Figura 11: Sinal de Romaña [3].

Em bebês infectados congenitamente, os sintomas mais comuns, que podem ser aparentes no nascimento, ou se desenvolver dentro de semanas após o parto, são hipotonicidade, febre, hepatoesplenomegalia e anemia. Outros achados incluem prematuridade, baixo peso ao nascer e baixo índice de Apgar ^[48]. Uma mulher infectada com o *T. cruzi*, em qualquer fase da doença, pode dar à luz a um feto infectado, durante qualquer de suas gestações ^[39].

Raramente, crianças, jovens, ou adultos podem morrer da doença aguda, isso devido a uma grave inflamação/infecção do músculo cardíaco (miocardite) ou do cérebro (meningoencefalite) ^[47]. A fase aguda também pode ser severa em pessoas com o sistema imunológico debilitado ^[35].

Se os sintomas se desenvolvem durante a fase aguda, eles normalmente desaparecem espontaneamente dentro de 3 a 8 semanas, em cerca de 90% dos

indivíduos. ^[39]. Apesar de os sintomas desaparecerem, a infecção persiste e entra numa fase crônica. De indivíduos com doença de Chagas crônica, 60 a 80% nunca irá desenvolver sintomas (chamado doença de Chagas crônica indeterminada), enquanto o restante 20 a 40% irá desenvolver risco cardíaco e/ou distúrbios digestivos durante a sua vida (chamada de doença de Chagas crônica determinada). Em 10% dos indivíduos a doença progride diretamente da fase aguda para fase crônica sintomática ^[39].

3.1.3.3 Fase Crônica

O desenvolvimento clínico da fase crônica da doença de Chagas vai desde a ausência de sinais e sintomas (na forma indeterminada) até os quadros onde a doença é grave e há risco de morte prematura. As manifestações clínicas típicas desta fase estão relacionadas com a alteração patológica do coração, esôfago, cólon, ou de uma combinação destes; e são agrupadas em três formas principais: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva ^[49].

Cerca de dois terços das pessoas com sintomas crônicos têm problemas cardíacos, com destaque para miocardiopatia dilatada, que causa anomalias do ritmo cardíaco e pode resultar em morte súbita. Estima-se que um terço dos pacientes desenvolvem danos ao sistema digestivo, resultando em dilatação do trato digestivo (megaesôfago e megacólon) (**Figura 12**), acompanhado de perda de peso severa. Dificuldades de deglutição (acalasia secundária) pode ser o primeiro sintoma de distúrbios digestivos e pode levar à desnutrição ^[38].

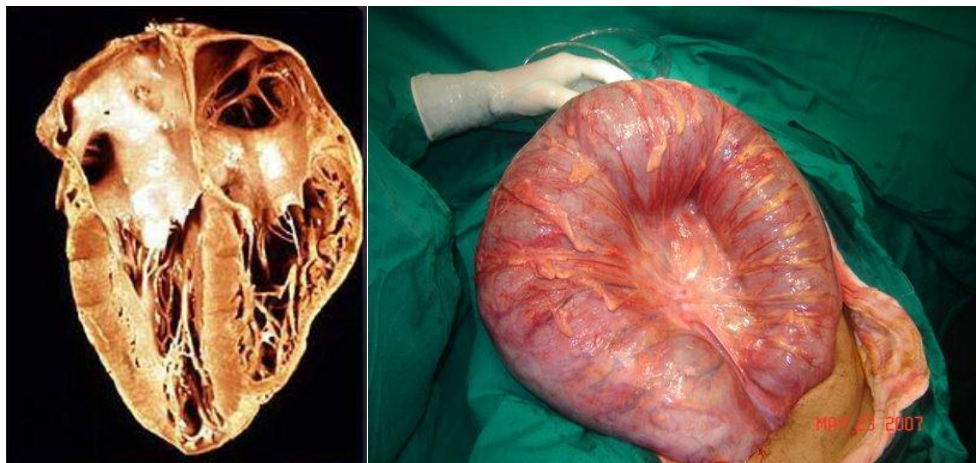


Figura 12: Anatomia de um coração Chagásico e megacólon [52].

A forma digestiva é encontrada quase que exclusivamente ao sul da bacia amazônica (principalmente na Argentina, Brasil, Chile e Bolívia), e é rara no norte da América do Sul, América Central e México. Esta distribuição geográfica é devida provavelmente a diferenças nas estirpes dos parasitas ^[50]. Disfunção gastrointestinal (principalmente megaesôfago, megacólon, ou ambos) ^[51], desenvolve-se em cerca de 10 a 15% dos pacientes cronicamente infectados ^[39].

O megaesôfago provoca disfagia com odinofagia, combinado com dor epigástrica, regurgitação, sialorréia e desnutrição em casos graves. O megacólon muitas vezes afeta o segmento sigmoide, reto ou cólon descendente, ou uma combinação desses; e produz obstipação prolongada, distensão abdominal, e ocasionalmente grande obstrução intestinal devido a fecaloma ou ao volvo sigmoide. Pacientes com megaesôfago têm uma maior prevalência de câncer do esôfago ^[53]. Por outro lado, a maior frequência de câncer colorretal não tem sido relatada em pacientes com megacólon chagásico ^[54].

A forma cardíaca é a manifestação mais grave e frequente da doença de Chagas crônica. Desenvolve-se em 20 a 30% dos indivíduos e, normalmente, leva a alterações do sistema de condução sanguíneo, bradiarritmias e taquiarritmias, aneurismas apicais, insuficiência cardíaca, tromboembolismo e morte súbita ^[49]. As anomalias mais comuns do ECG são o bloqueio do ramo direito, o bloqueio fascicular anterior esquerdo, batimentos ventriculares prematuros; mudanças no ST-T, ondas Q anormais e baixa tensão do QRS. A combinação de bloqueio de ramo direito e bloqueio fascicular anterior esquerdo é muito comum na doença de Chagas ^[39].

A insuficiência cardíaca é frequentemente uma manifestação tardia da doença de Chagas. Geralmente é biventricular, com predomínio de falência no lado direito (edema periférico, hepatomegalia e ascite, mais proeminentes do que congestão pulmonar) em estágios avançados. Insuficiência cardíaca esquerda isolada pode estar presente nas fases iniciais da descompensação cardíaca ^[49]. A insuficiência cardíaca de etiologia chagásica está associada com maior mortalidade do que é a insuficiência cardíaca de outras causas ^[55].

A morte súbita é a principal causa de morte em pacientes com cardiopatia chagásica, o que representa cerca de dois terços de todas as mortes, seguido de insuficiência cardíaca refratária (25 a 30%) e tromboembolismo (10 a 15%) ^[56]. A

morte cardíaca súbita pode ocorrer mesmo em pacientes previamente assintomáticos. É geralmente associada com taquicardia ventricular e fibrilação ou, mais raramente, com bloqueio atrioventricular total ou disfunção do nódulo sinusal.

A associação de doença cardíaca com megaesôfago ou megacólon, ou ambos, define a forma cardiodigestiva da doença de Chagas. Na maioria dos países, o desenvolvimento de megaesôfago geralmente precede o acometimento do coração e do cólon, mas a prevalência exata da forma cardiodigestiva não é conhecida por causa da escassez de estudos adequados [39]. A **Figura 13** resume as manifestações clínicas mais comuns associadas com a fase crônica da doença.

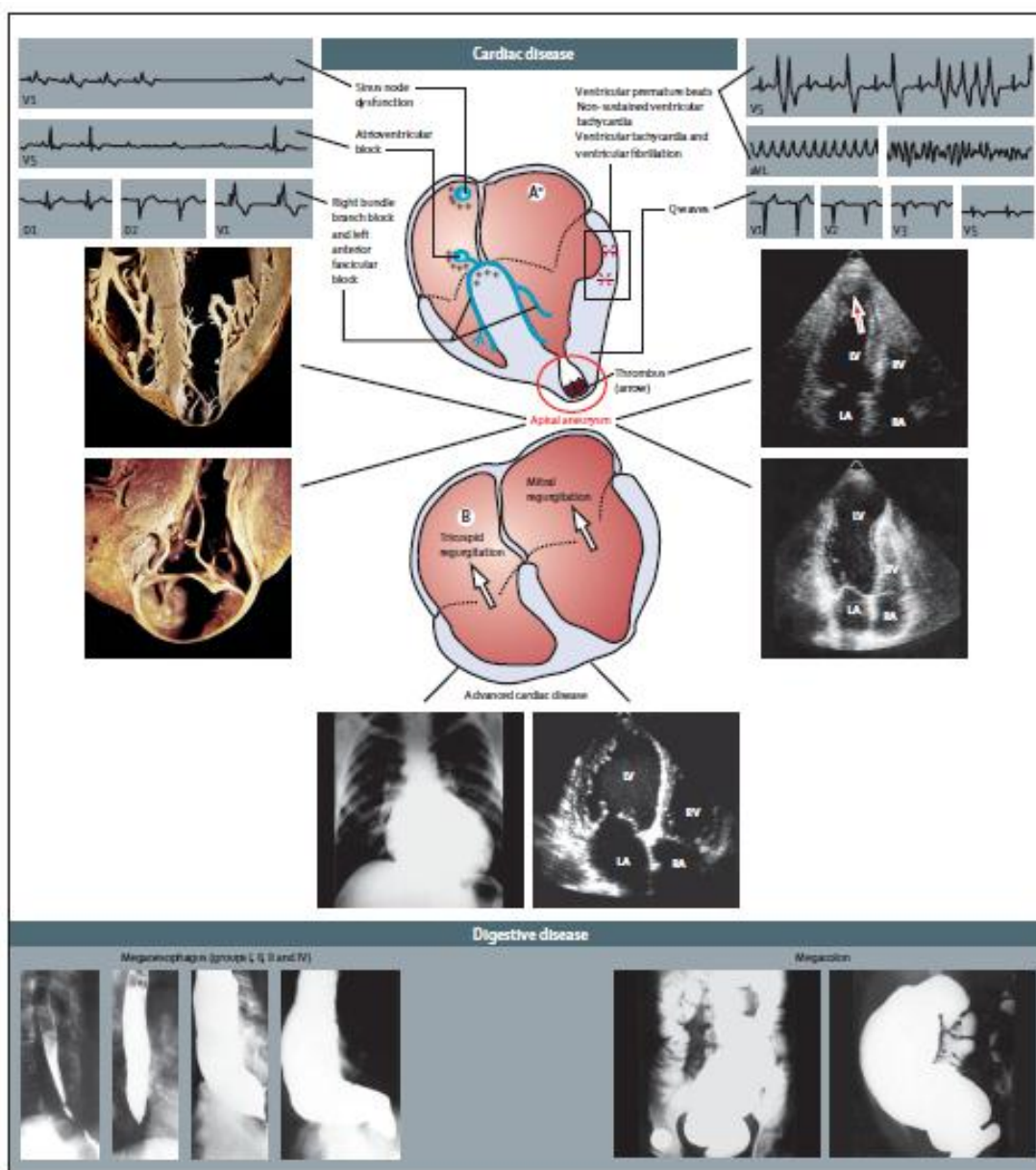


Figura 13: (A) Forma cardíaca segmentar. (B) Forma global cardíaca dilatada. LV = Ventrículo esquerdo. RV = Ventrículo direito. LA = átrio esquerdo. RA = átrio direito. Reproduzida a partir de Rassi e colegas [46]; direitos autorais Editora Roca 2009.

3.1.4 Transmissão do *T. cruzi*

3.1.4.1 Transmissão pelo Vetor

A doença de Chagas é transmitida aos seres humanos e a várias espécies de animais domésticos (por exemplo, cães, gatos) e mamíferos selvagens (por exemplo, roedores, marsupiais, e tatus), principalmente pelos insetos hematófagos triatomíneos da subfamília *Triatominae*, considera-se três ciclos que se sobrepõem: doméstico, peridoméstico e silvestre ^[57]. Embora existam mais de 100 espécies de triatomíneos, apenas algumas são vetores competentes para *T. cruzi* ^[58].

Triatoma infestans, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as três espécies de vetores mais importantes para a transmissão de *T. cruzi* ao homem ^[1]. *R. prolixus* é o principal vetor na Colômbia, Venezuela, Guatemala, Honduras e algumas partes da Nicarágua e El Salvador, e *T. dimidiata* ocupa uma área semelhante, mas estende-se também mais ao norte, no México. Em áreas onde a doença de Chagas é endêmica, *T. infestans* tem sido (**Figura 14**), de longe, o mais importante vetor ^[35].



Figura 14: *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*, principais vetores da doença de Chagas [52].

Triatomíneos têm cinco estágios ninfais, e insetos adultos de ambos os sexos, todos os quais podem abrigar e transmitir o *T. cruzi*. A probabilidade de um triatomíneo estar infectado com *T. cruzi* aumenta de acordo com o número de repastos sanguíneos realizados pelo mesmo, de modo que insetos mais velhos e adultos tendem a ter maiores taxas de infecção ^[39].

Lugares de vegetação densa (como em florestas tropicais) e habitats urbanos não são ideais para o estabelecimento do ciclo de transmissão humana. No entanto, em regiões onde o habitat silvestre e sua fauna são diluídos pela exploração

econômica e ocupação humana, como em áreas recém-desmatadas, áreas de cultura de palmeiras piaçava, e em algumas partes da região amazônica, um ciclo de transmissão humano pode desenvolver-se quando os insetos forem em busca novas fontes de alimento ^[59].

3.1.4.2 Outras Formas de Transmissão

A doença de Chagas pode ser transmitida ao homem por mecanismos que não incluem o inseto vetor, tais como transfusão de sangue, congenitamente da mãe para o bebê durante a gestação, ou através do leite materno ^[60]. O risco de contrair a doença após transfusão de sangue proveniente de um doador infectado é inferior a 10-20%, e depende de vários fatores, incluindo a concentração de parasitas no sangue do doador, o componente do sangue transfundido, e, talvez, a estirpe do parasita ^[61]. O risco de transmissão parece ser maior para transfusão de plaquetas do que para outros componentes do sangue. A transmissão congênita ocorre em 5% ou mais das mulheres grávidas com infecção crônica em algumas regiões da Bolívia, Chile e Paraguai, e de 1 a 2% ou menos na maioria dos outros países endêmicos ^[61]. Essas diferenças podem ser atribuídas à cepa do parasita, ao estado imunológico das mães infectadas, a fatores placentários, e as diferentes metodologias utilizadas para a detecção de casos congênitos.

As transmissões por transfusão e congênitas são as principais formas de infecção de seres humanos em zonas urbanas e em países não endêmicos. A transmissão da infecção por transplante de um órgão sólido ou da medula óssea de um doador com infecção crônica é algo possível, e tem sido bem documentado na América Latina. Em regiões não endêmicas, como os EUA e Canadá, e em muitas partes da Europa, alguns casos de infecções mediadas por transfusão sanguínea e transplante de órgãos foram relatadas ^[62], mas o número real de casos pode ser substancialmente maior por causa do grande número de imigrantes de áreas endêmicas da América Latina.

Esporadicamente, pode-se contrair a doença de Chagas por ingestão de alimentos ou líquidos contaminados com *T. cruzi*, e também por acidentes nos laboratórios que lidam com os parasitas vivos. A transmissão oral da doença de Chagas é normalmente responsável por surtos de infecção aguda em regiões

desprovidas de insetos vetores. A ingestão de alimentos contaminados, como caldo de cana-de-açúcar, açaí, ou carne crua, é geralmente associada a uma infestação parasitária maciça, resultando em uma manifestação clínica aguda mais severa e de alta mortalidade. Em 2007 foi relatado um surto na Venezuela, onde 103 crianças teriam ingerido suco de goiaba contaminado ^[63, 64].

3.1.5 Ciclo de Vida do *T. cruzi*

É um ciclo complexo, do tipo heteroxênico (**Figura 15**), no qual o parasita passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro (homens e outros animais) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos). O parasita passa por vários estágios de desenvolvimento nos insetos vetores e hospedeiros mamíferos; o inseto vetor parece não ser afetado pela infecção com o parasita. Tripomastigotas não-replicativas presentes na corrente sanguínea e, amastigotas replicativas intracelulares são as formas típicas do parasita que são identificadas em hospedeiros mamíferos, enquanto epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicas infecciosas infectam o vetor triatomíneo ^[65].

Durante a fase aguda, todos os tipos de células nucleadas no hospedeiro humano são alvos potenciais para a infecção. Com o desenvolvimento da resposta imune, a parasitemia diminui até uma concentração subpatente e o número de parasitas na corrente sanguínea diminui substancialmente, sinalizando o fim da fase aguda. Contudo, uma vez que o parasita não é completamente eliminado, a infecção de tecidos específicos, tais como o músculo ou gânglio entérico, persiste indefinidamente por toda a vida do hospedeiro.

Trypanosomiasis, American (Chagas disease)

(*Trypanosoma cruzi*)

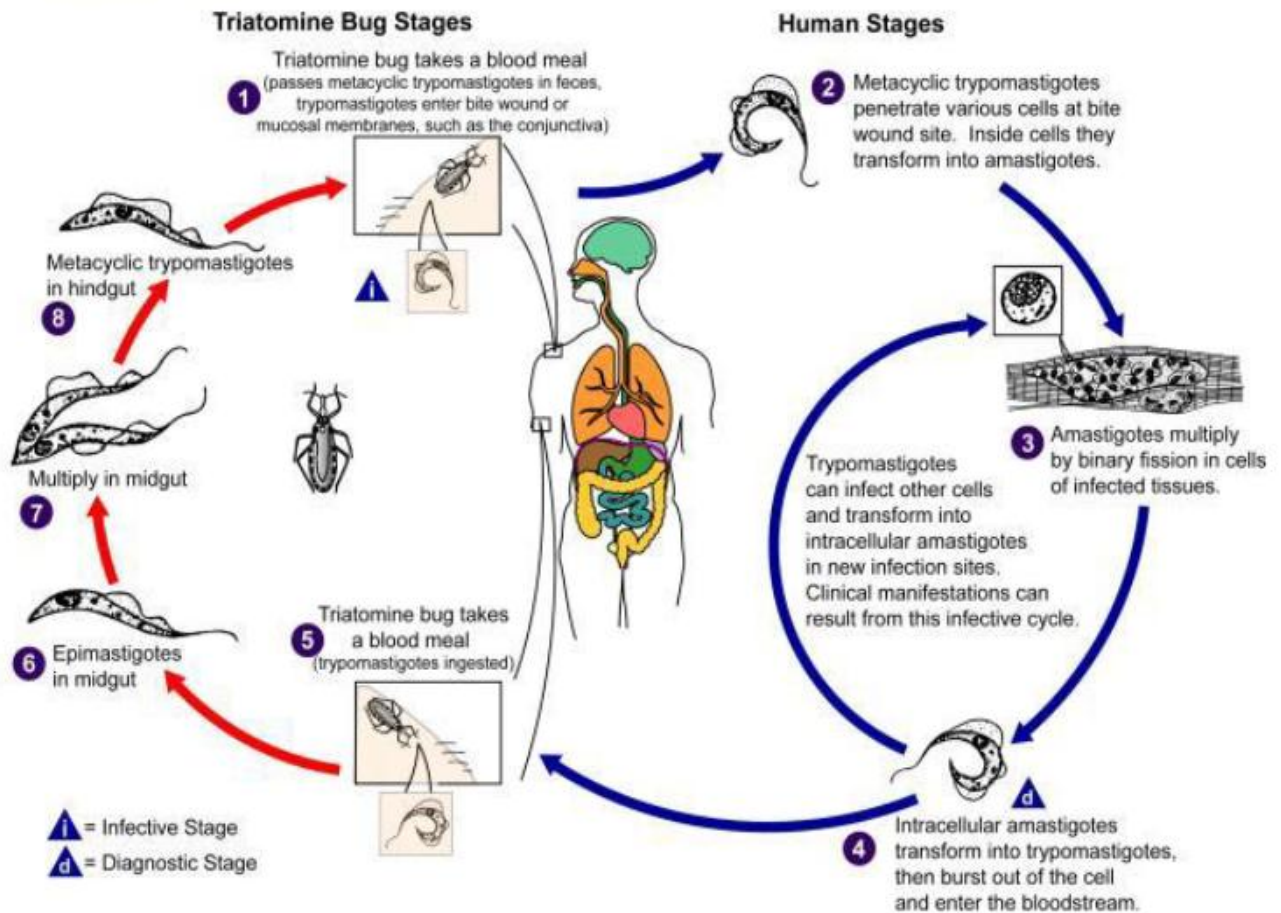


Figura 15: (1) Depois do repasto sanguíneo, o inseto vetor defeca sobre a pele do humano. Ao coçar o local da picada, o hospedeiro faz com que as tripomastigotas metacíclicas entrem (através da ferida ou de uma membrana mucosa intacta, como a conjuntiva), e alcancem a corrente sanguínea. (2) Uma vez dentro do hospedeiro, as tripomastigotas invadem diversas células para escapar de mecanismos de defesa do hospedeiro. Dentro das células, o parasita se transforma na forma amastigota. (3) As amastigotas multiplicam-se por fissão binária nas células dos tecidos infectados. (4) As amastigotas intracelulares diferenciam-se novamente em tripomastigotas, destruindo as células e alcançando novamente a corrente sanguínea. A partir daí, as tripomastigotas podem infectar outras células e se transformar em amastigotas intracelulares em novos sítios de infecção; ou podem ser ingeridas por um inseto vetor (5). Neste último caso, serão convertidas na forma epimastigota não infecciosa no intestino do inseto (6), completando o ciclo de vida entre o parasita e o vetor [52].

3.1.6 Diagnóstico

A presença de *T. cruzi* é diagnóstico de doença de Chagas. Ela pode ser detectada por exame microscópico do sangue fresco não coagulado, através da

análise da motilidade dos parasitas, ou por preparação de esfregaços de sangue espesso, corados com Giemsa, para visualização direta dos parasitas. Microscopicamente, o *T. cruzi* pode ser confundido com *Trypanosoma rangeli*, o qual não é relatado como sendo patogênico para humanos [52].

O Isolamento do *T. cruzi* pode ocorrer por meio de inoculação em ratos, por cultura de células em meios especializados (por exemplo, NNN, LIT), e por xenodiagnóstico [66], onde insetos reduvídeos (*Reduviidae*) não infectados são alimentados com o sangue do paciente, e em seguida é feito o exame parasitológico do seu conteúdo intestinal [38]. Vários imunoensaaios para *T. cruzi* estão disponíveis e podem ser usados para distinguir as diferentes cepas (zimodemas de *T. cruzi* com patogenicidade divergentes). Estes testes incluem: detecção de fixação do complemento, hemaglutinação indireta, ensaios de fluorescência indireta, radioimunoensaaios e ELISA. Alternativamente, o diagnóstico e identificação da estirpe do parasita podem ser feitos utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) [38].

3.1.6.1 Diagnóstico na Fase Aguda

O diagnóstico da infecção aguda é baseado na detecção microscópica de tripomastigotas no sangue [1]. Análise com microhematócrito é o método de escolha para a identificação da infecção congênita por causa da sua sensibilidade e da pequena quantidade de sangue necessária para análise. O exame microscópico do sangue do cordão umbilical ou de sangue periférico do recém-nascido por esta técnica é fortemente recomendado durante o primeiro mês de vida [48]. Se os resultados forem repetidamente negativos, ou se o teste não é feito no início da vida, o bebê deve passar por testes para anticorpos IgG anti-*T. cruzi* do 6º ao 9º mês de idade (preferencialmente no 9º mês), quando os anticorpos maternos não estão mais presentes no bebê [67]. Em centros especializados, os ensaios baseados em amplificação do DNA do *T. cruzi* por PCR também podem ser usados para o diagnóstico precoce de infecção congênita, uma vez que, neste contexto, a sensibilidade da PCR parece ser maior do que a de um exame microscópico [68].

3.1.6.2 Diagnóstico na Fase Crônica

Durante a fase crônica, como a parasitemia é escassa, a presença de anticorpos IgG contra os antígenos de *T. cruzi* tem de ser detectada por pelo menos dois tipos de métodos sorológicos diferentes (geralmente, imunofluorescência indireta ou hemaglutinação indireta) para confirmar o diagnóstico [67]. PCR não é útil no diagnóstico de rotina, devido à necessidade de instalações laboratoriais específicas, a um método não padronizado, possibilidade de contaminação cruzada de DNA e resultados variáveis em todos os laboratórios nos diferentes países. No entanto, por causa da sua sensibilidade aumentada em comparação com outros métodos parasitológicos, a PCR pode ser útil para a confirmação do diagnóstico em casos de sorologia inconclusiva, [67] e como um método auxiliar para monitorar o tratamento [69]. A PCR é útil para identificar falha no tratamento de uma detecção positiva de DNA do *T. cruzi*, mas não o sucesso do tratamento, uma vez que, mesmo repetindo-se resultados negativos para a PCR, não indica necessariamente a cura parasitológica. Na melhor das hipóteses, estes resultados são indicativos da ausência de DNA parasita no momento do teste.

3.1.7 Tratamento Clínico

O tratamento com fármaco antiparasitário é mais eficaz no início da infecção, mas não é limitado aos casos na fase aguda. A única droga de escolha é o benznidazol (Radanil ou Rochagan) (**Figura 16**). Esse fármaco tem capacidade limitada em efetuar cura parasitológica (eliminação completa do *T. cruzi*), especialmente em pacientes crônicos, e a resistência a esta droga tem sido relatada [70].

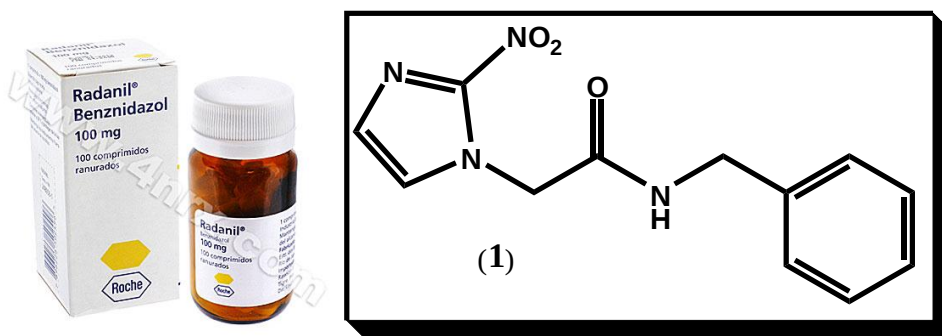


Figura 16: Radanil (benznidazol). Embalagem comercial e estrutura química.

O problema na administração desse fármaco é que a fase aguda nem sempre é diagnosticada e pode passar sem que seja notada. Sendo, assim, há necessidade de busca de novos fármacos que possuam eficácia na fase crônica da doença.

Outros problemas relacionados à utilização do benznidazol são, por exemplo, o grande número de efeitos colaterais apresentados durante a terapia (anorexia, vômitos, alergias) e o fato de que o *T. cruzi* apresentar linhagens diferentes de acordo com a localização geográfica, mostrando, assim, eficácia diferente, além da grande dificuldade na prescrição de uma dose adequada ^[70].

Os estudos sugerem que o tratamento antiparasitário no primeiro ano da doença de Chagas na fase aguda, conduz à cura parasitológica em cerca de 60-85% dos adultos e mais de 90% das crianças tratadas. Crianças (idade de 6 a 12 anos) com a doença crônica têm uma taxa de cura de cerca de 60% com benznidazol.

Até pouco tempo não existiam formulações pediátricas, apesar do fato de que crianças até 12 anos possuem maiores chances de se beneficiarem com o tratamento por não apresentarem ainda a sintomatologia crônica da doença. Porém, uma concentração pediátrica do benznidazol para a doença de Chagas – desenvolvida pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), em parceria com a DNDI (Drugs for Neglected Diseases Initiative) – já está disponível para compra via Fundo Estratégico da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) ou por contato direto com o laboratório. O novo medicamento será utilizado em crianças a partir de dois anos de idade ^[71].

Embora a taxa de cura diminua com tempo que um adulto foi infectado com Chagas, o tratamento com benznidazol tem demonstrado adiar o aparecimento de doenças do coração em adultos com infecção crônica ^[38]. O tratamento da infecção crônica em mulheres, antes ou durante a gravidez, não parece reduzir a probabilidade de a doença ser repassada para o bebê. Da mesma forma, não está claro se o tratamento profilático da infecção crônica é benéfico em pessoas que serão submetidas a imunossupressão ^[38].

3.1.7.1 Complicações

Na fase crônica, o tratamento envolve a administração das manifestações clínicas da doença. Por exemplo, marca-passos e medicamentos para batimentos cardíacos irregulares, como a amiodarona, podem salvar a vida de alguns pacientes com doença cardíaca crônica ^[72]. Enquanto a cirurgia pode ser necessária para megacólon. Entretanto, a doença não pode ser curada nesta fase.

Doença cardíaca crônica, causada pela doença de Chagas, é agora um motivo comum para a cirurgia de transplante de coração. Até recentemente, porém, a doença de Chagas era considerada uma contraindicação para este procedimento, uma vez que o dano cardíaco poderia reaparecer, já que o parasita aproveitaria a oportunidade oferecida pela imunossupressão que segue a cirurgia ^[72]. Observou-se que as taxas de sobrevivência em pacientes de Chagas pós-transplante podem ser significativamente melhoradas, utilizando doses menores da droga imunossupressora ciclosporina. Recentemente, o tratamento direto do músculo cardíaco com células tronco, utilizando o transplante de células de medula óssea, tem demonstrado reduzir significativamente os riscos de falha cardíaca em pacientes com doença de Chagas ^[72].

3.1.8 Desenvolvimento de Novas Drogas

A Química Medicinal compreende “a **invenção, descoberta, planejamento, identificação e preparação de compostos bioativos**, com estudo do metabolismo, interpretação molecular do modo de ação ao nível molecular e construção de relações entre a estrutura química e a atividade biológica” ^[73]. Aos pesquisadores dessa área de caráter multidisciplinar, envolvendo Química, Ciências Biológicas, Médicas e Farmacêuticas, compete a busca de compostos bioativos nas diferentes áreas da terapêutica, incluindo a busca de compostos eficazes para a doença de Chagas ^[74].

Dentre os grandes desafios na pesquisa de agentes quimioterápicos para a doença de Chagas, assim como de novos fármacos para outras doenças negligenciadas, podem-se destacar: (a) a motivação aos químicos medicinais a pesquisar na área; (b) a validação de novos alvos moleculares, (c) a busca de novos

compostos líderes e, (d) a motivação da indústria farmacêutica, especialmente, a nacional, sensibilizando-a para a importância do desenvolvimento dessa classe de fármacos ^[74].

Segundo dados do Diretório de Grupos de Pesquisa do Brasil do CNPq havia em 2009, 154 grupos desenvolvendo pesquisa sobre fármacos em geral. Em torno de 70% desses grupos (108) encontram-se localizados na região sudeste do país. Apenas cerca de 10% desses grupos brasileiros se dedicam à pesquisa de fármacos para a doença de Chagas, estando aproximadamente 87% na região sudeste. Embora esses números representem aumento do número de grupos dedicados à pesquisa em relação ao passado, há que se encetar esforços para que aumente substancialmente, a dedicação para a pesquisa de novos compostos tripanocidas ^[74].

O mundo acadêmico no plano mundial registra, analogamente, baixo interesse pelas doenças negligenciadas, a julgar pelo número de publicações nos últimos 40 anos. Doenças negligenciadas e não-negligenciadas com o mesmo número de anos de vida adaptados à incapacidade (DALY, disability-adjusted life year) apresentam número de publicações expressivamente diferentes, nos bancos de dados *Web of Science* e *PubMed*. Enquanto as publicações sobre doenças não-negligenciadas tiveram ascensão significativa, aquelas relativas a doenças negligenciadas registraram discretíssimo aumento no período pesquisado ^[74].

O aumento considerável nos investimentos requeridos no desenvolvimento de novos fármacos, aliado à perspectiva de retornos financeiros insuficientes, tem como resultado a quase inexistência de recursos em P&D na área de doenças parasitárias por parte das principais companhias farmacêuticas e biotecnológicas do mundo. Neste panorama atual, a doença de Chagas é considerada como extremamente negligenciada, o que ilustra uma realidade preocupante face às necessidades das populações mais pobres e vulneráveis do planeta ^[75, 76].

As pesquisas por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas têm evoluído sensivelmente nas últimas décadas, com destaque para o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* ^[77] que permitiu a identificação de vários genes, muitos deles existentes apenas no parasita e não no homem. Esses estudos recentes têm permitido a identificação de alvos potenciais no *T. cruzi* e que incluem o metabolismo de esteróis, o DNA e diferentes enzimas ^[76].

3.1.9 Alvos Terapêuticos

Os fatores atuais mais importantes na descoberta de novos fármacos envolvem isolamento, identificação e caracterização de novos compostos, bem como de suas propriedades moleculares e cinéticas. A validação de um novo alvo por método químico ou genético tem conduzido, frequentemente, ao estudo da otimização das propriedades farmacológicas e toxicológicas de possíveis inibidores para o tratamento da doença de Chagas [78].

A descoberta de novos alvos depende, em grande parte, da interpretação de informações contidas no genoma do *T. cruzi*. O sequenciamento e entendimento do genoma do parasita devem conduzir ao conhecimento aprofundado da relação estrutura-função de proteínas e exploração dos mecanismos de resistência a fármacos, diversidade antigênica, interação parasita-hospedeiro e patologia da doença [78].

Vários critérios devem ser considerados na seleção de inibidores potenciais. O alvo a ser explorado deve ser encontrado unicamente no parasita e, portanto, ausente na célula do hospedeiro; deve ser também essencial para o desenvolvimento do parasita em um dos estágios de seu ciclo replicativo. O uso de enzimas e metabólitos como alvos terapêuticos permite melhor investigação em termos mecanísticos e estruturais, além de contribuir significativamente para o planejamento racional de fármacos [79].

Os alvos identificados que têm sido explorados para o planejamento racional de fármacos antichagásicos envolvem a inibição seletiva de enzimas fundamentais no desenvolvimento do parasita, entre elas vale mencionar:

- **Tripanotiona redutase**, relacionada ao estresse oxidativo.
- **Trans-sialidase**, envolvida na glicosilação de mucinas de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) para reconhecimento e adesão do parasita na célula do hospedeiro.
- **C₁₄D^{24,25}-esterol metiltransferase**, essencial na biossíntese de ergosterol.
- **Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase**, presente na via glicolítica.

- **Cisteína protease (Cruzipaína)**, relacionadas à atividade proteolítica e penetração do parasita na célula do hospedeiro.
- **Diidrofolato redutase**, responsável pela geração de cofator na síntese “de novo” de timidina.
- **Prolil endopeptidase**, envolvida na clivagem de pequenos peptídeos biologicamente ativos.
- **Hipoxantina-fosforibosiltransferase**, essencial na síntese de nucleotídeos purínicos.
- **DNA topoisomerases I e II**, enzimas essenciais que catalisam alterações topológicas na molécula de DNA. Elas desempenham um papel fundamental no metabolismo do DNA, incluindo replicação, transcrição, recombinação e condensação.
- **Farnesilpirofosfato sintase**, envolvida na biossíntese de uma variedade de esteroides e poliisoprenoides a partir de farnesilpirofosfato.

3.1.10 Cisteína Protease

Conhecida como cruzaina (EC 3.4.22), também chamada de cruzipaína ou GP57/51 (**Figura 17**), constitui a mais abundante proteína da família das cisteíno proteases do *T. cruzi*, tem sido muito explorada levando à descoberta de vários inibidores potentes e seletivos. Das patentes depositadas através da Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO - *World Intellectual Property Organization*) sobre moduladores de rotas metabólicas do *T. cruzi*, os inibidores de cruzaina merecem especial destaque, sendo assim, um alvo viável na terapêutica ^[80]. Sua atividade está relacionada ao desenvolvimento do parasita e na diferenciação de vários estágios de seu ciclo biológico, na invasão no hospedeiro e na alteração da resposta imune do hospedeiro ^[81].

Esta enzima faz parte da família das papaínas C1 das cisteíno-proteases com especificidade intermediária entre as catepsinas L e B, sendo expressa em diferentes níveis por diferentes estágios do parasita, sendo codificada por um alto número de genes ^[81].

As principais classes de inibidores desta enzima incluem (**Figura 17**): (i) derivados peptídicos (**7** e **8**) ^[82]; (ii) derivados não-peptídicos (triazóis **9**, pirimidinas **10**, tiossemicarbazonas **12** e chalconas **11**) ^[77]; (iii) complexos de rênio e ouro (oxorênios **13** e ciclometalados de ouro **14**) ^[83]; e (iv) doadores de óxido nítrico (nitrosotióis **15** e nitrosilo, complexos de ferro e rutênio **16**) ^[84].

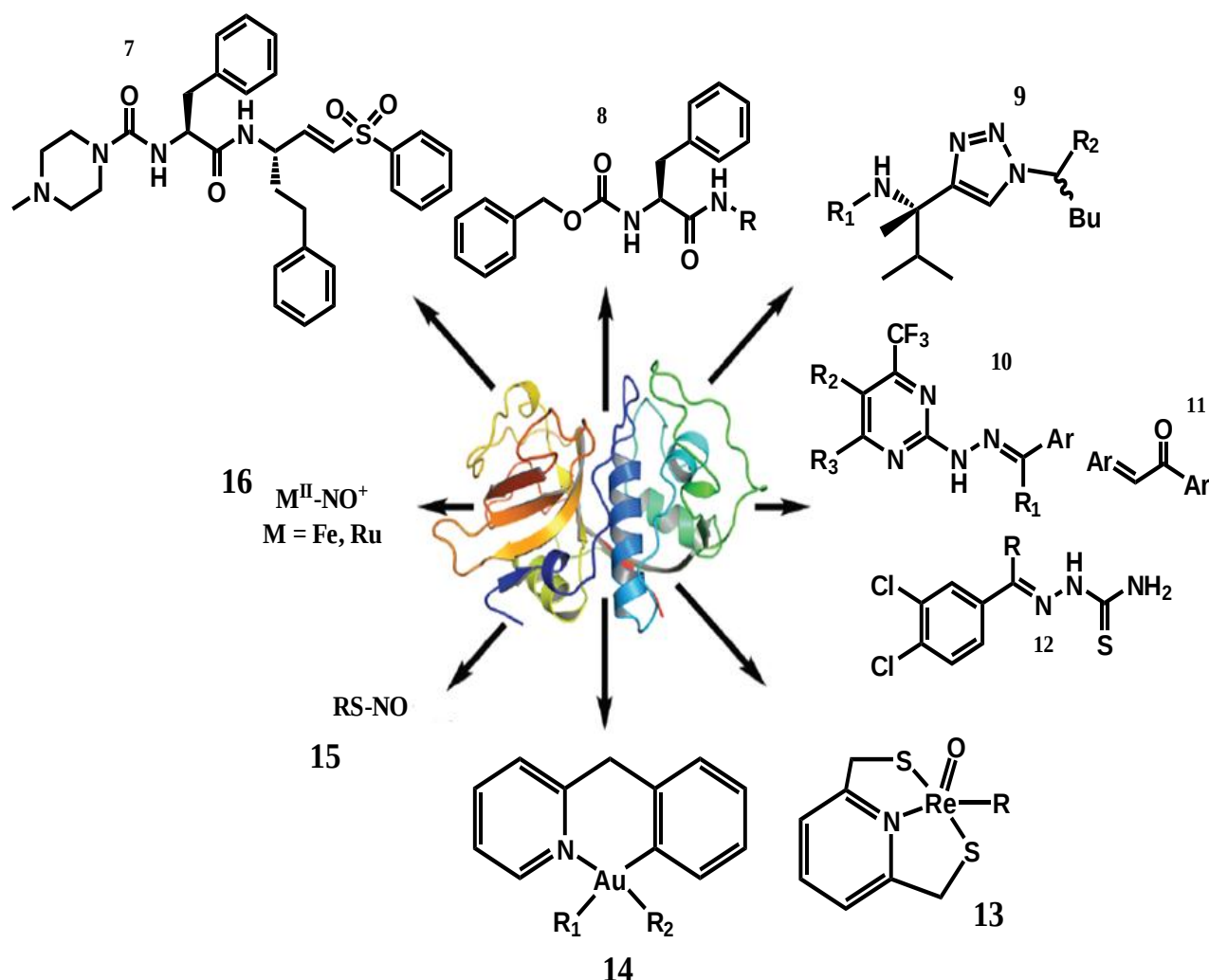


Figura 17: Estrutura cristalográfica da cruzaina de *T. cruzi* (PDB ID 1ME4). Inibidores da enzima alvo de diferentes classes químicas [85].

