



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

ARSÊNIO RODRIGUES OLIVEIRA

**OBTENÇÃO DE NOVOS FTALIL-TIAZÓIS E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTITUMORAL E IMUNOMODULATÓRIA *IN*
*VITRO***



RECIFE – PE
2014

ARSÊNIO RODRIGUES OLIVEIRA

**OBTENÇÃO DE NOVOS FTALIL-TIAZÓIS E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTITUMORAL E IMUNOMODULATÓRIA *IN*
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Síntese e Planejamento de Fármacos.

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

**RECIFE – PE
2014**

ARSÊNIO RODRIGUES OLIVEIRA

**OBTENÇÃO DE NOVOS FTALIL-TIAZÓIS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL
E IMUNOMODULATÓRIA *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Floriano Paes Silva Júnior (Examinador Externo)
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ

ARSÊNIO RODRIGUES OLIVEIRA

**OBTENÇÃO DE NOVOS FTALIL-TIAZÓIS E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTITUMORAL E IMUNOMODULATÓRIA *IN*
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Presidente:

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite – DCFar/UFPE

Membro Titular Interno:

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva – Departamento de Antibióticos/UFPE

Membro Titular Externo:

Prof. Dr. Floriano Paes Silva Júnior – IOC/FIOCRUZ – RJ

Membro Suplente Interno:

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima – Departamento de Antibióticos/UFPE

Membro Suplente Externo:

Prof^a. Dr^a Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro – CPqAM/FIOCRUZ – PE

**RECIFE – PE
2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Farias

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

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

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

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

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas graças que recebo diariamente e pelo esplendor da vida;

A Prof^a. Ana Cristina Lima Leite, por ter me recebido no LpQM (UFPE), grupo de pesquisa que coordena, aceitando ser minha orientadora do mestrado;

Aos componentes do LpQM: Daura, Dayane, Diogo, Edna, Elany, Gevanio, Laura, Lívia, Luana, Lucianna, Marcos, Míria, PA e Wan, pelo companheirismo e importantes contribuições neste período de minha formação;

A Prof^a. Teresinha e a Dr^a. Jaciana, pela realização dos ensaios antitumorais;

A Prof^a. Valdênia, pelos execução dos ensaios imunológicos;

A Central Analítica do DQF (UFPE) pelas análises espectroscópicas;

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado;

A Nerilin pela competência na execução do seu trabalho e pela receptividade todas as vezes que me dirigi à secretaria do PPGCF;

A minha família, Maria das Graças (Mainha), José (Papai), Tarcyso (Irmão), Ediozita (Cunhada) e Letícia (Sobrinha), por me apoiarem em tudo que idealizo fazer, em especial minha mãe que busca incansavelmente o meu sucesso;

As amigas: Dani, Izabel e Marciana, pela atenção nos momentos alegres e tensos;

A Aline pela parceria, cumplicidade e amizade neste período em que dividimos morada;

Ao Marcelo pela dedicação, cuidado, apoio e carinho neste momento de minha carreira;

A todos meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo e os fármacos disponíveis atualmente para a quimioterapia apresentam alta toxicidade, além de já mostrarem-se ineficazes, haja visto, o crescente surgimento de células tumorais resistentes a múltiplas drogas. Diante deste cenário, o desenvolvimento de novos protótipos a fármacos antineoplásicos é uma necessidade emergencial e representa uma linha de pesquisa relevante e promissora. Dentre as classes de fármacos sintéticos com atividade antitumoral, destacam-se as ftalimidas e os tiazóis. Com base nisso, este trabalho apresenta o planejamento e a síntese de uma série de 14 inéditos ftalil-tiazóis (As 01-14) candidatos a fármacos antitumorais potentes e menos tóxicos. Os compostos foram obtidos por rota sintética envolvendo duas etapas partindo da condensação entre o anidrido ftálico e a tiossemicarbazida, com posterior reação do composto obtido com diferentes α -halo-cetonas para a formação de anéis tiazóis diversamente substituídos. A purificação dos compostos obtidos foi realizada por recristalização em etanol. A elucidação estrutural foi realizada por meio da utilização de técnicas espectroscópicas de IV e RMN ^1H e ^{13}C . A fim de avaliar o potencial antitumoral destes ftalil-tiazóis, foi testado seu efeito citotóxico, *in vitro*, sobre linhagens de células tumorais [HEp-2 (carcinoma de laringe humana), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e MCF-7 (câncer de mama humana)]. Foram testados ainda frente a células fisiológicas de mamíferos (esplenócitos de camundongos BALB/c) e diante da produção, por estas células, de IFN- γ e IL-10 estimuladas por Con A. À exceção do composto As-02, todos os demais apresentaram potencial de inibição superior a 80% para a linhagem de leucemia. Os compostos com substituintes mais volumosos no anel tiazólico (As-09 e As-10) foram os menos tóxicos para as células fisiológicas de mamíferos. O composto As-09 apresentou também o melhor perfil citotóxico frente às linhagens tumorais ensaiadas. Para este foi mensurada a CI_{50} com valores inferiores a 13 $\mu\text{g/mL}$. Para a série de ftalil-tiazóis estudada, o composto As-09 foi o mais promissor protótipo a fármaco antitumoral.

Palavras-chave: Química medicinal. Câncer. Imunomodulação. Ftalimida. Tiazol.

ABSTRACT

Cancer is a leading cause of mortality worldwide and currently available drugs for chemotherapy show high toxicity, in addition to already show to be ineffective, there is see, the increasing emergence of resistant tumor cells to multiple drugs. In this scenario, the development of new prototypes to anticancer drugs is an urgent need and represents a line of research relevant and promising. Among the classes of synthetic drugs with antitumor activity, there are the phthalimides and thiazoles. Based on this, this paper presents the design and synthesis of a series of 14 unpublished phthalyl-thiazoles (As 01-14) candidates potent and less toxic antitumor drugs. The compounds were obtained by the synthetic route involving two steps starting from condensation between thiosemicarbazide and phthalic anhydride, with subsequent reaction of the compound obtained with different α -halo-ketones to form different rings variously substituted thiazoles. Purification of the obtained compounds was performed by recrystallization from ethanol. The structural elucidation was performed by use of spectroscopic techniques such as IR and ^1H and ^{13}C NMR. In order to evaluate the antitumor potential of these phthalyl-thiazoles, their cytotoxic effect in vitro was tested on cancer cell lines [HEp-2 (human larynx carcinoma), NCI-H292 (human pulmonary mucoepidermoid carcinoma), HL-60 (acute promyelocytic leukemia) and MCF-7 (human breast cancer)]. Even against physiological mammalian cells (splenocytes from BALB/c mice) and before production by these cell, IFN- γ and IL-10 stimulated by Con A were tested. Except for the compound As-02, all others showed potential inhibition superior to 80% for the lineage leukemia. The compounds with bulky substituents on the thiazole ring (As-09 and As-10) were less toxic to physiological mammalian cells. The compound As-09 also showed a better cytotoxic profile across the tumor cell lines tested. To this was measured with IC_{50} values less than 13 $\mu\text{g/mL}$. For the series of thiazoles-phthalyl the compound As-09 studied was found to be the most promising prototype antitumor drug.

Keywords: Medicinal chemistry. Cancer. Immunomodulation. Phthalimid. Thiazol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura da Talidomida.....	18
Figura 02 – Morfina: imagem da Papaver somniferum e estrutura.	21
Figura 03 – Estrutura da quinina.....	21
Figura 04 – Estrutura do ácido acetilsalicílico.	22
Figura 05 – Cronograma da descoberta de alguns fármacos	23
Figura 06 – Curare: Estrutura da tubocurarina e planta de onde é extraída.	24
Figura 07 – Penicilina.	25
Figura 08 – Representação esquemática do processo de imuno edição tumoral.....	34
Figura 09 – Mecanismo de ação proposto para o tratamento do câncer com a talidomida, sendo exemplificado na ilustração o mieloma múltiplo.....	38
Figura 10 – Núcleos heterocíclicos constituintes da talidomida.	39
Figura 11 – Análogos da talidomida em ensaios clínicos para terapia antitumoral.....	39
Figura 12 – Fármacos que apresentam núcleo tiazol em suas estruturas.....	40
Figura 13 – Tia-netropsina e alguns agentes tiazóis antitumorais	41
Figura 14 – Derivado do tiazol com potente atividade antitumoral.	42
Figura 15 – Derivado do tiazol com potente atividade antitumoral.	42
Figura 16 – Derivados 2-(amino substituídos)-4-fenil-1,3-tiazol com potente atividade antitumoral.....	43
Figura 17 – Derivados do tiazol com potente atividade antitumoral.....	43
Figura 18 – Composto com propriedades antitumorais sintetizado pelo LpQM.....	50
Figura 19 – Bioisosterismo entre o composto identificado pelo LpQM e os novos derivados ftalil-tiazóis.	51
Figura 20 – Planejamento dos novos derivados ftalil-tiazóis.	52
Figura 21 – Reação de obtenção do composto As-int.	54
Figura 22 – Mecanismo de reação proposto para se obter o composto As-int.	55
Figura 23 – Espectro de IV do composto intermediário As-int.	56
Figura 24 – Espectro de RMN – ^1H do composto intermediário As-int.	57
Figura 25 – Espectro de RMN – ^{13}C do composto intermediário As-int.	58
Figura 26 – Reação de obtenção dos novos ftalil-tiazóis.....	59
Figura 27 – Mecanismo de reação genérico proposto para se obter os compostos da série As 01-14.	60
Figura 28 – Exemplo de Espectro de IV da série de ftalil-tiazóis (As-01).	61

Figura 29 – Exemplo de Espectro de RMN – ^1H da série de ftalil-tiazóis (As-01).....	62
Figura 30 – Exemplo de Espectro de RMN – ^{13}C da série de ftalil-tiazóis (As-01).	63
Figura 31 – Forma tautoméricas do composto As-01.	64
Figura 32 – Estabilidade dos tautômeros de um bioisómero a série As 01-14.	64
Figura 33 – Estrutura do composto As-01.	66
Figura 34 – Estrutura do composto As-02.	67
Figura 35 – Estrutura do composto As-03.	68
Figura 36 – Estrutura do composto As-04.	69
Figura 37 – Estrutura do composto As-05.	70
Figura 38 – Estrutura do composto As-06.	71
Figura 39 – Estrutura do composto As-07.	72
Figura 40 – Estrutura do composto As-08.	73
Figura 41 – Estrutura do composto As-09.	74
Figura 42 – Estrutura do composto As-10.	75
Figura 43 – Estrutura do composto As-11.	76
Figura 44 – Estrutura do composto As-12.	77
Figura 45 – Estrutura do composto As-13.	78
Figura 46 – Estrutura do composto As-14.	79
Figura 47 – Efeito dos compostos da série As 01-14 sobre a produção de IFN- γ	90
Figura 48 – Efeito dos compostos da série As 01-14 sobre a produção de IL-10.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Cronograma de eventos importantes nos estudos sobre o câncer.	28
Tabela 02 – Série de novos derivados ftalil-tiazóis (As 01-14).....	53
Tabela 03 – Avaliação <i>in vitro</i> do potencial inibitório da série de ftalil-tiazóis (As 01-14) sobre células de carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (NCI-H292).....	81
Tabela 04 – Avaliação <i>in vitro</i> do potencial inibitório da série de ftalil-tiazóis (As 01-14) sobre células de carcinoma de laringe humano (HEp-2).	82
Tabela 05 – Avaliação <i>in vitro</i> do potencial inibitório da série de ftalil-tiazóis (As 01-14) sobre células de câncer de mama humano (MCF-7).....	83
Tabela 06 – Avaliação <i>in vitro</i> do potencial inibitório da série de ftalil-tiazóis (As 01-14) sobre células de leucemia promielocítica aguda (HL-60).	85
Tabela 07 – Avaliação <i>in vitro</i> do potencial inibitório da série de ftalil-tiazóis (As 01-14) sobre linhagens de células tumorais.....	87
Tabela 08 – Avaliação <i>in vitro</i> da toxicidade em células de mamíferos para a série de ftalil-tiazóis (As 01-14).	88
Tabela 09 – Determinação da CI_{50} para o composto As-09.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico)

Ar – aromático

ATP – trifosfato de adenosina

CCD – cromatografia de camada delgada

CI₅₀ – Concentração de inibidor necessária para inibir 50% de um parâmetro

Con A – Concanavalina A

CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Recife, Brasil)

d – dubleto

DEPT – Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização

DMAP – di-metil-amino-piridina

DMF – N,N-dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

DMSO-*d*₆ – dimetilsulfóxido deuterado

DNA – ácido desoxirribonucléico

ELISA – “Enzyme-linked immunosorbent assay”

FDA – “Food and Drug Administration”

FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz

gpP – glicoproteína P

HEp-2 – Carcinoma de Laringe Humana

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HL-60 – Leucemia Promielocítica Aguda

IFN- γ – interferon gama

IL – interleucina

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

IUPAC – “International Union of Pure and Applied Chemistry”

IV – Infravermelho

LpQM – Laboratório de Planejamento em Química Medicinal

Naf – Naftil

NCI-H292 – Carcinoma Mucoepidermoide de Pulmão Humano

NHI – National Health Institute

NK – “*natural killer*”

MCF-7 – Câncer de Mama Humano

MDR – resistência a múltiplas drogas

MHC I – complexo de histocompatibilidade maior I

MTT – “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide”

OMS – Organização Mundial de Saúde

PF – ponto de fusão

Ph – fenil

PM – peso molecular

ppm – partes por milhão

q – quarteto

Rend. – rendimento

R_f – razão de frente

RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênios

RMN ¹³C – ressonância magnética nuclear de carbono treze

RPMI – "Roswell Park Memorial Institutell

s – singleto

t – tripleto

TMS – tetra-metil-silano

TNF- α – fator de necrose tumoral

UV – Ultravioleta

δ – deslocamento químico

π – ligação pi

σ – ligação sigma

λ – comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. A Química Medicinal: origem e evolução	20
2.2. Origem e desenvolvimento dos Protótipos a Fármacos	23
2.3. Câncer	27
2.3.1. Histórico.....	28
2.3.2. Epidemiologia	31
2.3.3. Quimioterapia do Câncer	31
2.3.4. Correlação entre o Sistema Imunológico e o Câncer	33
2.5. Talidomida.....	35
2.5.1. Mecanismos de ação da Talidomida	37
2.6. Análogos Estruturais da Talidomida (Ftalimidas)	38
2.7. Tiazóis.....	40
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. Objetivo Geral	44
3.2. Objetivos Específicos	44
4. MATERIAL E METODOS	45
4.1. Monitoramento das reações.....	45
4.2. Banho de ultrassom	45
4.3. Pontos de fusão	45
4.4. Análises Espectroscópicas.....	45
4.5. Equipamentos	46
4.6. Reagentes e Solventes	46
4.7. Protocolos da Avaliação Farmacológica	47
4.7.1. Avaliação da citotoxicidade em células tumorais.....	47
4.7.2. Avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos	47

4.7.3. Obtenção de células esplênicas de camundongos isogênicos.....	48
4.7.4. Ensaio de citotoxicidade dos compostos em células esplênicas	48
4.7.5. Avaliação da CI_{50} do composto mais promissor	49
4.7.6. Ensaio imunológicos	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. Planejamento Estrutural	50
5.2. Síntese dos Compostos	54
5.2.1. Síntese do Composto Intermediário	54
5.2.2. Síntese da Série de Derivados Ftalil-Tiazóis	58
5.2.3. Metodologia Sintética e Dados Espectroscópicos.....	65
1-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)tioureia (As-int)	65
2-(4-(clorometil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-01)	66
2-(4-feniltiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-02)	67
2-(4- <i>p</i> -toluiltiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-03)	68
2-(4-(4-metoxifenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-04)	69
2-(4-(4-fluorfenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-05)	70
2-(4-(4-clorofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-06)	71
2-(4-(4-bromofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-07).....	72
2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-08)	73
2-(4-(bifenil-4-il)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-09)	74
2-(4-(naftalen-2-il)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-10)	75
2-(4-(3-nitrofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-11)	76
2-(4-(3,4-diclorofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-12)	77
2-(4-(2,4-diclorofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-13)	78
2-(4-(4-bromofenil)-5metiltiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-14)	79
5.3. Avaliação Farmacológica	80
5.3.1. Carcinoma Mucoepidermoide de Pulmão Humano (NCI-H292)	80

5.3.2. Carcinoma de Laringe Humana (HEp-2)	82
5.3.3. Câncer de Mama Humano (MCF-7)	83
5.3.4. Leucemia Promielocítica Aguda (HL-60)	85
5.3.5. Determinação da citotoxicidade em esplenócitos de camundongo	87
5.3.6. Determinação da CI_{50} do composto mais promissor	89
5.3.7. Avaliação imunomodulatória dos compostos.....	90
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	93
REFERÊNCIA	95

1. INTRODUÇÃO

No contexto atual, nota-se que as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de mortes no Brasil e no mundo, tendo seu lugar preenchido pelas doenças do aparelho circulatório e pelas neoplasias (INCA, 2013).