Esses inibidores da cruzaina provocam mudança na localização da enzima dentro do complexo de Golgi, reduzindo em 70% o transporte destas para os lisossomos. Com a diminuição da catálise e digestão desta, há acúmulo de cruzaina no interior da célula, diminuindo mobilidade das membranas do complexo de Golgi e resultando em distensão periférica de suas cisternas. Tais alterações provocariam a morte do parasita ^[85].

A diversidade química dos inibidores da **Figura 17** representa o espaço químico biológico que pode ser explorado, valorizando o papel dos produtos naturais e da síntese orgânica como fontes valiosas de moléculas privilegiadas capazes de interagir com sistemas biológicos complexos.

Um ênfase especial tem sido aplicado para identificar inibidores não peptídicos. Com base na relação bioisostérica conhecida entre ligações peptídicas e ureias, os primeiros inibidores não peptídicos da cruzaina identificados foram aril-ureias e tioureias, que exibiram uma afinidade moderada contra cruzaina e atividade antiproliferativa em culturas de formas amastigotas ^[86]. Após estas constatações, tiossemicarbazonas e seus pirazolina-1-tiocarboxiamida bioisósteros foram explorados como inibidores potenciais da cruzaina, uma vez que tioureias e tiossemicarbazonas são classicamente consideradas como bioisósteros. Esta abordagem rendeu agentes altamente eficazes contra a enzima e as culturas de células do parasito. Inspiradas pela potência de tiossemicarbazonas, outras classes de inibidores não peptídicos cruzaina têm sido desenvolvidas, explorando amidas funcionalizadas, hidrazonas, 4-tiazolinonas, 1,3-tiazóis e triazóis/triazinas, N-acilhidrazonas, vinilsulfonas, e chalconas como protótipos estruturais ^[9].

3.1.11 Núcleos de Interesse

Em 2002, Du e colaboradores descreveram uma nova série de aril-tiossemicarbazonas, essas moléculas demonstraram serem potentes inibidores da cisteína protease do *Trypanosoma cruzi* (cruzaina). Alguns desses compostos também demonstraram ter atividade tripanocida *in vitro*. Estes autores inicialmente descobriram que a 3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona (**17**) (**Figura 18**) inibia a cruzaina e poderia curar culturas de células de mamíferos infectadas com o *T. cruzi*. A 3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona não mostrou nenhuma toxicidade para as células de mamíferos nas concentrações em que era tripanocida ^[17].

Após a descoberta deste composto líder, mais de 100 compostos foram projetados e sintetizados. Uma relação estrutura-atividade (SAR) foi estabelecida e, muitos análogos potentes com baixos valores de CI_{50} na faixa de nanomolar foram identificados. A partir desses, foram identificados mais oito análogos com atividade

tripanocida no ensaio de cultura de células, na época, isso indicou que as aril-tiossemicarbazonas eram protótipos a fármacos tripanocidas ^[17].

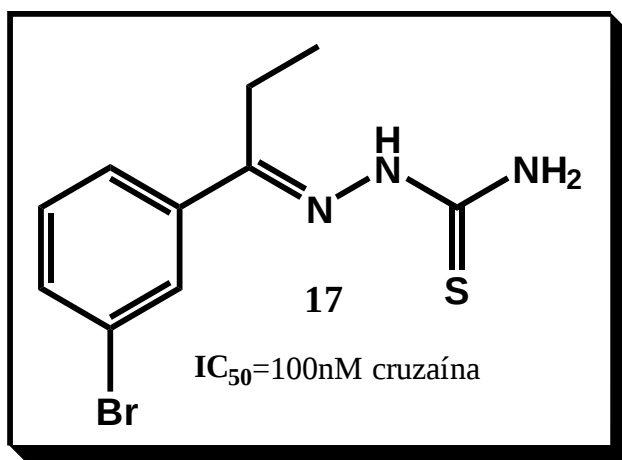


Figura 18: Estrutura química do composto líder 17.

Dentre esses vários análogos sintetizados, destaca-se a 3,4-dicloroacetofenona-tiossemicarbazona (**6**) (Figura 19), essa molécula resultou em um inibidor ainda mais potente com valores de Cl₅₀ de 50 nM frente a cruzaína, um aumento de cerca de 2 vezes na atividade quando comparado ao 17. Trabalhos posteriores de McKerrow e colaboradores descreveram que além do composto 6, alguns derivados desse apresentaram potente atividade em ensaios frente a cruzaína e rhodesaina, proteases cruciais nos ciclos de vida do *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei rhodesiense*, os organismos causadores da doença de Chagas e da doença do Sono ^[87, 88].

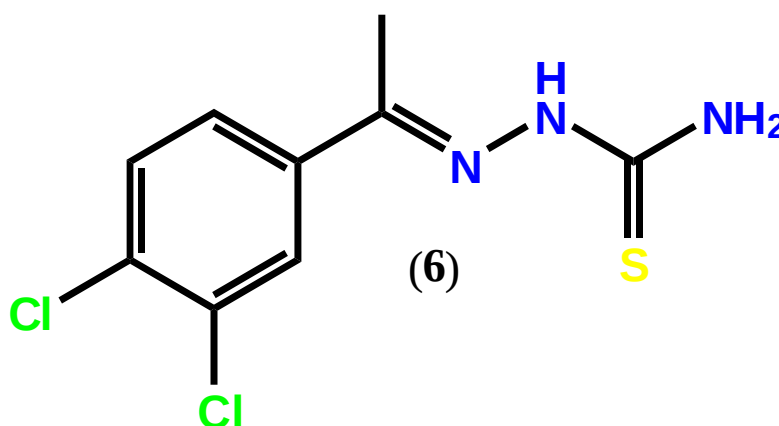


Figura 19: Estrutura química do composto 6.

O relato de Du e colaboradores em 2002 foi um marco na pesquisa de novos protótipos para fármacos antichagásicos. O robusto estudo de relação estrutura-atividade biológica elegeu o composto **6** como um dos mais promissores protótipos estruturais para pesquisa de novos agentes tripanocidas. Du ainda descreveu nesse estudo que a porção arila diclorada é essencial para atividade biológica ^[17].

Esse protótipo estrutural ainda tem como vantagem as propriedades: baixo peso molecular, razoável log P, bom número de doadores e receptores de ligação de hidrogênio – o que corrobora com a regra de Lipinski – e, rotas sintéticas fáceis e econômicas.

Estudos cinéticos mostraram que esses compostos são inibidores dependentes do tempo. Os estudos de modelagem molecular do complexo enzima-inibidor conduziram a uma proposta de mecanismo de interação, bem como o conhecimento sobre SAR da série de tiossemicarbazonas. A natureza não peptídica desta série, o pequeno tamanho das moléculas e o custo extremamente baixo de produção sugeriram que se trata de uma direção promissora para o desenvolvimento da nova quimioterapia anti-*T. cruzi* ^[17].

3.1.12 Tiossemicarbazonas e 4-tiazolinonas

Um grande número de trabalhos tem descrito a potente atividade inibitória de tiossemicarbazonas frente ao *T. cruzi* (**Figura 20**) ^[17, 109, 110]. Por exemplo, como já relatado, Du e colaboradores descreveram a 3'-bromopropilfenona-tiossemicarbazona e a 3,4-dicloroacetofenona como uns dos mais eficazes inibidores da cruzaina, com atividade tripanocida em níveis que não são tóxicos para células de mamíferos ^[17]. Para comparar estes resultados, Fujii et al. ^[20] investigaram tiossemicarbazonas que possuem maiores grupos alquila adjacente a hidrazona, e relataram que eles são mais ativos com um grupo n-butila ligado ao radical 3,4-diclorobenzoíla. Siles et al. ^[89], posteriormente sintetizaram uma série de derivados tiossemicarbazônicos com anéis fundidos, e descobriram novos compostos líderes, que são mais potentes do que os análogos não-fundidos, os quais ficaram conhecidos como sendo os compostos mais ativos baseados em tiossemicarbazonas inibidoras da cruzaina.

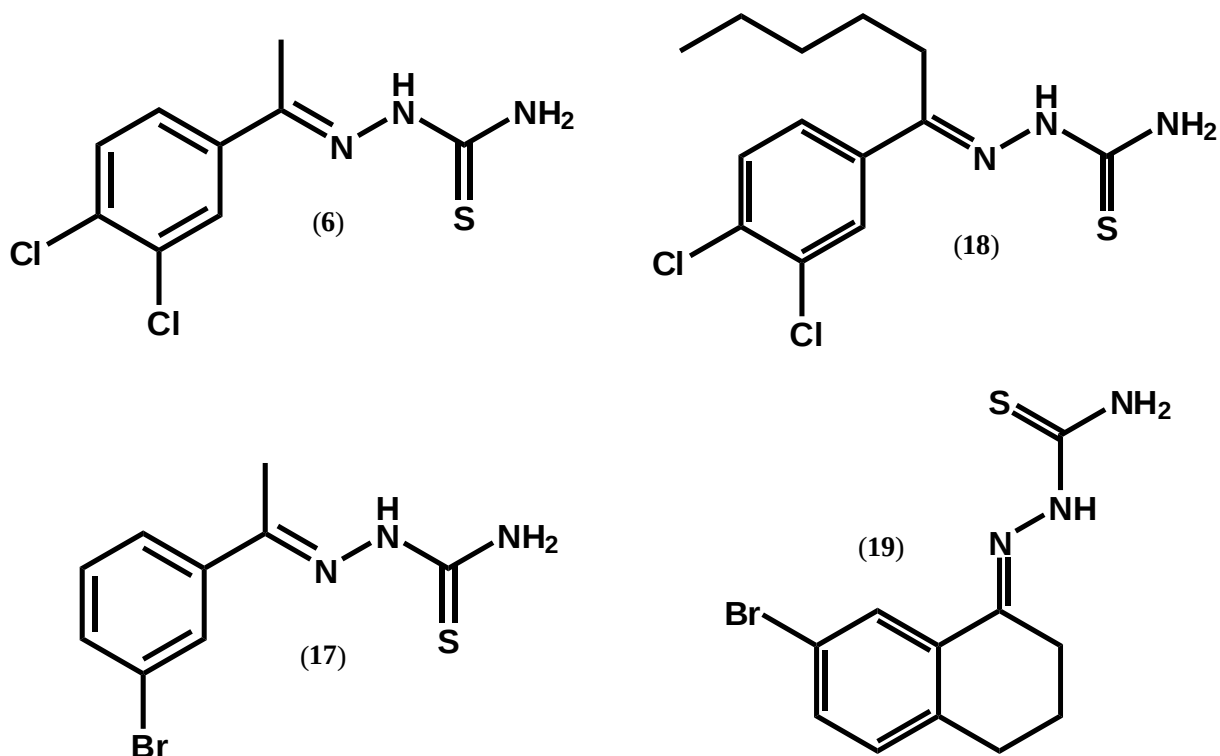


Figura 20: Representativas tiossemicarbazonas que são inibidoras da cruzaiña.

Estes estudos de relação estrutura-atividade biológica não incluem investigações sobre a substituição do grupo amino terminal da tioamida de tiossemicarbazonas com um sistema de anel heterocíclico.

Tiossemicarbazonas podem ser vistas como bioisósteros acíclicos e não clássicos de 4-tiazolinonas (**22**), e como bioisósteros acíclicos e clássicos para 2-pirazolina-1-tiocarboxamidas (**20**) (também descritas como potentes inibidores da cruzaiña) ^[17], conforme ilustrado na (**Figura 21**) ^[90]. Por outro lado, derivados de 4-tiazolidonas foram descritos como tendo atividade antitumoral ^[91], antibacteriana ^[92], antifúngica ^[93], e como agentes antiprotozoários ^[94].

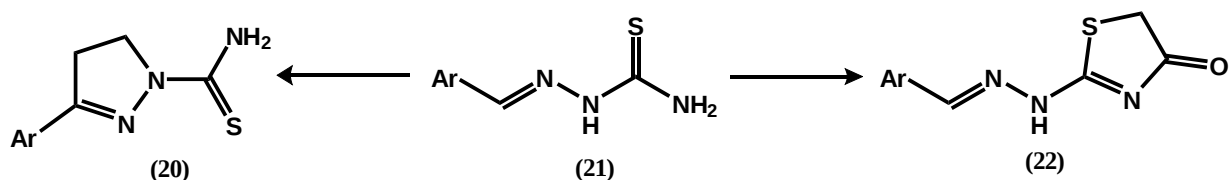


Figura 21: Tiossemicarbazona (centro) e seu bioisótero clássico pirazolina (**20**), e seu bioisótero não clássico 4-tiazolinona (**22**).

Em estudos posteriores Lima Leite e colaboradores descreveram que compostos da classe das 4-tiazolinonas são ativos contra *T. cruzi* nos ensaios *in*

vitro, e em concentrações não tóxicas para células de mamíferos (esplenócitos de ratos), e que sua atividade foi comparável a droga de referência benznidazol. Isso indicou que essa classe de compostos eram promissores candidatos a fármacos tripanocidas [9, 21, 22].

Em relatos mais recentes, Moreira e colaboradores comprovaram a atividade *anti-T. cruzi* das 4-tiazolinonas, esses novos compostos foram hábeis em inibir a atividade da cruzaina e a proliferação das epimastigotas do *T. cruzi*, e foram fatais para as tripomastigotas nos ensaios *in vitro* em concentrações não tóxicas para esplenócitos de ratos. Nos ensaios *in vivo* destacou-se o composto (5), que conseguiu reduzir a parasitemia sanguínea em camundongos infectados. Isso indica que as 4-tiazolinonas são os mais novos protótipos estruturais a fármacos antichagásicos [27]. A **Figura 22** apresenta a estrutura de alguns dos principais protótipos estruturais baseados em 4-tiazolinonas.

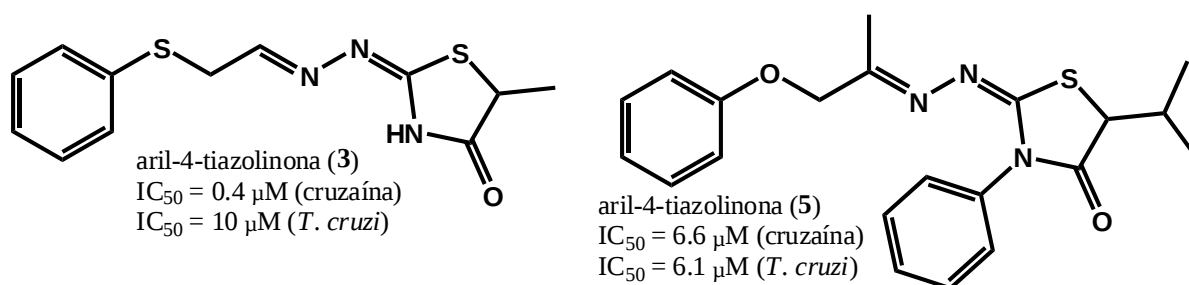


Figura 22: Estrutura de alguns dos principais protótipos a fármacos antichagásicos baseados em 4-tiazolinonas.

3.1.13 1,3-tiazóis

Tiazóis têm despertado o interesse dos químicos medicinais por causa de suas atividades biológicas. Eles têm se destacado com passar dos anos devido as suas ações: antibacteriana [28, 29, 31], antifúngica [30] e anti-inflamatória [29]. Chimenti e colaboradores desenvolveram uma série de inibidores seletivos das isoformas A e B da monoaminoxidase (MAO), esses tinham a função tiazóis na sua estrutura [32-34].

Vários estudos têm demonstrado que os inibidores da biossíntese do ergosterol comercialmente disponíveis tem o núcleo tiazol (**Figura 23**) ou triazol. Esse núcleo é altamente eficaz para o tratamento de doenças fúngicas (por

exemplo, cetoconazol, itraconazol, posaconazol ou ravuconazol) e tem efeitos supressores contra infecções por *T. cruzi* em experiências com seres humanos ou animais ^[95].

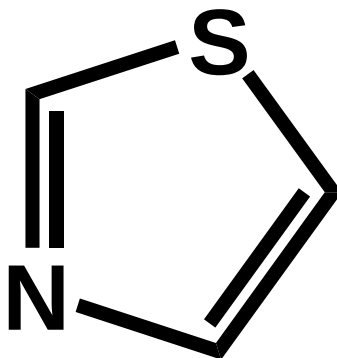


Figura 23: Estrutura química do núcleo tiazol.

Esse núcleo ainda tem aplicação no desenvolvimento de drogas para o tratamento de alergias, hipertensão, inflamação, esquizofrenia, infecções bacterianas, por HIV, como hipnóticos, para o tratamento da dor, como antagonistas dos receptores de fibrinogênio com atividade antitrombótica, e inibidores da DNA girase bacteriana B ^[96].

Recentemente, Caputto e colaboradores desenvolveram uma série de compostos com função de tiazol na sua estrutura, os quais apresentaram excelente atividade *in vitro* contra cepas de epimastigota, tripomastigota e amastigota do *T. cruzi* ^[15, 16], esses estudos indicam que o núcleo tiazol é bastante importante como um protótipo estrutural a fármaco antichagásico.

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1 Planejamento Estrutural

Com base nos relatos de Du, que descreveu o anel 3',4'-diclorobenzil como essencial para atividade tripanocida e frente a cruzaina ^[17] e em virtude das propriedades tripanocidas do composto (5, **figura 22**, pág 53), nós planejamos uma nova geração de aril-4-tiazolinonas (23) (**Figura 25**). Ademais, escolheu-se realizar modificações estruturais e inserir substituintes em posições estratégicas, como por exemplo, a inserção de substituintes na posição N3 que foi realizada de maneira racional, pois tínhamos obtido sucesso em trabalhos recentes ^[27].

Os compostos (3) e (5), **figura 22**, pág 53, possuem uma metila e uma isopropila, respectivamente, na posição C5. Análogos destes compostos desprovidos da metila em C5 foram menos potentes e até inativos ^[27]. Tendo em mente estes resultados, nós priorizamos a inserção de substituintes alifáticos e aromáticos na posição C5 da série (24).

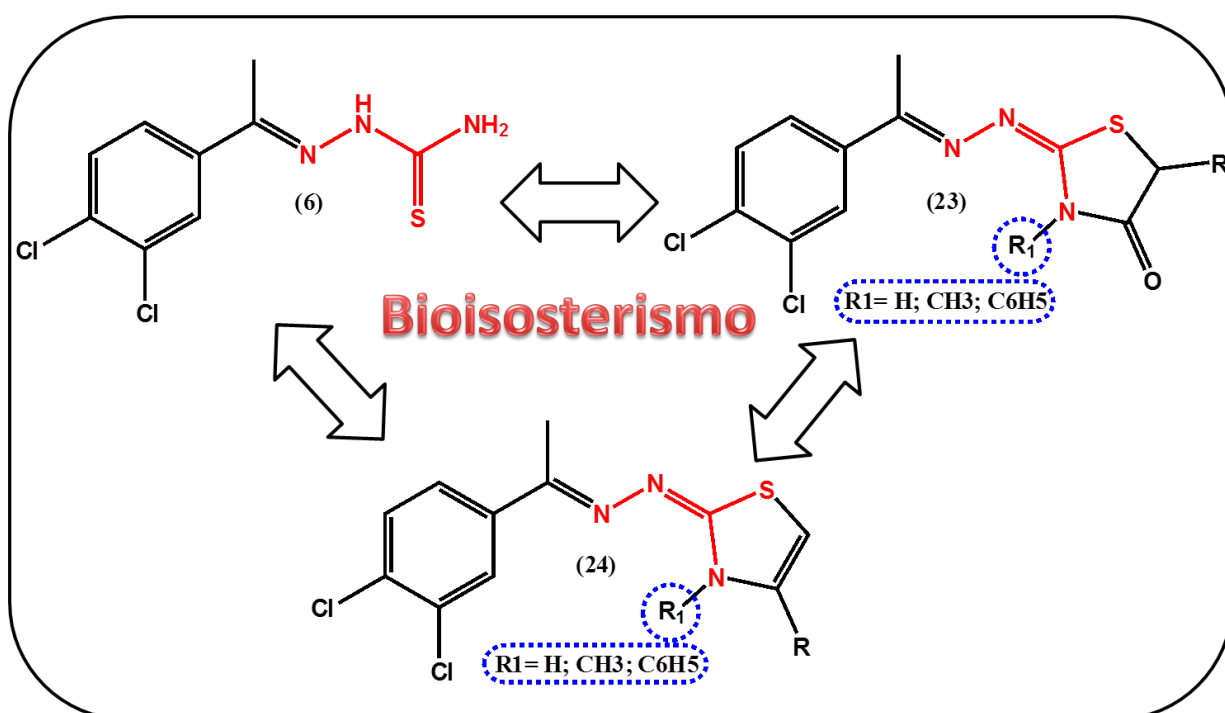


Figura 24: Emprego do bioisosterismo para o planejamento das aril-4-tiazolinonas (23) e dos aril-1,3-tiazóis (24).

Por fim, nós almejamos substituir o heterociclo tiazolidínico por outro heterociclo estruturalmente equivalente (bioisostérico). Em razão de trabalhos

recentes ^[27], nós elegemos o anel 1,3-tiazol, culminando assim com a construção estrutural dos aril-1,3-tiazóis (**24**) (**Figura 24**).

A construção estrutural da série de aril-1,3-tiazóis (**24**) também levou em conta a possível relação bioisostérica entre os heterociclos 4-tiazolinona *versus* 1,3-tiazol. Ambos os heterociclos são capazes de interagir por ligações de hidrogênio com os receptores envolvidos na atividade tripanocida. Porém, com propriedades físico-químicas (estereoelétrônicas, lipofilia) distintas.

O planejamento da série (**24**) possibilitaria estudar o efeito eletrônico de substituintes localizados na posição C4 do anel tiazólico. Partindo da fenila como anel aromático de referência, diversos substituintes no anel fenílico foram inseridos (mono-, bi- e tri-substituições nas posições *orto*, *meta* e *para*), além de anéis heterocíclicos aromáticos, tais como a 2-piridina.

Uma vez que o planejamento estrutural foi realizado, seguimos em direção à síntese dos compostos almejados. A **Figura 25** apresenta a sequencia das reações envolvidas na síntese das aril-4-tiazolinonas (**23a–o**) e aril-1,3-tiazóis (**24a–v**).

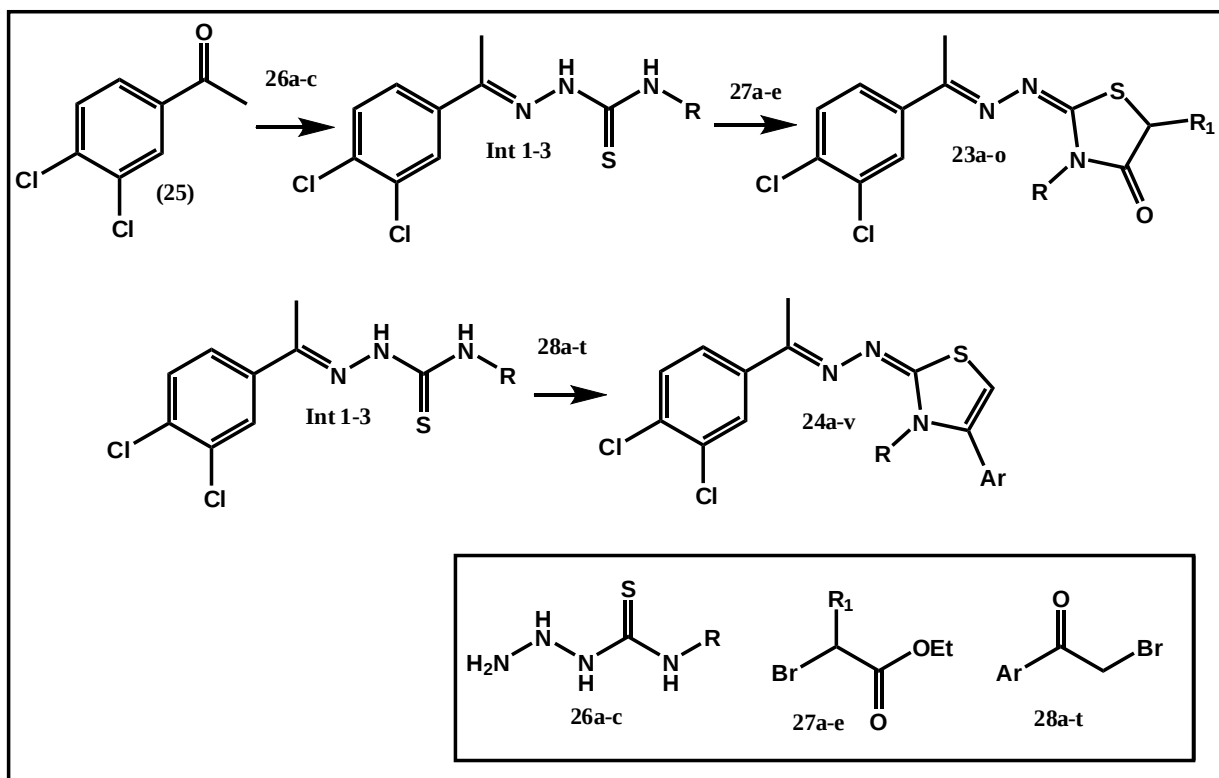


Figura 25: Rota sintética para obtenção das aril-4-tiazolinonas (**23a–o**) e aril-1,3-tiazóis (**24a–v**).

4.2 Síntese dos Compostos

4.2.1 Síntese das aril-4-tiazolinonas (23a–o)

A série (23a–t) tem como ponto de partida a síntese das tiossemicarbazonas (Int-1-3). Para a síntese das tiossemicarbazonas (Int-1-3), as tiossemicarbazidas substituídas (26a–c) e a 3',4'-dicloroacetofenona (25) (Figura 26) foram adquiridas de fontes comerciais.

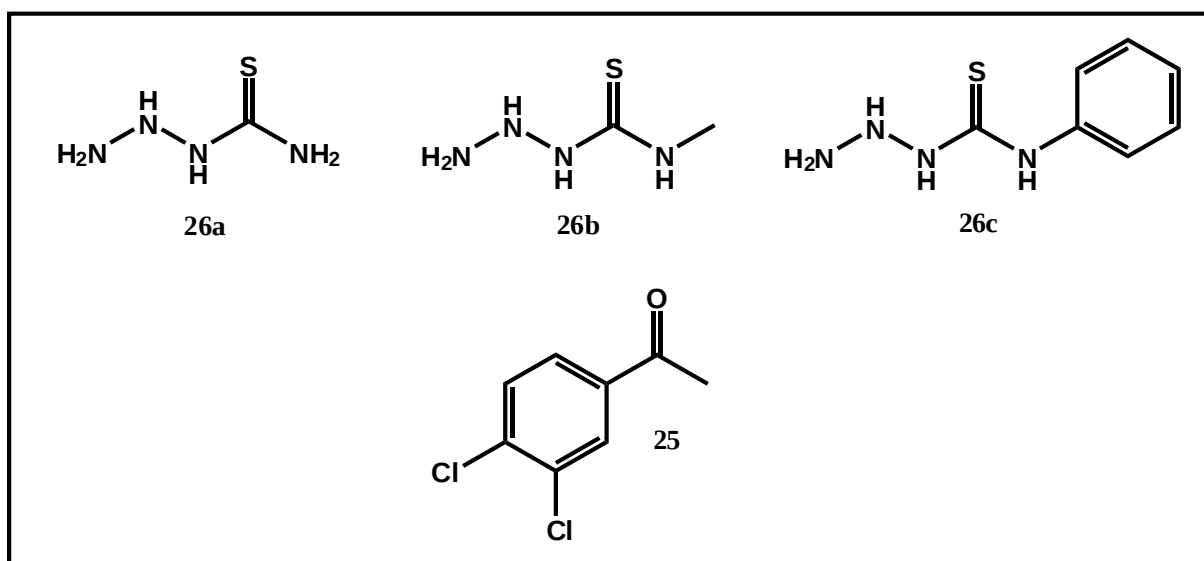


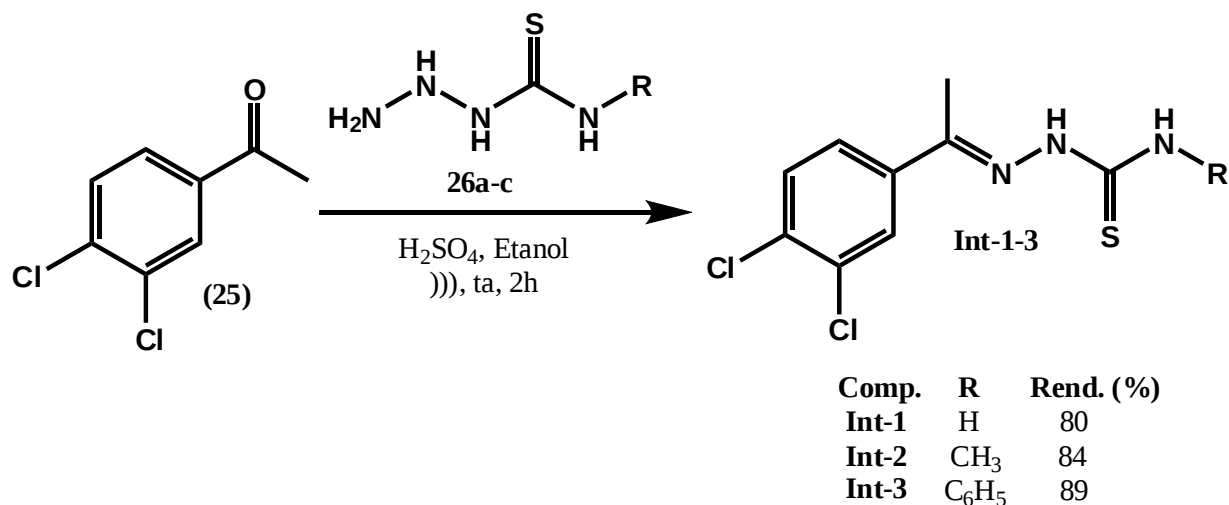
Figura 26: Estrutura das tiossemicarbazidas substituídas e da 3',4'-dicloroacetofenona.

As tiossemicarbazonas (Int-1-3) foram preparadas a partir da condensação da 3',4'-dicloroacetofenona (25) com as respectivas tiossemicarbazidas (26a–c) a temperatura ambiente em um banho de ultrassom ^[97]. Os produtos obtidos (Int-1-3) foram cristalizados em tolueno a quente, obteve-se cristais incolores com pureza e rendimentos satisfatórios (Esquema 1).

Conforme descrito no Esquema 1, as reações para as tiossemicarbazonas (Int-1-3) foram realizadas na presença de ácido sulfúrico (H₂SO₄), a temperatura ambiente, em um banho de ultrassom ^[98], com exceção do Int-2, onde utilizamos HCl, pois com esse ácido obtivemos maior rendimento e ausência de subprodutos. Nestas condições, foi possível sintetizar três tiossemicarbazonas (Int-1-3) com rendimentos satisfatórios (>80%) e tempo reacional de até 2h.

As tiossemicarbazonas (Int-1-3) foram caracterizadas por técnicas espectrométricas (RMN de ¹H e ¹³C, IV) e por EMAR. Nos espectros de IV, a ausência de absorção na região de estiramento axial de carbonilas (1790–1700 cm⁻¹)

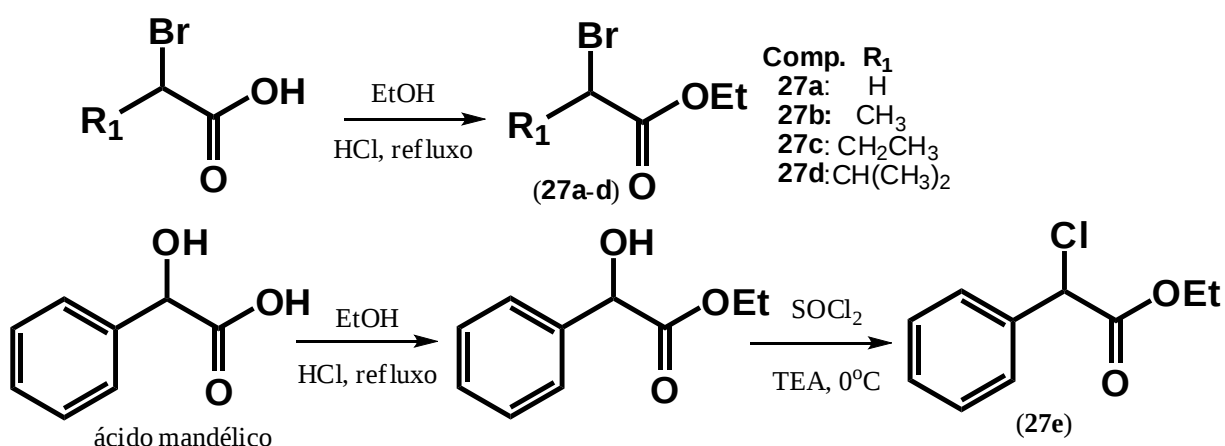
foi um indício importante da formação da ligação C=N. A adição de D₂O após a aquisição do RMN de ¹H permitiu localizar os prótons de NH₂ e NH.



Esquema 1: Obtenção das tiossemicarbazonas **Int-1-3**.

As tiossemicarbazonas (**Int-1-3**) são sólidos cristalinos, mas devido a algumas limitações, não tivemos tempo hábil para obter cristais apropriados para a difração de raios-X.

Antes de seguir com a preparação das aril-4-tiazolinonas (**23a-o**), foi necessário preparar os acetatos α -halogenados (**27a-e**). Os compostos (**27a-d**) foram obtidos a partir da esterificação dos ácidos α -haloacéticos disponíveis comercialmente. Os compostos (**27a-d**) foram utilizados na etapa posterior sem prévia purificação (**Esquema 2**). Já o composto (**27e**) foi preparado em duas etapas partindo do ácido mandélico (racêmico), com rendimento de 61% ^[99].



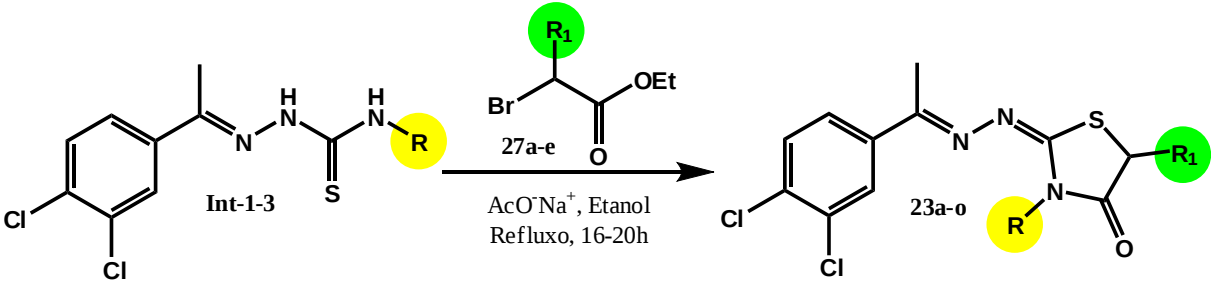
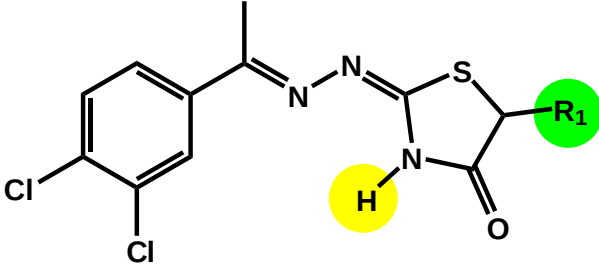
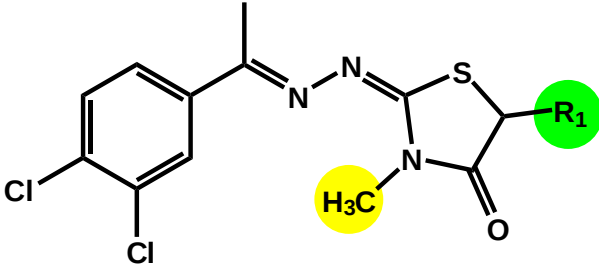
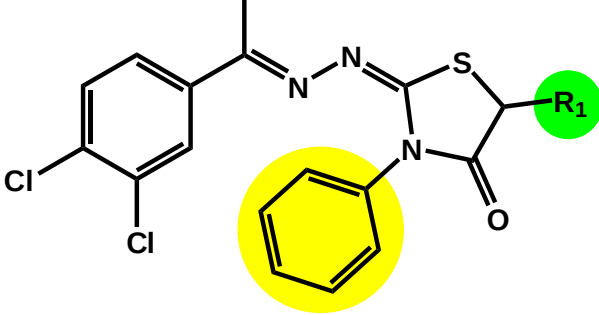
Esquema 2: Obtenção dos acetatos α -halogenados.

As aril-4-tiazolinonas (**23a-o**) foram então sintetizadas através da reação entre a respectiva tiossemicarbazona (**Int-1-3**) com os respectivos acetatos α -halogenados

(**27a–e**). Estas reações foram realizadas em etanol absoluto, com excesso de acetato de sódio anidro, a temperatura de refluxo e agitação magnética vigorosa. As reações foram acompanhadas por CCD que mostraram o consumo dos materiais de partida (tiossemicarbazonas) após 16–20 horas de reação (**Tabela 2**).

Após cristalização em tolueno, ciclohexano, ou mistura de ambos, os compostos (**23a–o**) foram isolados como sólidos cristalinos incolores e rendimentos que variaram de 35 a 87 %. Os substituintes e propriedades físicas das aril-4-tiazolinonas (**23a–o**) estão listadas na **Tabela 2**.

Tabela 2: Síntese das aril-4-tiazolinonas (**23a–o**) e descrição dos substituintes, rendimento (%) e propriedades físicas.