O câncer é uma patologia multifatorial em que estão envolvidas diversificadas vias bioquímicas e imunológicas (OMS, 2013). O arsenal quimioterápico disponível para o tratamento do câncer apresenta vários problemas quanto à especificidade, potencialidade e presença de efeitos indesejados. Além desses fatores, o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas é um elemento agravante na terapêutica do câncer (GOTTESMAN *et al.*, 2002).

Entretanto, a OMS afirma que 1/3 dos casos podem ser curados quando diagnosticados e tratados precocemente, tornando-se, assim, cada vez mais necessário medidas que levem a uma melhoria no diagnóstico/tratamento e consequentemente diminuição do número de óbitos (OMS, 2013).

Dentre essas medidas, a busca por novos fármacos potentes e seletivos para introdução na terapêutica oncológica é de essencial importância, haja visto que muitos aspectos desta doença ainda permanecem sem tratamento (INCA, 2013).

Historicamente a compreensão dos processos celulares e bioquímicos do câncer passou por diversas etapas, desde sua descoberta até a atualidade. Juntamente com a obtenção destes conhecimentos cada vez mais aprofundados e esclarecedores, ocorreram importantes descobertas científicas (ex. estrutura do DNA), surgimento de tecnologias (ex. sequenciamento do DNA) e compreensão de mecanismos biológicos (ex. proteínas G), os quais levaram a redução do índice de mortes por câncer em 2005 (DEVITA *et al.*, 2012).

Por muito tempo, os tumores foram vistos como uma massa composta apenas por células cancerosas. No entanto, recentemente, estes começaram a ser considerados como um tecido complexo constituído de diferentes tipos de células (ex. células imunes, endoteliais, mielóides, fibroblastos), as quais interagem de formas diferentes ao que se encontra nos tecidos normais.

As células normais também exercem importantes funções que levam a desenvolvimento e a progressão da doença. Frente a isso, se tem atualmente, um conceito quanto à biologia tumoral que esta não somente se restringe a células

tumorais, mas também as interações entre as células tumorais e estromais, que juntas formam o microambiente tumoral (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

Segundo Medrano (2013), as principais características desse microambiente tumoral são: desregulação de vias energéticas; sinais de proliferação autossustentados; evasão de sinais supressores de crescimento celular; replicação ilimitada; promoção de inflamação; invasão e metástase; indução da angiogênese; instabilidade genômica e desenvolvimento de mutações; resistência à morte celular; evasão dos mecanismos imunes antitumorais. Tais características são adquiridas através de uma forte seleção positiva durante a tumorigênese e representa o benefício da transformação celular que possibilita o desenvolvimento do câncer, sendo que as células que não sofrem estas mutações, provavelmente, não conseguem se estabelecer.

Tumores crescem e desenvolvem metástase por meio da angiogênese (formação de vasos sanguíneos). A inibição do processo angiogênico ou mesmo da segmentação de vasos tumorais existentes pode ser utilizada para o tratamento de tumores, como uma alternativa ou em paralelo com a quimioterapia convencional (MAKRILIA *et al.*, 2009). A formação de novos vasos é limitado em adultos saudáveis, logo, sua inibição não traria muitos efeitos colaterais (COSTA, 2011). Uma droga antitumoral com propriedade imunomodulatória e antiangiogênica bem documentada é a talidomida (1) (Figura 01) (SINGHAL, 1999).

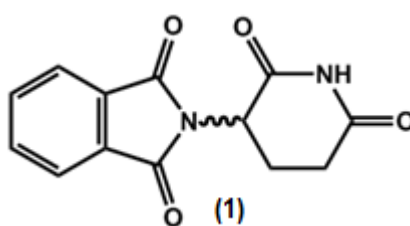


Figura 01 – Estrutura da Talidomida.

Todavia, este medicamento apresenta um indesejado perfil teratogênico, que veio a ser investigado após altas taxas de alterações congênitas que surgiram em filhos de mães que fizeram uso deste fármaco durante a gestação. Isso aconteceu alguns anos após a sua introdução no mercado farmacêutico como sedativo e hipnótico, em meados da década de 1950 (MELCHERT, 2007).

O emprego da talidomida é limitado ao tratamento de enfermidades para as quais não existem alternativas terapêuticas, condicionado à utilização de métodos contraceptivos em mulheres e ao monitoramento dos efeitos neurológicos ao longo do tratamento (BARBOSA, 2009).

Baseando-se em dados de relação estrutura-atividade da literatura, pode-se afirmar que a propriedade imunomoduladora da talidomida está relacionada ao grupamento ftalimida (BARBOSA, 2009). Este heterociclo é bastante promissor para o desenvolvimento de moléculas farmacologicamente direcionadas ao tratamento do câncer. Além de estar presente na lista do National Health Institute (NHI, USA) como uma das 40 estruturas farmacofóricas (“pharmacophoric scaffold”) mais promissoras para o desenvolvimento de fármacos antitumorais e imunomodulatórios (GOMES, 2012).

Os derivados das ftalimidas são conhecidos pela atividade imunomoduladora, sendo a inibição da citocina fator de necrose tumoral (TNF- α) bem investigada e com destacada importância, por ser considerada mediadora dos processos inflamatórios e tumorais. Atribui-se também a esta família de compostos as atividades antiangiogênica; antiproliferativa; ativadora de apoptose, células T e *natural killer* (NK); inibidora de adesão celular entre outras (TEO, 2005; HASHIMOTO, 2002).

Outra classe de compostos heterocíclicos bastante estudada na atualidade são os tiazóis. Este núcleo pode ser encontrado como subunidade em diversas moléculas biologicamente ativas naturais e/ou sintéticas. Apresentam também amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais destaca-se a potente ação citotóxica frente a diferentes tipos de tumores tais como carcinoma de pulmão, adenocarcinoma de cólon, glioblastoma, melanoma, câncer de próstata e leucemia (LAFRANC *et al.*, 2013; HASSAN *et al.*, 2012; FALLAH-TAFTI *et al.*, 2011; ALIABADI *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2005).

O presente trabalho está inserido neste contexto, com a obtenção e avaliação de inéditos derivados ftalil-tiazóis planejados para atuar no tratamento do câncer. Foram sintetizadas 14 novas moléculas as quais foram testadas em diferentes linhagens tumorais quanto ao seu perfil de inibição desses modelos experimentais, avaliadas também a sua citotoxicidade em células fisiológicas de mamíferos e quanto ao seu perfil modulatório no tocante a produção de citocinas imunológicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste estudo foram utilizados os seguintes conceitos e trabalhos que fundamentam e corroboram para as conclusões alcançadas.

2.1. A Química Medicinal: origem e evolução

Segundo vários achados históricos, os seres humanos, desde os primórdios de sua história, buscaram substâncias eficazes para o tratamento ou alívio dos sintomas de doenças que lhes afligia. Até o final do século XVIII, o uso de plantas, minerais e produtos de origem animal foi usado com embasamento adquirido de experiências empíricas, e esta prática, muitas vezes perigosa, gerou muitas informações acerca do potencial terapêutico de determinados produtos de fontes naturais, sendo este conhecimento denominado medicina popular (LOPES, 2010).

O advento da química moderna no início do século XIX, permitiu que compostos de origem natural, sendo a maior parcela destes derivados de vegetais, com atividade farmacológica fossem isolados, por técnicas de extração, e caracterizados. A purificação destas substâncias mostrou-se de grande relevância para o desenvolvimento de preparações farmacêuticas, além de, em vários casos, anular os efeitos indesejados atribuídos a outros compostos presentes no vegetal de origem (LOPES, 2010).

O isolamento do alcaloide opiáceo morfina (2) (Figura 02), realizados em 1815 por Friedrich Setürner a partir do extrato de ópio, é reconhecido como marco inicial para este cenário. A morfina apresenta propriedade analgésica e é obtida da espécie vegetal *Papaver somniferum* (SNEADER, 2005).

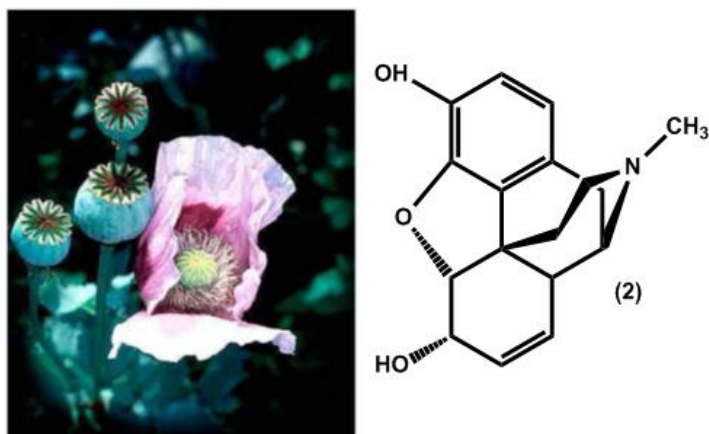


Figura 02 – Morfina: imagem da *Papaver somniferum* e estrutura.

Outro exemplo é a quinina (3) (Figura 03), que foi isolada em 1820 por J. Pelletier e J. Caventou a partir de extrato da casca da Cinchona. Consiste em um alcalóide quinolínico efetivo no tratamento da malária (HANSON, 2006).

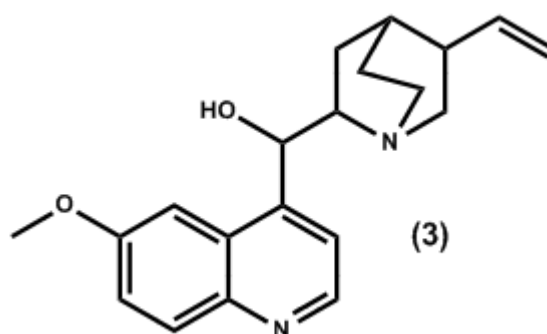


Figura 03 – Estrutura da quinina.

Um fenômeno que se iniciou nas universidades – e no final do século XX já se mostrava forte nas principais indústrias farmacêuticas – foi a obtenção de fármacos sintéticos, deixando de ser apenas oriundo de fontes vegetais. Como exemplo marco deste processo pode ser citado a obtenção e produção em larga escala do ácido acetilsalicílico (4) (Aspirina) pela indústria Bayer (PINTO, 2013) (Figura 04).

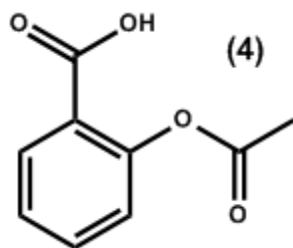


Figura 04 – Estrutura do ácido acetilsalicílico.

O planejamento estrutural era baseado em pequenas modificações de grupos funcionais previamente identificados em produtos naturais. Caracterizando neste caso o desenvolvimento inicial da ciência conhecida como Química Medicinal. Estas modificações compreendiam esterificação, alquilação, hidrólise, oxidação ou redução (SNEADER, 2005).

De acordo com a IUPAC, o campo de estudo da Química Medicinal abrange a invenção, o descobrimento, a identificação, o desenho e a preparação de moléculas bioativas; estando também atribuídos a esta ciência a análise e interpretação dos mecanismos em que estes compostos atuam em nível molecular, e o estudo dos fatores relacionados aos aspectos entre a estrutura química, a atividade biológica e os parâmetros farmacocinéticos envolvidos como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade do seu uso (WERMUTH, 2008).

Para Alfred Burger, um dos criadores do *Journal of Medicinal Chemistry*, a Química Medicinal mostra grande influência na prevenção, terapia e compreensão das doenças, buscando através de seu campo de estudo o uso de fármacos seguros, contribuindo com uma vida mais saudável e feliz (BURGER, 1991 *apud* SILVA, 2012).

Quanto à sua racionalidade, a Química Medicinal está essencialmente voltada à pesquisa de fármacos, inicialmente conduzida de forma expressiva pelos químicos, e o estudo de seus mecanismos de ação. Para atingir tais finalidades, diversas áreas estão fortemente atreladas a esta área de pesquisa, tais como a Química Pura, Farmacologia, Microbiologia, Bioquímica, Fisiologia, Biologia Molecular, Genética, Bioinformática entre outras. Sendo, neste caso, campo de atuação para diversos profissionais (HANN, 2011).

O desenvolvimento da Química Medicinal proporcionou e continua possibilitando a descoberta de muitos fármacos, representando uma grande conquista alcançada pela humanidade, uma vez que traz melhorias na qualidade e expectativa de vida (LOPES,

do Sul na prática da caça, vindo esta substância a ter extenso uso na clínica como relaxante muscular e anestésico (Figura 06) (SILVA, 2013).

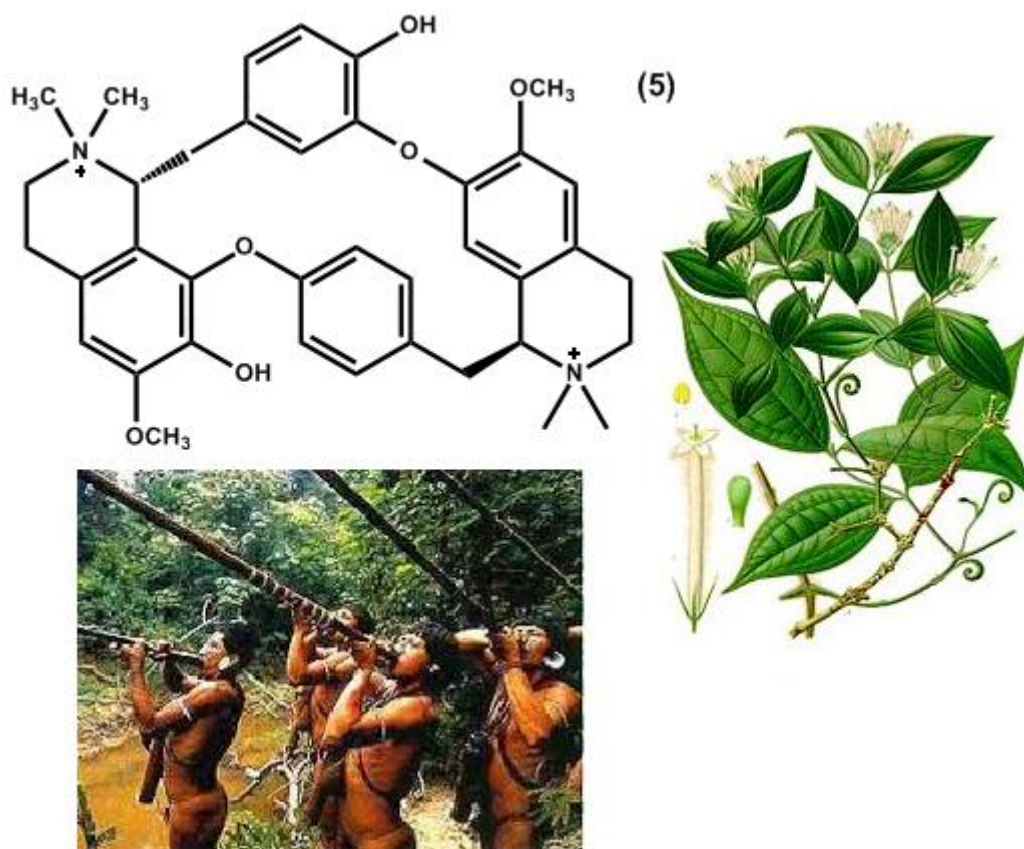


Figura 06 – Curare: Estrutura da tubocurarina e planta de onde é extraída.

Alguns fármacos também foram identificados de forma aleatória sem retirar o mérito dos grandes pesquisadores que brilhantemente souberam analisar a situação em que se encontravam tais compostos, interpretando e fazendo ligações destes para fins medicamentosos. Como principal exemplo temos o famoso trabalho de Fleming, que a partir de uma contaminação fúngica de suas culturas bacterianas, conseguiu descobrir o potente antibiótico penicilina (NOGRADY, 2005) (Figura 07).

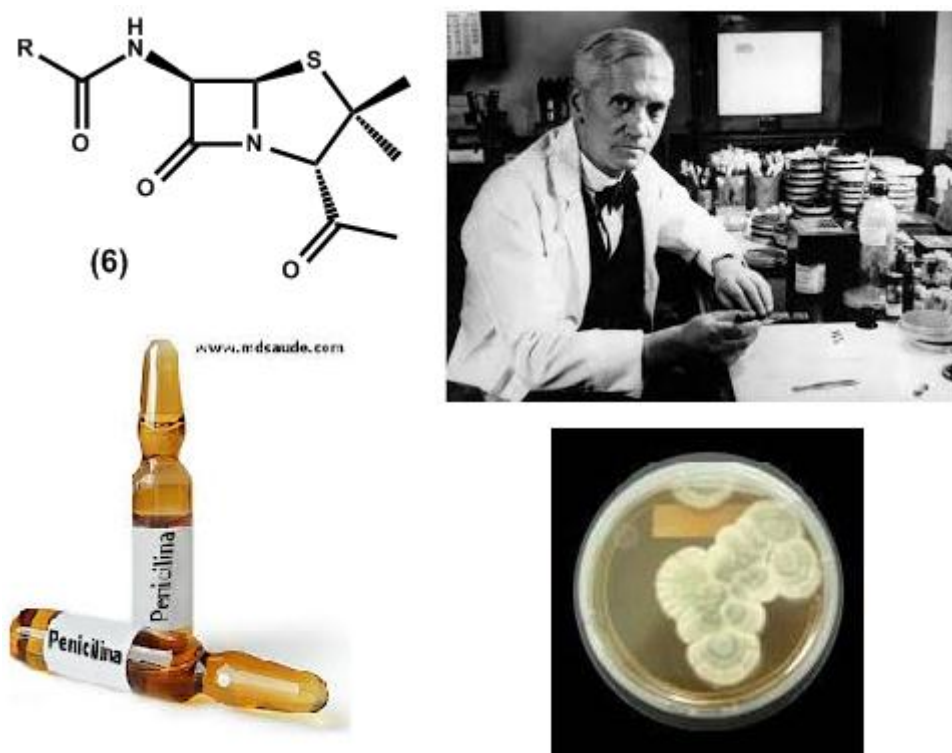


Figura 07 – Penicilina.

No entanto, o desenvolvimento da Química Medicinal provocou uma revolução no processo de descoberta de novos compostos bioativos. O aprimoramento tecnológico possibilitou a elaboração de métodos e técnicas que propiciaram um melhor desenvolvimento de fármacos, principalmente sintéticos. Frente a essa mudança, percebida nas últimas décadas, o planejamento e a identificação de compostos com propriedades terapêuticas passaram a ser orientados pela compreensão da forma em que esses atuam em nível bioquímico/fisiopatológico (KOLLMAN, 1989).

As formas antigas de descoberta de protótipos a fármacos não foram totalmente abandonadas, mas no cenário atual cada vez mais se busca um planejamento racional para a obtenção de fármacos, dando prioridade a compostos seguros e de fácil obtenção, preferencialmente por meios sintéticos a baixo custo (HANN, 2011).

São várias as vias utilizadas para a descoberta e o planejamento sintético de fármacos. Em 2008, Wermuth as agrupou em quatro abordagens diferentes que são definidas a seguir:

Desenho de análogos

Trata-se de um caminho utilizado para a obtenção de moléculas biologicamente ativas no qual se tem maior probabilidade de se conseguir este objetivo, já que parte-se de fármacos conhecido e caracterizados. Esta estratégia é a mais utilizada por químicos medicinais (WERMUTH, 2008).

Triagem sistemática

Consiste em uma estratégia utilizada para identificar potentes protótipos a fármacos que tenham ação em promissores alvos biológicos. Neste caso, uma biblioteca de compostos naturais e/ou sintéticos é testada, sendo que a prevalência é de ensaios *in vitro* (WERMUTH, 2008).

Exploração de informações biológicas e farmacológicas

Está principalmente ligada a etnofarmacologia, a qual são descobertos novos fármacos decorrente da avaliação científica do popular, por meio de um aprofundamento de estudos das propriedades clínicas principais e secundárias (WERMUTH, 2008).

Planejamento racional

Vislumbra a obtenção de compostos com estrutura molecular previamente planejada para atuar em determinado alvo farmacológico, o qual se tem conhecimento de estar ligado a determinado processo fisiopatológico (WERMUTH, 2008).

Os fármacos pertencentes a este grupo tem sua origem do desenho de um protótipo a partir do conhecimento topográfico do receptor ou de uma molécula bioativa conhecida, onde o protótipo pode, através de modificações moleculares, desenvolver aumento de sua eficácia. Neste caso as alterações do composto devem preservar as propriedades farmacocinéticas e ligantes farmacofóricos (SILVA, 2012).

Vimos até então a importância da Química Medicinal no combate de patologias em geral. Sendo o câncer uma patologia mais desafiadora para o desenvolvimento desse campo de estudo tendo em vista a sua complexidade.

2.3. Câncer

O câncer é uma doença multifatorial, caracterizada pelo aumento desordenado de células anormais. Este problema devastador pode ser desenvolvido em qualquer parte do organismo e em vários casos apresenta o fenômeno de invasão de partes adjacentes e/ou migração para partes distantes do corpo, sendo isto denominado metástase. Esse processo é considerado a principal causa de morte por câncer (CAVALCANTI, 2010).

Em organismos saudáveis existe uma regulação das divisões celulares, correspondendo às necessidades do tecido a que fazem parte e consequentemente ao sistema em homeostase. Essa característica fundamental está ausente nas células neoplásicas, as quais permanecem em constante divisão, mesmo cessando a exposição ao agente desencadeador, levando a deformidades anatômicas, compressão e até a perda de funções no órgão afetado (COSTA, 2011).

De acordo com a OMS (2013), o termo câncer é genericamente usado para designar um largo grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Esta definição se aplica também a outros termos usados como tumores malignos e neoplasias.

A origem de um processo neoplásico geralmente é a partir de uma única célula. Esta sofreu alguma alteração genética resultante de sua exposição a agentes, podendo estes ser de caráter químico, físico ou biológico. Como resultado disso se inicia a progressão de uma lesão pré-cancerígena, envolvendo vários estágios, culminando com a formação de tumores malignos (AL-OMARY *et al.*, 2012).

De forma geral, pode-se admitir que a célula neoplásica é uma célula mutante na qual seu material genético foi alterado/modificado resultando em uma complexa interação entre fatores intrínsecos e extrínsecos. Tal mutação leva a proliferação descontrolada, a indiferenciação e mudança na forma de interagir com os tecidos adjacentes, levando a invasão (COELHO, 2010).

2.3.1. Histórico

O Câncer foi/é visto como um estranho paradoxo, tendo em vista que as descobertas e o desenvolvimento de tecnologias pela medicina também eram acompanhadas do aumento do pavor da população em relação a esta doença. Durante muito tempo os médicos foram incapazes de evitar o sofrimento e as mortes causadas por esta patologia em decorrência da falta de conhecimento etiológico e de tratamento. No entanto, o câncer era agregado a um grande rol de mazelas que afligiam a sociedade. Frente a este quadro, os pacientes geralmente passavam por execração social causada pelo temor de sua suposta contagiosidade, restando-lhes agonizar até a morte, sem receber nenhum cuidado (TEIXEIRA & FONSECA, 2007).

A partir de meados do século XX percebeu-se, o começo da transformação deste cenário, pois os promissores tratamentos surgidos, ainda no início do século, passaram a mostrar eficácia, ao mesmo tempo em que os médicos passaram a ter interesse pelo diagnóstico precoce como forma de prevenção (DE VITA, 2012).

No entanto, a ampliação do conhecimento da doença e o surgimento de alguma esperança de tratamento dos portadores eram acompanhados do aumento também da compreensão das grandes dimensões deste mal, de suas diversas faces e da limitada capacidade da medicina da época em domá-lo, causando grande temor na sociedade, que passou a ver o câncer como o flagelo da modernidade (TEIXEIRA & FONSECA, 2007).

Na tabela 01 está representado um cronograma da história de desbravamento dos conhecimentos sobre o câncer e suas possíveis formas de tratamento:

Tabela 01 – Cronograma de eventos importantes nos estudos sobre o câncer.

30 a. C.	Egípcios, persas e indianos já se referiam a tumores malignos;
Século IV a. C.	Estudos da Escola Hipocrática Grega, que caracterizou a doença como um tumor duro que muitas vezes, reaparecia depois de extirpado, ou que se alastrava para diversas partes do corpo levando à morte;
Início do período cristão	Idéia do câncer como um desequilíbrio dos fluidos do organismo;

Século XV	Descoberta do sistema linfático; uso de terapias voltadas para obtenção do suposto equilíbrio corpóreo, como as sangrias.
Século XVIII	Desenvolvimento da anatomia patológica e dos conhecimentos sobre as células; o câncer passou a ser visto como uma doença local; Surgimento na Europa de hospitais para assistência aos desamparados acometidos com câncer;
Século XIX	O desenvolvimento da teoria celular vinculou a doença às células e ao processo de divisão; Introdução do conceito de metástase, a partir da observação, por Joseph Claude Recamier (1774-1852) de um tumor secundário no cérebro de uma paciente inicialmente atingida com um câncer no seio. Conclusão de que as células cancerosas se desenvolvem a partir de células normais, fato demonstrado pelo anatomista Wilhelm Waldeyer (1836-1921). Proliferação, em diversos países europeus, de instituições voltadas à proteção de pacientes com câncer;
Em meados do século XIX	Avanços das cirurgias como esperança para a cura;
Década de 1860	Desenvolvimento das técnicas de assepsia e antissepsia criadas por Joseph Lister (1827-1912) reduzindo o índice de insucessos nas cirurgias;
1895	Descoberta dos raios X;
1896	Início do uso dos raios X pela medicina em diversas doenças;
Início do século XX	Surgimento das primeiras instituições de pesquisa do câncer;

1904	Início do uso do rádio, descoberto pelo casal Pierre e Marie Curie, no tratamento de diversas doenças, e principalmente o câncer.
1905	O radiologista francês Jean Bergonié e o histologista Louis Tribondeau esclareceram os princípios de ação curativa dos raios X, mostrando que as células cancerosas são mais sensíveis a ele que as células sãs.
1906	Primeira Conferência Internacional contra o Câncer, em Paris;
1910	Segunda Conferência Internacional contra o Câncer, na Bélgica;
1923	Primeiro Congresso Internacional do Câncer, em Estrasburgo;
Segunda Guerra Mundial (1939-1945)	Início do uso de substâncias químicas para o tratamento do câncer;

*Construído com base em Teixeira & Fonseca (2007).

A preocupação com o problema do câncer pareceu se amplificar ainda mais em todo o mundo, no período que se estendeu entre as duas guerras mundiais. Nessa época, os dados estatísticos epidemiológicos coletados em diversos países indicavam extensões da doença ainda maiores do que se imaginava, com tendências a se elevarem mais ainda à medida que a expectativa de vida populacional se elevasse com a implantação de melhores condições de vida (DE VITA, 2012).

As terapias de combate ao câncer até então desenvolvidas mostravam certa eficácia. Os processos cirúrgicos tinham maiores taxas de sucesso na retirada de tumores malignos em diversos órgãos internos e a radioterapia era cada vez mais utilizada. No entanto, a percentagem de cura dos diversos tipos de câncer ainda era bastante baixa. O uso de substâncias quimioterápicas surgiu em meados do século XX como uma promissora estratégia que mudaria esse panorama (DE VITA, 2012).

Nesse contexto, de cada vez maior ampliação de conhecimentos sobre a doença e de possibilidades restritas de tratamento, o câncer progressivamente passou a ser motivo de atenção dos Estados, das instituições de pesquisa e dos médicos em geral,

cada vez mais confrontados com um mal que parecia tomar o lugar das grandes pragas do passado, que se mostravam em vias de controle pela medicina (TEIXEIRA, *et al.*, 2012).

2.3.2. Epidemiologia

Atualmente, o câncer ainda é uma doença grave e complexa que aflige a humanidade, não fazendo distinção de classe social, credo religioso ou etnia-raça. Segundo dados estatísticos fornecidos pela OMS, o número de novos casos de câncer no mundo, em 2008, foi de 12,7 milhões. Desse total, 7,6 milhões de pessoas vieram a óbito (OMS, 2013).

A OMS informa ainda que 70% das mortes ocasionadas por essa patologia ocorrem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, e projeta que 13,1 milhões de pessoas poderão morrer de algum tipo de câncer até 2030. Tal projeção indica que haverá um constante aumento no número de mortes ao longo dos anos (OMS, 2013).

No caso do Brasil, o prognóstico também não é animador, pois segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), há uma expectativa que a enfermidade alcançará a cifra de mais de 500 mil novos casos já nesse ano, sendo considerado um grave problema de saúde pública (INCA, 2013).

2.3.3. Quimioterapia do Câncer

A quimioterapia consiste no tratamento de pacientes com câncer por meio do uso de agentes químicos isolados ou em combinação. Esta estratégia terapêutica é uma das principais atualmente utilizadas, sendo que ela também pode ser empregada junto com outros métodos de forma adjuvante, quando usada após tratamento cirúrgico ou radioterápico curativo; ou previamente a uma remoção cirúrgica, geralmente para reduzir a massa tumoral minimizando a quantidade de lesões durante a cirurgia (COSTA-LOTUFO, 2010).

Seu uso apresenta maior eficácia no combate a tumores que estão no estágio inicial da formação. Dessa maneira, a quimioterapia pode ser empregada com fim curativo, buscando o extermínio do câncer, ou paliativo, quando se busca um controle

parcial da doença e a melhoria da qualidade de vida do paciente. Neste caso, ambas as finalidades de uso convergem para uma melhora da sobrevida do paciente (HASIMA & AGGARWAL, 2012; MA & WANG, 2009).

Historicamente o uso de substâncias químicas para o tratamento do câncer teve seu início na Segunda Guerra Mundial a partir da observação de que muitos soldados expostos ao gás mostarda morreram por atrofia de glândulas linfáticas e problemas na medula óssea. Dessa observação se passou a investigar a atividade das substâncias contra e a favor do câncer (TEIXEIRA & FONSECA, 2007).

Em 1950 foram identificados os primeiros antibióticos com atividade antitumoral. Depois disso vários cientistas se debruçaram na busca de produtos que pudessem ser usados no combate ao câncer, mostrando-se rápido o desenvolvimento da quimioterapia antineoplásica (COSTA-LOTUFO, 2010).

Mesmo diante do extenso desenvolvimento científico-tecnológico obtido nos últimos séculos, fruto do esforço de grandes centros de pesquisa e do interesse financeiro das indústrias farmacêuticas, ainda estão associados à quimioterapia antineoplásica efeitos colaterais e adversos intensos, os quais não só afetam a qualidade de vida dos pacientes como também trazem repercussões diretas para o contexto sócio-familiar (ANJOS, 2010).

O arsenal quimioterápico disponível para o tratamento do câncer apresenta vários problemas quanto à especificidade, agindo também em células normais, e potencialidade, apresentando cifras ainda consideradas pequenas de cura total, livre de rescisões. Além desses fatores, o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas é um elemento agravante e já com certa frequência de casos na terapêutica do câncer (SHUKLA *et al.*, 2012).

A busca por novas moléculas com propriedade antitumorais é de grande relevância tendo em vista a urgência de melhorias no cenário quimioterápico atual. Deve-se também intensificar a busca de novos fármacos potentes, específicos para as células neoplásicas e com reduzido ou nulo índice de efeitos colaterais. O que se mostra também como uma valiosa e promissora estratégia é o investimento em matrizes que modulem o sistema imunológico, haja vista que o câncer está diretamente ligado à imunidade.

2.3.4. Correlação entre o Sistema Imunológico e o Câncer

A ideia de que o sistema imunológico poderia controlar o surgimento e progressão de células neoplásicas foi inicialmente proposto em 1909 por Paul Ehrlich, o que levou a esta questão a intenso debate científico. Porém, o reduzido conhecimento dos componentes essenciais do sistema imune, na época, impossibilitou a comprovação desta ideia. Cerca de 50 anos mais tarde foi desenvolvida por Burnet a hipótese da imunovilância, a qual atribuía ao sistema imune adaptativo a responsabilidade de prevenção de tumores em organismos imunocompetentes. Entretanto, tal hipótese foi refutada por estudos subsequentes que não conseguiram comprovar tal função, após avaliar camundongos imunodeficientes dos componentes adaptativos, mas não dos inatos, e perceber a mesma susceptibilidade em comparação com o grupo imunocompetente (CAVALLO *et al.*, 2011).

Somente na década de 1990, em estudos com camundongos geneticamente modificados para apresentar deficiência de fatores de transcrição necessários para o desenvolvimento de células do sistema imunológico, foi possível observar uma maior susceptibilidade de componentes essenciais da imunidade adquirida (CAVALLO *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2006).

A partir destes estudos, constatou-se que o sistema imune também pode influenciar na imunogenicidade dos tumores, tendo em vista que os tecidos neoplásicos desenvolvidos em animais imunodeficientes eram mais imunogênicos do que os tumores desenvolvidos em organismos com sistema imune completo e ativo. Ou seja, aparentemente as células neoplásicas apresentam componentes diferentes das células comuns que levam o sistema imune a combatê-las e eliminá-las. Porém, durante a tumorigênese, algumas células tumorais perdem a imunogenicidade podendo fugir da vigilância imunológica e progredir para o desenvolvimento do câncer (SCHEREIBER *et al.*, 2011).

O conceito de imunovilância é dividido em três fases contínuas e progressivas, sendo estas: eliminação (primeira), equilíbrio (segunda) e evasão (terceira), as quais foram esquematizadas na figura 08. Entretanto, esta sequência pode ser quebrada devido à influência de fatores externos tais como condições ambientais, imunodeficiências ou envelhecimento. Em alguns casos os processos de formação de

tumores pode pular a eliminação, entrando diretamente na fase de equilíbrio ou evasão (MENDRANO, 2013).