				
Estrutura	R ₁	Código	PF (°C)	Rend. (%)
	H	23a	234-236	65
	CH ₃	23b	208-210	56
	CH ₂ CH ₃	23c	175-177	75
	CH(CH ₃) ₂	23d	193-195	56
	C ₆ H ₅	23e	245-247	65
	H	23f	195-197	61
	CH ₃	23g	178-180	75
	CH ₂ CH ₃	23h	167-168	64
	CH(CH ₃) ₂	23i	137-140	53
	C ₆ H ₅	23j	194-196	87
	H	23k	232-233	71
	CH ₃	23l	208-209	67
	CH ₂ CH ₃	23m	154	35
	CH(CH ₃) ₂	23n	158-160	61
	C ₆ H ₅	23o	210-212	58

Tal como as tiossemicarbazonas (**26a–c**), as aril-4-tiazolinonas (**23a–o**) foram caracterizadas por técnicas espectrométricas (RMN de ^1H e ^{13}C , IV) e por EMAR. A pureza foi confirmada pela análise elementar de C, N, H e S.

Uma característica espectroscópica dos compostos (**23a–r**) é a presença de absorções na região de estiramento axial de carbonilas nos espectros de IV, confirmando assim a formação do anel tiazolidínico. O sinal referente ao carbono da carbonila foi também localizado na RMN de ^{13}C e DEPT.

Com a análise do espectro de IV (**Figura 27**), observamos em 1711 cm^{-1} o estiramento de $\text{C}=\text{O}$, sinal diagnóstico de formação do anel 4-tiazolinona. Em 1618 cm^{-1} observamos também o estiramento $\text{C}=\text{N}$.

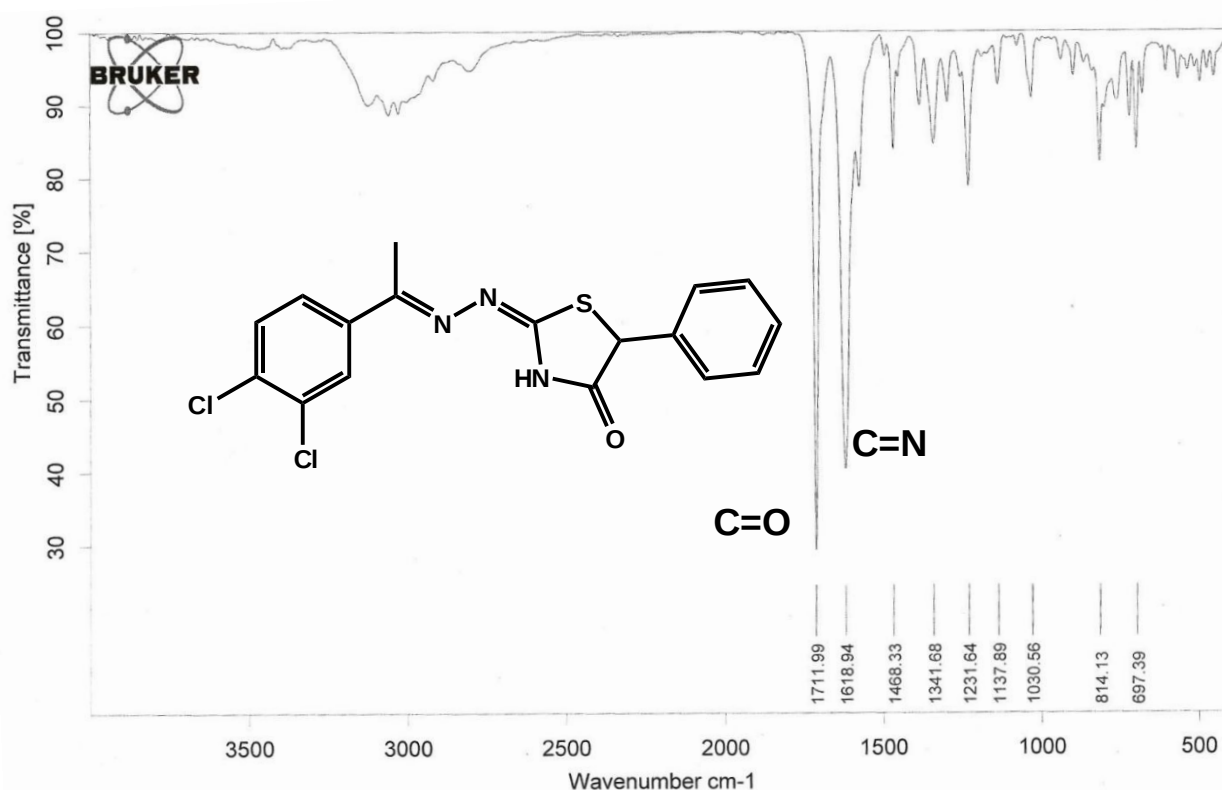


Figura 27: Exemplo de espectro de IV da série **23** (composto **23e**).

A **Figura 28** apresenta um exemplo de espectro de RMN ^1H para a série **23** (composto **23e**), onde foi constatada a presença de um sigleto em 2.41 ppm, integrando para três hidrogênios, referente ao único grupo metila da molécula. Em 5.49 ppm, identificamos um sigleto, integrando para um hidrogênio, correspondente ao hidrogênio do anel 4-tiazolinona. Em 7.39 ppm, identificamos um mutipletto, integrando para cinco hidrogênios, correspondentes aos hidrogênios do anel

aromático ligado na posição 5 do anel 4-tiazolinona. Em 7.68 ppm, observamos um dubleto, integrando para um hidrogênio, correspondente ao hidrogênio da posição 5 do anel 3,4-diclorobenzil. Em 7.81 ppm, identificamos um duplodubleto, integrando para um hidrogênio, correspondente ao hidrogênio da posição 6 do anel 3,4-diclorobenzil. Em 8.01 ppm, observamos um dubleto, que integra para um hidrogênio, correspondendo ao hidrogênio da posição 2 do anel 3,4-diclorobenzil. Por fim, identificamos um singlete com deslocamento químico de 12.35 ppm, que indicou a presença do NH amídico de lactamas.

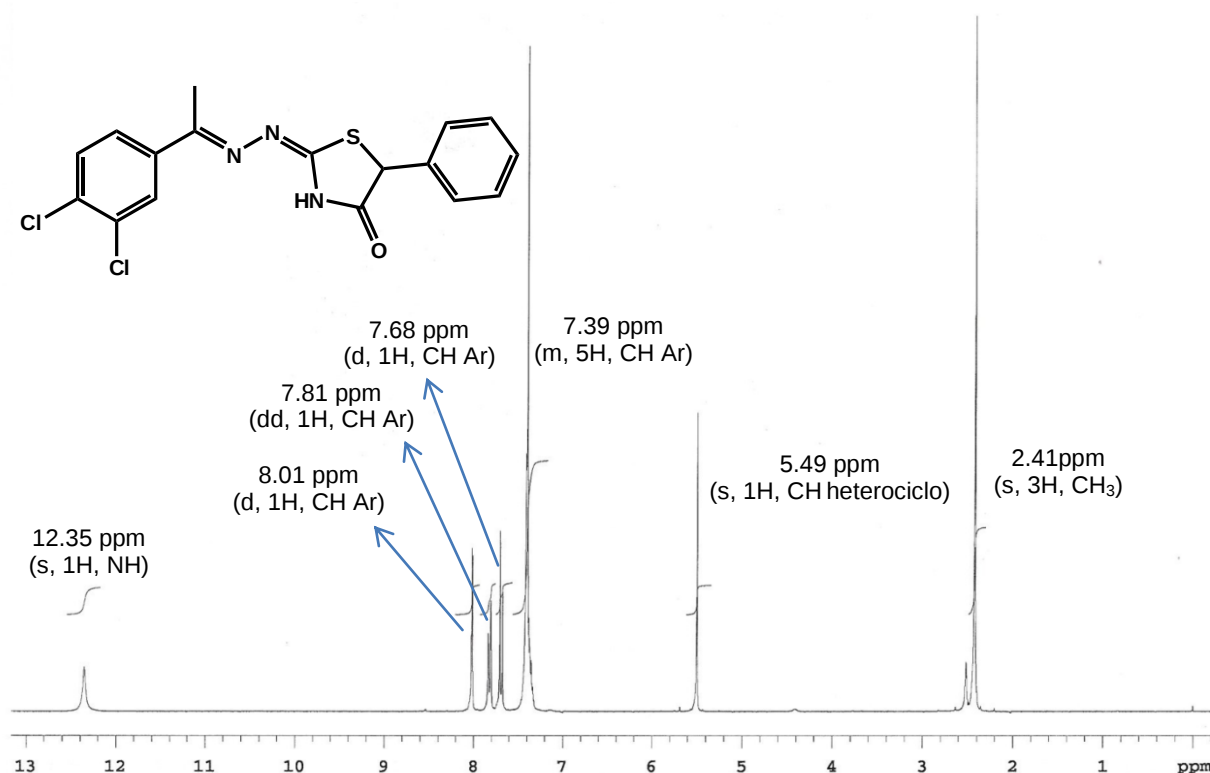


Figura 28: Exemplo de espectro de RMN de ^1H da série **23** (composto **23e**).

A **Figura 29** exemplifica os resultados de outra técnica utilizada, a ressonância magnética nuclear de carbono 13 e DEPT. Com ela, identificamos o sinal do carbono da única metila da molécula em 14.9 ppm. O sinal do carbono (CH heterociclo) da posição 5 do anel 4-tiazolinona em 51.4 ppm. Os sinais dos carbonos (CH) do anel aromático ligado a posição 5 do heterociclo em: 126.9, 128.4 e 128.7 ppm. Em 128.9, 129.3 e 131.1 ppm, identificamos os sinais dos carbonos (CH) do anel 3,4-diclorobenzil das posições 5, 6 e 2, respectivamente. Em 131.8 ppm identificamos o carbono quaternário do anel aromático ligado a posição 5 do heterociclo. Em 132.8 ppm identificamos o carbono da posição 1 do anel 3,4-diclorobenzil. Em 137.2 e

138.6 ppm identificamos os carbonos da posição 3 e 4 do anel 3,4-diclorobenzil, respectivamente. O C=N ligado a metila foi identificado em 159.2 ppm. Em 162.0 ppm identificamos o C=N do heterociclo. Por fim, em 175 ppm, identificamos o carbono da carbonila.

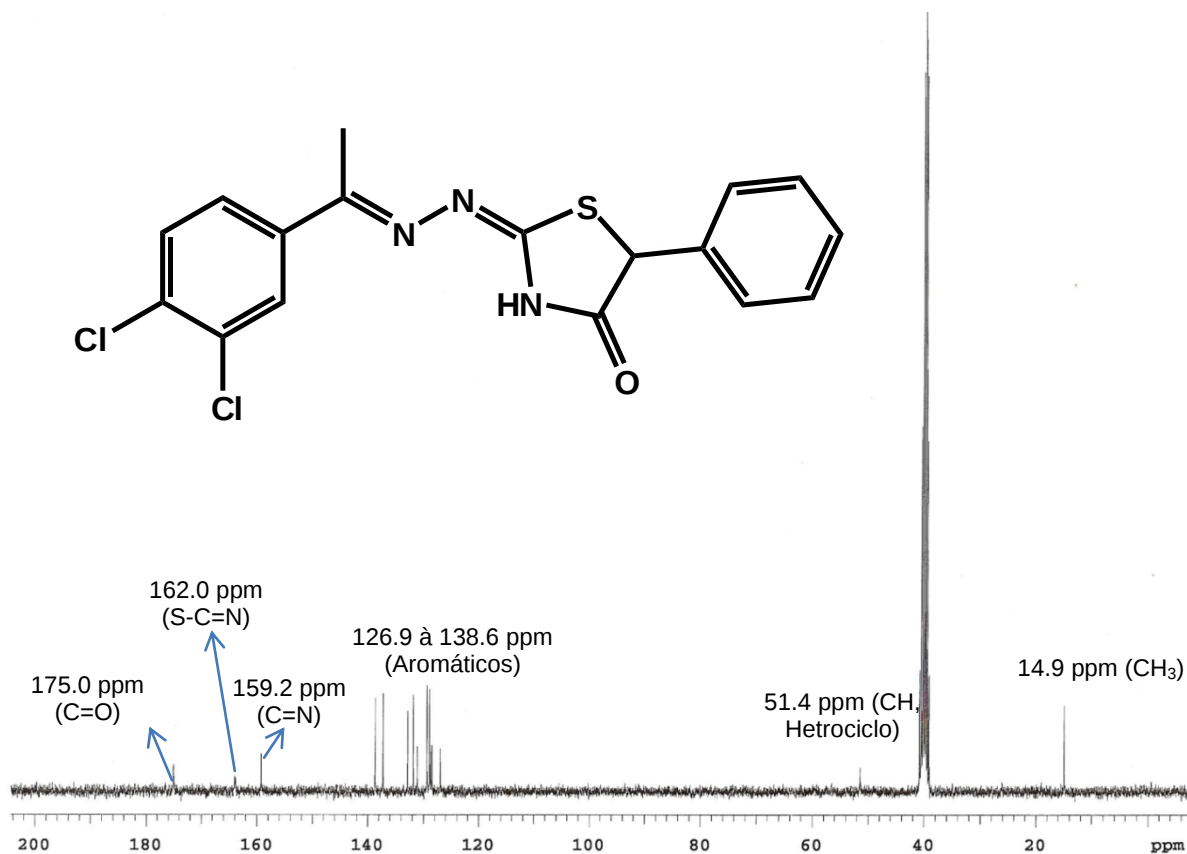


Figura 29: Exemplo de espectro de RMN de ^{13}C da série **23** (composto **23e**).

A Figura 30 apresenta um resumo das análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

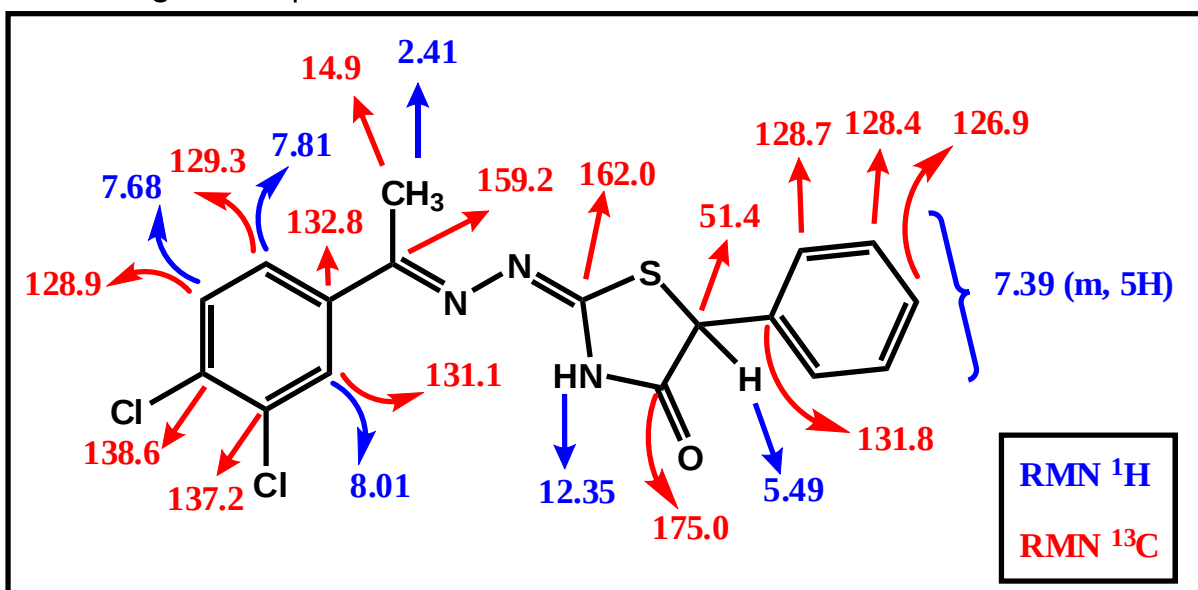


Figura 30: Dados espectroscópicos das aril-4-tiazolinonas (**23e**). Deslocamento químico em ppm.

Outra característica estrutural importante desses compostos é a posição da ligação dupla envolvendo o carbono C2 do anel heterociclo. Dependendo do tautomerismo imino-lactama, a ligação dupla do carbono C2 presente nos compostos (**23a–e**) pode ser endocíclica ou exocíclica em relação ao heterociclo (**Figura 31**).

Na RMN de ^1H dos compostos (**23a–e**), o deslocamento químico do N–H varia entre 12.05–12.35 ppm (em DMSO- d_6). Já nas tiossemicarbazonas (**Int-1-3**), o deslocamento químico de prótons hidrazínicos varia entre 10.29–10.66 ppm. Já os dados da literatura para prótons amídicos de lactamas, 4-tiazolinonas e tiazolidina-2,4-dionas mostram o deslocamento químico na faixa entre 11.4–12.3 ppm ^[100, 101]. Diante destes relatos, nós podemos sugerir que o sinal de N–H nos compostos (**23a–e**) não é característico de prótons hidrazínicos, mas sim característico de prótons amídicos típico de lactamas (**23e**, **forma I**).

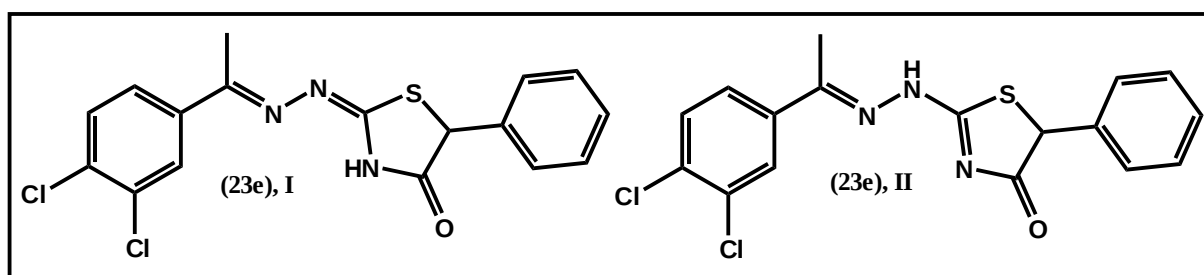
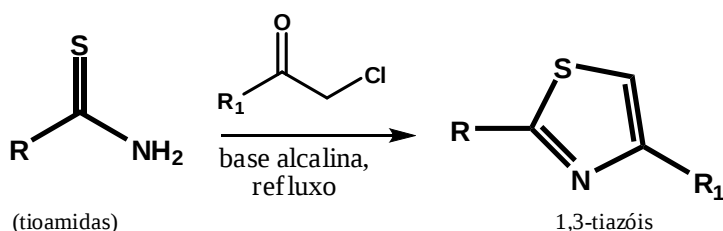


Figura 31: Posição da ligação C=N no carbono C2 do composto (**23e**).

Para uma atribuição inequívoca desta ligação, nós tentamos obter cristais dos compostos (**23a–e**) apropriados para a difração de raios-X, porém nós não obtivemos sucesso.

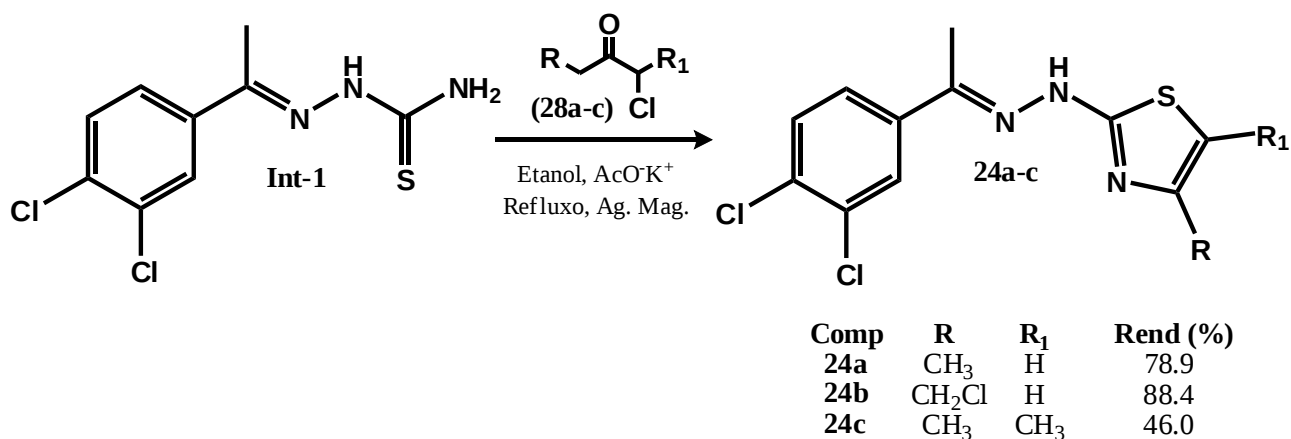
4.2.2 Síntese dos aril-1,3-tiazóis (24a-v)

Compostos do tipo aril-1,3-tiazóis são geralmente preparados através do protocolo de Hantzsch usando tioamida e uma acetona alfa-halogenada (**Esquema 3**). Esta rota fornece rendimentos satisfatórios, é de fácil execução, além de ser compatível com inumeros compostos ^[102].



Esquema 3: Método de preparação de 1,3-tiazóis, segundo protocolo de Hantzsch.

Os aril-1,3-tiazóis **24a-c** foram preparados segundo a metodologia descrita por Hantzsch, em agitação magnética, sob refluxo, com etanol como solvente e base alcalina como catalisador, em 16 à 20h de reação. Os compostos foram obtidos como sólidos cristalinos após evaporação a baixa pressão e posterior filtração, com rendimentos satisfatórios entre 46 à 88% (**Esquema 4**). As cloroacetonas foram adquiridas de fontes comerciais.

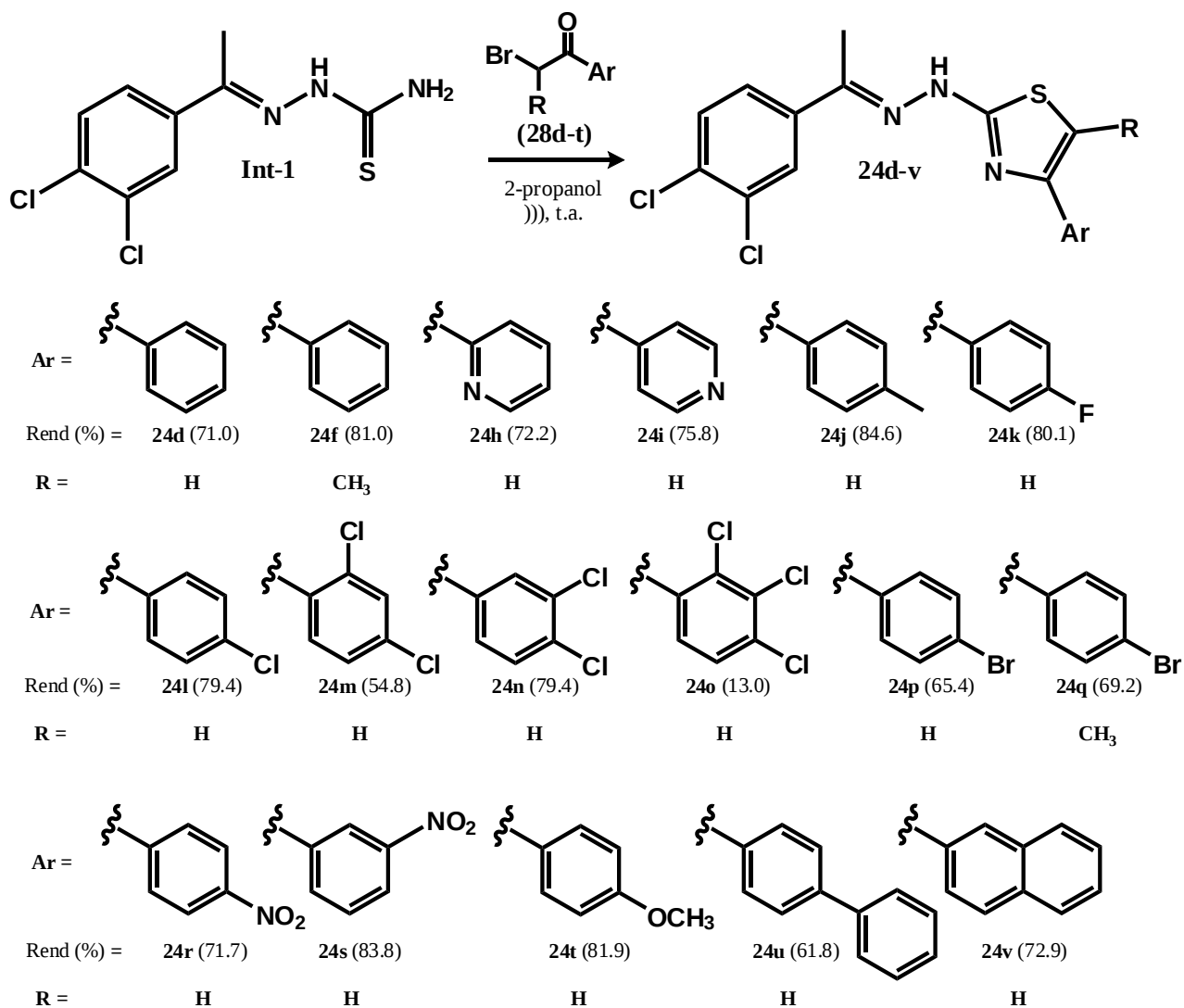


Esquema 4: Esquema de síntese dos 1,3-tiazóis **24a-c**

Para o restante da série de 1,3-tiazóis, devido a experiência previa do nosso grupo de pesquisa ^[27] e a relatos de Li e col. ^[103], a síntese da série de aril-1,3-tiazóis (**24d-v**) foi conduzida em um banho de ultrassom (40 MHz, 30-120 min), com 2-propanol como solvente, a temperatura ambiente. Pois nessas condições a reações procediam mais rapidamente e com rendimentos semelhantes aos do método de

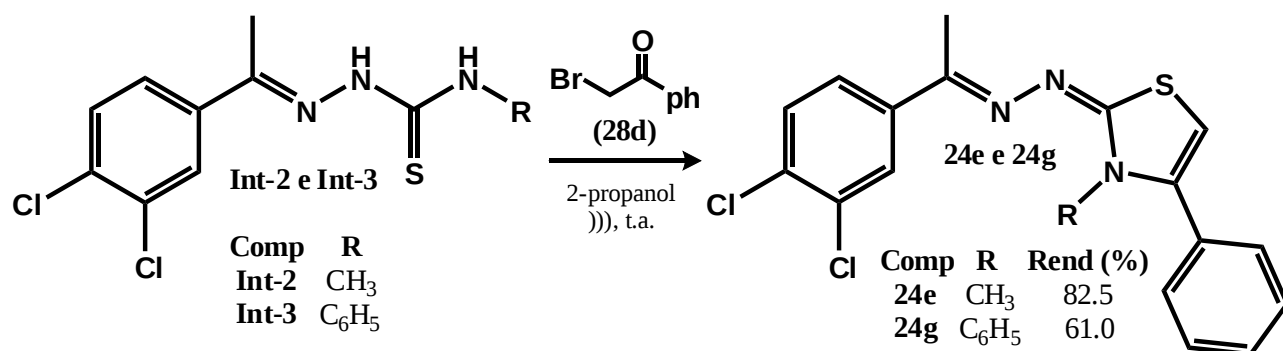
Hantzsch. As 2-bromoacetofenonas utilizadas foram adquiridas de fontes comerciais (**Esquema 5**).

Nós observamos uma mistura reacional aparentemente homogênea após cerca de 2 minutos de sonicação. Ao longo da reação, o produto reacional precipita, sendo necessário apenas uma filtração para coletar o produto ao final da reação. Os compostos foram isolados como sólidos cristalinos com rendimentos entre 54.8 à 84.6% (**Esquema 5**).



Esquema 5: Esquema de síntese dos 1,3-tiazóis (**24d-v**).

Para investigar o efeito de substituintes inseridos na posição N2 para a atividade farmacológica, nós preparamos os aril-1,3-tiazóis (**24e**) e (**24g**) (**esquema 6**). Estes dois compostos foram preparados da mesma maneira que os compostos (**24d-v**).



Esquema 6: Esquema de síntese dos 1,3-tiazóis **24e** e **24g**.

As estruturas dos aril-1,3-tiazóis (**24a–v**) foram confirmadas por IV, RMN (¹H, ¹³C e DEPT quando necessário) e EMAR. A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos compostos (**24a–v**) permitiu evidenciar os sinais referentes ao metino localizado na posição C5 no anel heterocíclico, sinal diagnóstico para esta classe de compostos. Na RMN de ¹³C, o carbono referente a este metino é de fácil localização, tendo $\delta = 101\text{--}117$ ppm. Nos espectros de IV, a presença de banda referentes as ligações imínicas, bem como a ausência de absorção na região de carbonilas, que também são sugestivos da formação dos compostos (**24a–v**).

Através da análise espectroscópica na região do infravermelho foi possível constatar as principais bandas de absorção (**Figura 32**). A frequência de 3089.00 cm⁻¹ sugere a deformação axial C-H. Em 1614 e 1565 cm⁻¹ são caracterizados estiramentos de imida cíclica, e em 1534 cm⁻¹ o estiramento C=N.

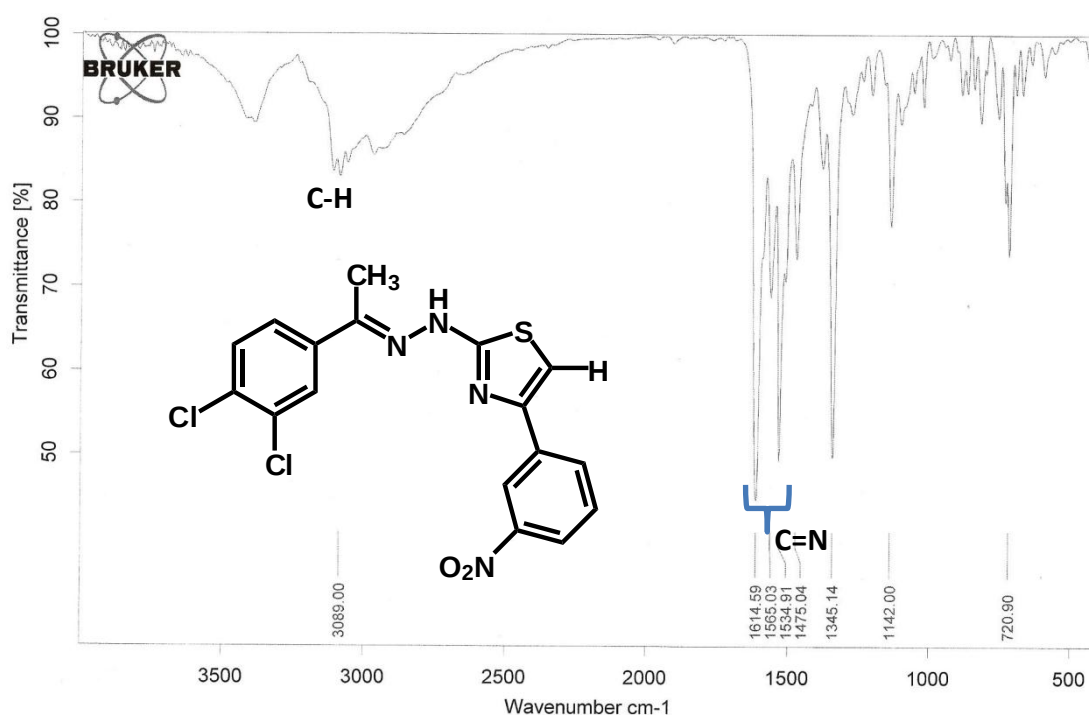


Figura 32: Exemplo de espectro de IV, série **24a–v** (composto **24s**).

A **Figura 33** apresenta um exemplo de espectro de RMN ^1H para série **24a-v**, onde foi constatada a presença de um singlete em 2.32, integrando para três hidrogênios, referente ao único grupo metila da molécula. Em 7.69 ppm, observamos um multiplete integrando para cinco hidrogênios aromáticos, um desses é o hidrogênio da posição 5 do anel tiazol, e os outros quatro hidrogênios correspondem ao anel aromático nitrado na posição meta. Em 7.91, observamos um dubleto integrando para um hidrogênio, correspondente ao hidrogênio da posição 5 do anel 3,4-diclorobenzil. Em 8.13 ppm, identificamos um duplodubleto integrando para um hidrogênio, correspondendo ao hidrogênio da posição 6 do anel 3,4-diclorobenzil. Em 8.30 ppm, identificamos um dubleto integrando para um hidrogênio, correspondendo ao hidrogênio da posição 2 do anel 3,4-diclorobenzil. E por fim, em 10.51 ppm, observamos um singlete largo integrando para um hidrogênio, correspondendo ao hidrogênio hidrazínico.

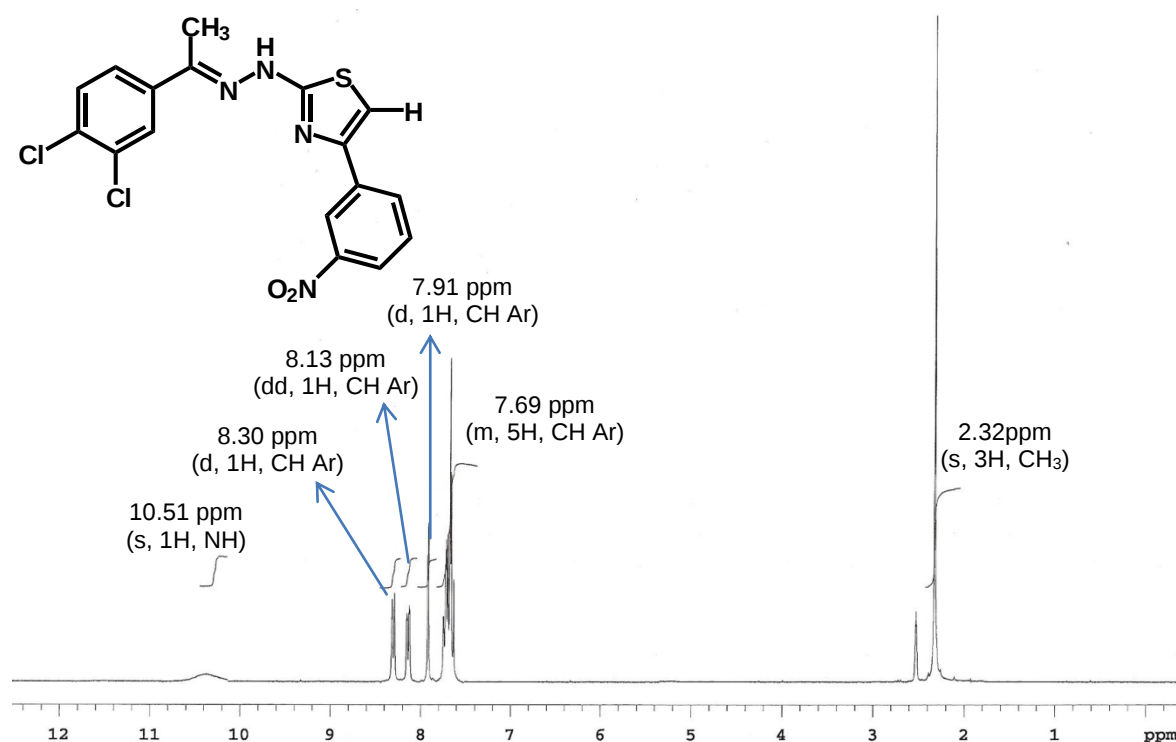


Figura 33: Exemplo de espectro de hidrogênio da série **24a-v** (composto **24s**).

Outra técnica utilizada foi a ressonância magnética nuclear de carbono 13. Analisando o espectro do **composto 24s** (**Figura 34**), observamos: o sinal de carbono em 14.2 ppm confirma a presença da única metila do composto. O sinal de carbono diagnóstico de tiazóis, o CH da posição 5 aparece em 107.5 ppm. Em

120.4, 122.4, 126.0, 127.6, 130.6, 130.9 e 131.5 ppm aparecem os carbonos aromáticos (CH). Em 131.7, 131.9, 136.6, 138.8 e 144.5 ppm aparecem os carbonos aromáticos quaternários. Em 148.6 ppm identificamos o C=N ligado a metila. E em 170.1 ppm identificamos o C=N do anel tiazol.

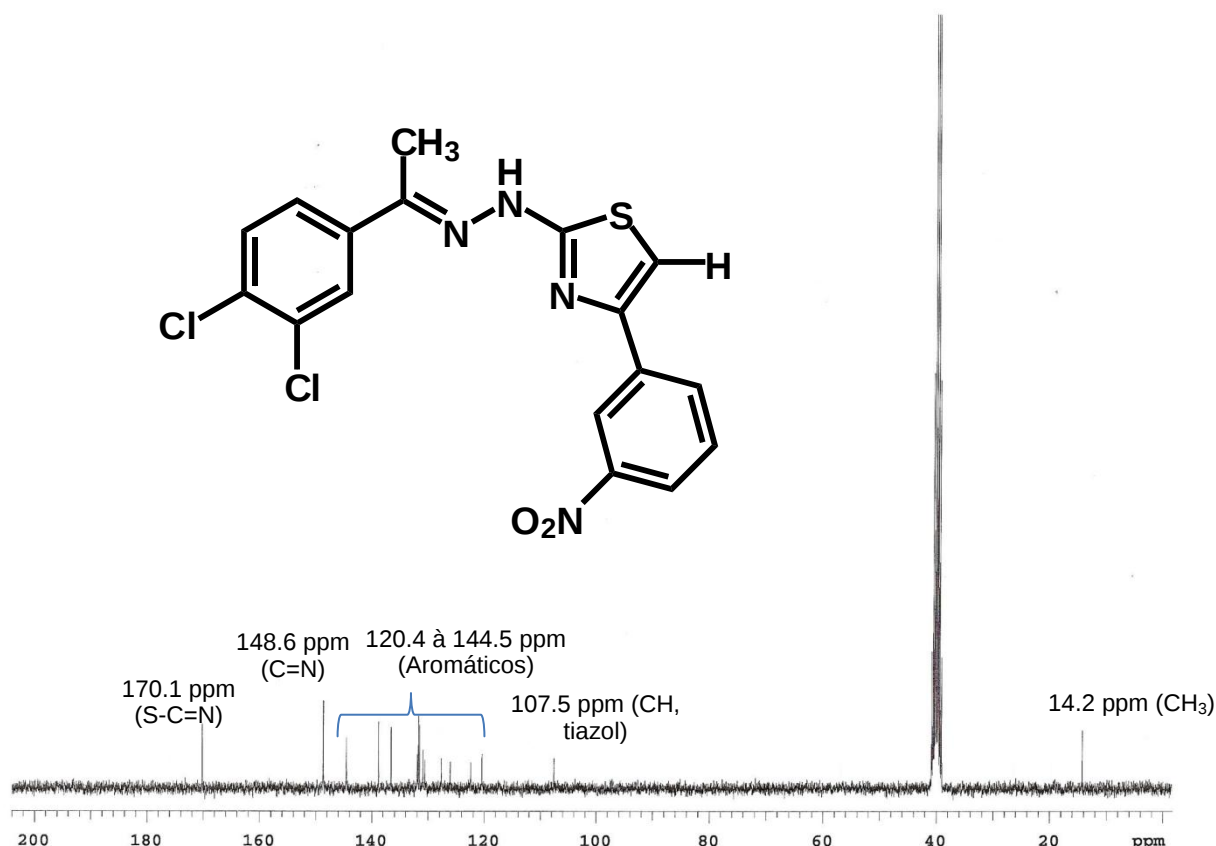


Figura 34: Exemplo de espectro de RMN de ^{13}C da série **24a-v** (composto **24s**).

Outra característica estrutural importante desses compostos é a posição da ligação dupla envolvendo o carbono C2 do anel heterociclo. Dependendo do tautomerismo imino-lactama, a ligação dupla do carbono C2 presente nos compostos (**24a-v**) pode ser endocíclica ou exocíclica em relação ao heterociclo (**Figura 35**).

Na RMN de ^1H dos compostos (**24a-v**), o deslocamento químico do N-H varia entre 10.5–11.5 ppm (em DMSO- d_6). Já nas tiossemicarbazonas (**Int-1-3**), o deslocamento químico de prótons hidrazínicos varia entre 10.29–10.66 ppm. Já os dados da literatura para prótons amídicos de lactamas, 4-tiazolinonas e tiazolidina-2,4-dionas mostram o deslocamento químico na faixa entre 11.4–12.3 ppm ^[100, 101]. Diante destes relatos, nós podemos sugerir que o sinal de N-H nos compostos (**24a-v**)

v) não é característico prótons amídicos típico de lactamas como para série (23a-o), mas sim de prótons hidrazínicos (24s, forma I).

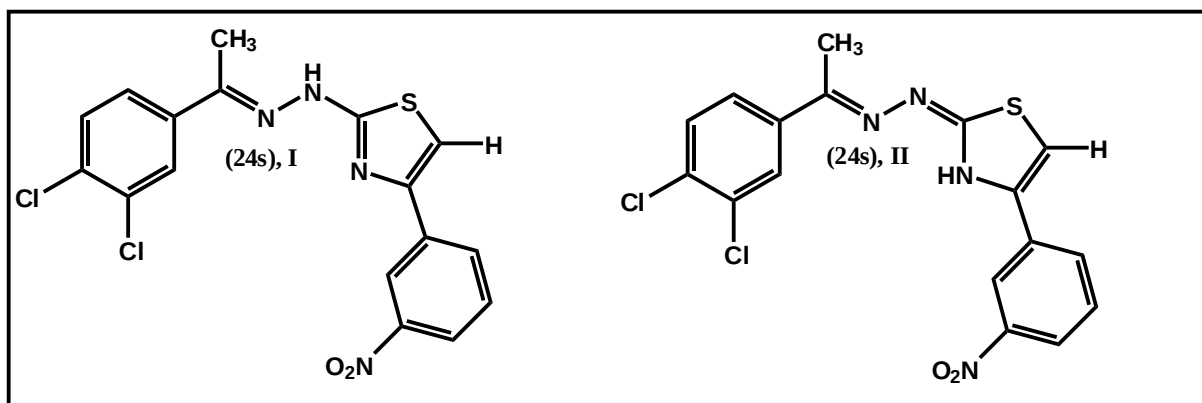


Figura 35: Posição da ligação C=N no carbono C2 do composto (24s).

Para uma atribuição inequívoca desta ligação, nós tentamos obter cristais dos compostos (23a–e) apropriados para a difração de raios-X, porém nós não obtivemos sucesso.

4.3 Avaliação farmacológica

As aril-4-tiazolinonas (**23a–o**) e os aril-1,3-tiazóis (**24a–v**) foram inicialmente avaliados, *in vitro*, quanto as propriedades tripanocidas em modelos experimentais frente às formas evolutivas tripomastigotas das cepas Y do *T. cruzi*. Nestes ensaios, os valores de CI_{50} (μM) foram calculados.

Nesses ensaios com tripomastigotas, a forma evolutiva infectante em mamíferos, o valor da CI_{50} reflete o efeito do composto em reduzir a viabilidade celular do parasita quando comparado com o controle negativo. Neste ensaio, os compostos (**23a–o**) e (**24a–v**) foram incubados na presença de tripomastigotas da cepa Y por vinte e quatro horas.

Para determinar a seletividade, os compostos (**23a–o**) e (**24a–v**) foram testados em ensaios com células de mamíferos. O efeito na viabilidade celular (toxicidade) destes compostos em **macrófagos J774** de camundongos foi avaliado. Como este ensaio é de viabilidade celular, os macrófagos foram incubados na presença dos compostos (**23a–o**) e (**24a–v**) por setenta e duas horas. Os valores de DL_{50} (em μM) foram determinados.

Para a triagem dos compostos tripanocidas mais potentes, os valores de CI_{50} foram comparados com o fármaco Bdz (**1**). Compostos com valores de CI_{50} igual ou menor que o Bdz (**1**) foram selecionados para a avaliação em ensaios com amastigotas do *T. cruzi*, assim como a determinação do índice de seletividade ($IS = DL_{50} \text{ células mamíferos} / CI_{50} \text{ amastigotas}$).

Os compostos selecionados para a avaliação com amastigotas foram testados no modelo de desenvolvimento da infecção, onde macrófagos de camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com tripomastigotas da cepa Y. Após infecção, os compostos foram adicionados na cultura celular e incubados por quatro dias. Neste modelo, o controle negativo apresenta uma taxa de macrófagos infectados elevada, e como consequência do desenvolvimento da infecção, o número de amastigotas intracelulares é alto ^[104]. Portanto, a eficácia de um composto neste modelo se reflete na capacidade em reduzir a diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, interrompendo o curso da infecção. Primeiro foi determinado o percentual de inibição da diferenciação, posteriormente os valores de CI_{50} serão calculados tendo como valor de referência a CI_{50} do Bdz (**1**).

Com o objetivo de identificar o mecanismo de ação dos compostos (**23a–o**) e (**24a–v**) no *T. cruzi*, a inibição da atividade catalítica da cruzaina pelos compostos está sendo determinada.

4.3.1 Avaliação farmacológica das aril-4-tiazolinonas (**23a–o**)

4.3.1.1 Avaliação *in vitro* das propriedades tripanocidas

A série (**23a–o**) foi planejada através do uso do grupo 3,4-diclorobenzil, previamente descrito numa classe de inibidores potentes da cruzaina ^[17] em combinação com o grupo 4-tiazolinona (**22**) previamente explorado pelo nosso grupo de pesquisas. A partir deste planejamento, seguido pela combinação de substituintes nas posições N3 e C5, obtivemos os compostos (**23a–o**).

Estes compostos foram inicialmente testados:

- (a) frente a tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, com determinação dos valores de CI_{50} em μM . O benznidazol (Bdz, **1**) foi utilizado como fármaco de referência.
- (b) determinação da toxicidade celular em macrófagos J774 isolados de camundongos, com determinação da DL_{50} expresso em μM .

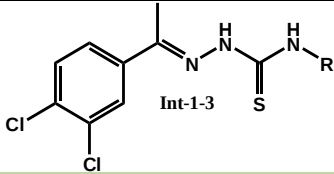
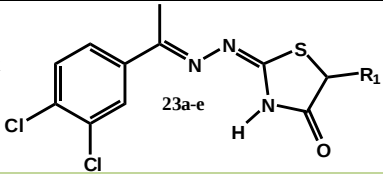
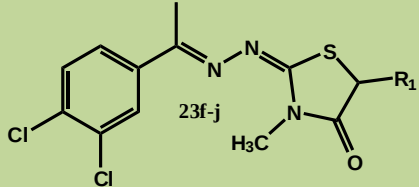
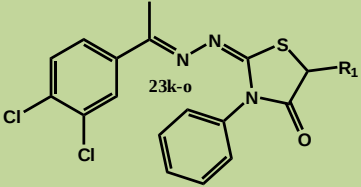
Com finalidade de comparação da atividade farmacológica, as aril-tiossemicarbazonas (**Int-1-3**) também foram testadas frente ao *T. cruzi* e a células de mamíferos. A **Tabela 3** apresenta os resultados da avaliação farmacológica *in vitro* das propriedades tripanocidas e da toxicidade em **macrófagos J774** para as aril-tiossemicarbazonas (**Int-1-3**) e aril-4-tiazolinonas (**23a–o**).

Primeiramente, podemos analisar a toxicidade dos compostos (**23a–o**) para macrófagos J774. A violeta de genciana (inibidor de referência) apresentou toxicidade elevada, afetando severamente a viabilidade celular dos macrófagos em concentrações de $0.45 \mu M$. Já os compostos (**23a–o**) foram significativamente menos tóxicos que a violeta de genciana. O composto **23m** foi o mais tóxico da série (**23a–o**), apresentou toxicidade em concentrações de $23.33 \mu M$ frente aos macrófagos J774, cerca de 52 vezes menos tóxico que o inibidor de referência. A maioria dos compostos (**23a–o**) não afetou a viabilidade celular de esplenócitos na concentração de $100 \mu M$.

Um dado importante, é que a tiossemicarbazona **Int-1**, que apresentou toxicidade em concentrações de 13.45 μM , foi 3 vezes mais tóxica do que seu bioisótero, o composto **23a**, o qual apresentou toxicidade em concentrações de 41.68 μM . Isso corrobora com trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, onde observamos que os bioisómeros cíclicos de tiossemicarbazonas, do tipo 4-tiazolinonas são menos tóxicos frente a células de mamíferos em ensaios *in vitro*.

Uma vez que a toxicidade em macrófagos foi determinada, as propriedades tripanocidas para as formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram avaliadas.

Tabela 3: Avaliação farmacológica *in vitro* das propriedades tripanocidas e toxicidade em macrófagos, para as aril-tiossemicarbazonas (**Int-1-3**) e aril-4tiazolinonas (**23a-o**).

comp.	R ₁	tripomastigotas do <i>T. cruzi</i> CI ₅₀ (μM) ^[a]	macrófagos DL ₅₀ $\pm$ DP (μM) ^[b]	Índice de seletividade ^[c]
 Int-1-3  23a-e				
Int-1	H	8,7	13,4 $\pm$ 0,82	1,5
Int-2	Metil	10,1	>100	10
Int-3	Fenil	>50	>100	-
23a	H	>50	41,8 $\pm$ 0,74	-
23b	Metil	49,2	>100	2,0
23c	Etil	ND	76.7 $\pm$ 0,46	-
23d	Isopropil	16,9	>100	5,9
23e	Fenil	NT	NT	-
 23f-j  23k-o				
23f	H	>50	>100	-
23g	Metil	>50	>100	-
23h	Etil	48,5	>100	2,0
23i	Isopropil	>50	>100	-
23j	Fenil	NT	NT	-
23k	H	>50	>100	-
23l	Metil	4,4	26,1 $\pm$ 0,90	6
23m	Etil	3,9	23,3 $\pm$ 0,96	6
23n	Isopropil	1,7	>100	58
23o	Fenil	NT	NT	-
Bdz (1)	-	10,6	NT	-
VG	-	NT	0,45 $\pm$ 0,04	-

^{a)} Após 24 horas de incubação do parasita (cepa Y) na presença dos compostos. CI₅₀ com valores de desvio padrão < ± 10 %. ^[b] Efeitos na viabilidade celular de macrófagos após 72 h de incubação com os compostos. ^[c] Calculado através da equação (DL₅₀ macrófagos) / (CI₅₀ tripomastigotas), determinado apenas para os compostos mais potentes. VG, violeta de genciana. ND, não determinado, pois não foi possível calcular a CI₅₀. NT, composto não testado.

Comparando as propriedades tripanocidas das aril-tiossemicarbazonas (**Int-1-3**), observamos que a tiossemicarbazona sem substituinte (**Int-1**) foi equipotente ao benznidazol, o que corrobora com o observado na literatura ^[17]. Observamos também que a inserção de um grupo metila em N4 (**Int-2**) não foi prejudicial a atividade tripanocida, ao contrário, gerou um composto equipotente ao benznidazol e a tiossemicarbazona **Int-1**, com a vantagem de ser cerca de 10 vezes menos tóxico para macrófagos. Verificamos que a inserção de um grupo fenila (**Int-3**) em N4 foi deletéria para atividade tripanocida, mesmo gerando um composto menos tóxico para macrófagos.

Para série de aril-4-tiazolinonas, podemos iniciar a análise das propriedades tripanocidas comparando a tiossemicarbazona **Int-1** e o seu bioisómero cíclico **23a**. Observamos que a ciclização foi deletéria para atividade tripanocida, no entanto, gerou um composto (**23a**) cerca de 5 vezes menos tóxico do que seu bioisómero acíclico (**Int-1**). Tendo discutido isso, podemos analisar as 4-tiazolinonas comparando os compostos com substituintes nas posições N3 e C5 no anel tiazolidínico (**23b-o**) com o composto não substituído na posição 5 (**23a**).

A aril-4-tiazolinona não substituída (**23a**) apresentou Cl_{50} para tripomastigotas >50 μ M, sendo cerca de 5 vezes menos potente que o benznidazol. Observamos que o composto substituído com uma metila na posição 5 (**23b**) apresentou Cl_{50} para tripomastigotas de 49.2 μ M, verificamos que nesse caso, a inserção de grupo metila na posição 5 do heterociclo não alterou muito a atividade da molécula, mas já apresentou efeito tripanocida, isso indicou que mudanças nessa posição seriam benéficas. Seguindo essa linha, observamos que o composto (**23d**, isopropil na posição 5) foi cerca de 4 vezes mais potente que o composto (**23a**, sem substituinte), e podemos dizer que ele é equipotente ao benznidazol (**1**). Isso indica que o aumento da cadeia alquila na posição 5 do anel 4-tiazolinona é benéfica para a atividade farmacológica.

Para verificar se a inserção de substituintes na posição N3 levaria a um aumento das propriedades tripanocidas, os compostos substituídos na posição N3 (**23f-j**, *N*-metil) e (**23k-o**, *N*-fenil) foram avaliados.

Dentre as aril-4-tiazolinonas da subsérie *N*-metil (**23f-j**), o composto (**23h**, etil), com Cl_{50} para tripomastigotas de 48.5 μ M, foi o mais potente desta subsérie, sendo equipotente a aril-4-tiazolinona substituída por metil na posição 5 (**23b**). Os outros compostos da subsérie *N*-metil (**23f-j**) não apresentaram propriedades

tripanocidas significativas. Com os resultados dessa subsérie, vimos que a substituição em N3 por grupos alquilas não é benéfica.

Para as aril-4-tiazolinonas da subsérie *N*-fenil (**23k-o**), observamos que a inserção do fenil na posição N3 foi benéfico para a atividade farmacológica. Todos os compostos dessa subsérie foram mais potentes que o benznidazol (**1**), com exceção do composto sem substituinte na posição 5 (**23k**). Observamos o mesmo padrão da subsérie (**23a-e**), onde quanto maior o substituinte alquila na posição 5, maior também será a atividade farmacológica. Na subsérie (**23k-o**) tem-se CI_{50} de 4.4, 3.9 e 1.7 μM para os substituintes na posição 5 metil (**23l**), etil (**23m**) e isopropil (**23n**), respectivamente. O derivado com o substituinte isopropil em C5 (**23n**) foi o mais potente desta subsérie, ele é 5 vezes mais potente que o benznidazol e cerca de 28 vezes mais potente que o composto **23a**. A aril-4-tiazolinona (**23m**, etil) também foi mais potente que o Bdz (**1**), cerca de 2 vezes. O composto (**23l**, metil) também foi mais potente que o Bdz (**1**), cerca de 2 vezes.

Na **figura 36** fazemos a comparação estrutural e das propriedades farmacológicas, entre a tiossemicarbazona (**Int-1**) com a 4-tiazolinona (**23n**) mais potente. Podemos observar que com a ciclização e mudanças pontuais na posição N3 (inserção de um fenil) e C5 (inserção de um isopropil) do heterociclo, além de obtermos um bioisómero cíclico cerca de 10 vezes menos tóxico nos ensaios frente a macrófagos, nos também logramos sucesso na identificação de um protótipo (**23n**) cerca de 4 vezes mais potente que seu bioisómero acíclico (**Int-1**). Cabe ressaltar que o IS para a 4-tiazolinona mais potente (**23n**) é cerca de 58, muito superior do que o observado para a tiossemicarbazona (**Int-1**), o que demonstra que esse protótipo estrutural é 58 vezes mais específico para ação sobre o parasita em relação as células do hospedeiro.

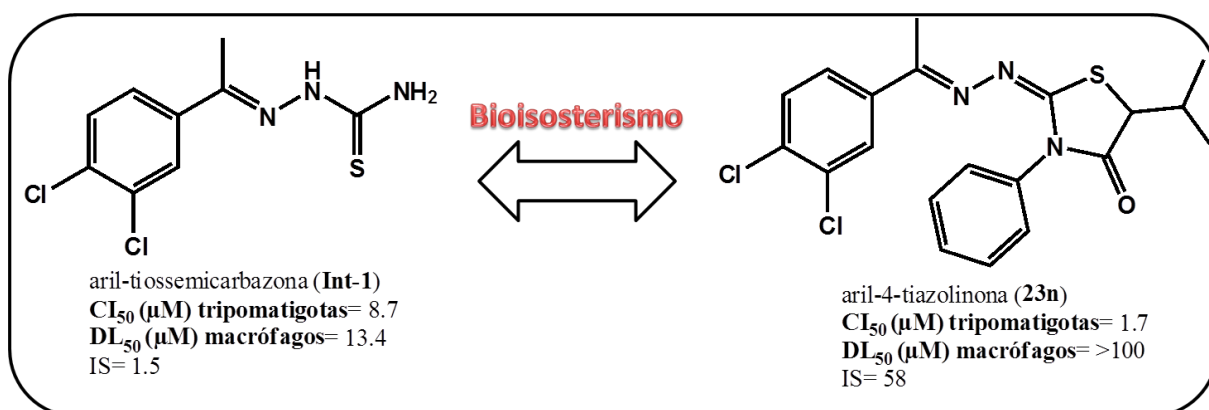


Figura 36: Comparação estrutural e das propriedades farmacológicas entre o protótipo estrutural (**Int-1**) e o derivado estrutural mais potente.

Dentre os compostos (**23a–e**, NH) e (**23f–j**, *N*-metil), identificamos apenas um composto (**23d**) com propriedades tripanocidas similares ao Bdz (**1**). Com esses dados nos parece coerente afirmar que substituintes alquilas na posição N3 das aril-4-tiazolinonas não são benéficos para as propriedades tripanocidas desse tipo de compostos.

De posse dos compostos (**23k–o**, *N*-fenil), foi possível observar correlações estrutura *versus* atividade de uma maneira muito mais clara. Isto culminou com a identificação das aril-4-tiazolinonas (**23l**, **23m** e **23n**) como o agentes tripanocidas mais potentes de toda série de compostos investigada. As aril-4-tiazolinonas (**23l**, **23m** e **23n**) foram tóxicas para tripomastigotas (CI_{50} = 4.4, 3.9 e 1.7 μ M, respectivamente) do *T. cruzi* sem afetar a viabilidade celular de macrófagos J774 (DL_{50} = 26.1, 23.3 e >100 μ M, respectivamente). As aril-4-tiazolinonas (**23l**, **23m** e **23n**) possuem um IS (DL_{50} macrófagos / CI_{50} tripomastigotas) de 6, 6 e 58, respectivamente (**Figura 37**). Sendo assim selecionadas para a avaliação em modelos *in vitro* de infecção pelo *T. cruzi*.

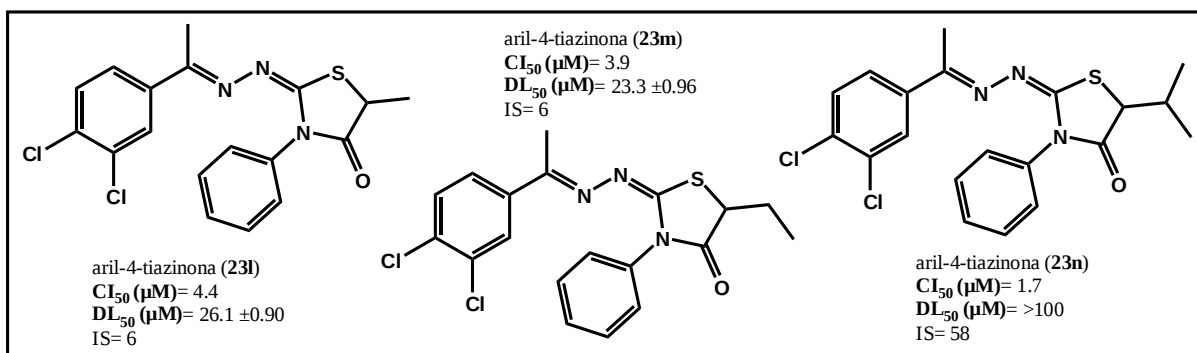


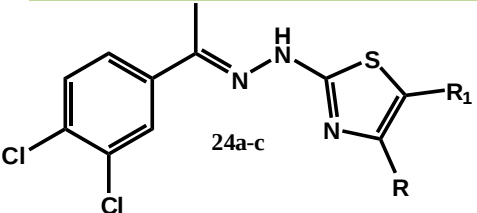
Figura 37: Estruturas e propriedades farmacológicas dos compostos líderes (**23l-m**).

4.3.2 Avaliação farmacológica dos 1,3-tiazóis (24a–v)

Os 2-imino-1,3-tiazóis (**24a–t**) foram planejados estruturalmente pela troca do anel tiazolinona pelo tiazol. Os compostos da série (**24a–t**) foram planejados de tal forma a variar o grupamento ligado a posição 4 do anel tiazol, tanto com substituinte alquilas, como com anéis aromáticos variando o substituinte em C4. Anéis fenílicos foram funcionalizados em *orto*-, *meta*- e *para*- com substituintes de contribuições estereoeletrônicas variadas: –H, –F, –Cl, –Br, –NO₂, –Me e –OMe, de modo a construir uma relação entre suas estruturas químicas e a atividade tripanocida.

Além da posição C4 (**24d–v**), preparamos tiazóis substituídos na posição N3 (**24e**, **24g**), permitindo assim comparar com as aril-4-tiazolinonas que possuem uma fenila em N3 (**23k–o**). Os resultados da avaliação farmacológica e toxicidade dos compostos são mostrados nas **Tabelas 4 e 5**.

Tabela 4: Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para os aril-1,3-tiazóis (**24a–c**).

Comp.	R	R ₁	<i>T. cruzi</i> Cl ₅₀ (μM), cepa Y tripomastigotas ^[a]	DL ₅₀ (μM) ^[b] Macrófagos J774
 24a-c				
24a	CH ₃	H	17,6	33,7 (± 0,63)
24b	CH ₂ Cl	H	NT	NT
24c	CH ₃	CH ₃	NT	NT
Bdz (1)	-	-	10,6	NT
Violeta de Genciana	-	-	NT	0,4 (± 0,04)

^[a] Após 24 horas de incubação na presença dos compostos, Cl₅₀ com valores de desvio padrão < ±10 %. ^[b] Maior concentração atóxica (sem efeitos na viabilidade celular). Valores determinados após 72 horas de incubação na presença dos compostos. ^[c] ND, não determinado, pois não foi possível calcular a Cl₅₀. NT, composto não testado.

Com relação a toxicidade dos compostos (**24a–v**) para macrófagos J774 de camundongos, apenas três compostos (**24a**, **24d** e **24r**) foram tóxicos em concentrações menores que 100 μM. O restante dos tiazóis não afetou a viabilidade celular de macrófagos na concentração de 100 μM. O composto mais tóxico (**24r**) foi 40 vezes menos tóxico do que o inibidor de referência.

Tabela 5: Avaliação farmacológica, *in vitro*, das propriedades tripanocidas e toxicidade em células de mamíferos para os aril-1,3-tiazóis (**24d-t**).

Comp.	Ar/R	R ₁	<i>T. cruzi</i> Cl ₅₀ (μM), cepa Y tripomastigotas ^[a]	DL ₅₀ (μM) ^[b] Macrófagos J774
-------	------	----------------	--	--

Chemical structure of compounds 24d-t: A 1,3-thiazole ring with an Ar group at position 2, an R₁ group at position 4, and a 2,4-dichlorophenylhydrazone group at position 5.

24d	Ph	H	>50	87,9 (± 1,4)
24f	Ph	CH ₃	10,0	>100
24h	2-Py	H	NT	NT
24i	4-Py	H	NT	NT
24j	4-CH ₃ Ph	H	NT	NT
24k	4-FPh	H	49,9	>100
24l	4-ClPh	H	>50	>100
24m	2,4-diClPh	H	>50	>100
24n	3,4-diClPh	H	>50	>100
24o	2,3,4-triClPh	H	NT	NT
24p	4-BrPh	H	>50	>100
24q	4-BrPh	CH ₃	19,4	>100
24r	4-NO ₂ Ph	H	>50	18,2 (± 1.9)
24s	3-NO ₂ Ph	H	>50	>100
24t	4-OCH ₃ Ph	H	15,9	>100
24u	4-PhPh	H	NT	NT-
24v	2-Naftil	H	>50	>100

Chemical structure of compounds 24e and 24g: A 1,3-thiazole ring with a Ph group at position 2, an R₁ group at position 4, and a 2,4-dichlorophenylhydrazone group at position 5. The thiazole ring also has an R group at position 5.

24e	CH ₃	H	NT	NT
24g	Ph	H	NT	NT
Bdz	-	-	10,6	NT
Violeta de Genciana	-	-	NT	0,4 (± 0,04)

^[a] Após 24 horas de incubação na presença dos compostos, Cl₅₀ com valores de desvio padrão < ±10 %. ^[b] Maior concentração atóxica (sem efeitos na viabilidade celular). Valores determinados após 72 horas de incubação na presença dos compostos. ^[c] ND, não determinado, pois não foi possível calcular a Cl₅₀. NT, composto não testado.

O composto **24a** apresentou propriedade tripanocida similar a do benznidazol, ele foi um dos mais potentes da série, que mostra que substituição de grupos alquila na posição 4 do anel tiazol são benéficas a atividade tripanocida, e devem ser mais exploradas por nosso grupo de pesquisa.

Em comparação com o composto não substituído no anel fenílico (**24d**) que foi inativo, a inserção de uma metila na posição 5 do anel tiazol (**composto 24f**), incrementou bastante a atividade farmacológica, dando origem a um composto (**24f**, $Cl_{50}=10.0\ \mu M$) equipotente ao benznidazol.

O composto mono-para-substituído com OCH_3 (**24t**, $Cl_{50}=15.9\ \mu M$) também foi equipotente ao benznidazol. Enquanto que nesta mesma posição, a substituição por flúor (**24k**), cloro (**24l**) ou bromo (**24p**) foi deletéria para atividade tripanocida. A substituição por dicloro nas posições 2,4- (**24m**) e 3,4- (**24n**) também não foi benéfica para a atividade tripanocida.

Interessante ressaltar que o composto (**24q**, $Cl_{50}=19.4\ \mu M$) mono-para-bromo-substituído, acrescentado de uma substituição por uma metila na posição 5 do anel tiazol apresentou atividade tripanocida semelhante a do benznidazol, o que corrobora com os resultados do composto **24f** e com a série das 4-tiazolinonas, onde inserção de substituintes alquilas nas posição 5 do heterociclo incrementavam a atividade farmacológica.

A troca da fenila (**24a**) pela naftila (**24v**) não resultou em aumento da atividade tripanocida. A inserção de grupos nitro na posição meta (**24s**) e para (**24r**), também não foi benéfica para atividade farmacológica.

A **figura 38** demonstra uma comparação estrutural e das atividade farmacológicas, entre os bioisósteros mais ativos das respectivas classes de compostos, tiossemicarbazonas (**Int-1**), 4-tiazolinonas (**23n**) e 1,3-tiazóis (**24f**). Observamos que a ciclização, tanto para tiazolinonas como para tiazóis, foi benéfica do ponto de vista de toxicidade. Os bioisósteros cíclicos apresentaram menor toxicidade frente a macrófagos que seu bioisótero acíclico (tiossemicarbazona **Int-1**). O tiazol **24f** foi equipotente a tiossemicarbazona protótipo **Int-1**, enquanto que a tiazolinona **23n** apresentou propriedades tripanocidas incrementadas, cerca de 4 vezes mais potente que seus bioisósteros.

É importante ressaltar que o IS para o derivado tiazólico **24f** é cerca de 10, maior do que observado para a tiossemicarbazona **Int-1**, o que indica maior seletividade frente ao parasita do que para células do hospedeiro.

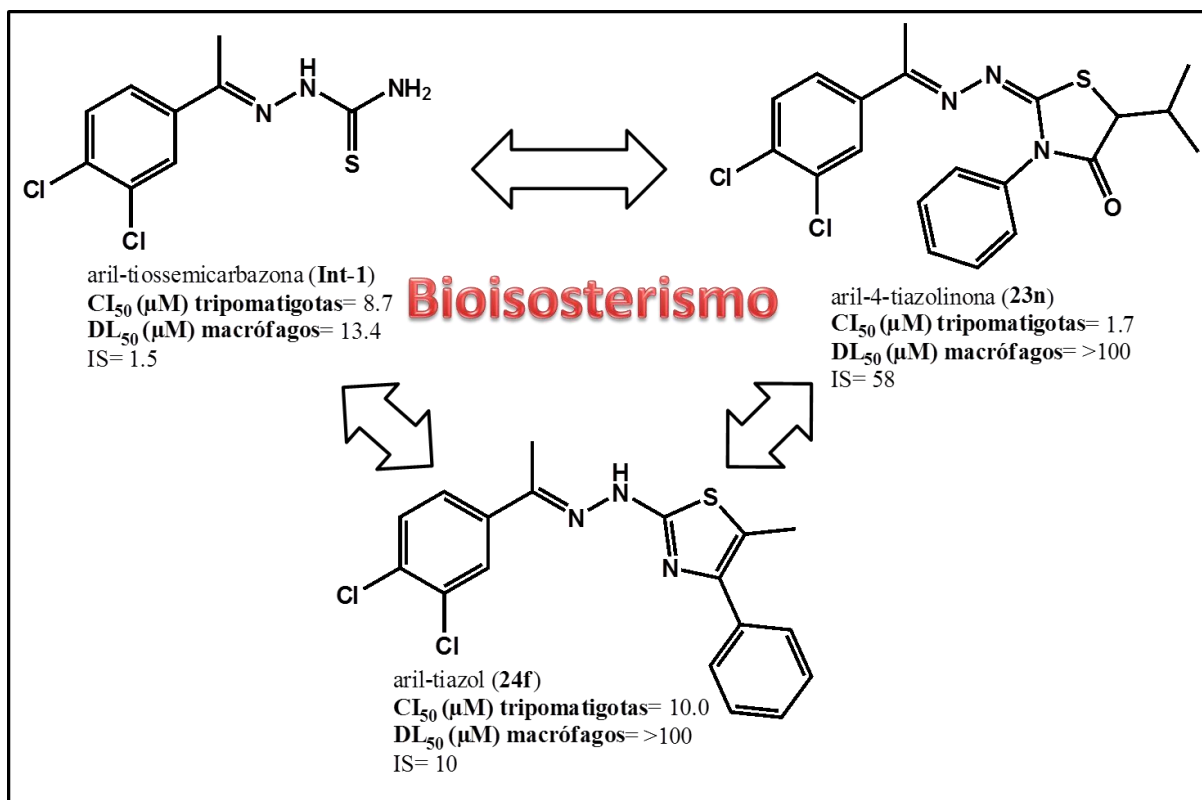


Figura 38: Comparação estrutural e das propriedades farmacológicas dos bioisósteros, tiossemicarbazona (**Int-1**), tiazolinona (**23n**) e tiazol (**24f**).

Os resultados obtidos para a série **24a-v** corroboram com o relato de Caputto e colaboradores, de que tiazóis são compostos com potente atividade tripanocida e com baixa toxicidade para células de mamíferos ^[15, 16].

Quando comparamos nosso tiazol mais potente **24f** aos tiazóis mais potentes descritos anteriormente por Caputto, observamos que nosso composto apresentou propriedades tripanocidas incrementadas (CI_{50} =10.0 μM), cerca de duas vezes maior do que o relatado por eles (CI_{50} =17.2 μM , tiazol **29**; CI_{50} =20.0 μM , tiazol **30**; CI_{50} =19.7 μM , tiazol **31**). O IS observado para o composto **24f** também foi superior ao encontrado na literatura (**Figura 39**).

Finalmente, cabe ressaltar que, embora o alvo molecular envolvido nas propriedades tripanocidas dos aril-1,3-tiazóis (**24a-v**) não seja conhecido, o perfil das propriedades farmacológicas identificadas são relevantes. Durante a triagem desta série, identificamos os compostos (**24a**), (**24f**), (**24q**) e (**24t**) como agentes tripanocidas equipotentes com o Bdz (**1**).

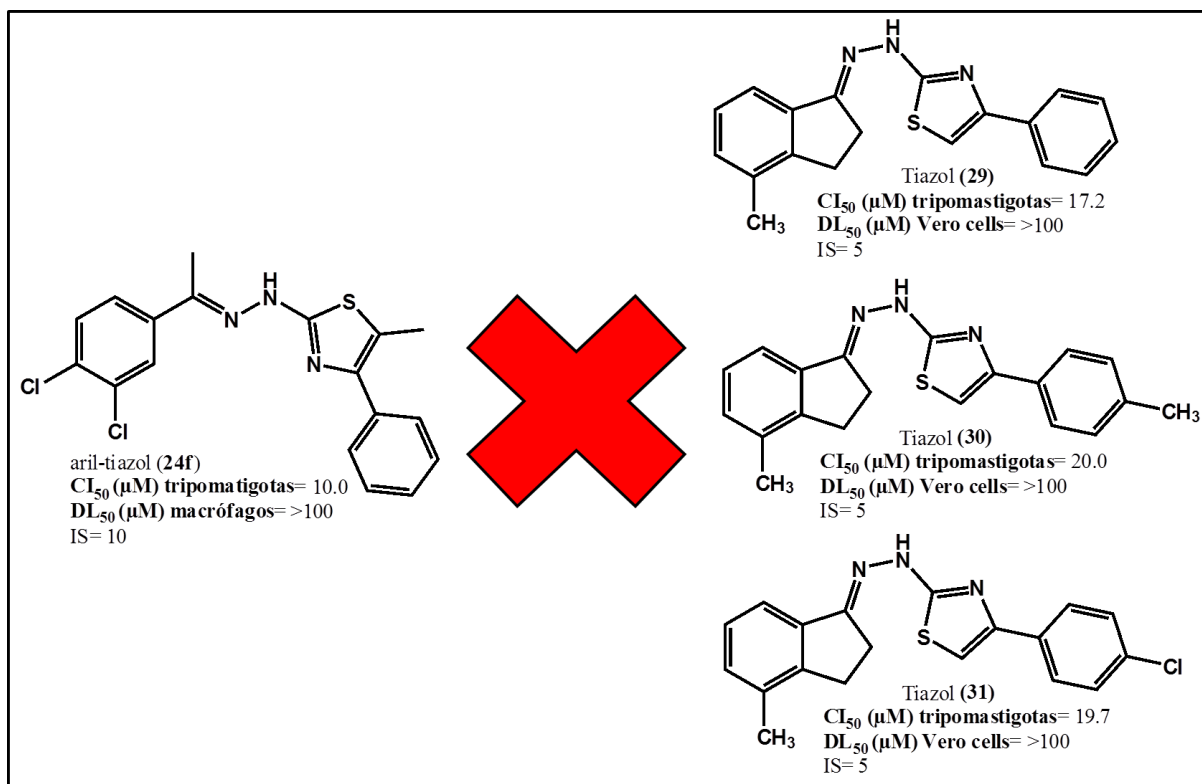


Figura 39: Comparação das atividades biológicas do composto **24f** com o observado na literatura.

4.3.3 Triagem dos compostos em ensaios, *in vitro*, de infecção pelo *T. cruzi*

Os compostos com CI_{50} em tripomastigotas igual ou menor que o Bdz (**1**) foram selecionados para a avaliação em ensaios, *in vitro*, de infecção pelo *T. cruzi*, bem como a determinação do índice de seletividade ($IS = CI_{50}$ células mamíferos / CI_{50} amastigotas). Todos os compostos selecionados pertencem a série das aril-4-tiazolinonas (**23a–o**), os compostos (**23l**), (**23m**) e (**23n**) foram selecionados.

Para os ensaios de infecção, macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com tripomastigotas da cepa Y numa proporção de 1/10 (macrófagos / tripomastigotas). Após infecção, os compostos selecionados foram adicionados ao meio celular e incubados por quatro dias (**gráfico 1**).

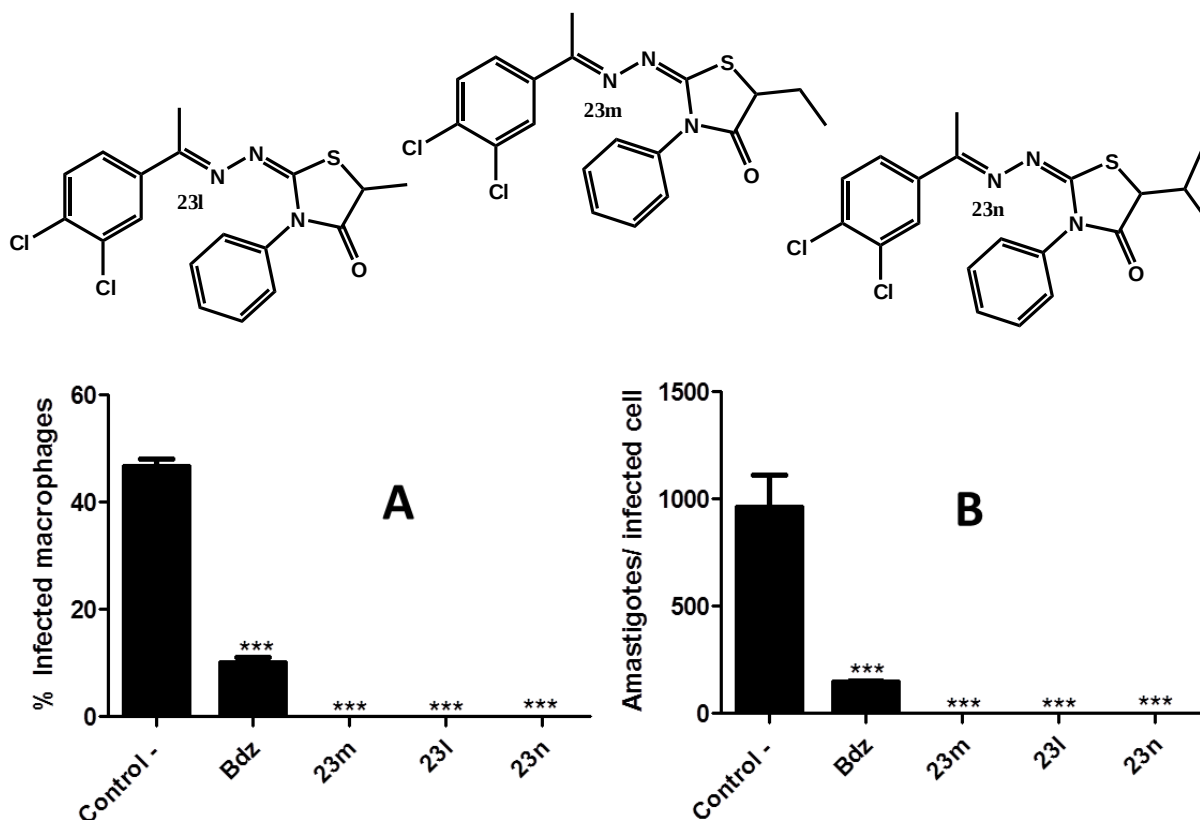


Gráfico 1: **A)** Porcentagem de macrófagos infectados. **B)** Proporção de amastigotas intracelulares. Bdz (**1**) é o inibidor de referência. Compostos foram adicionados na concentração de 50 μ M, em triplicatas. Dois experimentos independentes foram realizados, valores são relativos a um único experimento. Desvio padrão expresso em barras. Significância dos valores: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Analisando o **gráfico 1 (A)** vemos que os compostos **24l-n** foram capazes de inibir em 100% a infecção em macrófagos, impedindo assim a diferenciação de

tripomastigotas em amastigotas, os compostos apresentaram inibição da infecção superior ao benznidazol. Com a análise do **gráfico 1 (B)** observamos que o tratamento com os compostos **24I-n** erradicou o número de amastigotas, ou seja, não foi encontrada nenhuma amastigota, o que indica a inibição da infecção *in vitro*.