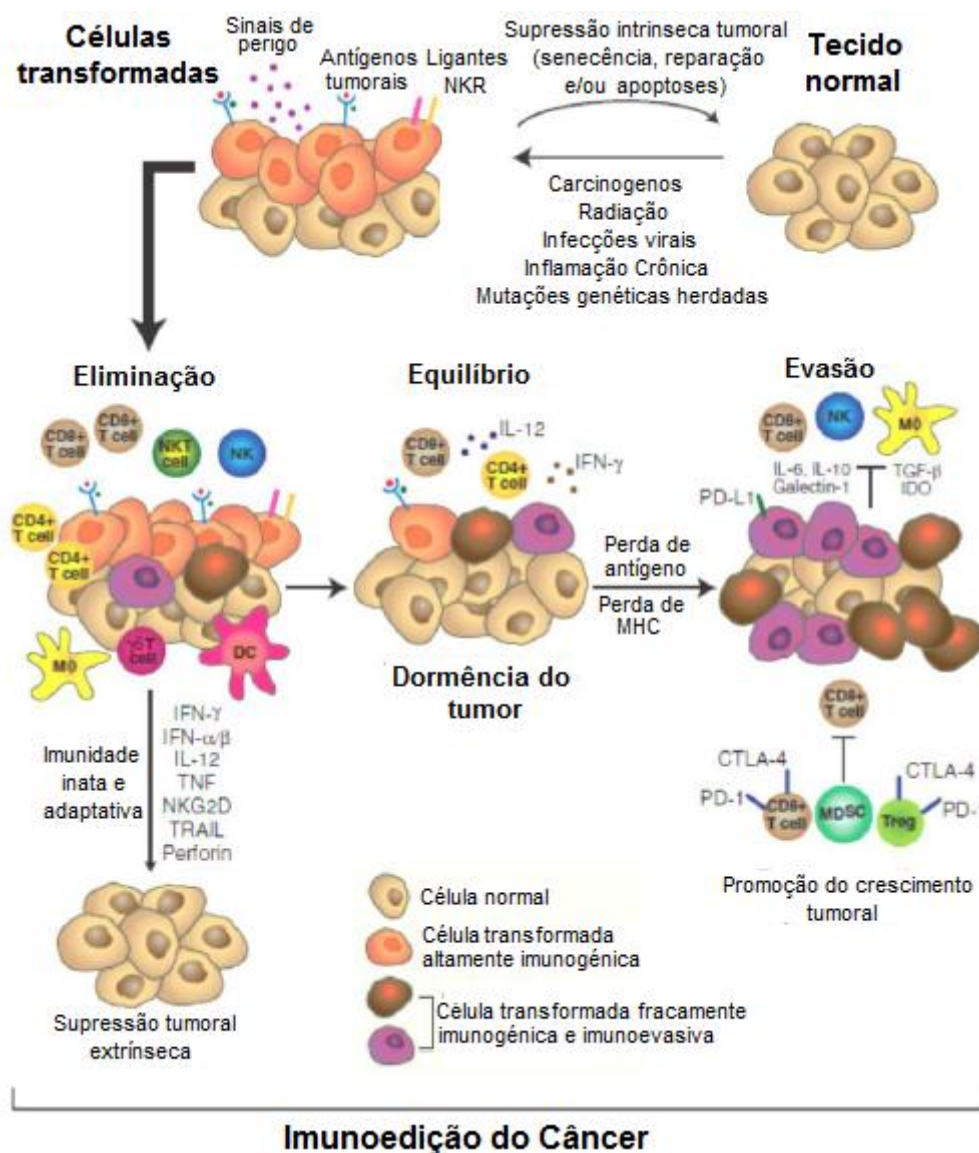


Figura 08 – Representação esquemática do processo de imunoeedição tumoral (MEDRANO, 2013).

A fase de eliminação pode ser descrita como uma versão atualizada da hipótese de imunovigilância, na qual as imunidades inata e adaptativa trabalham em conjunto para eliminar células portadoras de antígenos tumorais, precocemente antes dos tumores serem clinicamente detectáveis. Esta eliminação ocorre, possivelmente, através da liberação de sinais de alerta indicativos de início do desenvolvimento tumoral. Esses sinais ativam células dendríticas e promovem uma resposta mediada

por células T efetoras CD4⁺ e CD8⁺. Outro possível mecanismo é mediado pela expressão de ligantes da célula NK. O sucesso desse processo implica na permanência do hospedeiro livre de tumores. Entretanto, se uma variante rara de células tumorais não é eliminada, esta pode proliferar e entrar na fase de equilíbrio (VESELY *et al.*, 2011).

No equilíbrio, o crescimento tumoral é combatido, principalmente, por mecanismos imunes adaptativos. Células e citocinas do sistema imune entram em ação constante para manter o tumor em um estado de dormência podendo durar até grandes períodos nesta fase. Nesta etapa, aparentemente os componentes do sistema imunológico inato não desempenham um papel fundamental. E nesta fase também, devido a uma constante pressão seletiva do sistema imune e a instabilidade genética, variantes tumorais menos imunogênicas podem surgir. Estas são capazes de ultrapassar as barreiras imunológicas não sendo mais reconhecidas pelo sistema imune, resistindo aos mecanismos antitumorais ou induzir um ambiente altamente imunossupressor e dessa maneira, o tumor foge do controle imunológico entra na fase de evasão e as células emergem para causar a doença em si (VESELY *et al.*, 2011).

O câncer pode escapar do controle imunológico por diversos mecanismos. Entre os principais, no nível das células tumorais, alterações genéticas podem levar a perda de antígenos imunogênicos, resistência aumentada à citotoxicidade mediada por células T e expressão reduzida de proteínas de MHC I. O resultado final dessas alterações é a seleção de variantes pouco imunogênicas que podem se tornar invisíveis ao sistema imune. Os tumores também podem escapar pelo estabelecimento de um ambiente fortemente imunossupressor. Este estado é adquirido pela secreção de citocinas supressoras e pelo recrutamento de células, tais como, células T reguladoras (SCHREIBER *et al.*, 2011).

2.5. Talidomida

A talidomida (1) foi produzida e lançada como um sedativo em 1957 por Chemie-Grünenthal. Esta foi comercializada como muito segura e desprovida de efeitos indejados e rapidamente se tornou um fármaco milagroso entre 1957 e 1961 no tratamento de uma gama de condições, em particular o enjoo da manhã (MOOS *et al.*, 2003).

A talidomida (1) foi comercializada em 46 países, sob diferentes nomes (por exemplo, Distaval no Reino Unido e na Austrália, Isomin no Japão, Contergan na Alemanha, e Softenon na Europa). No entanto, logo após a sua liberação foram relatados casos de surgimento de neuropatia periférica em adulto que fizeram o uso deste fármaco (o que impediu o seu licenciamento e liberação geral nos EUA), bem como estar por trás da ocorrência de um alto e repentino aumento de defeitos congênitos raros denominados de focomelia, que tem como principal característica marcante a ausência ou encurtamento das partes proximais dos membros (VARGESSON, 2013).

Após investigação, as mutações observadas nas crianças foram associadas ao uso da talidomida no período da gestação. Este fato levou a retirada de seu uso, em novembro de 1961. Ainda se percebeu o nascimento de bebês talidomida, como ficaram conhecidos os filhos de gestantes que usaram este fármaco na gravidez, ao longo de 1962, mas o número de crianças afetadas diminuiu drasticamente após a suspensão do uso. No total, mais de 10 mil crianças nasceram com graves danos em todo o mundo (VARGESSON, 2013).

A talidomida não foi licenciada para uso nos EUA entre 1957 e 1961. O Dr. Frances Kelsey, um médico que trabalhava para o FDA, teve preocupações sobre a segurança da droga. Ele não achava seguro liberar seu uso diante da neuropatia periférica que tinha sido experimentada e relatada em alguns doentes, na Europa, a seguir à exposição a talidomida. O Dr. Kelsey, sem dúvida, impediu uma epidemia de defeitos em recém-nascidos induzida pelo uso de talidomida no EUA (RICE, 2007).

Ainda há dúvidas sobre os testes realizados com a talidomida antes de ser comercializada em 1957, se os ensaios foram suficientemente rigorosos, bem como se o desastre era evitável (RICE, 2007).

Após o desastre da talidomida, nova legislação foi introduzida em todo o mundo, mudando as normas para a introdução de novos fármacos na terapêutica. Estes precisam ser rigorosamente testados e sua aprovação documentada para poderem ser utilizados em humanos, especialmente mulheres grávidas (LIMA *et al.*, 2001).

Em 1965, a talidomida (1) revelou ser muito eficaz na redução das lesões à lepra e ao eritema nodoso hansêmico, uma complicação da lepra envolvendo a infecção crônica da pele e dos nervos causada pelo *Mycobacterium leprae*. Esta descoberta fez a talidomida (1) ressurgir como um fármaco promissor sendo novamente estudada em

detalhe para fins clínicos. Foram gerados relatórios vinculando a este fármaco como tendo ações anti-inflamatórias e ser eficaz para o tratamento clínico da lepra, do eritema nodoso hansêmico e outras patologias inflamatórias. Além disso, os estudos indicaram a talidomida com propriedade antiangiogênica e potencialmente útil para o tratamento do câncer (BARABOSA, 2009).

Hoje, a talidomida é licenciada em todo o mundo (incluindo os EUA desde 1998) para o tratamento da lepra e mieloma múltiplo. Este fármaco e seus análogos são também usados para tratar uma ampla série de outras condições, incluindo no sistema gastrointestinal (por exemplo, doença de Behcet, doença de Crohn), reumatológicas (lúpus, artrite e sarcoidose), e cânceres (por exemplo, renal, de próstata e sarcoma de Kaposi) (VARGESSON, 2013).

2.5.1. Mecanismos de ação da Talidomida

É comprovada por diversos trabalhos as propriedades antitumorais atribuídas a talidomida (1). No entanto, os possíveis mecanismos de ação deste fármaco não estão completamente elucidados. São bem relatadas as propriedades de modular a resposta imune e a inibição do processo angiogênico, associado a formação de tumores, o que amplia bastante a abrangência terapêutica deste composto pra uso na terapêutica do câncer (COÊLHO, 2010).

No intuito de estabelecer a forma em que a talidomida age nos processos neoplásicos, são propostos diversos mecanismos que podem ser exemplificados na figura 09, tendo como exemplo o mieloma múltiplo. As vias propostas para o tratamento do câncer com a talidomida (1), exemplificadas na figura são: inibição da angiogênese, aumento da ativação de linfócitos, redução da adesão das células tumorais ao estroma da medula óssea e modulação da citocinas produzidas nos processos inflamatórios e carcinogênicos (TNF- α e IL-6) (BARBOSA, 2009).

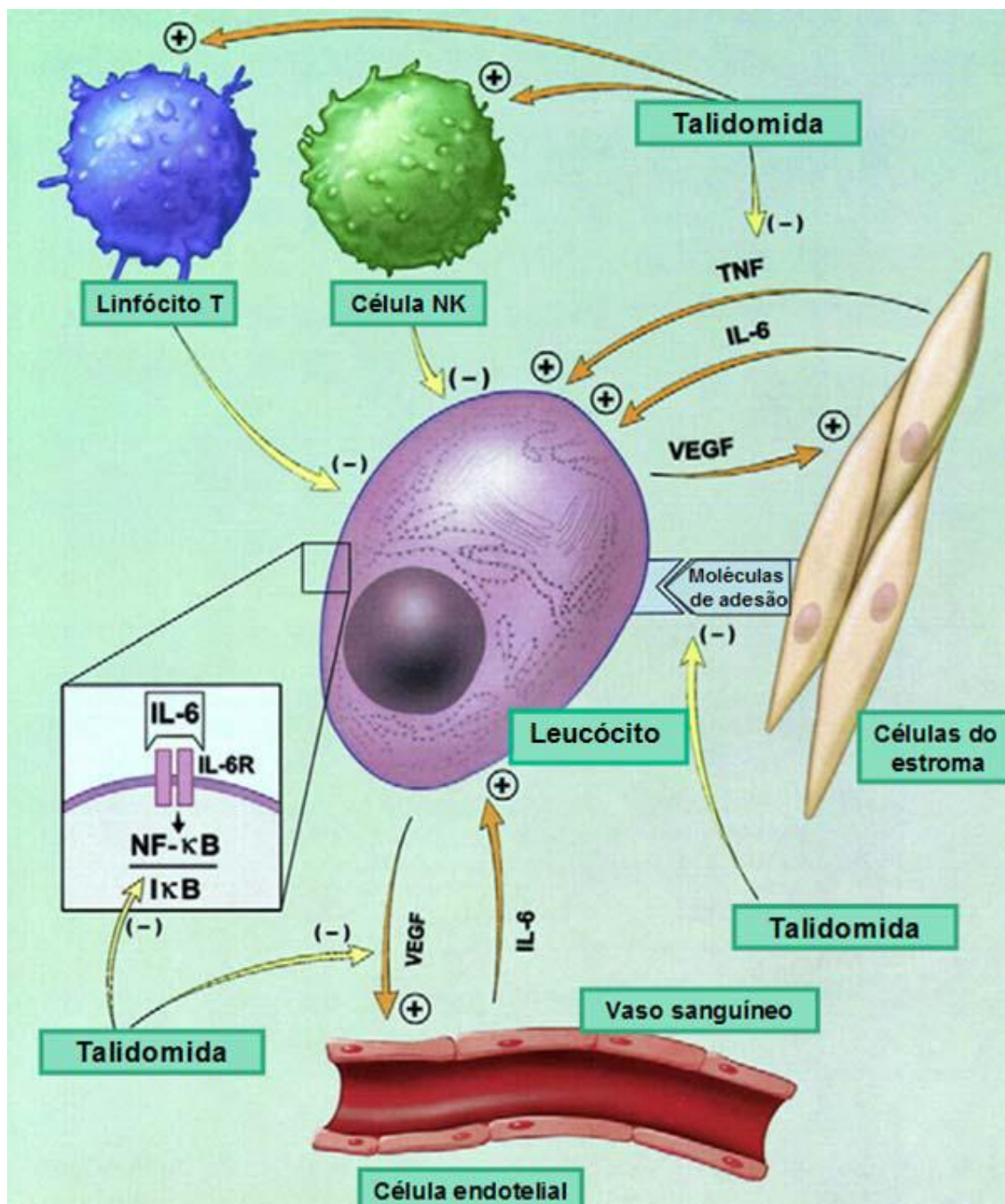


Figura 09 – Mecanismo de ação proposto para o tratamento do câncer com a talidomida, sendo exemplificado na ilustração o mieloma múltiplo (BARBOSA, 2009).

2.6. Análogos Estruturais da Talidomida (Ftalimidas)

A estrutura química da talidomida (1) consiste em dois núcleos heterocíclicos conectados, sendo estes duas imidas cíclicas denominadas de ftalimida e glutarimida (Figura 10). Um dos carbonos do anel glutarimida se apresenta como um centro

estereogênico, fornecendo duas formas enantiômeras em uma mistura racêmica deste composto (CAVALCANTI, 2010).

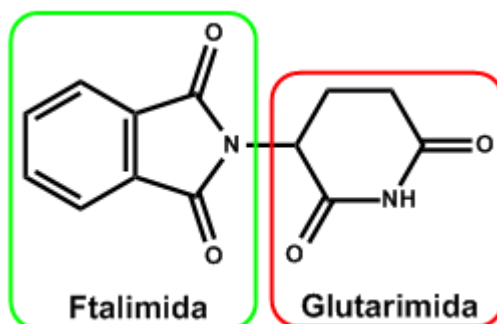


Figura 10 – Núcleos heterocíclicos constituintes da talidomida.

Segundo Pessoa *et al.* (2010), entre as drogas anticâncer e imunomoduladoras que participam de ensaios clínicos, a maioria são análogos da talidomida (1) como a pomalidona (ACTIMID CC-4047) (7) e a lenalidomida (Revlimid, CC-5013) (8) (Figura 11). Para eles também a ftalimida é um fragmento farmacofórico essencial.

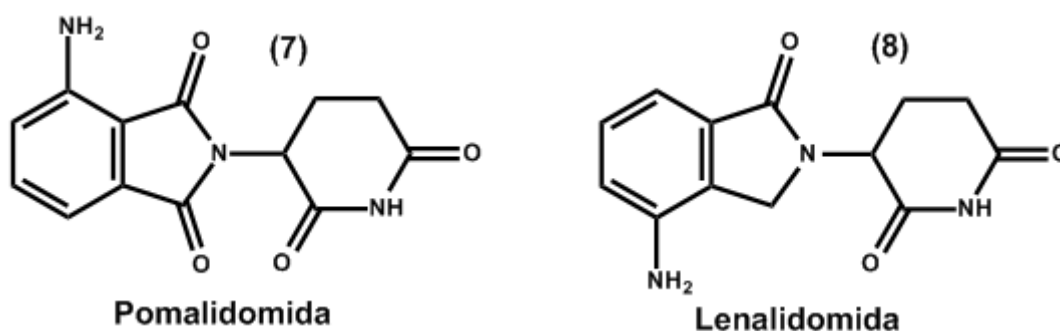


Figura 11 – Análogos da talidomida em ensaios clínicos para terapia antitumoral.