Esses dados são relevantes, pois se compararmos com o fármaco referência para o tratamento da doença de Chagas (Bdz **1**), nossos compostos inibiram em 100% a infecção, superior ao observado para o Bdz (**1**). O que indica que essas tiazolinonas são protótipos a fármacos antichagásicos.

4.3.4 Inibição da Atividade Catalítica da Cruzaína

As séries (**23a-o**) e (**24a-v**) foram planejadas através do uso do grupamento 3,4-diclorobezil, previamente descrito numa classe de inibidores potentes da cruzaína^[17] em combinação com os grupamentos 4-tiazolinona e 1,3-tiazol previamente explorados pelo nosso grupo de pesquisas. A partir deste planejamento, seguido pela combinação de substituintes localizados nas posições N3, C4 e C5 resultaram na composição dos compostos (**23a-o**) e (**24a-v**). O protocolo experimental descrito por Ferreira e col.^[105] foi utilizado neste ensaio com a enzima. Todos os compostos foram testados na concentração de 10 µM.

A **figura 40** apresenta os dados de inibição da atividade catalítica da cruzaína do *T. cruzi* pelas tiossemicarbazonas (**Int-1-3**).

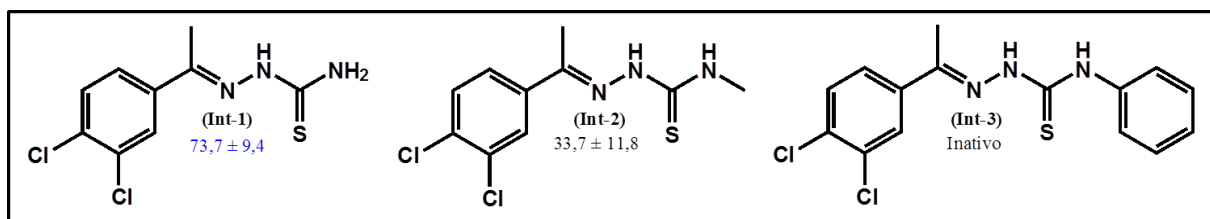


Figura 40: Inibição da enzima cruzaína do *T. cruzi* série **23a-o**. Percentual de inibição (±desvio padrão) calculado após 5 minutos de incubação com a enzima. Inativo significa que o composto não inibiu a enzima na concentração de 10 µM.

Inicia-se a análise comparando a tiossemicarbazona mais simples (**Int-1**) com os intermediários substituídos (**Int-2** e **Int-3**). O composto não substituído (**Int-1**) apresentou inibição de 73,7% frente à cruzaína. Observa-se que a inserção de uma metila em N4 foi deletéria a atividade frente à enzima, o composto não substituído apresentou baixo percentual de inibição (33,7%). A inserção de uma fenila em N4 também foi deletéria a atividade catalítica da enzima, o composto com fenil em N4 foi inativo frente à cruzaína.

Tendo discutido isso, pode-se partir para a análise das séries de compostos (**23a-o**) e (**24a-v**).

A **figura 41** apresenta os dados de inibição da atividade catalítica da cruzaína do *T. cruzi* pelas 4-tiazolinonas (**23a-o**).

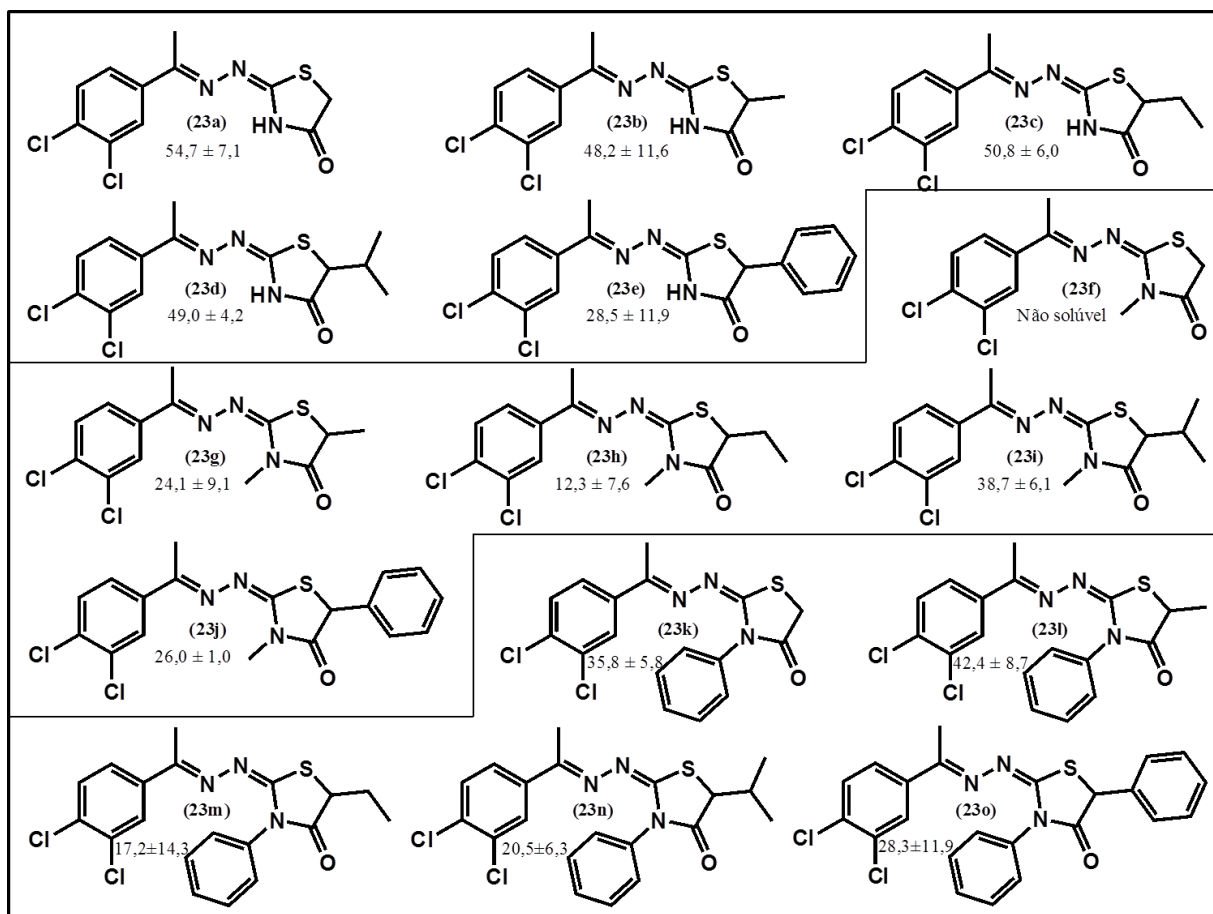


Figura 41: Inibição da enzima cruzaina do *T. cruzi* série **23a-o**. Percentual de inibição (±desvio padrão) calculado após 5 minutos de incubação com a enzima. Inativo significa que o composto não inibiu a enzima na concentração de 10 μ M.

Pode-se iniciar a análise das REA para série **23a-o** comparando a tiossemicarbazona (**Int-1**) com seu bioisótero cíclico, a 4-tiazolinona (**23a**). Observamos que a ciclização foi deletéria a atividade catalítica da enzima, enquanto a tiossemicarbazona (**Int-1**) apresentou 73,7% de inibição frente a cruzaina, o seu bioisótero cíclico exibiu 54,7% de inibição frente a enzima.

Feito isso, pode-se iniciar a discussão da série de 4-tiazolinonas (**23a-v**). Analisando os compostos com substituintes inseridos nas posições N3 e C5 no anel tiazolidínico (**23b-o**) em comparação com o composto não substituído (**23a**).

Percebe-se que modificações na posição N3 foram deletérias as propriedades inibitórias das 4-tiazolinonas na cruzaina. Os compostos substituídos em N3 tanto por metila (**23f-j**) quanto por fenila (**23k-o**) apresentaram percentual de inibição menor que seus análogos não-substituídos (**23a-e**).

Os compostos com o NH livre (**23a-e**) demonstraram os melhores percentuais de inibição na cruzaina. Observamos que o composto sem substituintes (**23a**)

apresentou melhor percentual de inibição do que os compostos substituídos em C5 (**23b-e**).

Então a série (**23a-o**) demonstrou que a ciclização dos intermediários (**Int-1-3**) é deletéria a atividade frente à cruzaina. Observa-se que nos compostos cíclicos (**23a-o**) a inserção de substituintes tanto em N3 quanto em C5 é deletéria a atividade tripanocida, tendo identificado como composto mais potente dessa série o **23a**, que apresentou 54,7% de inibição frente à cruzaina.

Tendo discutido isso, pode-se partir para a análise da série de compostos (**24a-v**).

A **figura 42** apresenta os dados de inibição da atividade catalítica da cruzaina do *T. cruzi* pelos 1,3-tiazóis (**24a-v**).

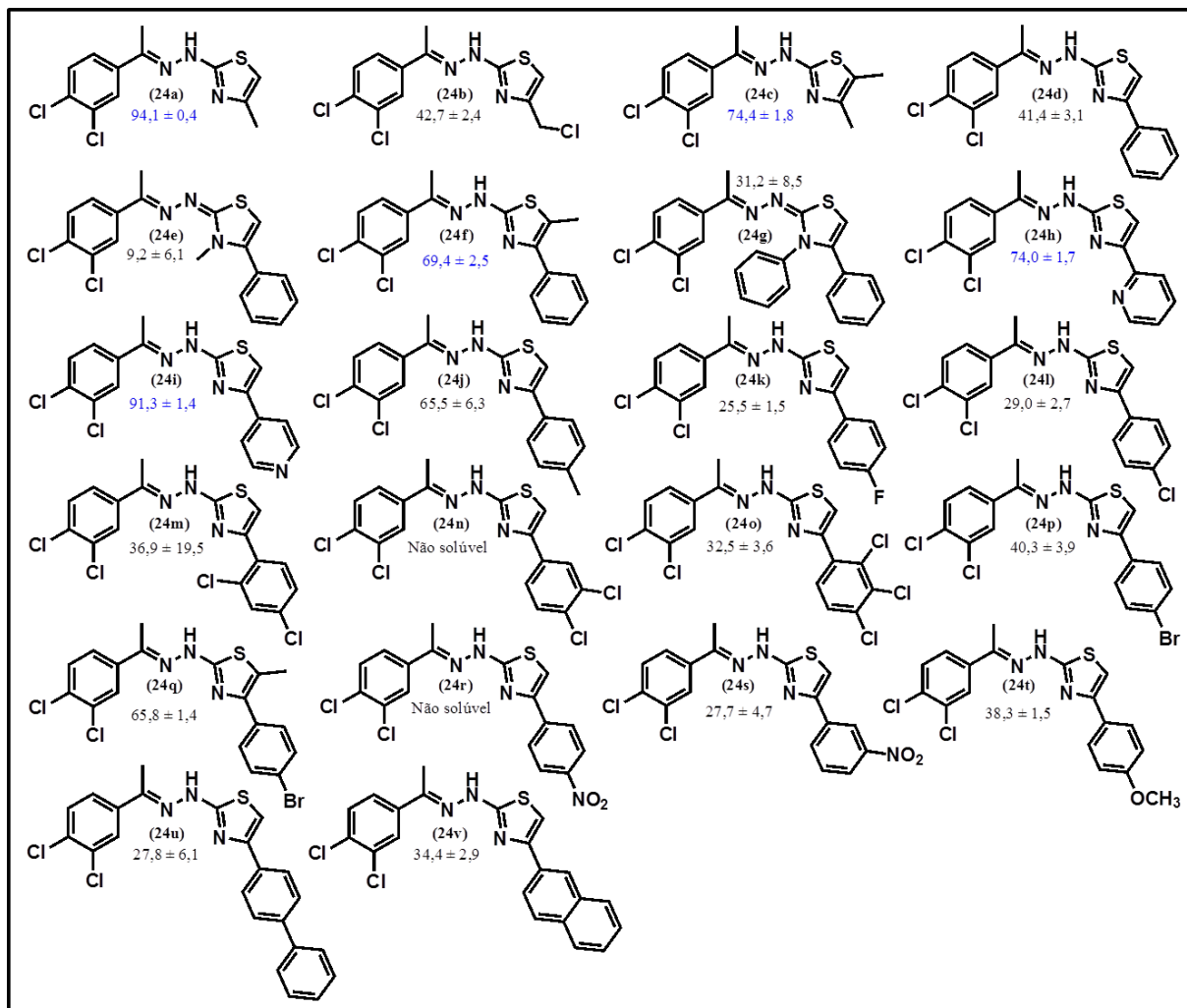


Figura 42: Inibição da enzima cruzaina do *T. cruzi* série **24a-v**. Percentual de inibição (±desvio padrão) calculado após 5 minutos de incubação com a enzima. Inativo significa que o composto não inibiu a enzima na concentração de 10 µM.

Pode-se iniciar a análise das REA da série **24a-v**, comparando o composto (**24a**) com seu bioisóstero (**23a**). Observa-se que a troca do anel tiazolinona pelo tiazol foi muito benéfica à atividade frente à enzima. O composto (**24a**) que tem como substituinte uma metila na posição C4, apresentou 94,1% de inibição frente à cruzaína, muito superior ao composto (**23a**). Feito isso, partimos para análise da série (**24a-v**).

Comparando o composto (**24a**) que possui uma metila em C4 com o (**24b**) que possui o substituinte cloro metil em C4, observa-se que a adição do cloro metil foi deletéria a atividade frente à cruzaína, enquanto o derivado com cloro metil em C4 apresentou 42,7% de inibição, o composto (**24a**) inibiu em 94,1% a atividade catalítica da enzima.

A inserção de uma metila em C5, mantendo também uma metila em C4 (composto **24c**), não foi benéfica para atividade quando comparado ao composto (**24a**). No entanto, o composto (**24c**) ainda reteve atividade, sendo um dos compostos mais ativos da série, apresentou 74,4% de inibição frente à cruzaína.

Outra modificação interessante foi a troca de substituintes alquilas por aromáticos em C4. Ao analisar o composto (**24d**) observa-se que a inserção de uma fenila em C4 não foi benéfica quando comparado aos compostos (**24a e 24c**), pois foi deletéria para atividade.

Mas a inserção de uma metila em C5 mantendo a fenila em C4 (composto **24f**) restaurou a atividade frente a cruzaína, indicando que substituições alquilas em C5 são benéficas a atividade frente a enzima.

A inserção tanto de metila quanto de fenila em N3 mantendo uma fenila em C4 (compostos **23e e 23g**), foi deletéria a atividade frente à cruzaína.

Um dado importante dessa série de compostos foi a substituição da fenila em C4 por heterocíclicos aromáticos 2- e 4-piridina (compostos **24h e 24i**), essa substituição foi muito benéfica para atividade frente a enzima, dando origem a alguns dos compostos mais potentes da série. O composto com 2-piridina em C4 (**24h**) apresentou 74,0% de inibição, enquanto que o com 4-piridina em C4 (**24i**) foi ainda melhor com 91,3% de inibição da atividade catalítica da enzima.

Observa-se que a inserção em C4 de grupos arilas mono-, bi- e tri-substituídos nas posições orto, meta e para, por metila, halogênios, grupos nitro, grupos metóxi, grupos fenil e naftil (compostos **24j-v**), não foi benéfica para atividade frente à enzima cruzaína, pois foi deletéria a atividade.

Nessa série identificou-se os compostos (**24a**, **24c**, **24f**, **24h** e **24g**) como inibidores da cruzaina tão potentes quanto a tiossemicarbazona (**Int-1**), os resultados obtidos sugerem um possível mecanismo de ação. Isto demonstra a importância de investigar a orientação das moléculas no sitio ativo da enzima, pois a diferença estrutural é mínima, com diferenças de potencialidade tripanocida evidentes, o que motiva a investigação de “*docking*” dos compostos na enzima para um melhor entendimento no mecanismo de ação.

5. Parte Experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Generalidades

Os reagentes foram adquiridos da Acros Organics, Fluka, Vetec ou Sigma-Aldrich, enquanto que os solventes foram provenientes da Vetec ou Dinâmica. Os solventes deuterados (DMSO- d_6) são da marca CIL (Tédia Brazil). Tiossemicarbazida foi adquirida pela Sigma-Aldrich. O acetato de sódio foi fundido em bico de Bunsen antes do uso.

As reações foram acompanhadas em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F₂₅₄. As placas cromatográficas foram visualizadas em uma lâmpada ultravioleta (com duplo comprimento de onda 365 ou 254nm).

As reações mediadas pela irradiação no ultrassom foram realizadas em banho de ultrassom modelo Unique EM-804 TGR usando frequência de 40 KHz (180 W). Em todas as reações no ultrassom, não houve aquecimento externo.

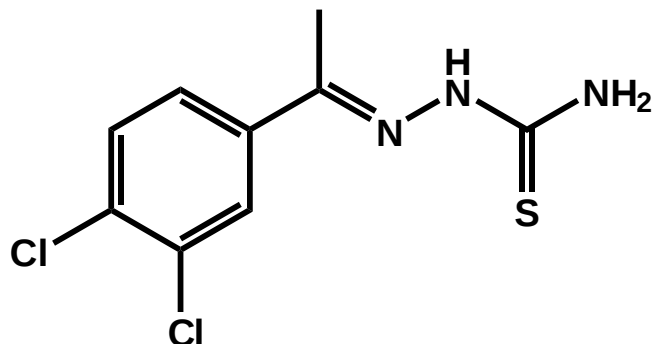
Os pontos de fusão foram medidos em capilares usando um aparelho de Thomas Hoover e os valores não foram posteriormente corrigidos. Quando não especificado pela abreviação "dec" (decomposição), os valores indicam que os produtos se fundiram sem aparente decomposição da amostra.

Para todos os compostos foram feitas as análises de RMN de ^1H e ^{13}C e quando necessário a análise bidimensional (DEPT). Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram adquiridos nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para ^1H ; 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX (300 MHz para ^1H e 75.5 MHz para o ^{13}C), usando o tetrametilsilano como padrão interno. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN ^1H foram designadas da seguinte forma: s / singleto; d / dubleto; t / tripleto; dd / duplo dubleto; q / quarteto; m / multipeto.

Para os espectros no infravermelho, utilizou-se o instrumento Bruker (Modelo IFS 66) usando pastilhas de KBr. As micro-análises para C, N, H, S foram feitas em um analisador elementar Carlo Erba (modelo EA 1110). Para os espectros de massas de alta-resolução (EMAR), usou-se a técnica de ionização por electrospray (ESI) nos modos positivos (ESI+) ou negativo (ESI-) com detecção no modo "time-of-flight" (TOF), medidos nos aparelhos LC-IT-TOF da Shimadzu.

5.2 Metodologias Sintéticas e Dados Espectroscópicos

5.2.1 1-(3,4-diclorofenil)-etilideno-tiossemicarbazida (Int-1; GT-01)



5.2.1.1 Sob agitação magnética: em um balão de 100 mL, foram adicionados 1.06 mmol (0.097 g) de tiossemicarbazida, 20 mL de etanol, 1.06 mmol (0.2 g) da 3',4'-dicloroacetofenona e 4 gotas de ácido sulfúrico. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética em refluxo (90 °C) durante 20 horas. O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado lavando-se com etanol. O produto foi recristalizado com tolueno a quente.

Cristais incolores; PF: 187-189 °C; Rend.: 0.10 g (38%).

5.2.1.2 Ultrassom: em um tubo de centrifuga, foram adicionados 1,06 mmol (0.2 g) da 3',4'-dicloroacetofenona, 1,06 mmol (0.097 g) de tiossemicarbazida, 3 mL de etanol e 5 gotas de ácido sulfúrico. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 30 minutos. Após isso, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com etanol e seco no dessecador sob vácuo. O produto foi recristalizado com tolueno a quente.

Cristais incolores; P.F.: 187-189 °C; Rend.: 0.22 g (80%); R_f 0.56 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.1.3 Análise elementar para $C_9H_9Cl_2N_3S$: Teórico: C, 41.23; H, 3.46; N, 16.03; S, 12.23. Calculado: C, 41,21; H, 3,61; N, 16,36; S, 12,78.

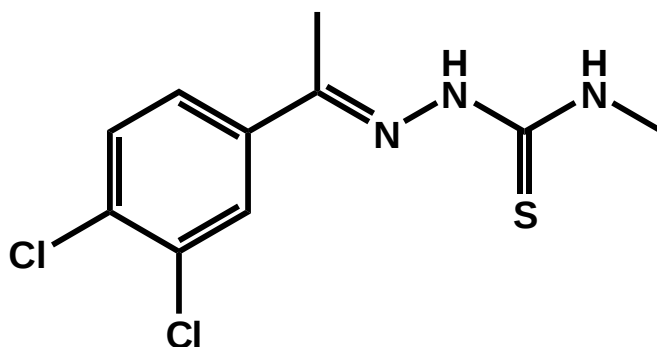
5.2.1.4 IV, principais sinais: 3427 (NH₂), 3399 (NH), 3138 (C-H), 1591 (C=N) cm⁻¹.

5.2.1.5 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.27 (s, 3H, CH₃), 7.58 (d, 1H, Ar), 7.86 (dd, 1H, Ar), 8.18 (s, 1H, NH₂), 8.26 (d, 1H, Ar), 8.36 (s, 1H, NH₂), 10.29 (s, 1H, NH). Os sinais com δ em 8.18, 8.36 e 10.29 ppm desaparecem após adição de D₂O.

5.2.1.6 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 13.8 (CH_3), 126.7 (CH , Ar), 128.2 (CH , Ar), 130.2 (CH , Ar), 131.3 (C , Ar), 131.6 (3ClC , Ar), 138.2 (4ClC , Ar), 145.312 ($\text{C}=\text{N}$), 179.0 ($\text{C}=\text{S}$).

5.2.1.7 EMAR (ESI): Calculado para $\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_3\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^+$: 259.98; encontrado 259.9565.

5.2.2 1-(3,4-diclorofenil)etilideno-4-metiltiossemicarbazida (Int-2; GT-03)



5.2.2.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.1.2**: 1.06 mmol (0.2 g) da 3',4'-dicloroacetofenona, 1.06 mmol (0.111 g) de 4-metil-3-tiossemicarbazida, 5 mL de etanol e 5 gotas de ácido sulfúrico. O produto foi recristalizado em tolueno a quente.

Cristais incolores; PF: 195-197 °C; Rend.: 0.24 g (84%); R_f = 0.7 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.2.2 Análise elementar para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{S}$: Teórico: C, 43.49; H, 4.01; N, 15.21; S, 11.61. Calculado: C, 43.34; H, 3.98; N, 15.55; S, 11.74.

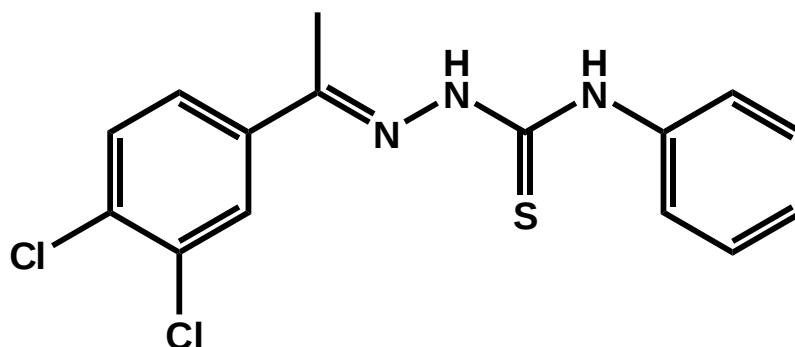
5.2.2.3 IV, principais sinais: 3343 e 3219 (NH), 1547 ($\text{C}=\text{N}$) cm^{-1} .

5.2.2.4 RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.28 (s, 3H, CH_3), 3.04 (d, 3H, $\text{N}-\text{CH}_3$, acoplamento com o $\text{N}-\text{H}$), 7.63 (d, 1H, Ar), 7.88 (dd, 1H, Ar), 8.23 (d, 1H, Ar), 8.61 (d largo, 1H, CH_3-NH), 10.33 (s, 1H, NH).

5.2.2.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 13.8 (CH_3), 31.1 ($\text{N}-\text{CH}_3$), 126.7 (CH , Ar), 128.1 (CH , Ar), 130.2 (CH , Ar), 131.3 (C , Ar), 131.5 (3ClC , Ar), 138.3 (4ClC , Ar), 145.0 ($\text{C}=\text{N}$), 178.6 ($\text{C}=\text{S}$).

5.2.2.6 EMAR (ESI): Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 276.01; encontrado 275.9475.

5.2.3 1-(3,4-diclorofenil)-etilideno-4-feniltiossemicarbazida (Int-3; GT-02)



5.2.3.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.1.2**: 1.06 mmol (0.2 g) da 3',4'-dicloroacetofenona, 1.06 mmol (0.177 g) de 4-fenil-3-tiossemicarbazida, 5 mL de etanol e 5 gotas de ácido clorídrico. O produto foi recristalizado em tolueno a quente.

Cristais incolores; PF: 200-202 °C; Rend.: 0.32 g (89%); R_f = 0.73 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.3.2 Análise elementar para $C_{15}H_{13}Cl_2N_3S$: Teórico: C, 53.26; H, 3.87; N, 12.42; S, 9.48. Calculado: C, 53.23; H, 3.84; N, 12.31; S, 9.32.

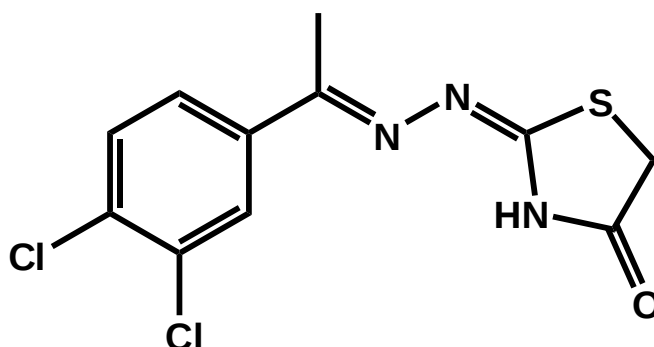
5.2.3.3 IV, principais sinais: 3309 e 3239 (NH), 3046 (C-H), 1523 (C=N) cm^{-1} .

5.2.3.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.36 (s, 3H, CH_3), 7.23 (t, 1H, Ar), 7.38 (t, 2H, Ar), 7.51 (d, 2H, Ar), 7.64 (d, 1H, Ar), 7.97 (dd, 1H, Ar), 8.34 (d, 1H, Ar), 10.18 (s, 1H, NH), 10.66 (s, 1H, ArNH).

5.2.3.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 14.2 (CH_3), 125.6 (CH, Ar), 126.5 (CH, Ar), 127.0 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 130.2 (CH, Ar), 131.3 (C, Ar), 131.8 (3CIC, Ar), 138.1 (4CIC, Ar), 139.2 (C-N, Ar), 146.3 (C=N), 177.3 (C=S).

5.2.3.6 EMAR (ESI): Calculado para $C_{15}H_{14}Cl_2N_3S$ $[M+H]^+$: 338.03; encontrado 337.9678.

5.2.4 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]tiazolidina-4-ona (23a; GT-04)



5.2.4.1 Sob agitação magnética: em um balão de 100 mL, foram adicionados 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**), 30 mL de etanol e 15.24 mmol (1.25 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento por cerca de 15 minutos, foram adicionados 5.73 mmol (0.8 g) de bromoacetato de etila e a reação foi então mantida sob refluxo (90 °C) durante 20 horas (monitorada por CCD). Após esse tempo, o precipitado formado foi separado em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavado com etanol resfriado e depois transferido para o dessecador sob vácuo. O produto foi purificado por recristalização em ciclohexano a quente.

Cristais incolores; PF: 234-236 °C; Rend.: 0.75 g (65%); R_f: 0.53 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.4.2 Análise elementar para C₁₁H₉Cl₂N₃OS: Teórico: C, 43.72; H, 3.00; N, 13.91; S, 10.61. Calculado: C, 44.00; H, 3.20; N, 13.47; S, 10.11.

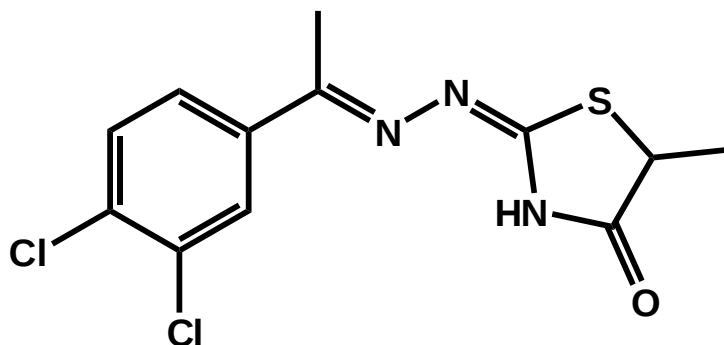
5.2.4.3 IV, principais sinais: 3143 (NH), 2985 (C-H), 1715 (C=O), 1628 (C=N) cm⁻¹.

5.2.4.4 RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.36 (s, 3H, CH₃), 3.89 (s, 2H, S-CH₂), 7.69 (d, 1H, Ar), 7.80 (d, 1H, Ar), 8.00 (s, 1H, Ar), 12.06 (s, 1H, NH).

5.2.4.5 RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.8 (CH₃), 33.3 (CH₂, heterociclo), 126.8 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 131.0 (CH, Ar), 131.8 (C, Ar), 132.7 (3CIC, Ar), 138.7 (4CIC, Ar), 158.6 (C=N), 166.0 (S-C=N), 174.3 (C=O).

5.2.4.6 EMAR (ESI): Calculado para C₁₁H₁₀Cl₂N₃OS [M+H]⁺: 301.99; encontrado 301.9364.

5.2.5 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-metiltiazolidina-4-ona (23b; GT-04B)



5.2.5.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**), 30 mL de etanol, 15.24 mmol (1.25 g) de acetato de sódio e 7.62 mmol (1.272 g) de 2-bromopropionato de metila. O produto foi purificado por recristalização em tolueno \ ciclohexano 2:1 a quente.

Cristais incolores; PF: 208-210 °C; Rend.: 0.68 g (56%); R_f: 0.52 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.5.2 Análise elementar para C₁₂H₁₁Cl₂N₃OS: Teórico: C, 45.58; H, 3.51; N, 13.29; S, 10.14. Calculado: C, 45.86; H, 3.68; N, 12.90; S, 10.00.

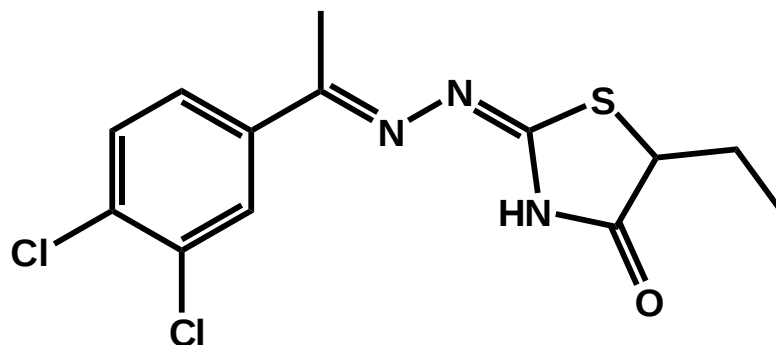
5.2.5.3 IV, principais sinais: 3422 (NH), 3139 (C-H), 1704 (C=O), 1627 (C=N) cm⁻¹.

5.2.5.4 RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) na presença de isômeros: δ 1.48 (d, 3H, CH₃ heterociclo), 2.27 e 2.35 (s, 3H, CH₃), 4.15 (q, 1H, CH heterociclo), 7.60 e 7.68 (d, 1H, Ar), 7.78 e 7.87 (d, 1H, Ar), 7.99 e 8.26 (s, 1H, Ar), 8.36 e 12.06 (s, 1H, NH).

5.2.5.5 RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) na presença de isômeros: δ 13.8 e 14.3 (CH₃ posição 5-heterociclo), 18.8 (CH₃), 41.0 (CH, heterociclo), 126.4 e 126.8 (CH, Ar), 127.8 e 128.2 (CH, Ar), 130.2 (CH, Ar), 131.3 e 131.6 (C, Ar), 132.2 (3CIC, Ar), 138.2 e 138.3 (4CIC, Ar), 145.3 (C=N), 157.9 (S-C=N), 177.3 (C=O).

5.2.5.6 EMAR (ESI): Calculado para C₁₂H₁₂Cl₂N₃OS [M+H]⁺: 316.01; encontrado 315.9491.

5.2.6 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-etiltiazolidin-4-ona (23c; GT-04A)



5.2.6.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**), 25 mL de etanol, 15.24 mmol (1.25 g) de acetato de sódio e 7.62 mmol (1.272 g) de 2-bromobutanoato de etila. O produto foi purificado por recristalização em tolueno a quente.

Cristais incolores; PF: 175-177 °C; Rend.: 0.94 g (75%); R_f: 0.63 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.6.2 Análise elementar para C₁₃H₁₃Cl₂N₃OS: Teórico: C, 47.28; H, 3.97; N, 12.72; S, 9.71. Calculado: C, 47.20; H, 3.60; N, 12.34; S, 9.55.

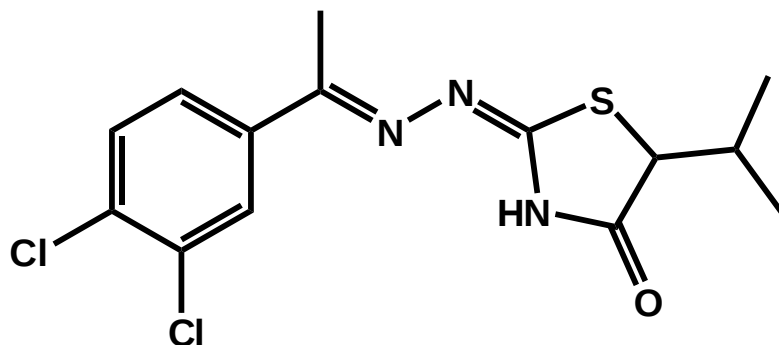
5.2.6.3 IV, principais sinais: 2975 (C-H), 1704 (C=O), 1623 (C=N) cm⁻¹.

5.2.6.4 RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.95 (s largo, 3H, CH₃), 1.88 (m, 2H, CH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 4.20 (s largo, 1H, CH heterociclo), 7.69 (d, 1H, Ar), 7.80 (d, 1H, Ar), 7.99 (s, 1H, Ar), 12.05 (s, 1H, NH).

5.2.6.5 RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.3 (CH₃), 14.3 (CH₃), 25.4 (CH₂), 49.0 (CH), 126.4 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.3 (C, Ar), 132.2 (3CIC, Ar), 138.3 (4CIC, Ar), 158.2 (C=N), 164.1 (S-C=N), 176.0 (C=O).

5.2.6.6 EMAR (ESI): Calculado para C₁₃H₁₄Cl₂N₃OS [M+H]⁺: 330.02; encontrado 329.9624.

5.2.7 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-isopropiltiazolidin-4-ona (23d; GT-04C)



5.2.7.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**), 30 mL de etanol, 15.24 mmol (1.25 g) de acetato de sódio e 7.62 mmol (1.379 g) de ácido 2-bromo-3-metilbutílico. O produto foi purificado por recristalização em tolueno \ ciclohexano 2:1 a quente.

Cristais incolores; PF: 193-195 °C; Rend.: 0.73 g (56%); R_f: 0.6 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.7.2 Análise elementar para C₁₄H₁₅Cl₂N₃OS: Teórico: C, 48.84; H, 4.39; N, 12.21; S, 9.31. Calculado: C, 49.19; H, 4.56; N, 12.16; S, 9.49.

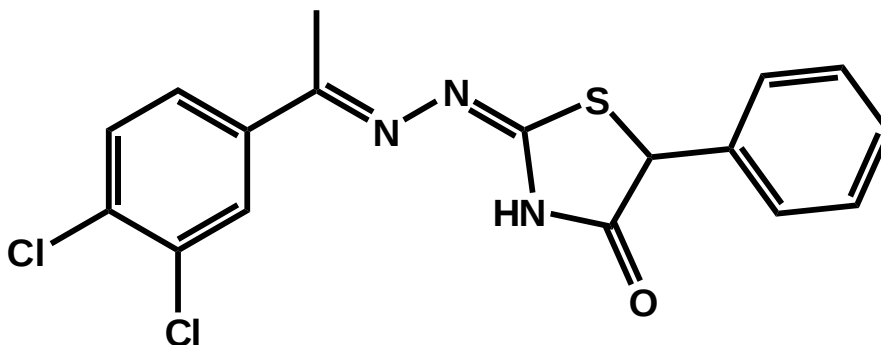
5.2.7.3 IV, principais sinais: 2953 (C-H), 1707 (C=O), 1616 (C=N) cm⁻¹.

5.2.7.4 RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.87 (d, 3H, CH₃), 0.98 (d, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.50 (s largo, 1H, CH), 4.30 (s largo, 1H, CH heterociclo), 7.69 (d, 1H, Ar), 7.81 (d, 1H, Ar), 7.99 (s, 1H, Ar), 12.06 (s, 1H, NH).

5.2.7.5 RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.4 (CH₃), 16.4 (CH₃), 20.3 (CH₃), 29.9 (CH), 54.7 (CH), 126.4 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.3 (C, Ar), 132.3 (3ClC, Ar), 138.3 (4ClC, Ar), 158.6 (C=N), 163.7 (S-C=N), 175.4 (C=O).

5.2.7.6 EMAR (ESI): Calculado para C₁₄H₁₆Cl₂N₃OS [M-H]⁺: 344.04; encontrado 343.9749.

5.2.8 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-feniltiazolidin-4-ona (23e; GT-04D)



5.2.8.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**), 25 mL de etanol, 15.24 mmol (1.25 g) de acetato de sódio e 7.62 mmol (1.512 g) de 2-cloro-2-fenilacetato de etila. O produto foi purificado por recristalização em tolueno a quente.

Cristais incolores; PF: 245-247 °C; Rend.: 0.95 g (65%); R_f: 0.57 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

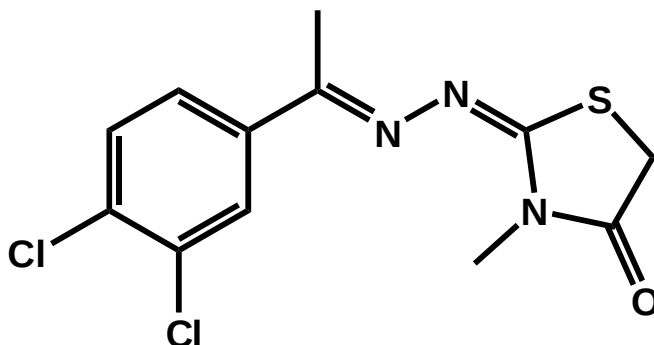
5.2.8.2 **Análise elementar para C₁₇H₁₃Cl₂N₃OS**: Teórico: C, 53.98; H, 3.46; N, 11.11; S, 8.48. Calculado: C, 53.75; H, 3.53; N, 11.12; S, 8.78.

5.2.8.3 **IV, principais sinais**: 1711 (C=O), 1618 (C=N) cm⁻¹.

5.2.8.4 **RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 2.41 (s, 3H, CH₃), 5.49 (s, 1H, CH heterociclo), 7.39 (s largo, 5H, Ar), 7.68 (d, 1H, Ar), 7.81 (dd, 1H, Ar), 8.01 (d, 1H, Ar), 12.35 (s, 1H, NH).

5.2.8.5 **RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 14.9 (CH₃), 51.4 (CH, heterociclo), 126.9 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 131.1 (CH, Ar), 131.8 (C, Ar), 132.8 (C, Ar), 137.2 (3ClC, Ar), 138.6 (4ClC, Ar), 159.2 (C=N), 162.0 (S-C=N), 175.0 (C=O).

5.2.9 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-metiltiazolidin-4-ona (23f; GT-06)



5.2.9.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 3.62 mmol (1.0 g) do composto (**GT-03**), 40 mL de etanol, 14.48 mmol (1.187 g) de acetato de sódio e 5.43 mmol (0.754 g) de bromoacetato de etila. O produto foi purificado por recristalização em tolueno a quente.

Cristais incolores; PF: 195-197 °C; Rend.: 0.70 g (61%); R_f: 0.73 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.9.2 Análise elementar para C₁₂H₁₁Cl₂N₃OS: Teórico: C, 45.58; H, 3.51; N, 13.29; S, 10.14. Calculado: C, 45.48; H, 3.33; N, 13.18; S, 9.90.

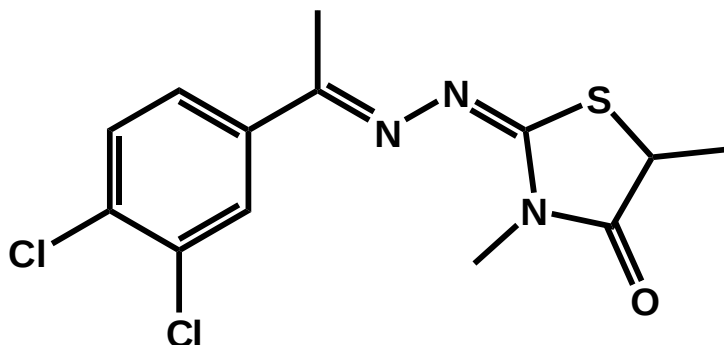
5.2.9.3 IV, principais sinais: 2942 (C-H), 1717 (C=O), 1613 e 1570 (C=N) cm⁻¹.

5.2.9.4 RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.43 (s, 3H, CH₃), 3.20 (s, 3H, N-CH₃), 3.95 (s, CH₂ heterociclo), 7.72 (d, 1H, Ar), 7.83 (dd, 1H, Ar), 8.03 (d, 1H, Ar).

5.2.9.5 RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.2 (CH₃), 29.2 (N-CH₃), 32.0 (CH₂ heterociclo), 126.3 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 130.5 (CH, Ar), 131.2 (C, Ar), 132.3 (3CIC, Ar), 138.1 (4CIC, Ar), 159.4 (C=N), 164.5 (S-C=N), 172.0 (C=O).

5.2.9.6 EMAR (ESI): Calculado para C₁₂H₁₂Cl₂N₃OS [M+H]⁺: 316.01; encontrado 315.9498.

5.2.10 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3,5-dimetiltiazolidin-4-ona (23g; GT-06B)



5.2.10.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 3.62 mmol (1.0 g) do composto (**GT-03**), 45 mL de etanol, 14.48 mmol (1.187 g) de acetato de sódio e 5.43 mmol (0.906 g) de 2-bromopropionato de metila. O produto foi purificado por recristalização em ciclohexano \ tolueno 3:1 a quente.

Cristais incolores; PF: 178-180 °C; Rend.: 0.90 g (75%); R_f: 0.8 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.10.2 Análise elementar para C₁₃H₁₃Cl₂N₃OS: Teórico: C, 47.28; H, 3.97; N, 12.72; S, 9.71. Calculado: C, 47.33; H, 3.81; N, 12.63; S, 9.69.

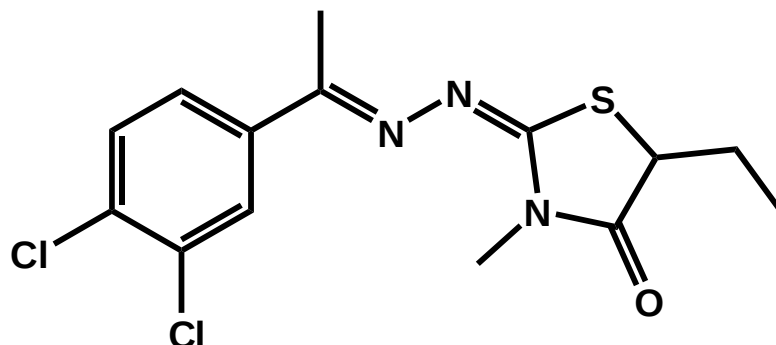
5.2.10.3 IV, principais sinais: 1704 (C=O), 1606 e 1570 (C=N) cm⁻¹.

5.2.10.4 RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.53 (d, 3H, CH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 3.22 (s, 3H, N-CH₃), 4.24 (quar, CH heterociclo), 7.70 (d, 1H, Ar), 7.82 (dd, 1H, Ar), 8.02 (d, 1H, Ar).

5.2.10.5 RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.1 (CH₃, posição 5 do heterociclo), 18.5 (CH₃), 29.3 (N-CH₃), 41.1 (CH heterociclo), 126.3 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 130.4 (CH, Ar), 131.2 (C, Ar), 132.2 (3ClC, Ar), 138.1 (4ClC, Ar), 159.3 (C=N), 163.0 (S-C=N), 175.0 (C=O).

5.2.10.6 EMAR (ESI): Calculado para C₁₃H₁₄Cl₂N₃OS [M+H]⁺: 330.02; encontrado 329.9630.

5.2.11 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-etil-3-metiltiazolidin-4-ona (23h; GT-06A)



5.2.11.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 3.62 mmol (1.0 g) do composto (**GT-03**), 45 mL de etanol, 14.48 mmol (1.187 g) de acetato de sódio e 5.43 mmol (0.906 g) de 2-bromobutanoato de etila. O produto foi purificado por recristalização em ciclohexano a quente.

Cristais incolores; PF: 167-168 °C; Rend.: 0.80 g (64%); R_f: 0.81 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

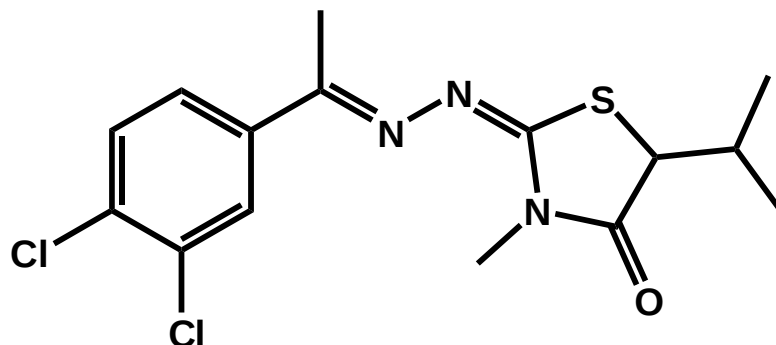
5.2.11.2 Análise elementar para C₁₄H₁₅Cl₂N₃OS: Teórico: C, 48.84; H, 4.39; N, 12.21; S, 9.31. Calculado: C, 48.83; H, 4.09; N, 12.15; S, 9.58.

5.2.11.3 IV, principais sinais: 2970 (C-H), 1716 (C=O), 1610 e 1567 (C=N) cm⁻¹.

5.2.11.4 RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.95 (t, 3H, CH₃), 1.83 (m, 1H, CH₂), 2.02 (m, 1H, CH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 3.19 (s, 3H, N-CH₃), 4.27 (dd, 1H, CH heterociclo), 7.70 (d, 1H, Ar), 7.83 (dd, 1H, Ar), 8.02 (d, 1H, Ar).

5.2.11.5 RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.1 (CH₃), 14.2 (CH₃), 25.3 (CH₂), 29.2 (N-CH₃), 48.1 (CH heterociclo), 126.3 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 130.4 (CH, Ar), 131.2 (C, Ar), 132.3 (3ClC, Ar), 138.1 (4ClC, Ar), 159.5 (C=N), 162.9 (S-C=N), 174.0 (C=O).

5.2.12 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-5-isopropil-3-metiltiazolidin-4-ona (23i; GT-06C)



5.2.12.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 3.62 mmol (1.0 g) do composto (**GT-03**), 45 mL de etanol, 14.48 mmol (1.187 g) de acetato de sódio e 7.24 mmol (1.31 g) de ácido 2-bromo-3-metil-butílico. O produto foi purificado por recristalização em ciclohexano \ tolueno 3:1 a quente.

Cristais incolores; PF: 137-140 °C; Rend.: 0.70 g (53%); R_f: 0.84 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.12.2 Análise elementar para C₁₅H₁₇Cl₂N₃OS: Teórico: C, 50.28; H, 4.78; N, 11.73; S, 8.95. Calculado: C, 50.29; H, 4.64; N, 11.71; S, 9.19.

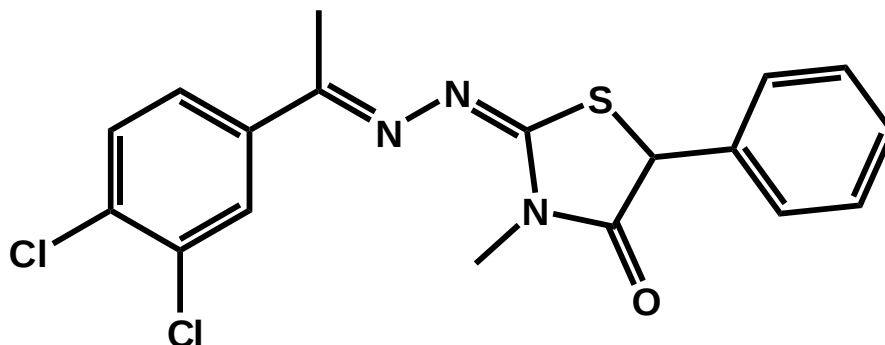
5.2.12.3 IV, principais sinais: 2947 (C-H), 1713 (C=O), 1610 e 1563 (C=N) cm⁻¹.

5.2.12.4 RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.84 (d, 3H, CH₃), 1.00 (d, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.45 (m, 1H, CH), 3.21 (s, 3H, N-CH₃), 4.38 (d, 1H, CH heterociclo), 7.72 (d, 1H, Ar), 7.85 (dd, 1H, Ar), 8.03 (d, 1H, Ar).

5.2.12.5 RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.4 (CH₃), 16.4 (CH₃), 20.2 (CH₃), 29.3 (CH), 30.1 (N-CH₃), 53.9 (CH heterociclo), 126.5 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 130.7 (CH, Ar), 131.3 (C, Ar), 132.4 (3ClC, Ar), 138.1 (4ClC, Ar), 159.9 (C=N), 163.2 (S-C=N), 173.8 (C=O).

5.2.12.6 EMAR (ESI): Calculado para C₁₅H₁₈Cl₂N₃OS [M+H]⁺: 358.05; encontrado 357.9853.

5.2.13 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-metil-5-feniltiazolidin-4-ona (23j; GT-06D)



5.2.13.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 2.68 mmol (0.742 g) do composto (**GT-03**), 40 mL de etanol, 10.72 mmol (0.879 g) de acetato de sódio e 5.36 mmol (1.06 g) de 2-cloro-2-fenilacetato de etila. O produto foi purificado por recristalização em tolueno a quente.

Cristais incolores; PF: 194-196 °C; Rend.: 0.91 g (87%); R_f: 0.82 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

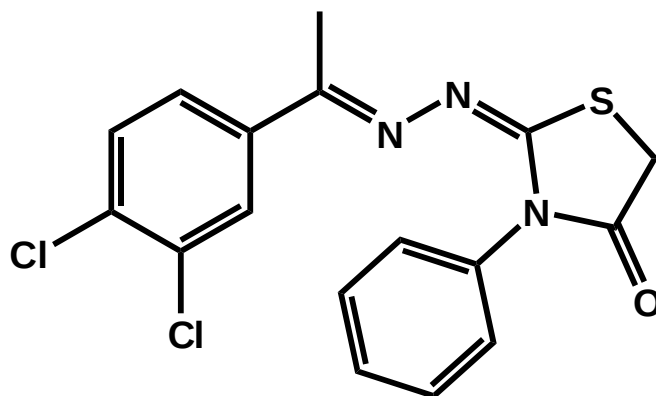
5.2.13.2 Análise elementar para C₁₈H₁₅Cl₂N₃OS: Teórico: C, 55.11; H, 3.85; N, 10.71; S, 8.17. Calculado: C, 55.37; H, 3.92; N, 10.58; S, 8.44.

5.2.13.3 IV, principais sinais: 1709 (C=O), 1603 e 1565 (C=N) cm⁻¹.

5.2.13.4 RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.47 (s, 3H, CH₃), 2.50 (s, 3H, N-CH₃), 5.55 (s, 1H, CH heterociclo), 7.39 (m, 5H, Ar), 7.71 (d, 1H, Ar), 7.84 (dd, 1H, Ar), 8.03 (d, 1H, Ar).

5.2.13.5 RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.4 (CH₃), 29.9 (N-CH₃), 50.1 (CH heterociclo), 126.5 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.3 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.3 (C, Ar), 136.5 (3CIC, Ar), 138.0 (4CIC, Ar), 160.0 (C=N), 163.0 (S-C=N), 173.0 (C=O).

5.2.14 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-feniltiazolidin-4-ona (23k; GT-05)



5.2.14.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 2.96 mmol (1.0 g) do composto (**GT-02**), 80 mL de etanol, 11.84 mmol (0.970 g) de acetato de sódio e 4.44 mmol (0.616 g) de bromoacetato de etila. O produto foi purificado por recristalização em tolueno a quente.

Cristais incolores; PF: 232-233 °C; Rend.: 0.8 g (71%); R_f: 0.79 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

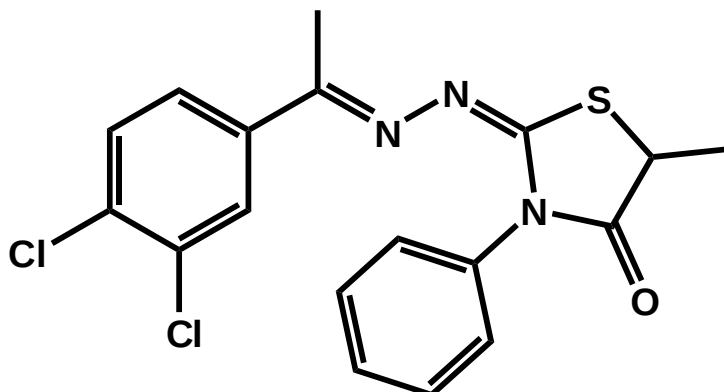
5.2.14.2 Análise elementar para C₁₇H₁₃Cl₂N₃OS: Teórico: C, 53.98; H, 3.46; N, 11.11; S, 8.48. Calculado: C, 53.68; H, 3.42; N, 10.89; S, 7.94.

5.2.14.3 IV, principais sinais: 2970 (C-H), 1728 (C=O), 1606 e 1562 (C=N) cm⁻¹.

5.2.14.4 RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.16 (s, 3H, CH₃), 4.10 (s, 2H, CH₂ heterociclo), 7.41 (d, 2H, Ar), 7.45 (t, 1H, Ar), 7.53 (t, 1H, Ar), 7.70 (d, 1H, Ar), 7.79 (d, 1H, Ar), 7.99 (s, 1H, Ar).

5.2.14.5 RMN de ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.3 (CH₃), 32.2 (CH₂), 126.3 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 130.5 (CH, Ar), 134.9 (C, Ar), 136.8 (C, Ar), 163.0 (C=N), 171.6 (S-C=N), 198.6 (C=O).

5.2.15 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-fenil-5-metiltiazolidin-4-ona (23I; GT-05B)



5.2.15.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 2.96 mmol (1.0 g) do composto (**GT-02**), 50 mL de etanol, 11.84 mmol (0.970 g) de acetato de sódio e 5.92 mmol (0.642 g) de 2-bromopropionato de metila. O produto foi purificado por recristalização em ciclohexano \ tolueno 3:1 a quente.

Cristais incolores; PF: 208-209 °C; Rend.: 0.78 g (67%); R_f: 0.83 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

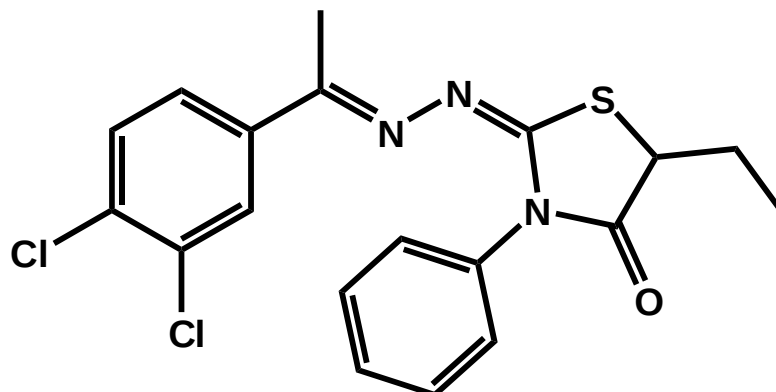
5.2.15.2 Análise elementar para C₁₈H₁₅Cl₂N₃OS: Teórico: C, 55.11; H, 3.85; N, 10.71; S, 8.17. Calculado: C, 55.36; H, 4.01; N, 10.44; S, 7.64.

5.2.15.3 IV, principais sinais: 1712 (C=O), 1609 e 1571 (C=N) cm⁻¹.

5.2.15.4 RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.63 (d, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 4.41 (quar, 1H, CH heterociclo), 7.41-7.55 (m, 5H, Ar), 7.70 (d, 1H, Ar), 7.79 (dd, 1H, Ar), 7.99 (d, 1H, Ar).

5.2.15.5 RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.3 (CH₃), 18.7 (CH₃), 41.0 (CH heterociclo), 126.4 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.3 (C, Ar), 132.4 (3ClC, Ar), 135.0 (C, Ar), 138.0 (4ClC, Ar), 159.7 (C=N), 163.2 (S-C=N), 174.8 (C=O).

5.2.16 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-fenil-5-etiltiazolidin-4-ona (23m; GT-05A)



5.2.16.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 2.96 mmol (1.0 g) do composto (**GT-02**), 50 mL de etanol, 11.84 mmol (0.970 g) de acetato de sódio e 4.44 mmol (0.740 g) de 2-bromobutanoato de etila. O produto foi purificado por recristalização em ciclohexano a quente.

Cristais incolores; PF: 154 °C; Rend.: 0.42 g (35%); R_f : 0.86 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.16.2 Análise elementar para $C_{19}H_{17}Cl_2N_3OS$: Teórico: C, 56.16; H, 4.22; N, 10.34; S, 7.89. Calculado: C, 55.80; H, 4.23; N, 9.96; S, 7.97.

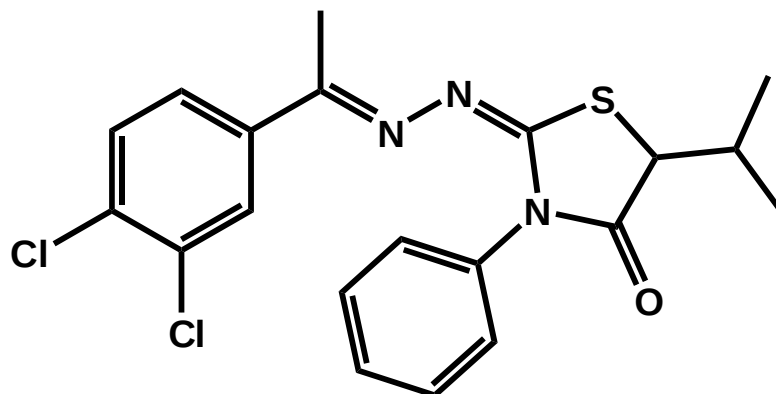
5.2.16.3 IV, principais sinais: 1708 (C=O), 1607 e 1568 (C=N) cm^{-1} .

5.2.16.4 RMN de 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1.03 (t, 3H, CH_3), 1.98 (m, 1H, CH_2), 2.08 (m, 1H, CH_2), 2.16 (s, 3H, CH_3), 4.45 (dd, 1H, CH heterociclo), 7.39-7.55 (m, 5H, Ar), 7.71 (d, 1H, Ar), 7.80 (dd, 1H, Ar), 7.99 (d, 1H, Ar).

5.2.16.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, $DMSO-d_6$): δ 10.1 (CH_3), 14.4 (CH_3), 25.5 (CH_2), 48.2 (CH heterociclo), 126.4 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.3 (C, Ar), 132.4 (3CIC, Ar), 134.9 (C, Ar), 138.0 (4CIC, Ar), 160.0 (C=N), 163.0 (S-C=N), 173.9 (C=O).

5.2.16.6 EMAR (ESI): Calculado para $C_{19}H_{18}Cl_2N_3OS$ $[M+H]^+$: 406.05; encontrado 405.9517.

5.2.17 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-fenil-5-isopropiltiazolidin-4-ona (23n; GT-05C)



5.2.17.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 2.96 mmol (1.0 g) do composto (**GT-02**), 50 mL de etanol, 11.84 mmol (0.970 g) de acetato de sódio e 5.92 mmol (1.071 g) de ácido 2-bromo-3-metilbutílico. O produto foi purificado por recristalização em ciclohexano a quente.

Cristais incolores; PF: 158-160 °C; Rend.: 0.76 g (61%); R_f: 0.9 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.17.2 Análise elementar para C₂₀H₁₉Cl₂N₃OS: Teórico: C, 57.15; H, 4.56; N, 10.00; S, 7.63. Calculado: C, 57.16; H, 4.49; N, 9.90; S, 7.68.

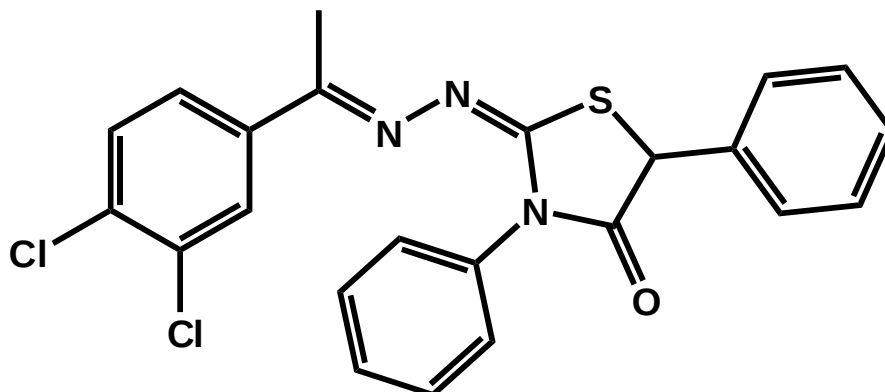
5.2.17.3 IV, principais sinais: 2964 (C-H), 1720 (C=O), 1603 e 1564 (C=N) cm⁻¹.

5.2.17.4 RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.98 (d, 3H, CH₃), 1.06 (d, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s largo, 1H, CH), 4.53 (d, 1H, CH heterociclo), 7.36-7.56 (m, 5H, Ar), 7.71 (d, 1H, Ar), 7.81 (dd, 1H, Ar), 7.99 (d, 1H, Ar).

5.2.17.5 RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.5 (CH₃), 16.5 (CH₃), 20.1 (CH₃), 30.5 (CH), 53.8 (CH heterociclo), 126.5 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 130.2 (CH, Ar), 131.3 (C, Ar), 132.5 (3ClC, Ar), 134.8 (C, Ar), 138.0 (4ClC, Ar), 160.3 (C=N), 163.1 (S-C=N), 173.5 (C=O).

5.2.17.6 EMAR (ESI): Calculado para C₂₀H₂₀Cl₂N₃OS [M+H]⁺: 420.07; encontrado 419.9888.

5.2.18 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno]hidrazona]-3,5-difeniltiazolidin-4-ona (23o; GT-05D)



5.2.18.1 Procedimento experimental semelhante ao descrito no item **2.4.1**: 2.96 mmol (1.0 g) do composto (**GT-02**), 40 mL de etanol, 11.84 mmol (0.970 g) de acetato de sódio e 5.92 mmol (1.175 g) de 2-cloro-2-fenilacetato de etila. O produto foi purificado por recristalização em tolueno a quente.

Cristais incolores; PF: 210-212 °C; Rend.: 0.77 g (58%); R_f: 0.88 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

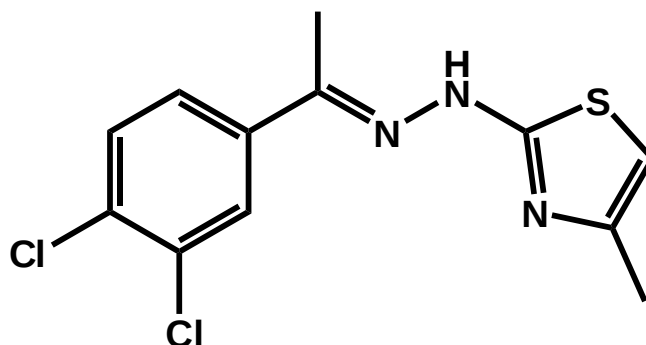
5.2.18.2 Análise elementar para C₂₃H₁₇Cl₂N₃OS: Teórico: C, 60.80; H, 3.77; N, 9.25; S, 7.06. Calculado: C, 60.68; H, 3.74; N, 9.26; S, 7.08.

5.2.18.3 IV, principais sinais: 3053 (C-H), 1715 (C=O), 1605 e 1566 (C=N) cm⁻¹.

5.2.18.4 RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.20 (s, 3H, CH₃), 5.70 (s, 1H, CH heterociclo), 7.36-7.58 (m, 10H, Ar), 7.69 (d, 1H, Ar), 7.80 (dd, 1H, Ar), 7.99 (d, 1H, Ar).

5.2.18.5 RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.0 (CH₃), 50.1 (CH heterociclo), 126.3 (CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 129.6 (CH, Ar), 130.5 (CH, Ar), 133.5 (C, Ar), 133.7 (C, Ar), 134.8 (C, Ar), 134.9 (C, Ar), 136.8 (C, Ar), 163.0 (C=N), 171.2 (S-C=O), 198.0 (C=O).

5.2.19 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-metil-1,3-tiazol (24a; GT-07)



5.2.19.1 Sob agitação magnética: em um balão de 50 mL, foram adicionados 0.76 mmol (0.2 g) do composto (**GT-01**), 30 mL de etanol e 3.04 mmol (0.25 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento por cerca de 15 minutos, foram adicionados 1.14 mmol (0.105 g) de 2-cloroacetona e a reação foi então mantida sob refluxo (90 °C) durante 5 horas (monitorada por CCD). Após esse tempo, o precipitado branco (sal) foi filtrado em papel de filtro, o sobrenadante foi evaporado a vácuo por completo. Posteriormente o produto foi purificado por recristalização em água a quente.

Cristais marrons; PF: 102-104 °C; Rend.: 0.18 g (78%); R_f : 0.57 (Tolueno / Acetato de etila 6:4)..

5.2.19.2 Análise elementar para $C_{12}H_{11}Cl_2N_3S$: Teórico: C, 48.01; H, 3.69; N, 14.00; S, 10.68. Calculado: C, 48.07; H, 3.96; N, 14.07; S, 10.65.

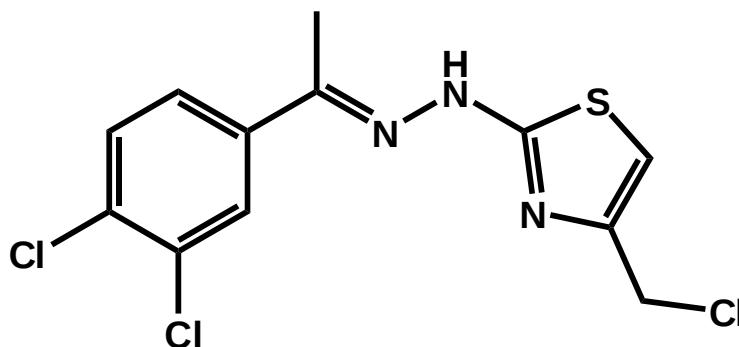
5.2.19.3 IV, principais sinais: 3190 (NH), 1568 (C=N) cm^{-1} .

5.2.19.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1.88 (s, 3H, CH₃), 2.15 (s, 3H, CH₃), 6.30 (s, 1H, CH tiazol), 7.63 (d, 1H, Ar), 7.71 (dd, 1H, Ar), 7.90 (d, 1H, Ar), 11.99 (s, 1H, NH).

5.2.19.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 16.4 (CH₃), 21.4 (CH₃), 101.8 (CH tiazol), 125.5 (CH, Ar), 127.0 (CH, Ar), 130.5 (CH, Ar), 130.7 (C, Ar), 131.2 (3CIC, Ar), 138.8 (4CIC, Ar), 144.5 (C, tiazol), 169.5 (C=N), 172.2 (S-C=N).

5.2.19.6 EMAR (ESI): Calculado para $C_{12}H_{12}Cl_2N_3S$ $[M+H]^+$: 300.01; encontrado 300.0168.

5.2.20 4-(clorometil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24b; GT-20)



5.2.20.1 Sob agitação magnética: em um balão de 100 mL, foram adicionados 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**), 30 mL de etanol e 15.24 mmol (1.25 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento por cerca de 20 minutos, foram adicionados 3.81 mmol (0.483 g) de 1,3-dicloroacetona e a reação foi então mantida sob refluxo (90 °C) durante 10 horas (monitorada por CCD). Após esse tempo, o precipitado branco (sal) foi filtrado em papel de filtro, o solvente da mistura reacional foi reduzido a vácuo pela metade. O precipitado marrom escuro foi obtido, filtrado em funil de Büchner. Posteriormente o produto foi purificado por recristalização em etanol a quente.

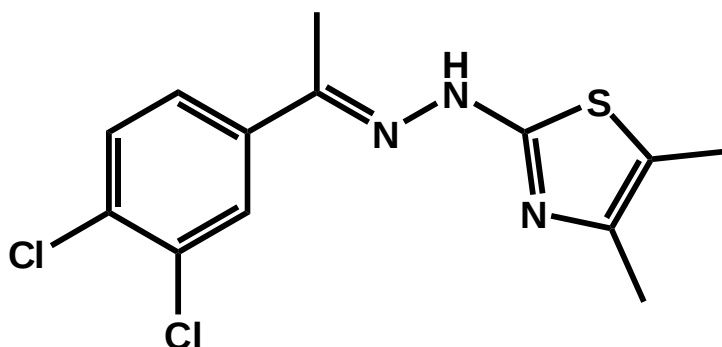
Cristais marrons; PF.: 124-126 °C; Rend.: 1.12 g (88%); R_f: 0.64 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.20.2 Análise elementar para C₁₂H₁₀Cl₃N₃S: Teórico: C, 43.07; H, 3.01; N, 12.56; S, 9.58. Calculado: C, 43.07; H, 3.00; N, 12.42; S, 9.69.

5.2.20.3 IV, principais sinais: 3065 (CH), 1561 (C=N) cm⁻¹.

5.2.20.4 RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.30 (s, 3H, CH₃), 3.31 (d, 1H, CH₂), 3.55 (d, 1H, CH₂), 6.30 (s, 1H, CH tiazol), 7.67 (d, 1H, Ar), 7.75 (dd, 1H, Ar), 7.96 (d, 1H, Ar), 9.03 (s, 1H, NH).

5.2.21 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4,5-dimetil-1,3-tiazol (24c; GT-21)



5.2.21.1 Sob agitação magnética: em um balão de 100 mL, foram adicionados 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**), 30 mL de etanol e 15.24 mmol (1.25 g) de acetato de sódio anidro. Após aquecimento por cerca de 15 minutos, foram adicionados 3.81 mmol (0.405 g) de 3-cloro-2-butanona e a reação foi então mantida sob refluxo (90 °C) durante 15 horas (monitorada por CCD). Após esse tempo, o precipitado branco (sal) foi filtrado em papel de filtro, o sobrenadante foi evaporado a vácuo pela metade. O precipitado amarelo formado foi filtrado em funil de Büchner. Posteriormente o produto foi purificado por recristalização em etanol a quente.

Cristais amarelos; PF.: 157-159 °C; Rend.: 0.55 g (46%); R_f: 0.51 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

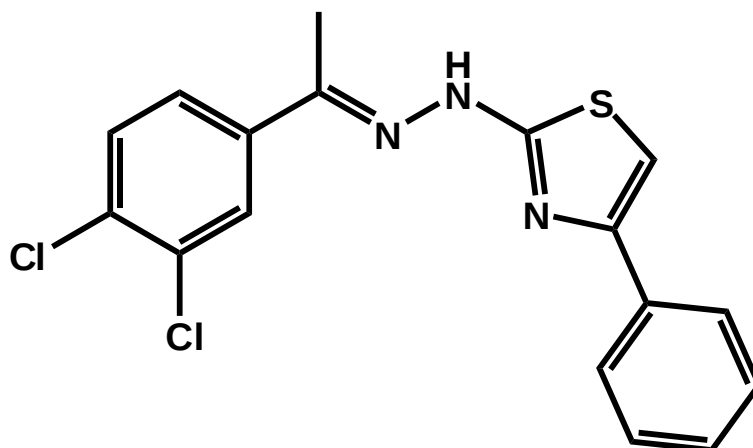
5.2.21.2 Análise elementar para C₁₃H₁₃Cl₂N₃S: Teórico: C, 49.69; H, 4.17; N, 13.37; S, 10.20. Calculado: C, 49.35; H, 4.28; N, 13.27; S, 10.30.

5.2.21.3 IV, principais sinais: 3197 (NH), 2918 (CH), 1546 (C=N) cm⁻¹.

5.2.21.4 RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.04 (s, 3H, CH₃), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃), 7.63 (d, 1H, Ar), 7.71 (dd, 1H, Ar), 7.90 (d, 1H, Ar), 11.525 (s, 1H, NH).

5.2.21.5 RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.3 (CH₃), 13.8 (CH₃), 21.5 (CH₃), 112.0 (N-C-CH₃), 125.9 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 130.90 (CH, Ar), 130.98 (C, Ar), 131.6 (3ClC, Ar), 139.4 (4ClC, Ar), 145.2 (S-C-CH₃), 167.4 (C=N), 172.5 (S-C=N).

5.2.22 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-fenil-1,3-tiazol (24d; GT-12)



5.2.22.1 Ultrassom: em um balão de 100 mL, foram adicionados 3.81 mmol (0.758 g) da 2-bromoacetofenona e 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização dos reagentes. Em seguida foi adicionado 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). Logo após a adição, verificou-se total solubilização e mudança da coloração da mistura reacional de amarelo claro para cinza. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após isso, o precipitado formado foi filtrado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo. O produto foi recristalizado a quente em mistura de etanol / metanol 2:1.

Cristais cinza; P.F: 259-261 °C; Rend.: 0.98 g (71%); R_f = 0.62.

5.2.22.2 Análise elementar para $C_{17}H_{13}Cl_2N_3S$: Teórico: C, 56.36; H, 3.62; N, 11.60; S, 8.85. Calculado: C, 56.34; H, 3.69; N, 11.51; S, 8.84.

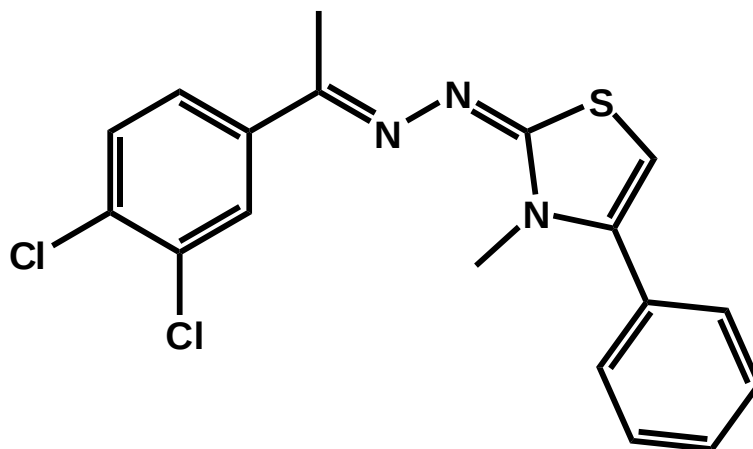
5.2.22.3 IV, principais sinais: 2918 (CH), 1612 (C=N) cm^{-1} .

5.2.22.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.31 (s, 3H, CH_3), 7.30-7.43 (m, 4H, Ar), 7.65-7.94 (m, 5H, Ar), 11.25 (s largo, 1H, NH).

5.2.22.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 11.5 (CH_3), 102.1 (CH tiazol), 123.2 (CH, Ar), 123.4 (CH, Ar), 124.9 (CH, Ar), 125.3 (CH, Ar), 126.3 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 130.98 (C, Ar), 131.6 (3ClC, Ar), 135.0 (C, Ar), 139.4 (4ClC, Ar), 143.9 (C, Ar), 150.0 (C=N), 170.0 (S-C=N).

5.2.22.6 EMAR (ESI): Calculado para $C_{17}H_{14}Cl_2N_3S$ $[M+H]^+$: 362,03; encontrado 361.9579.

5.2.23 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3-metil-4-fenil-1,3-tiazol (24e; GT-28)



5.2.23.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.62 mmol (0.758 g) da 2-bromoacetofenona, 25 mL de isopropanol e 3.62 mmol (1.0 g) do composto (**GT-03**). O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Cristais amarelos; PF: 247-248 °C; Rend.: 1.12 g (82%); R_f = 0.93 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

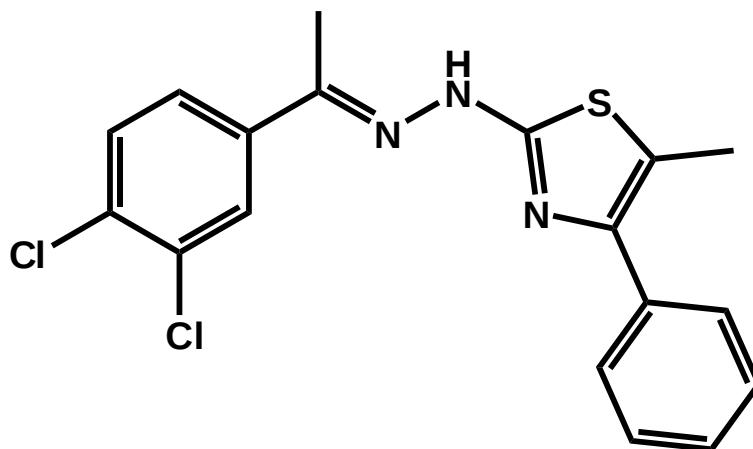
5.2.23.2 Análise elementar para $C_{18}H_{15}Cl_2N_3S$: Teórico: C, 57.45; H, 4.02; N, 11.17; S, 8.52. Calculado: C, 57.51; H, 3.98; N, 11.43; S, 8.55.