Baseando-se em dados de relação estrutura-atividade da literatura, pode-se afirmar que a propriedade imunomoduladora da talidomida (1) está relacionada ao grupamento ftalimida sendo a modulação do TNF- α a mais pronunciada (MACHADO *et al.*, 2005; LIMA *et al.* 2006).

Este heterociclo é bastante promissor para o desenvolvimento de drogas para o tratamento do câncer. Além de estar presente na lista do National Health Institute (NHI, USA) como uma das 40 estruturas farmacofóricas mais promissoras para o desenvolvimento de fármacos antitumorais e imunomodulatórios (GOMES, 2012).

Diante desta perspectiva promissora, o planejamento e a obtenção de moléculas que contenham o anel ftalimídico em sua estrutura química mostra-se bastante vantajoso para a obtenção de fármacos antitumorais.

2.7. Tiazóis

O núcleo heterocíclico 1,3-tiazol pode ser encontrado como subunidade constituinte de diversas moléculas biologicamente ativas naturais e/ou sintéticas. Essa classe de compostos apresenta amplo espectro de atividades biológicas, tais como anticâncer, antibacteriana, anti-inflamatória, imunomoduladora, anti-hipertensiva, anticonvulsivante e antidepressiva (MESHRAM *et al.*, 2012; BONDOCK *et al.*, 2007). Como exemplo, podemos citar o sulfatiazol (9), um importante fármaco antimicrobiano, as epotilonas A e B (10), potentes agentes antitumorais de origem natural, e o retonavir (11) (Norvir®) que consiste em um dos componentes do coquetel de combate ao vírus HIV (SOUZA *et al.*, 2005). As estruturas destes exemplos estão representadas na figura 12.

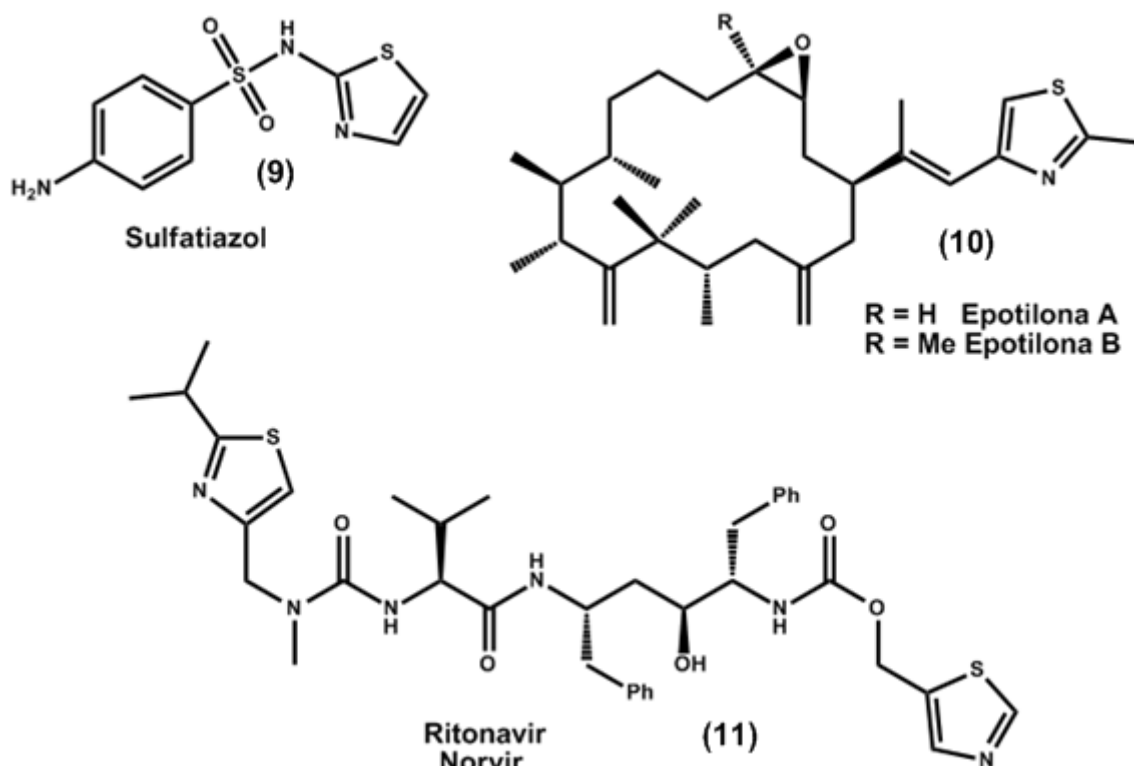


Figura 12 – Fármacos que apresentam núcleo tiazol em suas estruturas (SOUZA, *et al.*, 2005).

Quanto às propriedades farmacológicas antitumorais, são encontrados diversos trabalhos que comprovam este aspecto atribuído a moléculas que apresentam este núcleo. Também é descrita importância farmacofórica que esta unidade possui para a ação de diversos agentes antitumorais descritos na literatura como os representados na figura 13 (HASSAN *et al.*, 2012).

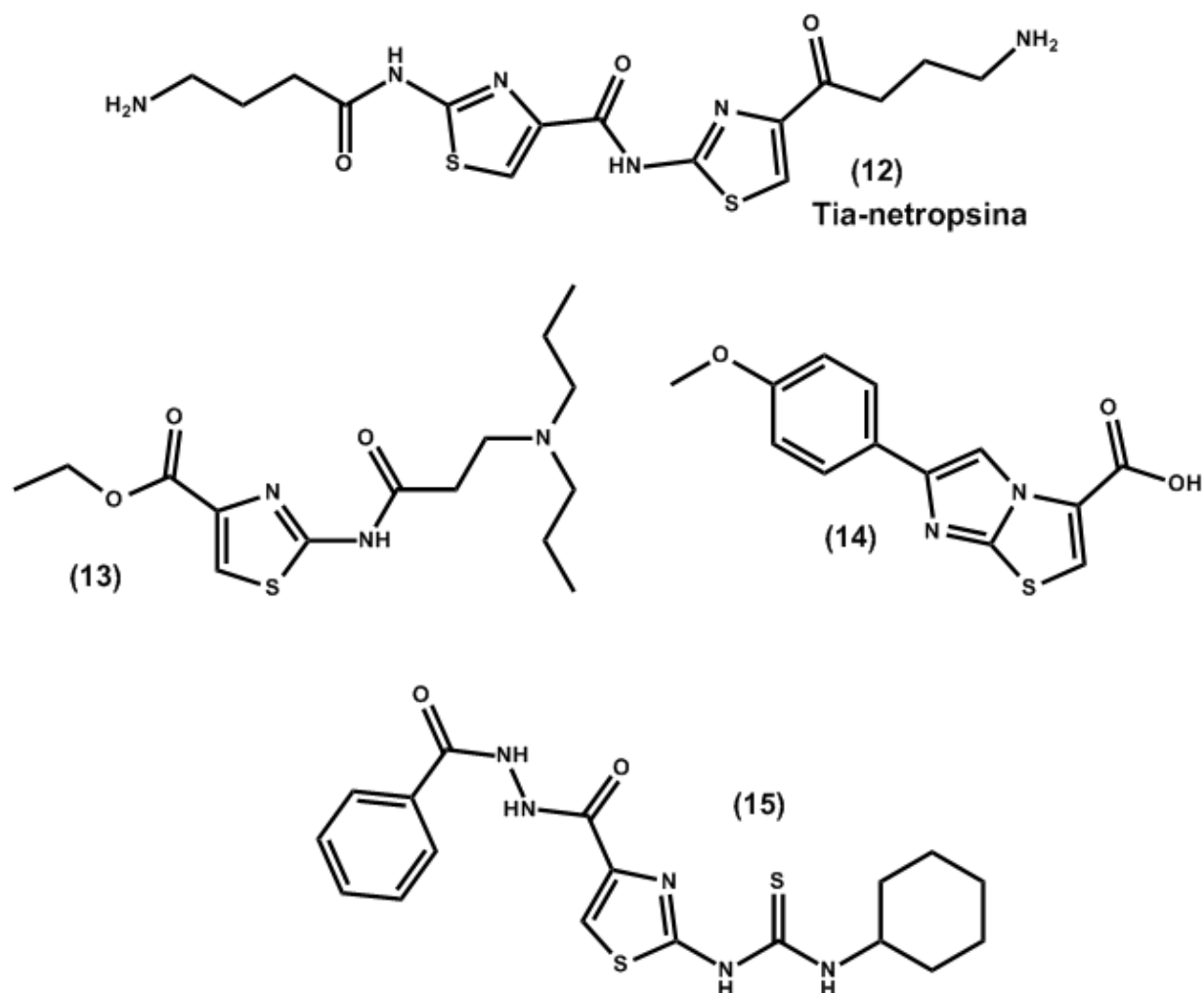


Figura 13 – Tia-netropsina e alguns agentes tiazóis antitumorais descritos na literatura.

Muitos análogos 2,4-dissubstituídos do 1,3-tiazol foram sintetizados e suas propriedades antitumorais testadas. Em vários trabalhos consultados, são relatados diversos compostos que possuem promissora atividade citostática contra numerosas linhagens celulares tumorais (LEFRANC *et al.*, 2013; HASSAN *et al.*, 2012; FALLAH-TAFTI *et al.*, 2011; ALIABADI *et al.*, 2010).

Aliabadi *et al*, (2010) ao sintetizaram uma série de compostos contendo o heterociclo 1,3-tiazol em suas estruturas, constataram um potente fármaco (16) com atividades antiproliferativas frente a linhagens de câncer de pulmão, colorretal e cólon com Cl_{50} inferior a 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14).

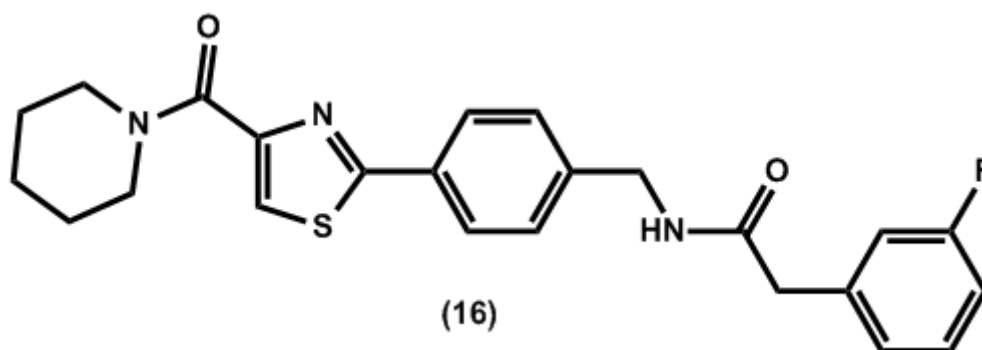


Figura 14 – Derivado do tiazol com potente atividade antitumoral.

Fallah-Tafti *et al*, (2011) sintetizaram e determinaram atividade antitumoral, *in vitro*, de compostos derivados do tiazol, em linhagens de células de carcinoma de cólon humano, de pulmão e leucemia. Vale destacar que um dos compostos avaliados (17) chegou a inibir 64 - 71% da viabilidade das células na dosagem de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 15).

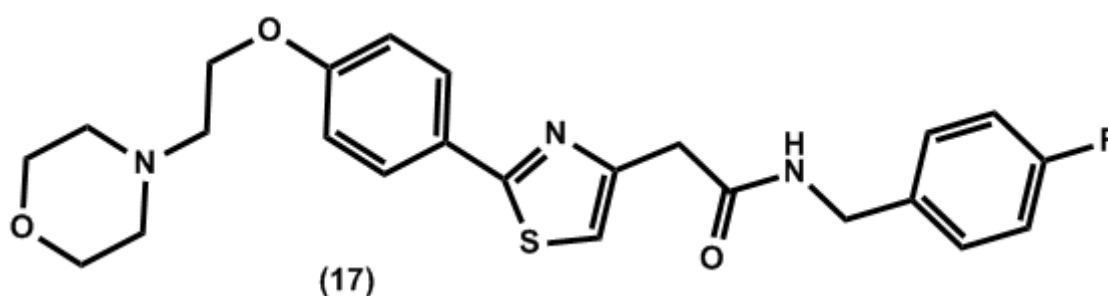


Figura 15 – Derivado do tiazol com potente atividade antitumoral.

Hassan, *et al*, (2012), sintetizaram derivados 2-(amino substituídos)-4-fenil-1,3-tiazóis. A atividade antitumoral destes compostos foi avaliada *in vitro* frente a uma ampla gama de linhagens cancerígenas e foram identificados protótipos a fármacos (compostos 18 e 19) nove vezes mais potentes que a droga antitumoral 5-fluorouracil (padrão positivo usado nos experimentos) (Figura 16).

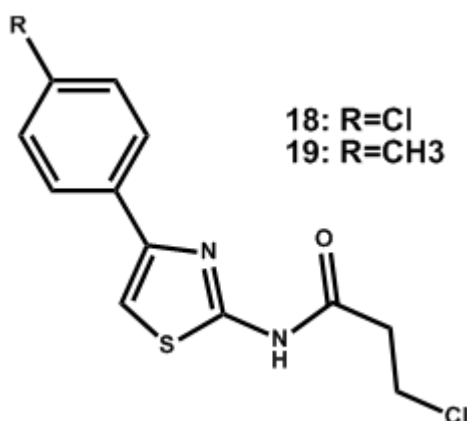


Figura 16 – Derivados 2-(amino substituídos)-4-fenil-1,3-tiazol com potente atividade antitumoral.

Eles (HASSAN, *et al.* 2012) avaliaram também a importância dos substituintes presentes no anel aromático ligado na posição C4 do 1,3-tiazol, onde foram desenvolvidas variações de grupos ativadores e desativadores dos elétrons aromáticos.

Lefranc *et al*, (2013) sintetizaram e testaram compostos tiazólicos, frente a seis linhagens de células de cânceres humanos. Alguns destes apresentaram atividade citostática 10 vezes mais potente que o padrão álcool perílico, um composto com conhecida atividade antitumoral (Figura 17).

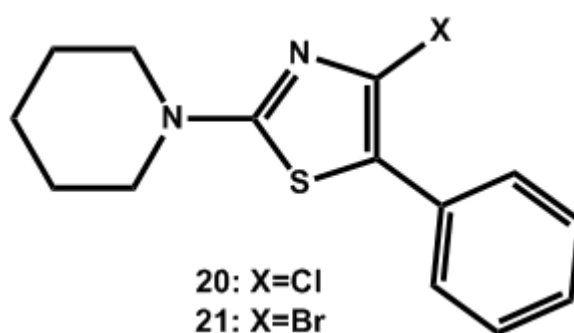


Figura 17 – Derivados do tiazol com potente atividade antitumoral.

Diante destes dados, os tiazóis surgem como uma classe de compostos bastante promissora para o desenvolvimento de fármacos antitumorais. Apresentam também amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais destaca-se a potente

ação citotóxica frente a diferentes tipos de tumores tais como carcinoma de pulmão, adenocarcinoma de cólon, glioblastoma, melanoma, câncer de próstata e leucemia.

3. OBJETIVOS

Frente a necessidade da descoberta de novos possíveis fármacos eficazes para o tratamento do câncer foram estabelecidos os seguinte objetivos:

3.1. Objetivo Geral

Identificar inéditos compostos derivados ftalil-tiazóis e avaliar suas propriedades antitumorais e imunomodulatórias *in-vitro*.

3.2. Objetivos Específicos

- Efetuar, através do planejamento estrutural, a síntese e a purificação de uma série inédita de ftalil-tiazóis (As 1-14);
- Determinar as características físico-químicas – ponto de fusão, R_f – e elucidação estrutural de todos os compostos através de técnicas de Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H - RMN) e Carbono (^{13}C - RMN) e Análise Elementar;
- Estabelecer a citotoxicidade frente a células normais de mamíferos;
- Avaliar a citotoxicidade frente a diferentes linhagens de celular neoplásicas;
- Determinar a CI_{50} do composto mais ativo frente as células tumorais;
- Avaliar as concentrações de produção de citocinas IFN- γ e IL-10.

4. MATERIAL E METODOS

O procedimentos e recursos que foram utilizados para o desenvolvimento deste trabalho são descritos a seguir.

4.1. Monitoramento das reações

As reações foram acompanhadas utilizando placas de cromatografia em camada delgada (CCD) de Sílica Gel 60 contendo indicador fluorescente F₂₅₄ de 0,25 mm de espessura. A leitura das mesmas foi realizada através de radiação de ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

4.2. Banho de ultrassom

As reações de obtenção dos compostos da série As 01-14 foram todas mediadas pela irradiação no ultrassom usando modelo Unique EM-804 TGR em frequência de 40 KHz (180 W). Estes processos foram efetuados a temperatura ambiente.

4.3. Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram medidos em capilares usando um aparelho de Thomas Hoover (FISATOM 430 D) e os valores não foram posteriormente corrigidos. No entanto estes indicaram que os produtos se fundiram sem aparente decomposição da amostra.

4.4. Análises Espectroscópicas

Para todos os compostos sintetizados, foram feitas análises de RMN de ^1H e ^{13}C e quando necessário, análises bidimensionais como, DEPT. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram adquiridos em 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). Os deslocamentos químicos (δ) foram reportados em ppm, utilizando tetrametilsilano

(TMS) como padrão interna. As constantes de acoplamento foram indicadas em Hertz (Hz), e as multiplicidades dos sinais foram designadas da seguinte forma: s – singlete, d – dublete, dd – duplo dublete, t – tripleto, q – quarteto, m – multiplete. Os espectros de IV foram obtidos em espectrofotômetro BRUKER IFS-66, em discos de KBr. As micro-análises para C, N, H, e S foram realizadas em um analisador Carlos Erba (modelo EA 1110).

4.5. Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a obtenção dos compostos da série As 01-14 fazem parte da infraestrutura do LpQM. A seguir estes foram listados:

- Vidrarias em geral;
- Placa de agitação e aquecimento (FISATOM 752A);
- Balança semi-analítica (BEL MARK 220);
- Capela com exaustão;
- Dessecador;
- Estufa (NOVA TÉCNICA NT 802);
- Bomba a vácuo (MICRONAL BA525S);
- Evaporador rotativo (FISATON 802);
- Freezer de armazenamento;
- Espátulas e pinças metálicas.

4.6. Reagentes e Solventes

Os reagentes utilizados na síntese 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) foram da marca CIL (Tédia Brazil).

A seguir encontra-se uma lista dos reagentes e solventes utilizados:

- | | | |
|----------------------|-----------------|--------------|
| • tiossemicarbazida; | • Metanol | • DMF; |
| • α -halo- | • Etanol; | • DMAP; |
| acetofenonas; | • Isopropanol; | • Propanona; |
| • Hexano; | • DMSO | |
| • Acetato de etila; | • DMSO- d_6 ; | |

4.7. Protocolos da Avaliação Farmacológica

4.7.1. Avaliação da citotoxicidade em células tumorais

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (ALLEY *et al.*, 1988; MOSMANN, 1983).

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram HEP-2 (carcinoma de laringe humana), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano) mantidas em meio de cultura DMEM, HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e MCF-7 (câncer de mama humana) mantidas em meio de cultura RPMI. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

As células HEP-2, NCI-H292 e MCF-7 ($1,0 \times 10^5$ células/mL) e HL-60 ($3,0 \times 10^5$ células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Em seguida as amostras dissolvidas em DMSO (1%) ou tampão foram adicionadas aos poços em concentração final de 25 µg/mL. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL). Após 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0.

4.7.2. Avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos

Para a determinação da citotoxicidade em esplenócitos, camundongos albinos da linhagem BALB/c (fêmeas entre 6-8 semanas) foram fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM, Recife, 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.

4.7.3. Obtenção de células esplênicas de camundongos isogênicos

Células esplênicas foram obtidas de acordo com Pereira *et al.* (2005). Após eutanásia do animal utilizando CO₂, o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e, em fluxo vertical, macerado em placa de Petri contendo meio de cultura RPMI. As suspensões celulares obtidas foram centrifugadas a 4°C, durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, adicionou-se água destilada ao sedimento promovendo lise das hemácias. Após o período de 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e centrifugou-se novamente a 4°C, 200 x g por cinco minutos. O sedimento (contendo as células esplênicas) foi ressuspensão em meio RPMI 1640 e uma alíquota de cada suspensão celular removida, diluída 1:10 em azul de trypan e quantificada em câmara de Neubauer para se verificar as células viáveis.

4.7.4. Ensaio de citotoxicidade dos compostos em células esplênicas

Células esplênicas ($6,0 \times 10^5$ células/poço) obtidas anteriormente foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em sete diferentes concentrações (faixa de 200 a 0,1 µg/mL) e com 1 µM de timidina tritiada/poço durante 72 h em estufa de CO₂ a 37°C. Em paralelo, foram feitos controles com células tratadas com saponina (0,05%) (controle positivo), com células tratadas com DMSO (0,05%) (controle branco), substâncias com reconhecida atividade tóxica e um controle sem tratamento. Após 72 h de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina tritiada foi determinada através do contador beta de cintilação. O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados.

4.7.5. Avaliação da CI_{50} do composto mais promissor

O produto (0,39 – 25 $\mu\text{g/mL}$) que apresentou inibição maior que 75% em três linhagens de células tumorais foi submetido a determinação da concentração que inibe 50% do crescimento em relação ao controle negativo (CI_{50}). A doxorrubicina (0,009 – 1,25 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como padrão. A CI_{50} e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) calculados a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism* 5.0.

4.7.6. Ensaios imunológicos

O baço de camundongos BALB/c (8 semanas) foi retirado após eutanásia por deslocamento cervical. As suspensões de células foram preparadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com HEPES (10 mM), 2-mercaptoetanol (0,05 mM), 216 mg de L-glutamina/L de gentamicina (50 mg/L) e 5% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich). As células do baço foram cultivadas a uma concentração final de 6×10^6 (72 h) células/mL em placas de 24 poços de cultura de tecidos (Costar Cambridge, MA, EUA) e, subsequentemente, na presença dos compostos As-int e da série As 01-14 mais Concanavalina A (Con A) (5 $\mu\text{g/mL}$). Os sobrenadantes foram colhidos após 72 h e dosados quanto ao teor das citocinas IL-10 e IFN- γ . As citocinas foram medidas usando dois anticorpos específicos de ELISA, utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: para IL-10, C252-2A5 e biotinilado SXC-1, para IFN- γ , XMG 1.2 e biotinilado AN18. A ligação dos anticorpos biotinilados foi detectada usando um conjugado de estreptavidina-peroxidase (Sigma-Aldrich) e uma solução de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico); Sigma) em tampão de citrato 0,1 M mais H_2O_2 . As placas foram lidas (405 nm) em um sistema automatizado para a leitura de ELISA. As amostras foram quantificadas por comparação com as curvas padrão de citocinas recombinantes purificadas (rIL-10 ou rIFN- γ), com a detecção resultante limite de 0,31 ng/mL para IL-10 e 1,25 ng/mL para IFN- γ .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir estão descritos os resultados, bem como as influências destes, para se chegar as conclusões deste estudo.

5.1. Planejamento Estrutural

Hoje são encontrados vários candidatos a fármacos anticâncer e imunomodulatórios interessantes para o desenvolvimento de estudos clínicos. Boa parte desses são análogos da talidomida. Levando em consideração estudos de relação estrutura atividade em análogos e metabolitos deste fármaco constatou-se que o heterociclo ftalimida é um grupamento farmacofórico essencial para as atividades atribuídas a essa classe de compostos (Pessoa, *et al.*, 2010; Hashimoto, 2008).

Conforme demonstrado anteriormente, as ftalimidas constituem uma classe de moléculas que apresenta relevantes propriedades antitumorais, imunomodulatórias e antiangiogênicas. Com base na literatura, objetivando obter fármacos com atividade antitumoral, sendo estes potentes e destituídos de efeitos indesejados, nosso grupo de pesquisa sintetizou e identificou moléculas com tais características dentre as quais podemos destacar a molécula com estrutura representada na figura 18 (Pessoa, *et al.*, 2010).

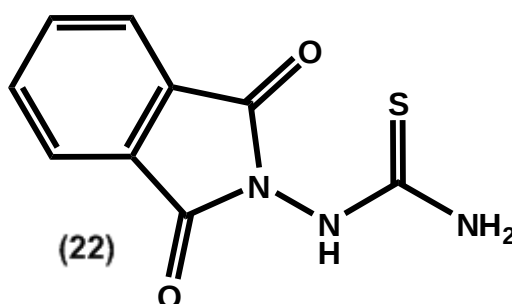


Figura 18 – Composto com propriedades antitumorais sintetizado pelo LpQM.

As propriedades antitumorais do composto (22) acima representado envolvem, em parte, a inibição da secreção de citocinas, tais como o TNF- α e IL-2, porém sem comprometer a secreção da IL-10. Como resultado diminui a inflamação, reduzindo assim o dano tecidual provocado pela proliferação de células tumorais (Pessoa, *et al.*, 2010).

Nosso grupo de pesquisa também constatou que este protótipo possui propriedade antiangiogênica, *in vivo*, com propriedades inibitórias similares ao observado com a talidomida (1).

Por outro lado, nota-se também um crescente número de protótipos a fármacos antitumorais que possuem como subunidade o heterociclo 1,3-tiazol sendo relatada esta característica em diversos trabalhos (LEFRANC *et al.*, 2013; HASSAN *et al.*, 2012; FALLAH-TAFTI *et al.*, 2011; ALIABADI *et al.*, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2005).

Conhecendo as propriedades atribuídas ao composto 22, planejou-se uma série de moléculas (As 01-14) estruturalmente semelhantes a 22, utilizando a ferramenta do bioisosterismo (Figura 19).

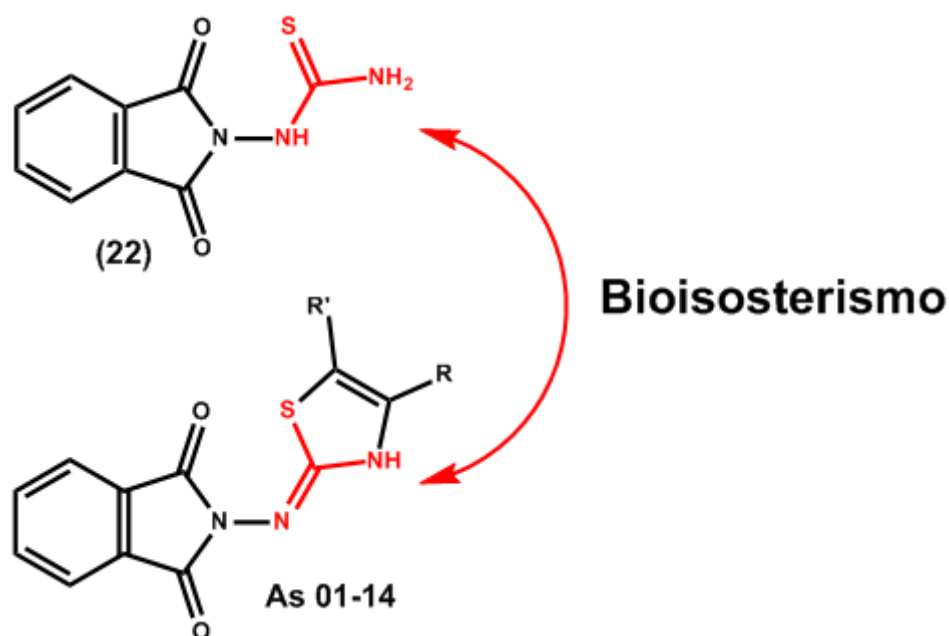


Figura 19 – Bioisosterismo entre o composto identificado pelo LpQM e os novos derivados ftalil-tiazóis.

Eles avaliaram também a importância dos substituintes presentes no anel aromático ligado na posição C4 do tiazol, em que foram desenvolvidas variações de grupos ativadores e desativadores dos elétrons aromáticos. Além de afirmarem ser essencial a substituição 2,4 do anel tiazol para propagação da atividade constatada (HASSAN *et al.*, 2012).

Frente a estes dados e tendo em vista que os compostos identificados por nosso grupo ainda apresentam atividade inferior aos fármacos antitumorais em uso na terapêutica, desenvolveu-se uma série de inéditos compostos partindo da hibridação

molecular entre os anéis heterocíclicos ftalimida e 1,3-tiazol (Figura 20). Os anéis estão conectados por um nitrogênio amínico localizado na posição C2 do tiazol, sendo este também substituído em C4, conforme estrutura de outros fármacos com atividade antitumoral descritos (EL-MESSERY *et al.*, 2012, HASSAN *et al.*, 2012).

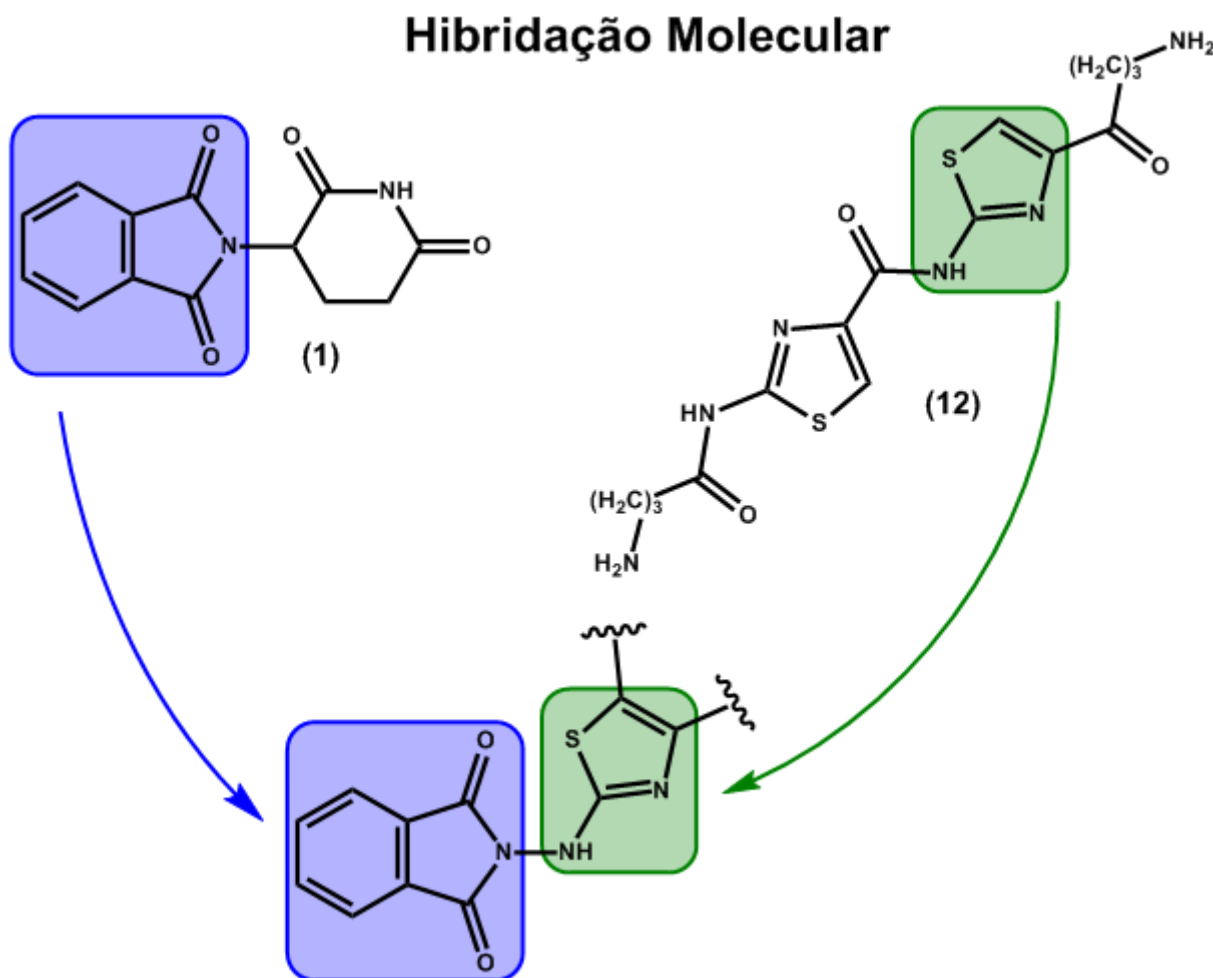


Figura 20 – Planejamento dos novos derivados ftalil-tiazóis.

O planejamento da série possibilitou estudar o efeito eletrônico de substituintes localizados nas posições C4 e C5 do anel tiazólico. Partindo da fenila como anel aromático de referência, diversos substituintes no anel fenílico foram inseridos (mono- e bi-substituições nas posições *orto*, *meta* e *para*). Na tabela 02 estão esquematizados todos os compostos obtidos.

Tabela 02 – Série de novos derivados ftalil-tiazóis (As 01-14).

R			
R'	H	H	H
	As-01	As-02	As-04
R			
R'	H	H	H
	As-05	As-06	As-08
R			
R'	H	H	
	As-09	As-10	
R			
R'	H	H	CH ₃
	As-11	As-12	As-14

Uma vez que o planejamento estrutural foi estabelecido, procedeu-se a síntese e a purificação dos compostos para posterior avaliação farmacológica.

5.2. Síntese dos Compostos

Para obtenção dos inéditos derivados ftalil-tiazóis seguiram-se as rotas sintéticas e procedimentos de elucidação estrutural descritos a seguir.