5.2.23.3 IV, principais sinais: 3035 (CH), 1593 (C=N) cm^{-1} .

5.2.23.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.40 (s, 3H, CH₃), 3.40 (s, 3H, N-CH₃), 6.59 (s, 1H, CH tiazol), 7.51 (m, 5H, Ar), 7.67 (d, 1H, Ar), 7.80 (d, 1H, Ar), 7.98 (s, 1H, Ar).

5.2.23.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 14.2 (CH₃), 34.1 (N-CH₃), 101.8 (CH tiazol), 125.9 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 130.0 (CH, Ar), 130.6 (C, Ar), 131.3 (3ClC, Ar), 138.8 (4ClC, Ar), 141.0 (C, Ar), 152.5 (C=N), 170.1 (S-C=N).

5.2.24 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-5-metil-4-fenil-1,3-tiazol (24f; GT-16)



5.2.24.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (0.811 g) da 2-bromopropiofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Cristais beges; PF: 234-236 °C; Rend.: 1.16 g (81%); R_f = 0.54 (Tolueno / Acetato de etila 6:4)..

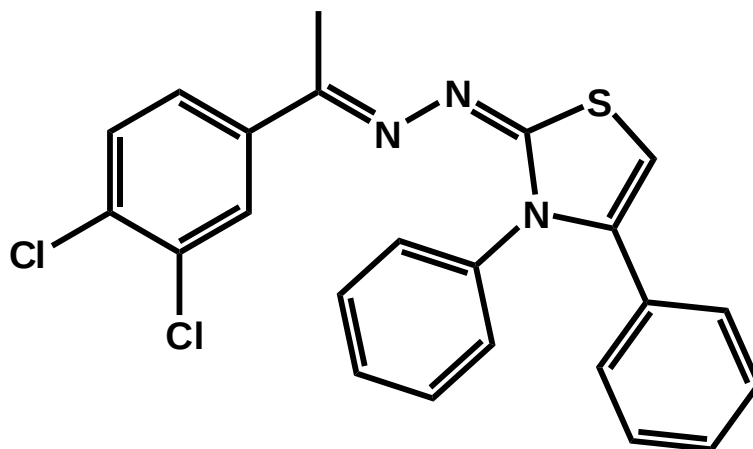
5.2.24.2 Análise elementar para $C_{18}H_{15}Cl_2N_3S$: Teórico: C, 57.45; H, 4.02; N, 11.17; S, 8.52. Calculado: C, 57.34; H, 3.95; N, 11.21; S, 8.58.

5.2.24.3 IV, principais sinais: 3022 (CH), 1619 (C=N) cm^{-1} .

5.2.24.4 RMN de 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 2.35 (s, 3H, CH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3), 7.42-7.62 (m, 5H, Ar), 7.67-7.91 (m, 2H, Ar), 8.06 (s, 1H, Ar), 10.32 (s, 1H, NH).

5.2.24.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, $DMSO-d_6$): δ 12.4 (CH_3), 14.7 (CH_3), 117.9 (C5 tiazol), 126.1 (CH, Ar), 127.6 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 130.5 (CH, Ar), 131.0 (C, Ar), 131.8 (C, Ar), 132.0 (C, Ar), 138.4 (C, Ar), 165.9 (C=N), 167.2 (S-C=N).

5.2.25 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazona]-3,4-difenil-1,3-tiazol (24g; GT-27)



5.2.25.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 0.88 mmol (0.175 g) da 2-bromoacetofenona, 7 mL de isopropanol e 0.88 mmol (0.3 g) do composto (**GT-02**). O produto foi recristalizado em tolueno a quente.

Cristais beges escuros; P.F.: 170-172 °C; Rend.: 0.23 g (61%); R_f 0.96 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

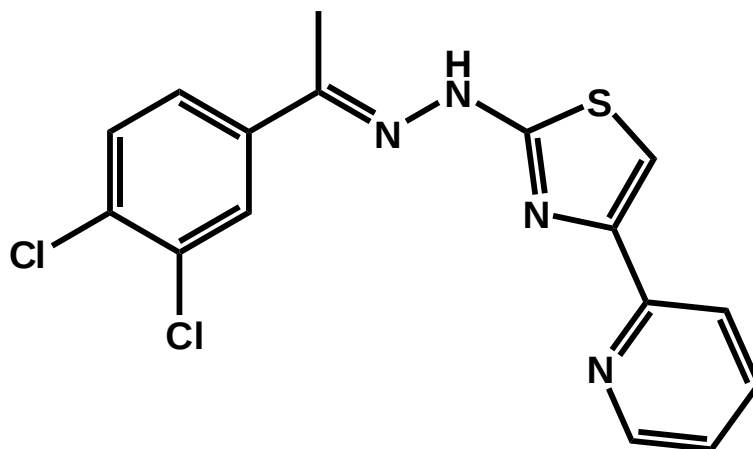
5.2.25.2 Análise elementar para $C_{23}H_{17}Cl_2N_3S$: Teórico: C, 63.02; H, 3.91; N, 9.59; S, 7.31. Calculado: C, 62.45; H, 4.08; N, 9.63; S, 6.86.

5.2.25.3 IV, principais sinais: 1597 e 1515 (C=N) cm^{-1} .

5.2.25.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.16 (s, 3H, CH₃), 6.67 (s, 1H, CH tiazol), 7.16-7.52 (m, 10H, Ar), 7.65 (d, 1H, Ar), 7.76 (dd, 1H, Ar), 7.95 (d, 1H, Ar).

5.2.25.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 14.1 (CH₃), 102.1 (CH tiazol), 125.6 (CH, Ar), 125.8 (CH, Ar), 126.5 (CH, Ar), 127.0 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 127.7 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 130.2 (CH, Ar), 130.5 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.1 (C, Ar), 131.2 (C, Ar), 137.5 (C, Ar), 138.9 (C, Ar), 139.6 (C, Ar), 153.2 (C=N), 169.9 (S-C=N).

5.2.26 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(piridin-2-il)-1,3-tiazol (24h; GT-24)



5.2.26.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 5.71 mmol (1.222 g) da 2-bromo-1-(2-piridinil)etanona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Cristais verdes; PF: 227 °C; Rend.: 1.0 g (72%); R_f = 0.46 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

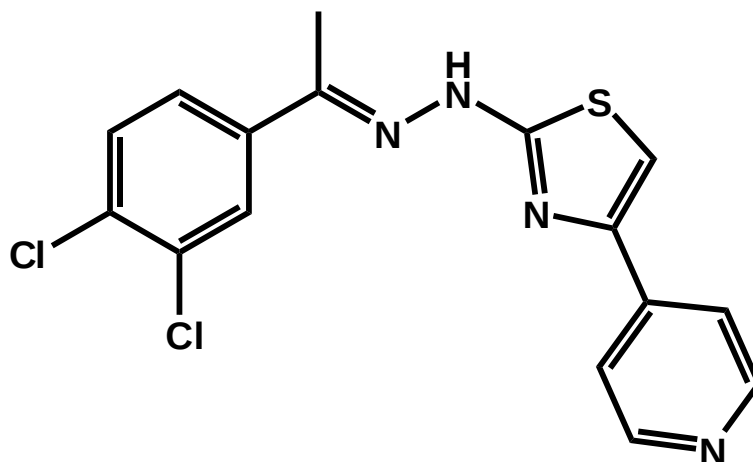
5.2.26.2 Análise elementar para $C_{16}H_{12}Cl_2N_4S$: Teórico: C, 52.90; H, 3.33; N, 15.42; S, 8.83. Calculado: C, 52.85; H, 3.38; N, 15.72; S, 8.88.

5.2.26.3 IV, principais sinais: 3360 (NH), 3165 (CH), 1615 e 1597 (C=N) cm^{-1} .

5.2.26.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.35 (s, 3H, CH_3), 7.68-7.79 (m, 3H, Ar), 7.97-8.10 (m, 2H, Ar), 8.24-8.36 (m, 2H, Ar), 8.64-8.72 (m, 1H, Ar), 11.00 (s, 1H, NH).

5.2.26.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 14.0 (CH_3), 117.1 (CH tiazol), 124.3 (CH, Ar), 125.8 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.3 (CH, Ar), 138.2 (C, Ar), 138.9 (C, Ar), 139.6 (C, Ar), 145.5 (C, Ar), 153.2 (C=N), 169.9 (S-C=N).

5.2.27 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(piridin-4-il)-1,3-tiazol (24i; GT-23)



5.2.27.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 5.71 mmol (1.222 g) da 2-bromo-1-(4-piridinil)etanona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Cristais verdes; PF: 197 °C; Rend.: 1.05 g (75%); R_f = 0.5 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

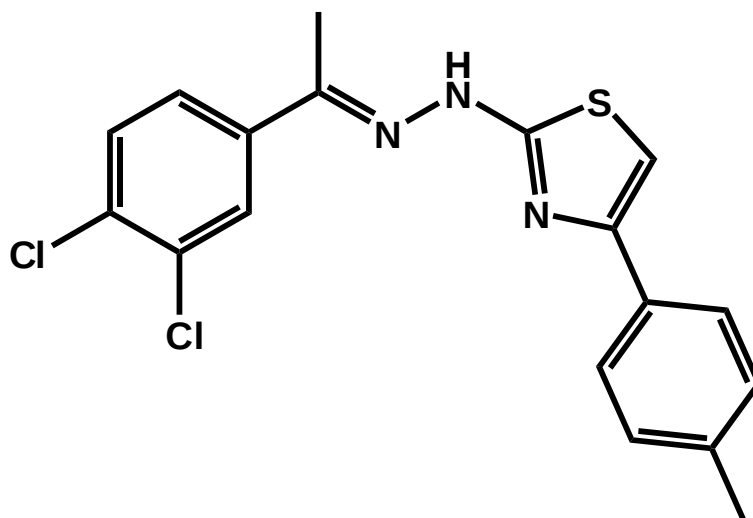
5.2.27.2 Análise elementar para $C_{16}H_{12}Cl_2N_4S$: Teórico: C, 52.90; H, 3.33; N, 15.42; S, 8.83. Calculado: C, 52.70; H, 3.37; N, 15.41; S, 8.88.

5.2.27.3 IV, principais sinais: 1630 e 1561 (C=N) cm^{-1} .

5.2.27.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.31 (s, 3H, CH₃), 7.62-7.72 (m, 2H, Ar), 7.89 (s, 1H, Ar), 8.25-8.58 (m, 3H, Ar), 8.92-8.94 (m, 2H, Ar), 11.72 (s, 1H, NH).

5.2.27.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 14.0 (CH₃), 117.0 (CH tiazol), 122.0 (CH, Ar), 125.7 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.3 (CH, Ar), 138.1 (C, Ar), 142.1 (C, Ar), 145.1 (C, Ar), 145.9 (C, Ar), 149.1 (C, Ar), 153.2 (C=N), 170.3 (S-C=N).

5.2.28 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-p-toluil-1,3-tiazol (24j; GT-25)



5.2.28.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (0.811 g) da 2-bromo-4'-metilacetofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Cristais beges; PF: 256-258 °C; Rend.: 1.21 g (84%); R_f = 0.75 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

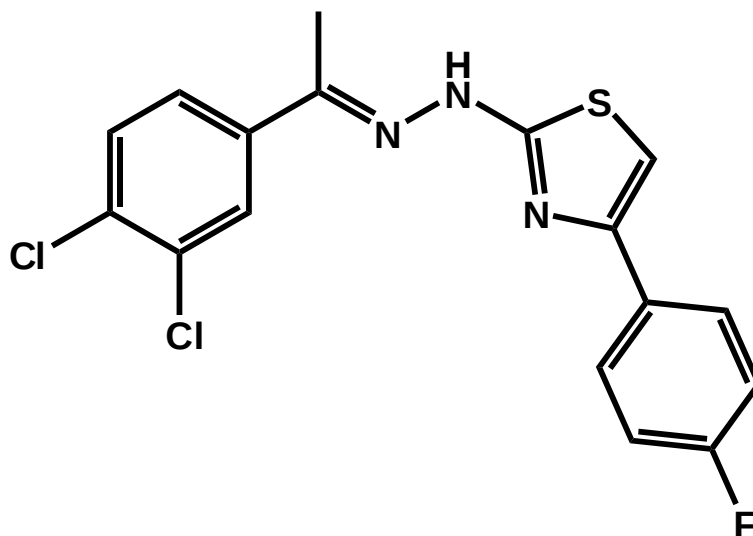
5.2.28.2 Análise elementar para $C_{18}H_{15}Cl_2N_3S$: Teórico: C, 57.45; H, 4.02; N, 11.17; S, 8.52. Calculado: C, 57.15; H, 4.00; N, 10.86; S, 8.42.

5.2.28.3 IV, principais sinais: 3030 (CH), 1608 (C=N) cm^{-1} .

5.2.28.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.31 (s, 3H, CH_3), 7.19-7.26 (m, 3H, Ar), 7.63-7.76 (m, 4H, Ar), 7.94 (s, 1H, Ar), 11.50 (s, 1H, NH).

5.2.28.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 13.9 (CH_3), 20.8 (CH_3), 103.6 (CH tiazol), 125.6 (CH, Ar), 125.8 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.2 (C, Ar), 131.3 (C, Ar), 137.1 (C, Ar), 138.3 (C, Ar), 144.8 (C, Ar), 149.4 (C, Ar), 169.3 (C=N), 172.2 (S-C=N).

5.2.29 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(4-fluorofenil)-1,3-tiazol (24k; GT-19)



5.2.29.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 2.79 mmol (0.606 g) da 2-bromo-4'-fluoroacetofenona, 13 mL de isopropanol e 2.79 mmol (0.730 g) do composto (**GT-01**). O produto não precisou de posterior purificação.

Cristais beges; P.F.: 267-269 °C; Rend.: 0.85 g (80%); R_f = 0.66 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

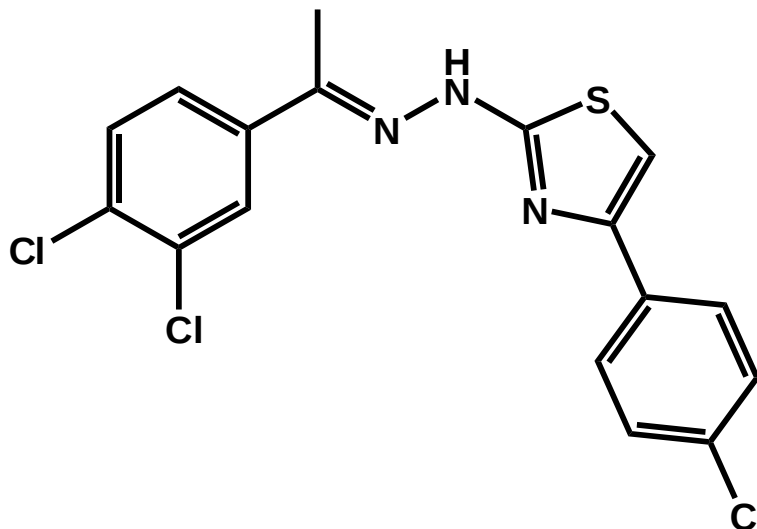
5.2.29.2 **Análise elementar para $C_{17}H_{12}Cl_2FN_3S$:** Teórico: C, 53.69; H, 3.18; N, 11.05; S, 8.43. Calculado: C, 53.53; H, 3.52; N, 10.95; S, 8.42.

5.2.29.3 **IV, principais sinais:** 2923 (CH), 1615 (C=N) cm^{-1} .

5.2.29.4 **RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6):** δ 2.29 (s, 3H, CH₃), 7.20-7.31 (m, 3H, Ar), 7.61-7.73 (m, 2H, Ar), 7.87-7.91 (m, 3H, Ar), 11.00 (s, 1H, NH).

5.2.29.5 **RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6):** δ 13.9 (CH₃), 104.3 (CH tiazol), 115.4 (CH, Ar), 115.7 (CH, Ar), 125.7 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 127.6 (CH, Ar), 127.7 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.2 (C, Ar), 131.3 (C, Ar), 138.3 (C, Ar), 144.8 (C, Ar), 148.6 (C, Ar), 160.1 (C-F, Ar), 163.3 (C=N), 169.5 (S-C=N).

5.2.30 4-(4-clorofenil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24I; GT-10)



5.2.30.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (0.889 g) da 2-bromo-4'-cloroacetofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto não precisou de posterior purificação.

Cristais beges; PF: 266-268 °C; Rend.: 1.2 g (79%); R_f 0.72 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.30.2 Análise elementar para $C_{17}H_{12}Cl_3N_3S$: Teórico: C, 51.47; H, 3.05; N, 10.59; S, 8.08. Calculado: C, 51.35; H, 3.22; N, 10.58; S, 7.93.

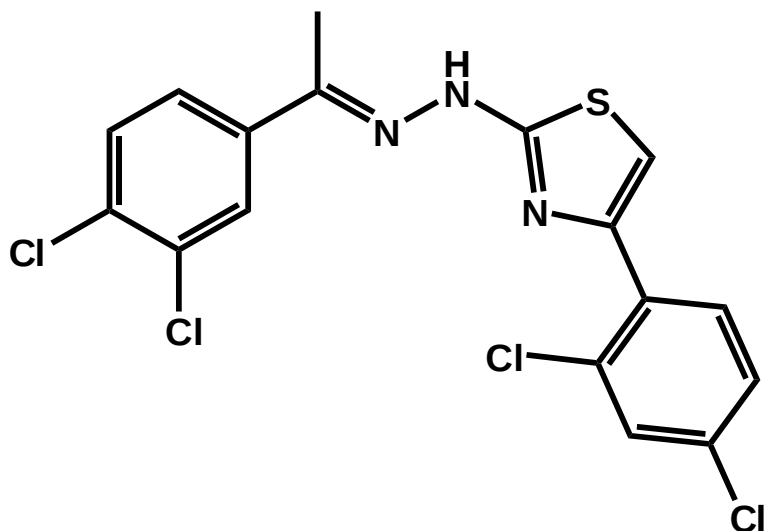
5.2.30.3 IV, principais sinais: 3047 (CH), 1611 (C=N) cm^{-1} .

5.2.30.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.28 (s, 3H, CH₃), 7.38-7.45 (m, 3H, Ar), 7.60-7.71 (m, 2H, Ar), 7.82-7.90 (m, 3H, Ar), 10.59 (s, 1H, NH).

5.2.30.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 13.9 (CH₃), 105.3 (CH tiazol), 125.7 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.2 (C, Ar), 131.3 (C, Ar), 132.1 (C, Ar), 133.1 (C, Ar), 138.3 (C, Ar), 144.6 (C-Cl, Ar), 148.3 (C=N), 169.5 (S-C=N).

5.2.30.6 EMAR (ESI): Calculado para $C_{17}H_{13}Cl_3N_3S$ $[M+H]^+$: 395.99; encontrado 395.9470.

5.2.31 4-(2,4-diclorofenil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24m; GT-11)



5.2.31.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (0.851 g) da 2,2',4'-tricloroacetofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Cristais cinza; PF: 244-246 °C; Rend.: 0.9 g (54%); R_f 0.65 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.31.2 Análise elementar para $C_{17}H_{11}Cl_4N_3S$: Teórico: C, 47.36; H, 2.57; N, 9.75; S, 7.44. Calculado: C, 47.60; H, 2.61; N, 9.71; S, 7.50.

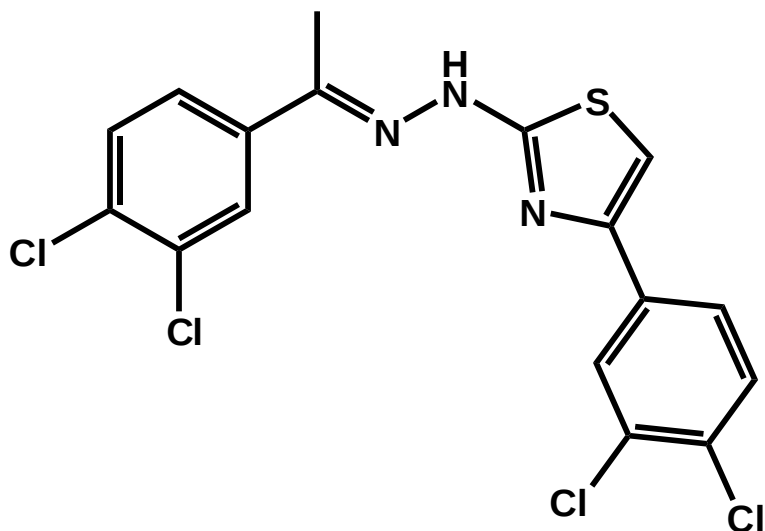
5.2.31.3 IV, principais sinais: 2923 (CH), 1623 (C=N) cm^{-1} .

5.2.31.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.31 (s, 3H, CH₃), 7.44-7.53 (m, 2H, Ar), 7.67-7.77 (m, 3H, Ar), 7.91-7.95 (m, 2H, Ar), 11.51 (s, 1H, NH).

5.2.31.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 17.0 (CH₃), 105.0 (CH tiazol), 128.3 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 132.6 (CH, Ar), 131.2 (C, Ar), 131.3 (C, Ar), 132.1 (C, Ar), 133.1 (C, Ar), 138.3 (C, Ar), 144.6 (C, Ar), 168.3 (C=N), 171.5 (S-C=N).

5.2.31.6 EMAR (ESI): Calculado para $C_{17}H_{12}Cl_4N_3S$ $[M+H]^+$: 429.95; encontrado 429.9246.

5.2.32 4-(3,4-diclorofenil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24n; GT-08)



5.2.32.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (1.02 g) da 2-bromo-3',4'-dicloroacetofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Cristais beges; PF: 266-268 °C; Rend.: 1.2 g (79%); R_f = 0.76.

5.2.32.2 Análise elementar para $C_{17}H_{11}Cl_4N_3S$: Teórico: C, 47.36; H, 2.57; N, 9.75; S, 7.44. Calculado: C, 47.34; H, 2.30; N, 9.71; S, 7.43.

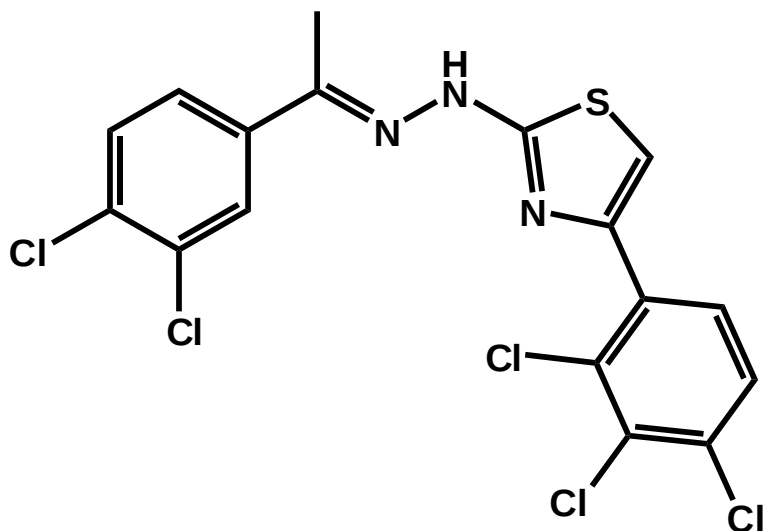
5.2.32.3 IV, principais sinais: 3043 (CH), 1616 (C=N) cm^{-1} .

5.2.32.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.29 (s, 3H, CH_3), 7.56-7.73 (m, 4H, Ar), 7.81-8.08 (m, 3H, Ar), 9.10 (s, 1H, NH).

5.2.32.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 14.5 (CH_3), 107.3 (CH tiazol), 126.2 (CH, Ar), 126.3 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 130.3 (CH, Ar), 131.2 (CH, Ar), 131.5 (CH, Ar), 131.8 (C, Ar), 132.0 (C, Ar), 132.0 (C, Ar), 132.1 (C, Ar), 135.8 (C, Ar), 139.0 (C, Ar), 144.9 (C, Ar), 148.6 (C=N), 170.3 (S-C=N).

5.2.32.6 EMAR (ESI): Calculado para $C_{17}H_{12}Cl_4N_3S$ $[M+H]^+$: 429.95; encontrado 429.8872.

5.2.33 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(2,3,4-triclorofenil)-1,3-tiazol (24o; GT-22)



5.2.33.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (1.152 g) da 2-bromo-2',3',4'-triclouroacetofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Cristais laranjas escuros; PF: 214-217 °C; Rend.: 0.23 g (13%); R_f 0.55.

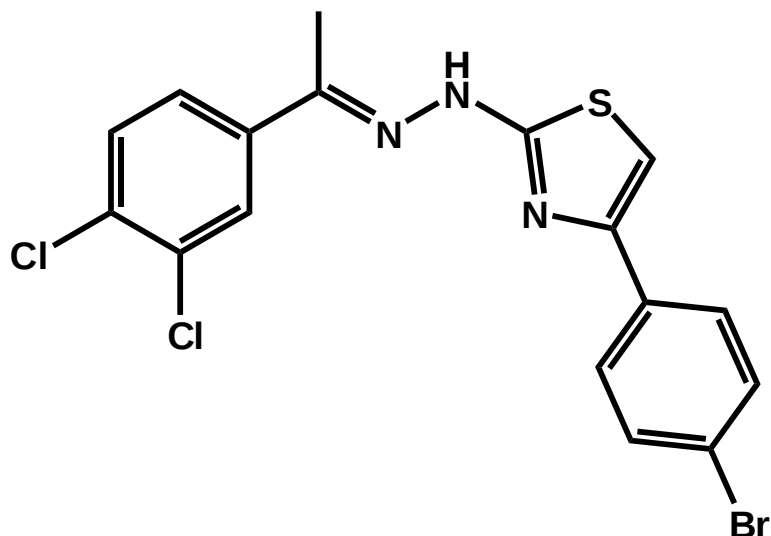
5.2.33.2 Análise elementar para $C_{17}H_{10}Cl_5N_3S$: Teórico: C, 43.85; H, 2.16; N, 9.02; S, 6.89. Calculado: C, 43.90; H, 1.94; N, 9.06; S, 6.81.

5.2.33.3 IV, principais sinais: 2922 (CH), 1621 e 1567 (C=N) cm^{-1} .

5.2.33.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.27 (s, 3H, CH₃), 7.59-7.89 (m, 3H, Ar), 8.19-8.37 (m, 3H, Ar), 10.31 (s, 1H, NH).

5.2.33.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 13.8 (CH₃), 117.3 (CH tiazol), 126.2 (CH, Ar), 126.3 (CH, Ar), 126.8 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 130.2 (CH, Ar), 131.3 (C, Ar), 131.6 (C, Ar), 132.0 (C, Ar), 132.1 (C, Ar), 135.8 (C, Ar), 138.2 (C, Ar), 145.3 (C, Ar), 160.6 (C=N), 179.3 (S-C=N).

5.2.34 4-(4-bromofenil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24p; GT-09)



5.2.34.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (1.05 g) da 2,4'-dibromoacetofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto não precisou de posterior purificação.

Cristais cinza escuro; PF: 265-267 °C; Rend.: 1.10 g (65%); R_f 0.71 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

5.2.34.2 Análise elementar para $C_{17}H_{12}BrCl_2N_3S$: Teórico: C, 46.28; H, 2.74; N, 9.52; S, 7.27. Calculado: C, 46.29; H, 2.92; N, 8.55; S, 7.30.

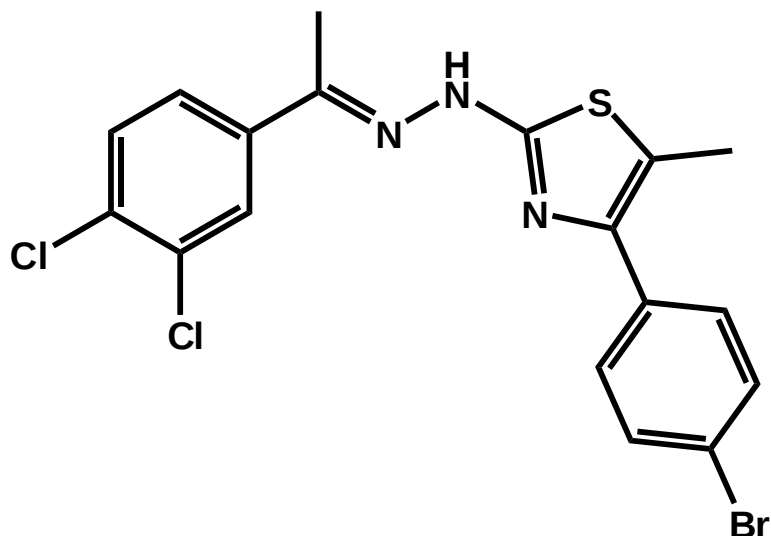
5.2.34.3 IV, principais sinais: 2925 (CH), 1616 (C=N) cm^{-1} .

5.2.34.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.30 (s, 3H, CH_3), 5.19 (s, 1H, NH), 7.42 (s, 1H, CH tiazol), 7.59 (d, 2H, Ar), 7.65 (d, 1H, Ar), 7.73 (dd, 1H, Ar), 7.80 (d, 2H, Ar), 7.92 (d, 1H, Ar).

5.2.34.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 13.8 (CH_3), 105.3 (CH tiazol), 120.6 (C, Ar), 125.7 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 127.6 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.1 (C, Ar), 131.3 (CH, Ar), 131.5 (CH, Ar), 133.7 (C, Ar), 138.4 (C, Ar), 144.2 (C, Ar), 149.1 (C=N), 169.5 (S-C=N).

5.2.34.6 EMAR (ESI): Calculado para $C_{17}H_{11}BrCl_2N_3S$ $[M-H]^+$: 437,92; encontrado 437.9016.

5.2.35 4-(4-bromofenil)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-5-metil-1,3-tiazol (24q; GT-17)



5.2.35.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (1.112 g) da 2,4'-dibromopropiofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto não precisou de posterior purificação.

Cristais beges; PF: 270 °C; Rend.: 1.20 g (69%); R_f = 0.65 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

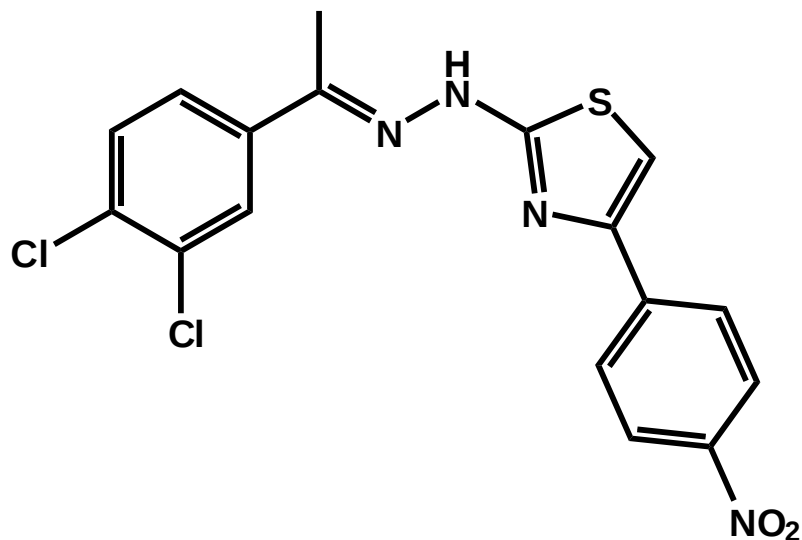
5.2.35.2 Análise elementar para $C_{18}H_{14}BrCl_2N_3S$: Teórico: C, 47.49; H, 3.10; N, 9.23; S, 7.04. Calculado: C, 47.52; H, 3.02; N, 9.83; S, 7.05.

5.2.35.3 IV, principais sinais: 2923 (CH), 1622 (C=N) cm^{-1} .

5.2.35.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.31 (s, 3H, CH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3), 7.54-7.67 (m, 5H, Ar), 7.75-7.78 (m, 1H, Ar), 7.97 (s, 1H, Ar), 10.51 (s, 1H, NH).

5.2.35.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 12.1 (CH_3), 14.0 (CH_3), 118.4 (C5 tiazol), 120.8 (C, Ar), 125.9 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 130.2 (CH, Ar), 130.5 (CH, Ar), 131.3 (CH, Ar), 131.5 (CH, Ar), 133.7 (C, Ar), 138.2 (C, Ar), 144.2 (C, Ar), 149.1 (C=N), 165.5 (S-C=N).

5.2.36 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol (24r; GT-13)



5.2.36.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (0.929 g) da 2-bromo-4'-nitroacetofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Cristais laranja vivo; PF: 226-228 °C; Rend.: 1.11 g (71%); R_f = 0.61.

5.2.36.2 Análise elementar para $C_{17}H_{12}Cl_2N_4O_2S$: Teórico: C, 50.13; H, 2.97; N, 13.76; S, 7.87. Calculado: C, 50.12; H, 3.00; N, 13.69; S, 8.07.

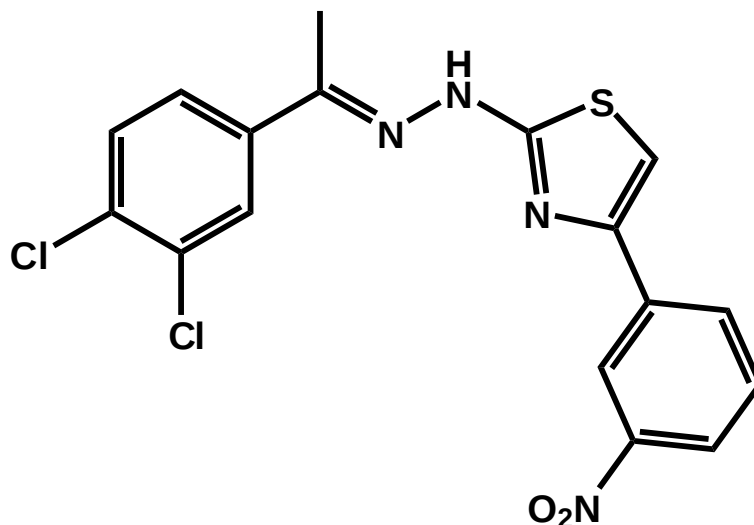
5.2.36.3 IV, principais sinais: 3304 (NH), 1597 e 1565 (C=N) cm^{-1} .

5.2.36.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.32 (s, 3H, CH_3), 4.00 (s, 1H, NH), 7.67 (s, 1H, Ar), 7.70-7.78 (m, 2H, Ar), 7.95 (s, 1H, Ar), 8.13 (d, 2H, Ar), 8.29 (d, 2H, Ar).

5.2.36.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 16.2 (CH_3), 106.5 (CH tiazol), 121.4 (CH, Ar), 123.4 (CH, Ar), 127.0 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 131.6 (CH, Ar), 131.9 (CH, Ar), 132.5 (CH, Ar), 132.7 (C, Ar), 132.9 (C, Ar), 137.6 (C, Ar), 139.8 (C, Ar), 144.5 (C, Ar), 158.6 (C=N), 171.1 (S-C=N).

5.2.36.6 EMAR (ESI): Calculado para $C_{17}H_{11}Cl_2N_4O_2S$ $[M-H]^+$: 405,00; encontrado 404.9496.

5.2.37 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(3-nitrofenil)-1,3-tiazol (24s; GT-15)



5.2.37.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (0.929 g) da 2-bromo-3'-nitroacetofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto não precisou de posterior purificação.

Cristais laranja; PF: 234-236 °C; Rend.: 1.30 g (83%); R_f = 0.63.

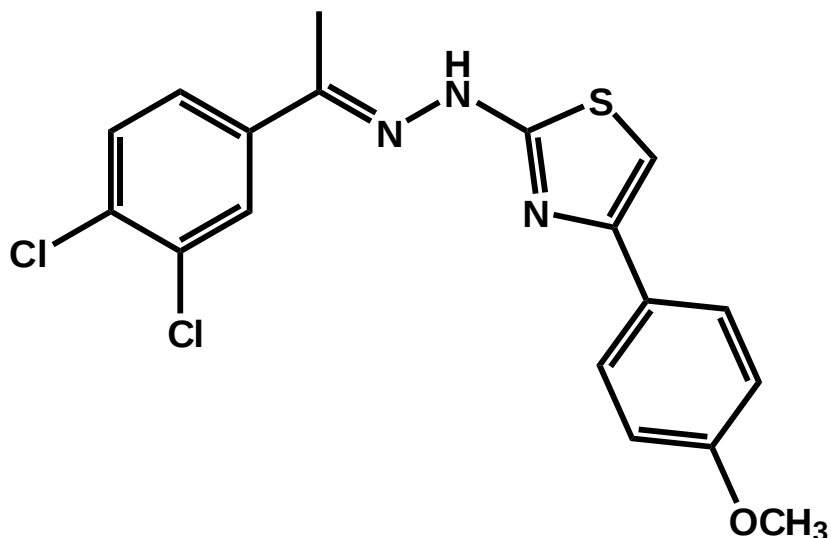
5.2.37.2 Análise elementar para $C_{17}H_{12}Cl_2N_4O_2S$: Teórico: C, 50.13; H, 2.97; N, 13.76; S, 7.87. Calculado: C, 50.33; H, 2.87; N, 13.77; S, 7.88.

5.2.37.3 IV, principais sinais: 3089 (CH), 1614 e 1565 (C=N) cm^{-1} .

5.2.37.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.32 (s, 3H, CH_3), 7.69 (m, 5H, Ar), 7.91 (d, 1H, Ar), 8.13 (dd, 1H, Ar), 8.30 (d, 1H, Ar), 10.51 (s largo, 1H, NH).

5.2.37.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 14.2 (CH_3), 107.5 (CH tiazol), 120.4 (CH, Ar), 122.4 (CH, Ar), 126.0 (CH, Ar), 127.6 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 130.9 (CH, Ar), 131.5 (CH, Ar), 131.7 (C, Ar), 131.9 (C, Ar), 136.6 (C, Ar), 138.8 (C, Ar), 144.5 (C, Ar), 148.6 (C=N), 170.1 (S-C=N).

5.2.38 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(4-metoxifenil)-1,3-tiazol (24t; GT-14)



5.2.38.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (0.872 g) da 2-bromo-4'-metoxiacetofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto não precisou de posterior purificação.