5.2.1. Síntese do Composto Intermediário

Na obtenção da série de compostos ftalil-tiazóis (As 01-14) obteve-se primeiramente a molécula 22 que a partir daqui será denominada composto intermediário (As-int). Este foi sintetizado partindo da condensação entre o anidrido ftálico (23) com a tiossemicarbazida (24) (Figura 21). Estes reagentes foram adquiridos de fontes comerciais.

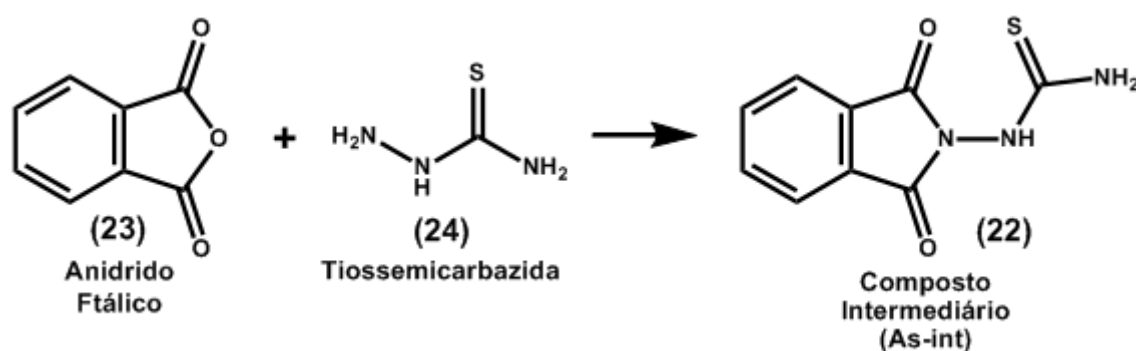


Figura 21 – Reação de obtenção do composto As-int.

O mecanismo proposto para a reação desenvolvida para obter o intermediário As-int, envolve a adição do par de elétrons não ligante do nitrogênio da amina mais distante da tiocarbonila da tiossemicarbazida (24) ao carbono carbonílico do anidrido ftálico (23) (Figura 19). Neste processo, ocorre o rompimento da ligação π C=O e a formação do intermediário tetraédrico (25). O restabelecimento desta ligação π resulta no rompimento da ligação σ C-O, com relaxamento da tensão angular. A restauração do anel de cinco membros tensionado é endergônica, justificando a energia térmica fornecida ao sistema durante a etapa lenta da reação. No entanto, essa restauração só é possível porque o nitrogênio da ligação amida formada ainda contém um par de elétrons não ligante, com geometria e distância adequadas para a realização de um segundo ataque nucleofílico ao átomo de carbono carbonílico (sp^2) do ácido carboxílico (28), conduzindo a novo intermediário tetraédrico (29). Por fim, há restauração da

ligação π , eliminação de uma molécula de água e formação do composto As-int (22), conforme esquema ilustrado na figura 22 (BARBOSA, 2009)

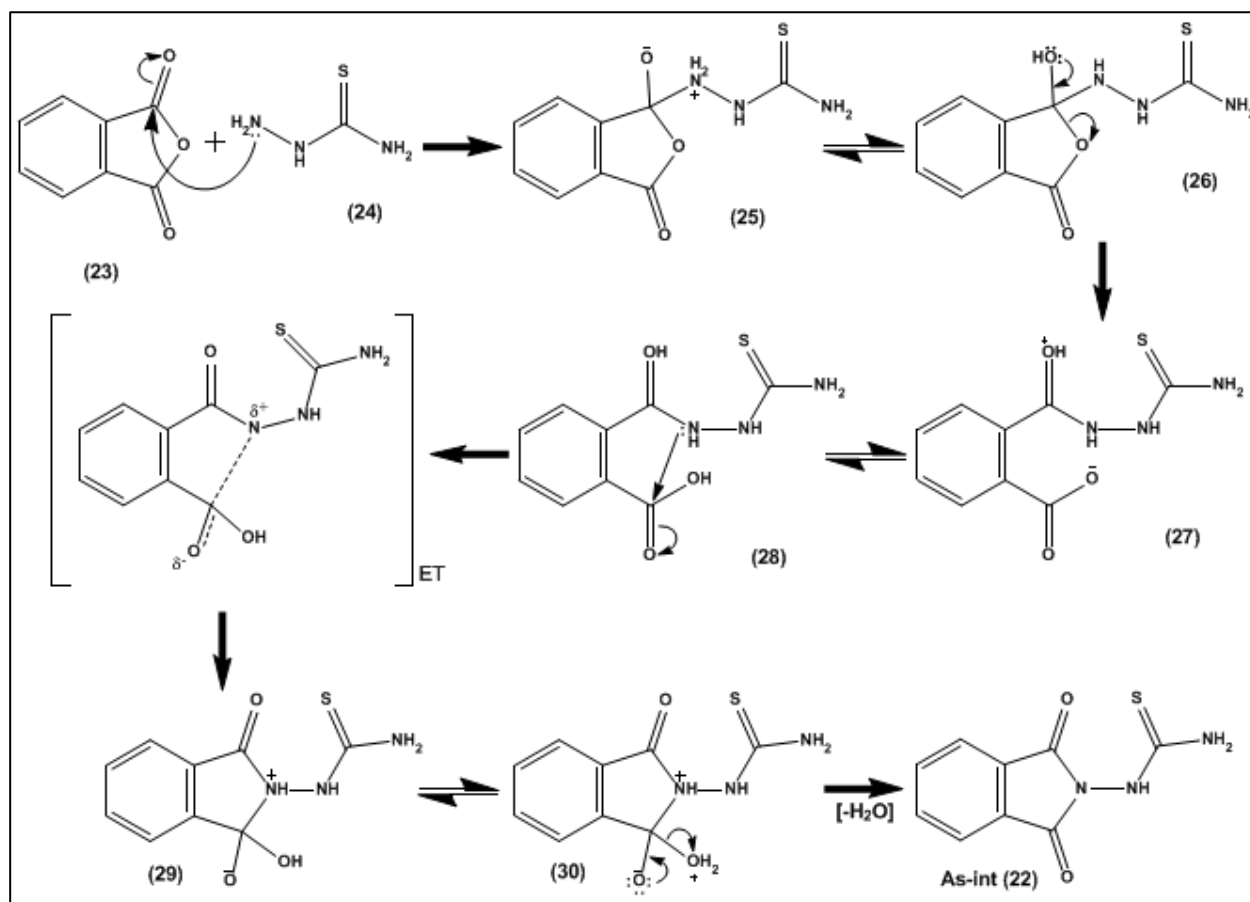


Figura 22 – Mecanismo de reação proposto para se obter o composto As-int.

O intermediário da rota de síntese foi preparado sob refluxo e aquecimento, usando como solvente N,N-di-metilformamida (DMF) e o catalizador di-metil-amino-piridina (DMAP). O produto obtido, após encerrada a reação, foi precipitado com adição de água destilada e para a purificação dissolveu-se o produto em propanona com posterior filtração, obtendo-se um sólido cristalino branco. O composto As-int foi caracterizado por técnicas espectrométricas (IV, RMN de ^1H e ^{13}C).

A figura 23 consiste no espectro de IV obtido pela análise do As-int onde constata-se as principais bandas de absorção. A banda na frequência de 3475.39 cm^{-1} sugere a presença de grupamento NH_2 . A banda em 3201.18 cm^{-1} é indicativo de deformação axial NH . E na frequência de 1727.56 cm^{-1} é caracterizado estiramentos de C=O de imida cíclica, indicando a provável ocorrência da reação com formação da ftalimida.

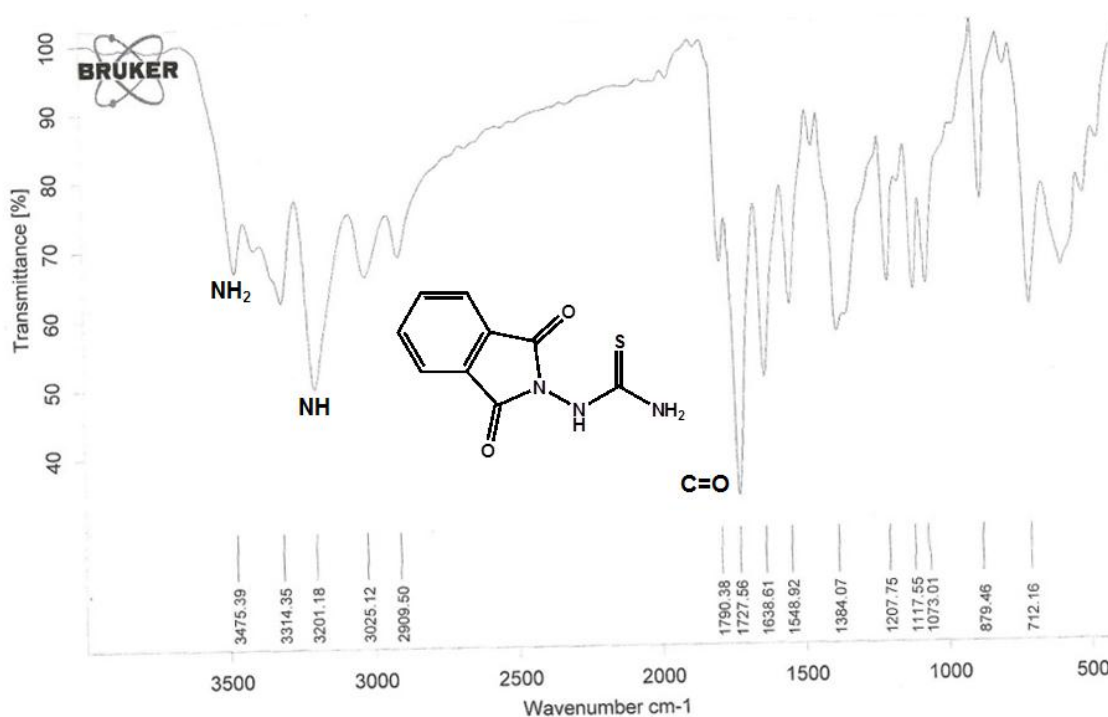


Figura 23 – Espectro de IV do composto intermediário As-int.

A figura 24 apresenta o espectro de RMN ^1H do As-int. Os hidrogênios aromáticos estão localizados no multipeto localizado em 7.9 ppm. Os dois singletos localizados em 8.2 e 8.3 ppm são referentes aos dois hidrogênios da amina primária (NH_2) que estão em ambientes químicos diferentes. Este fenômeno é característico de tiossemicarbazidas não substituídas nesta posição. Por último observa-se o singlete integrando para um hidrogênio referente a amina secundária (NH).

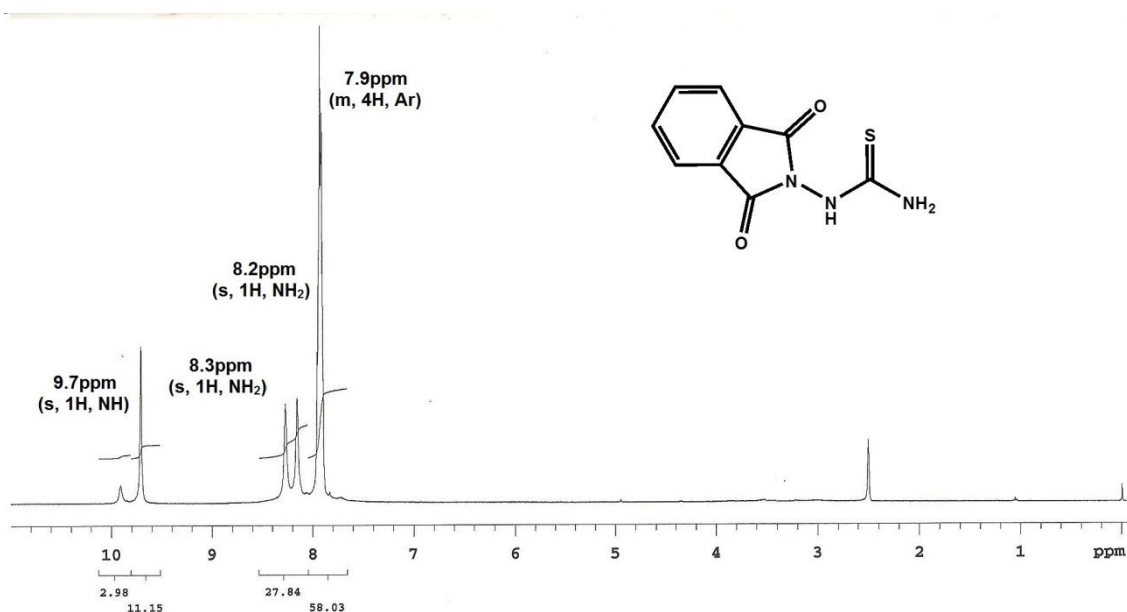


Figura 24 – Espectro de RMN – ^1H do composto intermediário As-int.

Na figura 25 está representado o espectro de RMN ^{13}C do As-int. Com auxílio do espectro de DEPT identificam-se os sinais em 123.527 e 134.921 ppm como referentes aos carbonos aromáticos ligados a um hidrogênio (carbonos metínicos). Já o sinal em 130.010 ppm é referente aos carbonos quaternários do anel aromático. Os carbonos carbonílicos ($\text{C}=\text{O}$) ressoaram em 165.142 ppm ($\text{C}=\text{O}$). Finalizando esta análise identifica-se o sinal em 182.476 ppm advindo da ressonância do carbono tiocarbonílico ($\text{C}=\text{S}$).

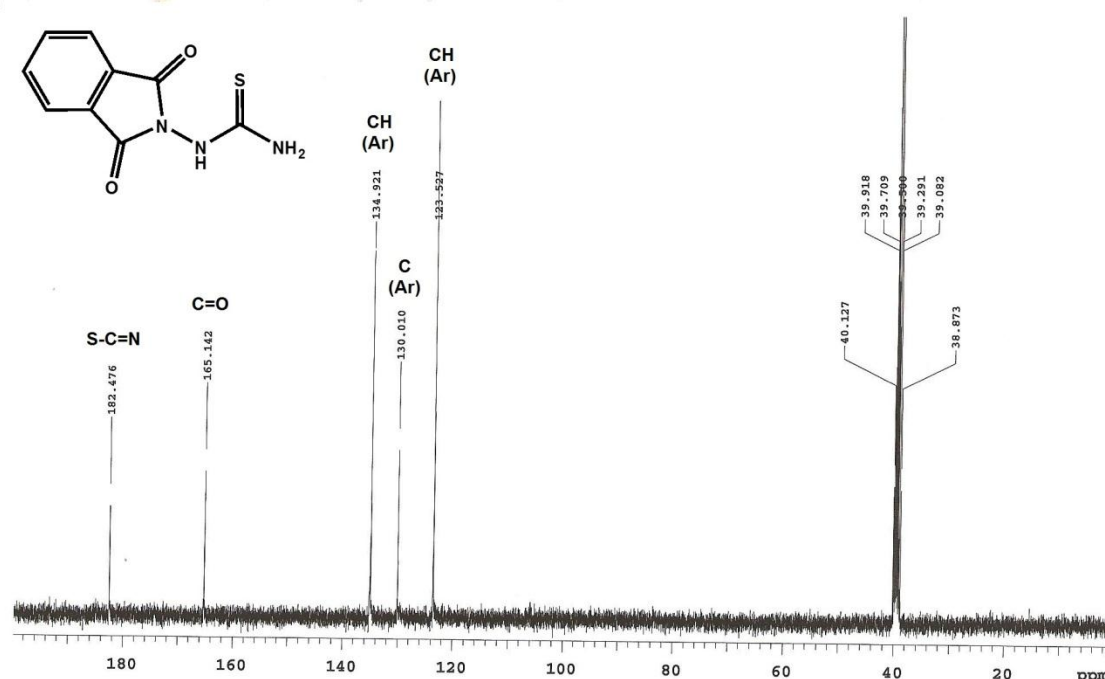


Figura 25 – Espectro de RMN – ^{13}C do composto intermediário As-int.

5.2.2. Síntese da Série de Derivados Ftalil-Tiazóis

Para a obtenção de compostos derivados tiazólicos, geralmente, segue-se o protocolo desenvolvido por Hantzsch em 1887, no qual reagem tioamidas e uma α -halo-cetona-substituída (SOUSA *et al.*, 2005). Nesta metodologia as reações são desenvolvidas em agitação magnética sob refluxo. Esta rota é de fácil execução, apresentando bons rendimentos, além de mostrar-se compatível para o preparo de inúmeros compostos.

No entanto o nosso grupo otimizou o protocolo de Hantzsch e partindo também dos relatos de Zang *et al* (2012) a ciclização dos tiazóis foi conduzida em um banho de

ultrassom (40 MHz, 60 min), com 2-propanol como solvente, a temperatura ambiente (OLIVEIRA FILHO, 2013). Esta mudança das condições reacionais tornou o procedimento mais rápido e com rendimentos semelhantes aos do método descrito por Hantzsch. As α -halo-cetofenonas utilizadas foram adquiridas de fontes comerciais (Figura 26).