Cristais amarelos; PF: 216-218 °C; Rend.: 1.22 g (81%); R_f = 0.6 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

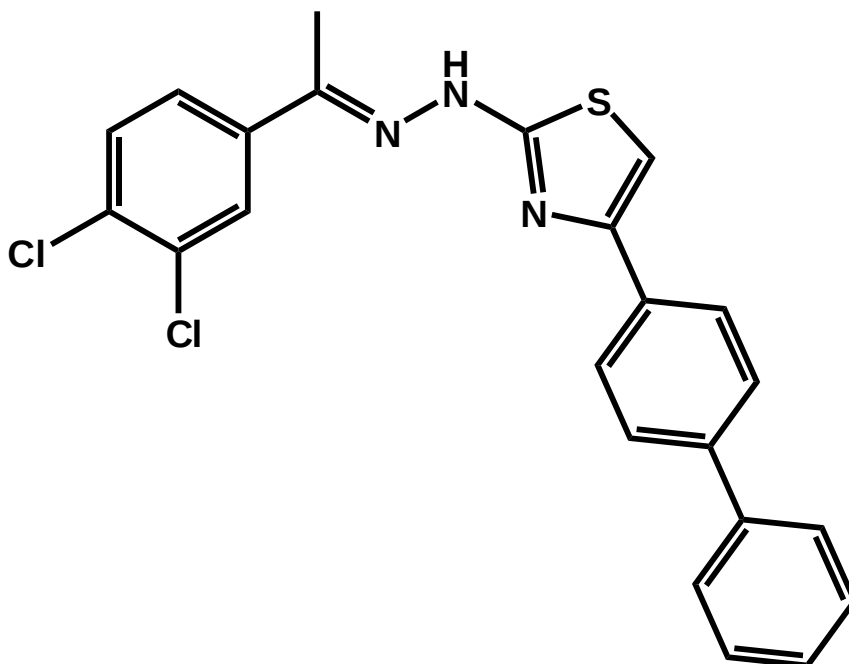
5.2.38.2 Análise elementar para $C_{18}H_{15}Cl_2N_3OS$: Teórico: C, 55.11; H, 3.85; N, 10.71; S, 8.17. Calculado: C, 55.09; H, 3.62; N, 10.50; S, 8.23.

5.2.38.3 IV, principais sinais: 2914 (CH), 1611 (C=N) cm^{-1} .

5.2.38.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.31 (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 3H, O- CH_3), 6.97 (d, 2H, Ar), 7.17 (s, 1H, CH tiazol), 7.58-7.89 (m, 4H, Ar), 7.95 (s, 1H, Ar), 10.29 (s largo, 1H, NH).

5.2.38.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 13.8 (CH_3), 55.1 (O- CH_3), 102.2 (CH tiazol), 114.0 (CH, Ar), 125.7 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 127.2 (CH, Ar), 130.6 (CH, Ar), 131.1 (C, Ar), 131.3 (C, Ar), 138.4 (C, Ar), 144.4 (C, Ar), 149.5 (C, Ar), 158.9 (C=N), 169.3 (S-C=N).

5.2.39 4-(bifenil-4-il)-2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-1,3-tiazol (24u; GT-26)



5.2.39.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (1.047 g) da 2-bromo-4'-fenilacetofenona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto foi recristalizado em tolueno.

Cristais beges; PF: 269-271 °C; Rend.: 1.15 g (61%); R_f = 0.78 (Tolueno / Acetato de etila 6:4).

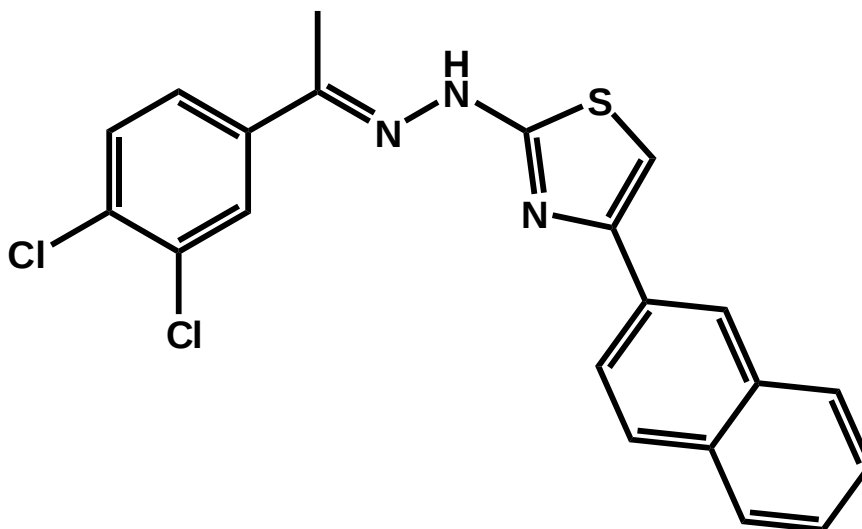
5.2.39.2 Análise elementar para $C_{23}H_{17}Cl_2N_3S$: Teórico: C, 63.02; H, 3.91; N, 9.59; S, 7.31. Calculado: C, 63.08; H, 3.98; N, 9.55; S, 7.21.

5.2.39.3 IV, principais sinais: 2925 (CH), 1608 (C=N) cm^{-1} .

5.2.39.4 RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.32 (s, 3H, CH_3), 7.33-7.48 (m, 5H, Ar), 7.66-7.78 (m, 6H, Ar), 7.93 (s largo, 2H, Ar), 7.96 (s largo, 1H, NH).

5.2.39.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 15.0 (CH_3), 104.7 (CH tiazol), 125.8 (CH, Ar), 126.2 (CH, Ar), 126.5 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 129.0 (CH, Ar), 130.6 (C, Ar), 131.2 (C, Ar), 131.3 (C, Ar), 133.2 (C, Ar), 138.4 (C, Ar), 139.2 (C, Ar), 139.6 (C, Ar), 150.0 (C=N), 169.4 (S-C=N).

5.2.40 2-[1-(3,4-diclorofenil)etilideno-hidrazinil]-4-(naftalen-2-il)-1,3-tiazol (24v; GT-18)



5.2.40.1 Procedimento reacional semelhante ao descrito no item **2.22.1**, 3.81 mmol (0.948 g) da 2-bromo-1-(naftil)etanona, 25 mL de isopropanol e 3.81 mmol (1.0 g) do composto (**GT-01**). O produto foi recristalizado em tolueno.

Cristais beges; PF: 259-260 °C; Rend.: 1.14 g (72%); R_f = 0.68.

5.2.40.2 Análise elementar para $C_{21}H_{15}Cl_2N_3S$: Teórico: C, 61.17; H, 3.67; N, 10.19; S, 7.78. Calculado: C, 61.18; H, 3.94; N, 10.21; S, 7.99.

5.2.40.3 IV, principais sinais: 3047 (CH), 1621 (C=N) cm^{-1} .

5.2.40.4 RMN de 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 2.32 (s, 3H, CH_3), 7.49 (m, 3H, Ar), 7.62-7.75 (m, 3H, Ar), 7.88-8.00 (m, 5H, Ar), 8.38 (s largo, 1H, NH).

5.2.40.5 RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, $DMSO-d_6$): δ 13.9 (CH_3), 105.3 (CH tiazol), 123.9 (CH, Ar), 124.2 (CH, Ar), 125.7 (CH, Ar), 126.1 (CH, Ar), 126.5 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 127.6 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 130.6 (C, Ar), 131.1 (C, Ar), 131.3 (C, Ar), 131.6 (C, Ar), 132.4 (C, Ar), 133.1 (C, Ar), 138.4 (C, Ar), 144.6 (C, Ar), 149.7 (C=N), 169.5 (S-C=N).

5.3 Protocolos da Avaliação Farmacológica

5.3.1 Animais

Para a determinação da citotoxicidade em esplenócitos e para os experimentos de infecção *in vitro* e *in vivo*, camundongos BALB/c (fêmeas entre 6 a 8 semanas) foram fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM, Salvador, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas esterilizadas, e receberam alimentação e água à vontade. Os experimentos foram aprovados pelos comitês de ética da FIOCRUZ.

5.3.2 Células, Enzimas e Inibidores Químicos

O baço de camundongo foi macerado e o sobrenadante foi lavado em meio RPMI-1640. O número de macrófagos foi determinado com o auxílio de um microscópio óptico e ajustado de acordo com o ensaio. Para os ensaios de infecção *in vitro*, macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, foram sensibilizados com tioglicolato de sódio (3 %) e lavados em meio RPMI-1640 por duas vezes e a densidade celular foi ajustada com o auxílio de um microscópio óptico. Epimastigotas da cepa Y foram coletadas e mantidas em meio axênico usando o meio de cultura "liver infusion triptose" contendo 10% de SBF, 1% de hemina, 1% de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina e mantidas sob 26 °C. Tripomastigotas circulantes da cepa Y foram coletadas do sobrenadante de células LLC-MK₂ infectadas. Os parasitas foram então mantidos em ambiente axênico usando o meio RPMI-1640 contendo 10% de SBF, 1 % de hemina, 1 % de meio R9 e 50 µg/mL de gentamicina em estufa sob 37 °C e 5 % de CO₂. Cruzaína recombinante foi expressa e purificada seguindo o protocolo descrito por McKerrow e col. ^[105] e gentilmente fornecida pelo Prof. James H. McKerrow do Departamento de Patologia da Universidade da Califórnia (São Francisco, CA, EUA). benznidazol foi fornecido pelo LAFEPE (Recife, Brasil).

5.3.3 Inibição da Enzima Cruzaína

A atividade enzimática foi medida baseada na clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC (benzoil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina), que gera o grupo repórter 7-amino-4-metilcumarina. Para a análise da fluorescência utilizaram-se os comprimentos de onda de 340 nm para excitação e 440 nm para emissão. O ensaio foi realizado em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5 na presença de 0,5 nM de cruzaína, 2,5 μ M de substrato ($K_m=1 \mu$ M), 1 mM de mercaptoetanol e 0,01% de Triton X-100, em volume final de 200 μ L. Os ensaios foram acompanhados por cinco minutos e os cálculos de atividade enzimática baseados na velocidade inicial de reação. Inicialmente os compostos foram avaliados na concentração de 10 μ M, e a atividade foi comparada com o controle contendo apenas DMSO. Caso fosse observado mais de 70% de inibição da enzima nesta concentração, foi determinado o valor de CI_{50} , baseado em pelo menos sete concentrações dos compostos, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 para análise dos dados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em placas em 96 poços.

5.3.4 Toxicidade para Macrófagos j774

Foram plaqueadas 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços em meio RPMI completo. Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO_2 por 24 horas; os poços foram lavados 2 vezes com salina estéril; a droga foi adicionada em diferentes concentrações nos poços após as lavagens (em triplicata). Como controle positivo foi utilizado a Violeta de genciana (10 μ g/mL ou 20 μ M). O controle negativo foi composto apenas por células em meio RPMI completo; Posteriormente as placas foram novamente incubadas a 37 °C e 5 % de CO_2 por 72 horas. Os poços foram lavados mais 2 vezes com salina estéril. Em seguida foi adicionado o meio RPMI sem phenol red e 10 % de Alamar Blue (volume final 200 μ L). Foi acrescentada na placa uma triplicata contendo apenas RPMI sem phenol red e 10 % de Alamar Blue (Branco). Por fim as placas foram mais uma vez incubadas a 37 °C e 5 % de CO_2 por 4 horas. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (570 nm; 600 nm).

5.3.5 Toxicidade para a Forma Tripomastigota

Tripomastigotas da cepa Y foram coletadas do sobrenadante de células LLC-MK₂ e distribuídas em uma placa de 96 poços para uma densidade final de 4×10^5 células por poço. Cada inibidor químico, dissolvidos como descrito no item 5.3.5, foram adicionados nos respectivos poços, em triplicatas. Bdz (1) e Nfx (2) foram usados como controles positivos neste ensaio. A placa foi então cultivada por 24 horas em 37° C contendo 5 % de CO₂. Após esse tempo, alíquotas de cada poço foram coletadas e o número de parasitas viáveis (ou seja, com motilidade aparente) foi contado em uma câmara de Neubauer. Para os poços que não receberam os inibidores químicos, assumiu-se como 100% do número de parasitas viáveis. As curvas dose-respostas foram determinadas e os valores das CI₅₀ foram calculados usando ao menos sete concentrações (data-points) usando regressão não-linear (Prism, versão 4.0).

5.3.6 Infecção de Tripomastigotas em Macrófagos

Macrófagos coletados do exsudado peritoneal de camundongos BALB/c foram distribuídos em uma placa de 24 poços para uma densidade final de 2×10^5 células por poço, contendo meio RPMI em 10 % de SBF. A placa foi cultivada por 24 horas para obter adesão celular. Em seguida, adicionou-se 2×10^6 tripomastigotas suspensas em meio RPMI em cada poço. A placa foi mantida por 2 horas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. Após esse tempo, a placa foi lavada com soluções salina, para remover tripomastigotas extracelulares. Logo em seguida, os inibidores químicos foram adicionados na concentração de 10 µM (previamente dissolvidos em DMSO e meio RPMI) em duplicatas. Bdz (1) foi usado como controle positivo. Após a adição dos inibidores químicos, a placa foi incubada por 6 horas, então o meio de cultivo foi substituído por um meio de cultivo "fresh", e a placa foi mantida em estufa por 96 horas. As células foram fixadas com metanol e observadas em microscópio ótico (Olympus, Tóquio, Japão). A taxa de macrófagos infectados foi contada em cada poço. O percentual de inibição da infecção da cultura tratada com os inibidores foi comparado com o controle negativo. Para a contagem de amastigotas, alíquotas de cada poço foram marcadas com uma solução de Giemsa e as lâminas foram

observadas em um microscópio ótico (Olympus, Tóquio, Japão). O número de amastigotas / macrófagos foi determinado pela contagem de pelo menos 100 macrófagos por cada lâmina analisada. O mesmo procedimento foi realizado para o cálculo da CI_{50} , usando ao menos cinco concentrações diferentes de cada inibidor químico. Foram realizados dois experimentos independentes para os cálculos da CI_{50} .

5.3.7 Análise Estatística

Para o item 3.6, a análise estatística foi calculada usando o teste ANOVA "one-way". As variáveis com $P < 0.05$ foram considerados com diferença estatística significativa.

6. Conclusões

6. Conclusões

A elaboração estrutural das aril-4-tiazolinonas (**23a–o**) foi fundamentada na tentativa de identificar compostos que mantivessem a atividade tripanocida, com menor toxicidade que seus bioisósteros não cíclicos, as tiossemicarbazonas. Já a construção dos aril-1,3-tiazóis (**24a–v**) teve como fundamento averiguar o efeito na atividade tripanocida após a troca do anel tiazolinona pelo tiazólico.

Com estas metas, as aril-4-tiazolinonas (**23a–o**) e os aril-1,3-tiazóis foram sintetizados a partir das tiossemicarbazonas (**Int-1-3**), através de metodologias sintéticas já implementadas em nosso laboratório. As condições reacionais utilizadas resultaram em rendimentos satisfatórios (35-88%) e pureza adequada. As estruturas foram confirmadas por I.V., RMN de ^1H e ^{13}C , análise elementar e massas.

As aril-4-tiazolinonas (**23a–o**), em particular os derivados contendo uma fenila localizada na posição N3 no anel heterocíclico (**23k–o**), apresentaram excelentes propriedades tripanocidas, já os 2-imino-1,3-tiazóis (**24a–v**) apresentaram propriedades tripanocidas mais modestas, quando comparados as 4-tiazolinonas.

Após triagem das propriedades tripanocidas dos compostos (**23a–v**) e (**24a–o**), foi possível identificar os compostos (**23d**) e (**24a, 24f, 24q e 24t**) como agentes tripanocidas com potência similar ao Bdz (**1**) em inibir a viabilidade celular de tripomastigotas da cepa Y.

Os compostos (**23l, 23m e 23n**) foram identificados como agentes tripanocidas mais potentes que o Bdz (**1**) em inibir a viabilidade celular de tripomastigotas da cepa Y. Estes compostos também foram capazes de erradicar a infecção *in vitro*, com melhor potência do que o observado com o Bdz (**1**).

A aril-4-tiazolinona (**23n**) foi identificada como o composto tripanocida mais potente dentre os compostos (**23a–o**). Esta aril-4-tiazolinona possui como característica estrutural a presença de uma fenila em N3 e uma isopropila em C5.

Para nossa surpresa, a série de 4-tiazolinonas (**23a–o**) não apresentou atividade pronunciada em inibir a cruzaina, como observado anteriormente em trabalhos do nosso grupo. Já a série de 1,3-tiazóis (**24a–v**) demonstrou excelente atividade frente à enzima, podendo destacar os compostos (**24a, 24c, 24f, 24h e 24g**), e sugerindo um possível mecanismo de ação desses compostos.

Por fim, obtivemos sucesso, já que identificamos duas séries de bioisósteros cíclicos das tiossemicarbazonas, com menor toxidade para macrófagos, e com maior atividade tripanocida.

Referências

Referências

- [1] Organização Mundial de Saúde; Disponível em: <<http://www.who.int/tdr>>. Acessado em: 2 de Março de 2012.
- [2] LOSET, J. R.; CHANG, S. Drugs for Neglected Diseases initiative model of drug development for neglected diseases: current status and future challenges. **Future Medicinal Chemistry**, 3 (11), 1361-1371, 2011.
- [3] Fundação Oswaldo Cruz; Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acessado em: 29 de Novembro de 2012.
- [4] KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas' disease). Ed. R. E. RAKEL, **Conn's Current Therapy**. W.B. Saunders, New York, 101-102, 2000.
- [5] URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, 19 (11), 495-501, 2003.
- [6] URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, 8 (4), 287-295, 2002.
- [7] CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 94 (I), 331-335, 1999.
- [8] DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Free-radical intermediates in the antiparasitic action of drugs and phagocytic cells. Ed. W.A. PRYOR, *Free Radicals in Biology*, vol 6, Academic Press, New York, 243-288, 1984.
- [9] HERNANDES, M. Z.; RABELLO, M. M.; LEITE, A. C.; CARDOSO, M. V.; MOREIRA, D. R.; BRONDANI, D. J.; SIMONE, C. A.; REIS, L. C.; SOUZA, M. A.; PEREIRA, V. R.; FERREIRA, R. S.; McKERROW, J. H. Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 18 (22), 7826-7835, 2010.
- [10] PÉCOUL, B.; ORBINSKI, J.; TORREELE, E. Fatal imbalance: the crisis in research and development for neglected diseases, Geneva: Médecins Sans Frontières/Drug for Neglected Diseases Working Group, 2001. Disponível em: <<http://www.msf.org/source/access/2001/fatal/fatal.pdf>>. Acessado em: 29 de Novembro de 2012.
- [11] TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, 5 (9), 785-799, 2006.
- [12] O'BRIEN, T. C.; MACKEY, Z. B.; FETTER, R. D.; CHOE, Y.; O'DONOGHUE, A. J.; ZHOU, M.; CRAIK, C. S.; CAFFREY, C. R.; McKERROW, J. H. A parasite

cysteine protease is key to host protein degradation and iron acquisition. **The Journal of Biological Chemistry**, 283 (43), 28934-28943, 2008.

[13] McKERROW, J. H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P.; SAJID, M. Proteases in parasitic diseases. **Annual Review Pathology**, 1 (497), 497-536, 2006.

[14] BRAK, K.; DOYLE, P. S.; McKERROW, J. H.; ELLMAN, J. A. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, 130 (20), 6404-6410, 2008.

[15] CAPUTTO, M. E.; FABIAN, L. E.; BENÍTEZ, D.; MERLINO, A.; RÍOS, N.; CERECETTO, H. MOLTRASIO, G. Y.; MOGLIONI, A. G.; GONZÁLEZ, M.; FINKIELSZTEIN, L. M. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 19 (22), 6818-6826, 2011.

[16] CAPUTTO, M. E.; CICCARELLI, A.; FRANK, F.; MOGLIONI, A. G.; MOLTRASIO, G. Y.; VEGA, D.; LOMBARDO, E.; FINKIELSZTEIN, L. M. Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolylhydrazone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 55, 155-163, 2012.

[17] DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; McKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, 45 (13), 2695-2707, 2002.

[18] CHIYANZU, I.; HANSELL, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; McKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and Evaluation of Isatins and Thiosemicarbazone Derivatives Against Cruzain, Falcipain-2 and Rhodesain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 13 (2), 3527-3530, 2003.

[19] GREENBAUM, D. C.; MACKEY, Z.; HANSELL, E.; DOYLE, P.; GUT, J.; CAFFREY, C. R.; LEHRMAN, J.; ROSENTHAL, P. J.; McKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Parasiticidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors Against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, 47 (12), 3212-3219, 2004.

[20] FUJII, N.; MALLARI, J. P.; HANSELL, E. J.; MACKEY, Z.; DOYLE, P.; ZHOU, Y. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; McKERROW, J. H.; GUY, R. K. Discovery of Potent

Thiosemicarbazone Inhibitors of Rhodesain and Cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 15 (1), 121-123, 2005.

[21] LEITE, A. C. L.; LIMA, R. S.; MOREIRA, D. R. M.; CARDOSO, M. V. O.; BRITO, A. C. G.; SANTOS, L. M. F.; HERNANDES, M. Z.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, R. S.; SOARES, M. B. P. Synthesis, docking, and *in vitro* activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14 (11), 3749-3757, 2006.

[22] LEITE, A. C. L.; MOREIRA, D. R. M.; CARDOSO, M. V. O.; HERNANDES, M. Z.; PEREIRA, V. R. A.; SILVA, R. O.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, M. S.; SOARES, M. B. P. Synthesis, Cruzain Docking, and *in vitro* Studies of Aryl-4-Oxothiazolylhydrazones Against *Trypanosoma cruzi*. **ChemMedChem**, 2 (9), 1339-1345, 2007.

[23] GUIDO, R. V.; TROSSINI, G. H.; CASTILHO, M. S.; OLIVA, G.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-Activity Relationships for a Class of Selective Inhibitors of the Major Cysteine Protease from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 23 (6), 964-973, 2008.

[24] TROSSINI, G. H. G.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D. Quantitative structure–activity relationships for a series of inhibitors of cruzaina from *Trypanosoma cruzi*: Molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 28, 3-11, 2009.

[25] PIZZO, C.; FARAL-TELLO, P.; SALINAS, G.; FLO, M.; ROBELLO, C.; WIPF, P.; MAHLER, S. G. Selenosemicarbazones as Potent Cruzipain Inhibitors and Their Antiparasitic Properties Against *Trypanosoma cruzi*. **Medicinal Chemistry Communications**, 3, 362-368, 2012.

[26] MERLINO, A.; BENITEZ, M.; CAMPILLO, N. E.; PAEZ, J. A.; TINOCO, L. W.; GONZALEZ, M.; CERECETTO, H. Amidines Bearing Benzofuroxan or Benzimidazole 1,3-Dioxide Core Scaffolds as *Trypanosoma cruzi*-Inhibitors: Structural Basis for Their Interactions with Cruzipain. **Medicinal Chemistry Communications**, 3, 90-101, 2012.

[27] MOREIRA, D. R. M. M.; COSTA, S. P. M.; HERNANDES, M. Z.; RABELLO, M. M.; OLIVEIRA FILHO, G. B.; MELO, C. M. L.; ROCHA, L. F.; SIMONE, C. A.; FERREIRA, R.; FRADICO, J. R. B.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; SRIVASTAVA, R. M.; PEREIRA, V.; SOARES, M. B. P. S.; LEITE, A. C. L. L. Structural Investigation of Anti-*Trypanosoma cruzi* 2-Iminothiazolidin-4-ones Allows

the Identification of Agents with Efficacy in Infected Mice. **Journal of Medical Chemistry**, 55 (24), 10918-10936, 2012.

[28] BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A. A. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 42 (7), 948-954, 2007.

[29] HOLLA, B. S.; MALINI, K. V.; RAO, B. S.; SAROJINI, B. K.; KUMARI, N. S. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 38(3), 313-318, 2003.

[30] G. TURAN-ZITOUNI, A. ÖZDEMİR, Z.A. KAPLANCIKLI, K. BENKLI, P. CHEVALLET, G. AKALIN, Synthesis and antituberculosis activity of new thiazolylhydrazone derivatives, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 43, 981-985, 2008.

[31] F. CHIMENTI, B. BIZARRI, A. BOLASCO, D. SECCI, P. CHIMENTI, A. GRANESE, S. CARRADORI, M. D'ASCENZIO, D. LILLI, D. RIVANERA, Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-disubstituted-1,3-thiazoles as anti-Candida spp. agents, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 46, 378-382, 2011.

[32] F. CHIMENTI, E. MACCIONI, D. SECCI, A. BOLASCO, P. CHIMENTI, A. GRANESE, O. BEFANI, P. TURINI, S. ALCARO, F. ORTUSO, M.C. CARDIA, S. DISTINTO, Selective inhibitory activity against MAO and molecular modeling studies of 2-thiazolylhydrazone derivatives, **Journal of Medicinal Chemistry**, 50, 707-712, 2007.

[33] F. CHIMENTI, D. SECCI, A. BOLASCO, P. CHIMENTI, A. GRANESE, S. CARRADORI, E. MACCIONI, M.C. CARDIA, M. YAÑEZ, F. ORALLO, S. ALCARO, F. ORTUSO, R. CIRILLI, R. FERRETTI, S. DISTINTO, J. KIRCHMAIR, T. LANGER, Synthesis, semipreparative HPLC separation, biological evaluation, and 3D-QSAR of hydrazothiazole derivatives as human monoamine oxidase B inhibitors, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 18, 5063-5070, 2010.

[34] F. CHIMENTI, D. SECCI, A. BOLASCO, P. CHIMENTI, A. GRANESE, S. CARRADORI, M. D'ASCENZIO, M. YAÑEZ, F. ORALLO, Synthesis and selective inhibition of human monoamine oxidases of a large scaffold of (4,5-substituted-thiazol-2-yl) hydrazones, **Medicinal Chemistry Communications**, 1, 61-72, 2010.

- [35] DPDx – Trypanosomiasis, American. Fact Sheet. Centers for Disease Control (CDC). Retrieved 12/Março/2012.
- [36] AUFDERHEIDE AC, SALO W, MADDEN M, ET AL. A 9,000-year record of Chagas disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; 101, 2034–39, 2004.
- [37] BERNSTEIN RE. Darwin's illness: Chagas disease resurgens. *Journal of the Royal Society of Medicine*; 77, 608–09, 1984.
- [38] LOUIS V KIRCHHOFF (17 December 2010). Chagas Disease (American Trypanosomiasis). **eMedicine**, Retrieved 12/Março/2012.
- [39] RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. **Lancet**, 375, 1388–402, 2010.
- [40] RASSI A, DIAS JC, MARIN-NETO JA, RASSI A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas disease; **Heart and Education in Heart**, 95 (7), 524–34, 2009.
- [41] MONCAYO A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; **98**, 577–91, 2003.
- [42] Organizacion Panamericana de la Salud. Estimacion cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas. Montevideo, Uruguay: Organizacion Panamericana de la Salud, 2006 (in Spanish). Disponível em: www.paho.org/; Acessado em 25/Novembro/2012.
- [43] CASTRO E. CHAGAS DISEASE, Lessons from routine donation testing. **Transfusion Medicine Reviews**; 19, (1); 16–23, 2009.
- [44] GASCON J, BERN C, PINAZO MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**; DOI:10.1016/j., 2009.
- [45] BRAZ LM, AMATO NETO V, OKAY TS. Reactivation of Trypanosoma cruzi infection in immunosuppressed patients: contributions for the laboratorial diagnosis standardization. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; 50, 65–66, 2008.
- [46] DIAS JCP. Natural history of Chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**; 65; 359–66, 1995.
- [47] GUIMARAES FN, DA SILVA NN, CLAUSELL DT, DE MELLO AL, RAPONE T, SNELL T, RODRIGUES N. Um surto epidemico de doença de Chagas de provável

transmissão digestiva, ocorrido em Teutonia. **Joint Information Systems Committee**; 73 (6): 1767–804, 1968.

[48] FREILIJ H, ALTCHER J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. **Clinical Infectious Diseases**; 21; 551–55, 1995.

[49] MARIN-NETO JA, RASSI A JR, MACIEL BC, SIMOES MV, SCHMIDT A. Chagas heart disease. In: Yusuf S, Cairns JA, Camm AJ, Fallen EL, Gersh BJ, eds. Evidence-based cardiology, 3rd edn. London: **British Medical Journal (BMJ) Books**, 823–41, 2010.

[50] CAMPBELL DA, WESTENBERGER SJ, STURM NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. **Current Molecular Medicine**; 4; 549–62, 2004.

[51] DE REZENDE JM, LUQUETTI AO. Chagasic megavisceras. In: Chagas' disease and the nervous system. Scientific publication, nº 547. Washington, DC: Pan American Health Organization, 149–71, 1994.

[52] UMESH S. PAL, MRUNAL K. SHIRSAT, INDRAJEET J. SINGHVI., MANOJ VERMA., NIKHIL SHAH; Review: Chagas Disease; **American Journal of Pharmtech Research**; Volume 1, Issue 3, 2011.

[53] BRANDALISE NA, ANDREOLLO NA, LEONARDI LS, CALLEJAS NETO F. Carcinoma associated with Chaga's megaesophagus. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**; 12, 196–99, 1985.

[54] GARCIA SB, ARANHA AL, GARCIA FR, ET AL. A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic cancer, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; 45, 91–93, 2003.

[55] FREITAS HF, CHIZZOLA PR, PAES AT, ET AL. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas heart disease. **International Journal of Cardiology**; 102: 239–47, 2005.

[56] RASSI A JR, RASSI SG, RASSI AG, ET AL. Sudden death in Chagas disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**; 76: 75–96, 2001.

[57] DEANE LM. Animal reservoirs of Trypanosoma cruzi in Brazil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**; 16: 27–48, 1964.

[58] GALVAO C, CARCAVALLO R, ROCHA DS, JURBERG J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera,

Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**; **202**: 1–36 2003.

[59] TEIXEIRA AR, MONTEIRO PS, REBELO JM. Emerging Chagas disease trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. **Emerging infectious disease**; **7** (1):100–12, 2001.

[60] SANTOS FERREIRA C, AMATO NETO V, GAKIYA E, BEZERRA RC, ALARCÓN RS. Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; **45** (1): 41–2, 2003.

[61] BERN C, MONTGOMERY SP, KATZ L, CAGLIOTI S, STRAMER SL. Chagas disease and the US blood supply. **Current Opinion in Infectious Diseases**; **21**: 476–82, 2008.

[62] US Centers for Disease Control and Prevention. Chagas disease after organ transplantation—Los Angeles, California, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; **55**: 798–800.

[63] ALARCÓN DE NOYA B, DÍAZ-BELLO Z, COLMENARES C, ET AL. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas.Venezuela. **Journal of Infectious Diseases**; **201** (9):1308–15, 2010.

[64] PEREIRA KS, SCHMIDT FL, GUARALDO AM, FRANCO RM, DIAS VL, PASSOS LA. Chagas disease as a foodborne illness. **Journal of food protection**; **72**: 441–46, 2009.

[65] RASSI A, RASSI A JR, RASSI SG, ET AL. Doença de Chagas. In: Lopes AC, ed. Tratado de clinica medica, 2nd edn. Sao Paulo: Editora Roca, 2009: 4123–34.

[66] BRUMPT E. Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la trypanosomose de Chagas . **Le Bulletin de la Société de pathologie exotique**; **7** (10): 706–10, 1914.

[67] GOMES YM, LORENA VM, LUQUETTI AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**; **104** (suppl 1): 115–21, 2009.

[68] DIEZ CN, MANATTINI S, ZANUTTINI JC, BOTTASSO O, MARCIPAR I. The value of molecular studies for the diagnosis of congenital Chagas disease in northeastern Argentina. **American journal of tropical medicine and hygiene**; **78**: 624–27, 2008.

- [69] BRITTO CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**; **104** (suppl 1): 122–35, 2009.
- [70] GARCIA S, RAMOS CO, SENRA JF. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas disease decreases cardiac alterations, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; 49 (4): 1521–8, 2005.
- [71] DNDi. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/pt/centro-de-documentacao/comunicados-de-imprensa/331-30-05-2012-lote-comercial-bzn-pediatrico.html>, acessado em 01 de junho de 2012.
- [72] DUBNER S, SCHAPACHNIK E, RIERA AR, VALERO E. Chagas disease: state-of-the-art of diagnosis and management. **International Journal of Cardiology**; 15 (6): 493–504, 2008.
- [73] WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Chemistry and Human Health Division Medicinal Chemistry Section, **Pure and Applied Chemistry**, 70, 1129, 1998.
- [74] FERREIRA, E. I.; Planejamento de Fármacos na Área de Doença de Chagas: Avanços e Desafios; **Revista Virtual de Química**, 4 (3), 225-246, 2012.
- [75] NWAKA, S.; HUDSON, A.; **Nature Reviews**, 5, 941, 2006.
- [76] FIOCRUZ – Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>, acessado em 12 de abril de 2012.
- [77] MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; **Current Drug Targets**, 10, 212, 2009.
- [78] GUHL, F.; LAZDINS-HELDS, J.K. (Eds.). Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. WHO & PAHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases Report, v.9, p. 1-2, 2007.
- [79] EL-SAYED, N. M. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409-415, 2005.
- [80] URBINA, J. A.; DOCAMPO, R.; Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 495-501, 2003.
- [81] MCKERROW, J. H.; DOYLE, P.S.; ENGEL, J.C.; PODUST, L.M.; ROBERTSON, S. A.; FERREIRA, R.; SAXTON, T.; ARKIN, M.; KERR, I. D.; BRINEN, L. S.; CRAIK, C. S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p. 263-269, 2009.

- [82] MCKERROW, J. H.; ROSENTHAL, P. J.; SWENERTON, R.; DOYLE, P.; **Current Opinion in Infectious Diseases.**, 21, 668, 2008.
- [83] FRICKER, S. P.; MOSI, R. M.; CAMERON, B. R.; BAIRD, I.; ZHU, Y.; ANASTASSOV, V.; COX, J.; DOYLE, P. S.; HANSELL, E.; LAU, G.; LANGILLE, J.; OLSEN, O.; QIN, L.; SKERLJ, R.; WONG, R. S. Y.; SANTUCCI, Z.; MCKERROW, J. H.; **Journal of Inorganic Biochemistry.**, 102, 1839, 2008.
- [84] SILVA, J. J. N.; OSAKABE, A. L.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W.; *In vitro* and *in vivo* antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors, **British Journal of Pharmacology**, 152, 112, 2007.
- [85] LUIZ C. DIAS E MARCO A. DESSOY; Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no Desenvolvimento de Novos Fármacos; **Química Nova**, Vol. 32, Nº. 9, 2444-2457, 2009.
- [86] DU, X.; HANSELL, E.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R.; COHEN, F. E.; MCKERROW, J. H. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents, **Chemistry & Biology**, 7, 733–742; 2000.
- [87] DORON C. GREENBAUM; ZACHARY MACKEY; ELIZABETH HANSELL; PATRICIA DOYLE; JIRI GUT; CONOR R. CAFFREY; JULIA LEHRMAN; PHILIP J. ROSENTHAL; JAMES H. MCKERROW; AND KELLY CHIBALE; Synthesis and Structure-Activity Relationships of Parasitocidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*; **Journal of Medicinal Chemistry**, 47, 3212-3219, 2004.
- [88] NAOAKI FUJII; JEREMY P. MALLARI; ELIZABETH J. HANSELL; Z. MACKEY; PATRICIA DOYLE; Y. M. ZHOU; JIRI GUT; PHILIP J. ROSENTHAL; JAMES H. MCKERROW; AND R. KIPLIN GUY; Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain; **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 15, 121–123, (2005).
- [89] R. SILES, S. CHEN, M. ZHOU, K. G. PINNEY, M. L. TRAWICK, Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 16, 4405 – 4409, 2006.
- [90] L. M. LIMA, E. J. BARREIRO, Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design; **Current Medicinal Chemistry**, 12, 23–49, 2005.

- [91] A. C. L. LEITE, L. M. F. SANTOS, F. F. BARBOSA, M. V. DE O. CARDOSO, D. R. M. MOREIRA, I. A. SOUZA, Synthesis of aminoacyl thiaolidones as potential antitumour agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 60, 121– 126, 2006.
- [92] C. J. ANDRES, J. J. BRONSON, S. V. D'ANDREA, M. S. DESHPANDE, P. J. FALK, K. A. GRANT-YOUNG, W. E. HARTE, H. T. HO, P. F. MISCO, J. G. ROBERTSON, D. STOCK, Y. X. SUN, A. W. WALSH, 4-Thiazolidinones: Novel Inhibitors of the Bacterial Enzyme MurB, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 10, 715 – 717, 2000.
- [93] G. KZÅZKGZZEL, A. KOCATEPE, E. DE CLERCQ, F. S, AHIN, M. GZLLZCE, Synthesis and biological activity of 4-thiazolidinones, thiosemicarbazides derived from diflunisal hydrazide, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 41, 353–359, 2006.
- [94] A. J. ALVES, A. C. L. LEITE, D. P. SANTANA, M. T. BELTRÃO, M. R. COELHO, P. GAYRAL, Synthesis of some 4-oxo- Δ^2 -thiazolin-2-ylhydrazones as potential antiprotozoal agents, *IL Farmaco*, 48, 1167–1171, 1993.
- [95] C.S. GRAEBIN, F.D. UCHOA, L.S.C. BERNARDES, V.L. CAMPO, I. CARVALHO, V.L. EIFLER-LIMA, Antiprotozoal agents: an overview, **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, 8, 345 e 366, 2009.
- [96] BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A. A. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde; **European Journal of Medicinal Chemistry**; 42; 948 e 954; 2007.
- [97] BU, X.; JING, H.; WANG, L.; CHANG, T.; JINA, L.; LIANG, Y. Organic base catalyzed O-alkylation of phenols under solvent-free condition. **Journal of Molecular Catalysis A**, 258, 121–124, 2006.
- [98] LEITE, A. C. L.; MOREIRA, D. R. M.; COELHO, L. C. D.; DE MENEZES, F. D.; BRONDANI, D. J. Synthesis of aryl-hydrazones via ultrasound irradiation in aqueous medium. **Tetrahedron Letters**, 49, 1538–1541, 2008.
- [99] ELIEL, E. L.; FISK, M. T.; PROSSER, T. α -Chlorophenylacetic acid. *Org. Synth. Coll.* **1963**, vol. 4, p.169.
- [100] VICINI, P.; GERONIKAKI, A.; ANASTASIA, K.; INCERTIA, M.; ZANI, F. Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14, 3859–3864, 2006.

- [101] PIZZO, C.; SAIZ, C.; TALEVI, A.; GAVERNET, L.; PALESTRO, P.; BELLERA, C.; BLANCH, L. B.; BENÍTEZ, D.; CAZZULO, J. J.; CHIDICHIMO, A.; WIPF, P.; MAHLER, S. G. Synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones based on multicomponent reactions and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. *Chemical Biology & Drug Design*, 77, 162–177, 2011.
- [102] ERIAN, A. W.; SHERIF, S. M.; GABER, H. M. The chemistry of α -haloketones and their utility in heterocyclic synthesis. *Molecules*, 8, 793–865, 2003.
- [103] ZHANG, D. N.; LI, J. T.; SONG, Y. L.; LIU, H. M.; LI, H. Y. Efficient one-pot three-component synthesis of *N*-(4-arylthiazol-2-yl)hydrazones in water under ultrasound irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 475–478, 2012.
- [104] ROMANHA, A. J.; DE CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C. L.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J. E.; BUSTAMANTE, J. M.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; ROMERO, L. I.; BAHIA, M. T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M. B. P.; ANDRADE, S. M.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z. A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 233–238, 2010.
- [105] FERREIRA, R.S.; BRYANT, C.; ANG, K. K.; MCKERROW, J.H.; SHOICHET, B.K.; RENSLO, A. R. Divergent modes of enzyme inhibition in a homologous structure-activity series. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 5005–5058, 2009.