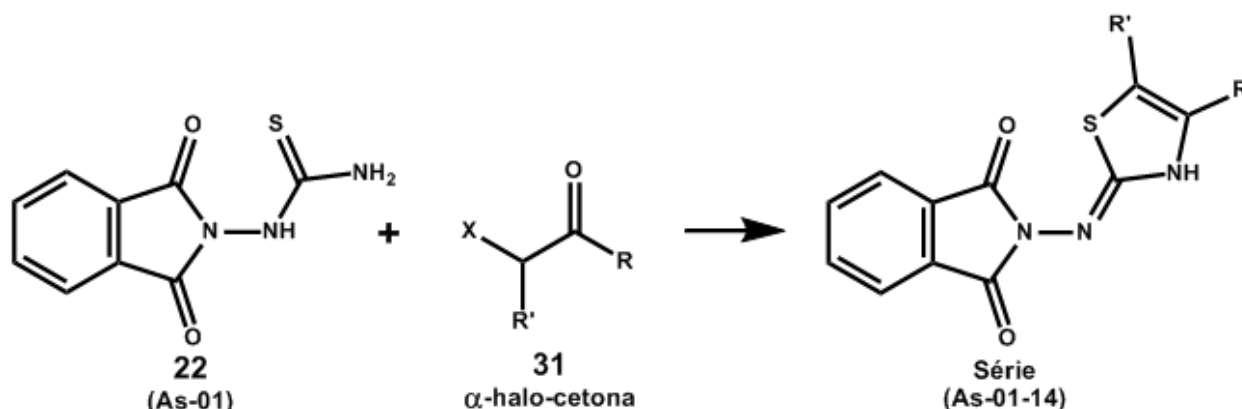


Figura 26 – Reação de obtenção dos novos ftalil-tiazóis.

O mecanismo proposto para as reações desenvolvidas na obtenção da série As 01-14 consiste no ataque nucleofílico, dos elétrons não ligantes do enxofre do composto As-int, ao carbono ligado ao halogênio da α -halo-cetona (31). Posteriormente ocorre um rearranjo eletrônico da estrutura formada, após perda do hidrogênio ligado ao nitrogênio. Em seguida, ocorre um ataque nucleofílico do nitrogênio ao carbono da carbonila. Esta etapa é finalizada com perda de uma molécula de água e o carbono vizinho perde um hidrogênio. Como resultado, ocorre a formação de uma ligação π entre carbonos e ciclização do anel (Figura 27) (GOMES, 2012).

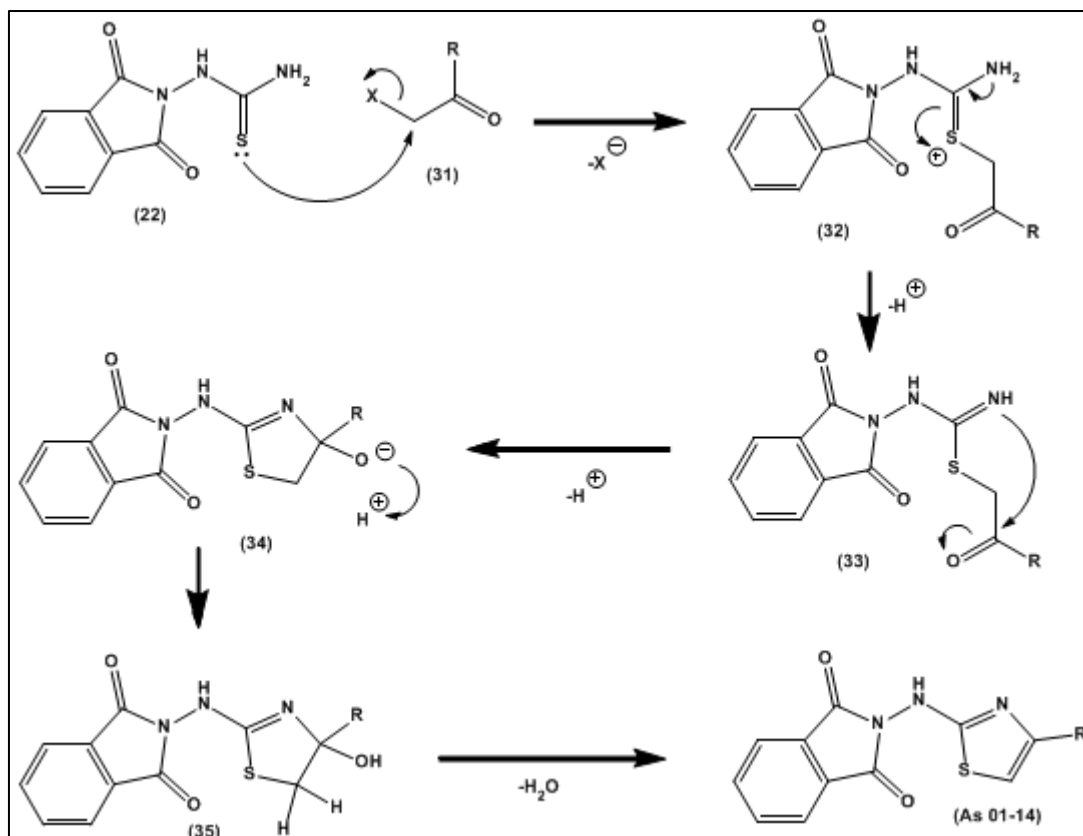


Figura 27 – Mecanismo de reação genérico proposto para se obter os compostos da série As 01-14.

As estruturas dos derivados ftalil-tiazóis (As 01-14) foram confirmadas por IV e RMN (¹H, ¹³C e DEPT quando necessário). A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos compostos permitiu evidenciar os sinais referentes ao metino localizado na posição C5 no anel tiazólico, sinal diagnóstico para esta classe de compostos heterocíclicos. Na RMN de ¹³C, o carbono referente a este metino é de fácil localização, tendo $\delta = 101\text{-}117$ ppm.

As figuras 28, 29 e 30 correspondem, respectivamente, aos espectros de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C do composto As-01. Exemplificando os demais espectros da série As 01-14.

Através da análise espectroscópica na região do infravermelho foi possível constatar as principais bandas de absorção (Figura 28). A frequência de 3119.15 cm^{-1} sugere a deformação axial N-H. E em 1743.24 e 1794.59 cm^{-1} são caracterizados estiramentos de C=O de imida cíclica.

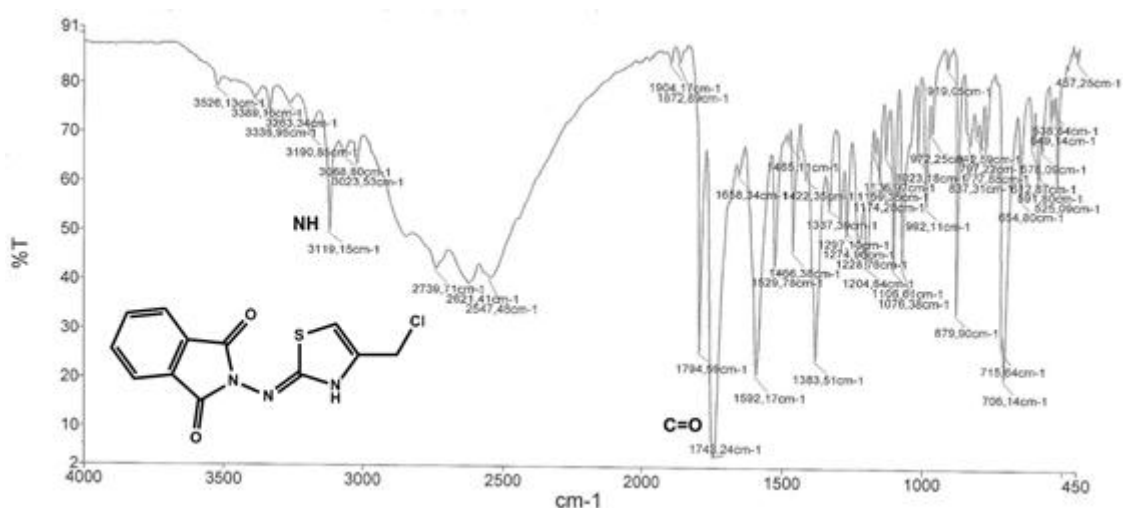


Figura 28 – Exemplo de Espectro de IV da série de ftalil-tiazóis (As-01).

A figura 29 apresenta o espectro de RMN ^1H onde foi constatada a presença de um singleto em 4.539 ppm, integrando para dois hidrogênios, referente ao grupo metileno da molécula. Em 7.028 ppm, observamos um singleto integrando para um hidrogênio da posição C5 do núcleo tiazol. Nos sinais entre 7.931-7.996 ppm, observamos um multipeto integrando para quatro hidrogênios aromáticos do anel ftalimida. E por fim, em 10.541 ppm, observamos um singleto largo integrando para um hidrogênio, correspondendo ao hidrogênio da amina secundária.

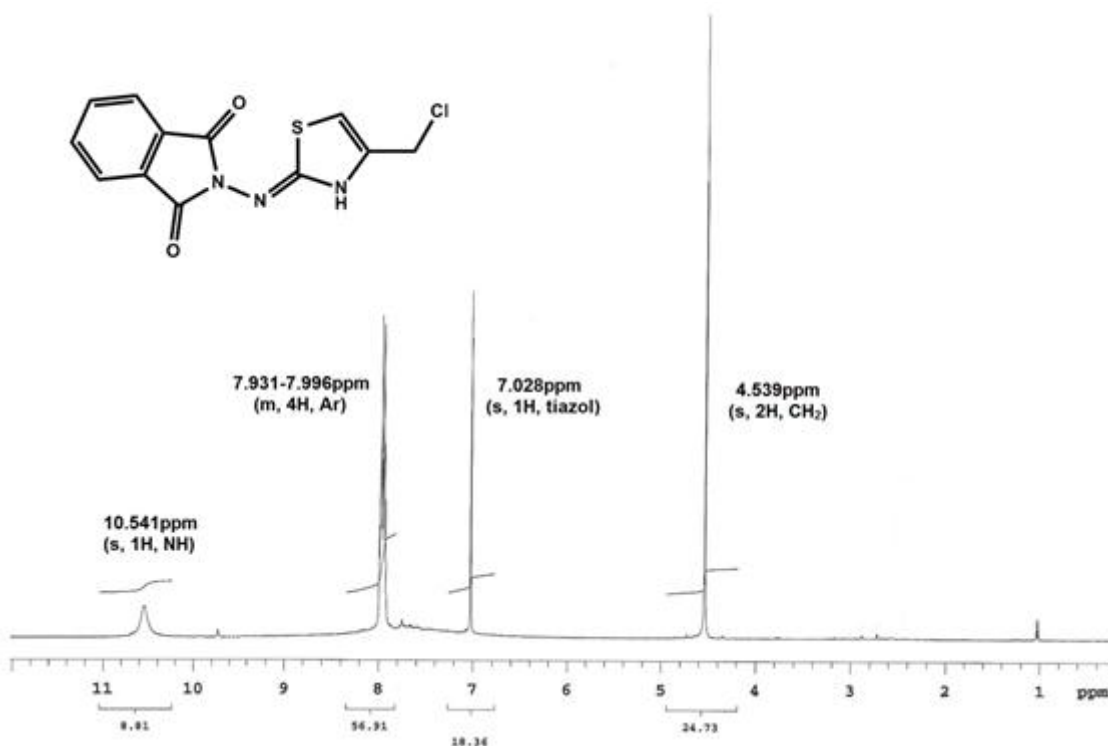


Figura 29 – Exemplo de Espectro de RMN – ^1H da série de ftalil-tiazóis (As-01).

A figura 30 corresponde ao espectro de RMN ^{13}C no qual, com auxílio da análise do espectro DEPT, observa-se: em 41.126 ppm o sinal correspondente os carbono metilênico; em 109.764 ppm o sinal de um carbono metínico que confirma a formação do anel tiazol; em 123.860 ppm e 135.401 ppm estão os sinais referentes aos metinos aromáticos; em 129.360 ppm o pico indicativo dos carbonos quaternários do anel ftalimida; já em 147.127 ppm o carbono quaternário do anel tiazol; em 165.560 ppm o sinal das carbonilas (C=O); e por fim em 168.271 ppm o pico referente ao carbono do tiazol que está ligado ao enxofre e ao nitrogênio (S-C=N).

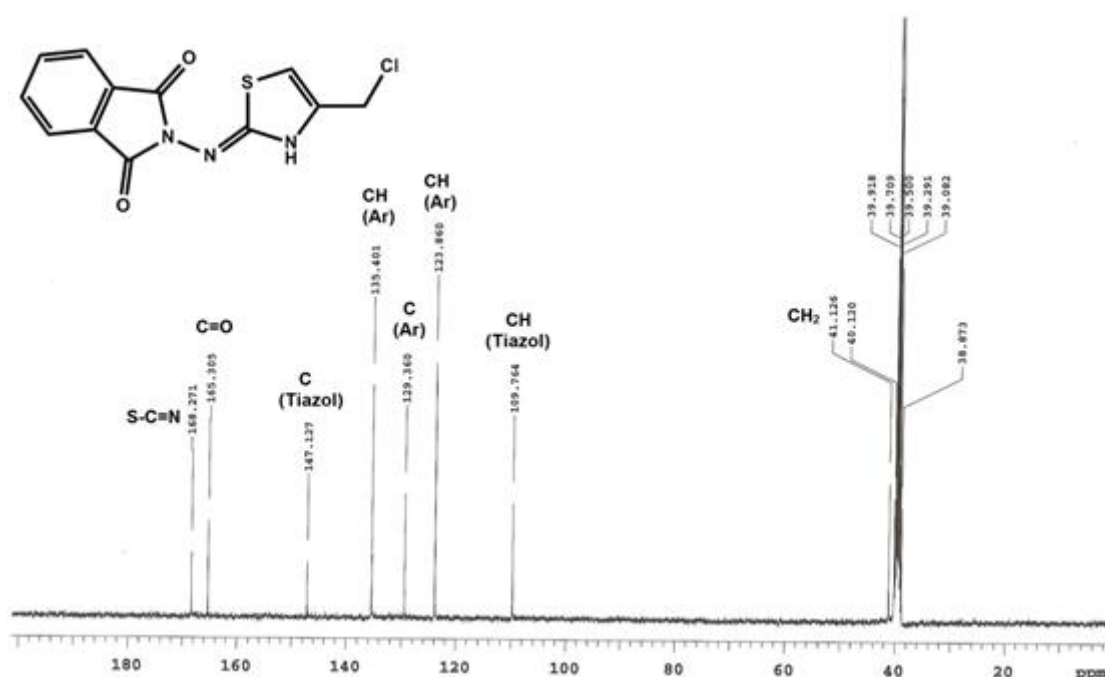


Figura 30 – Exemplo de Espectro de RMN – ^{13}C da série de ftalil-tiazóis (As-01).

Uma característica estrutural importante do tiazóis consiste na posição da ligação dupla envolvendo o carbono C2 deste heterociclo. Dependendo do tautomerismo imino-lactama, a ligação dupla envolvendo o carbono C2 do anel tiazólico presente nos compostos (As 01-14) pode ser endocíclica ou exocíclica (Figura 31).

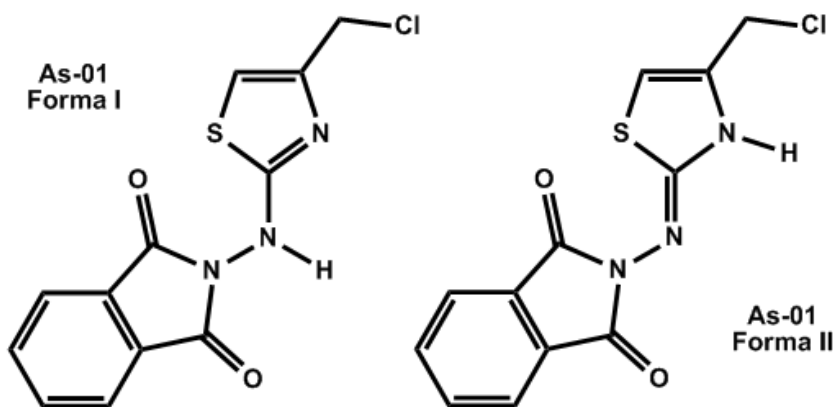


Figura 31 – Forma tautoméricas do composto As-01.

Buscando-se a determinação inequívoca da posição desta ligação, tentou-se obter cristais do composto As-01 apropriados para a análise por difração de raios-X, porém não obtive-se sucesso.

No entanto, Pessoa *et al.* (2010) compararam os tautômeros do composto (36) derivado da 4-tiazolinona e calcularam que a forma com a dupla ligação exocíclica 36b é 16,86 kJ/mol mais estável que 36a (Figura 32). Considerando que as 4-tiazolinonas são bioisósteros dos 1,3-tiazóis e a semelhança estrutural percebida entre 36 e os compostos da série As 01-14, pode-se estimar uma grande probabilidade de a forma mais estável também ser a que apresenta dupla ligação exocíclica (ex. As 01 Forma II).

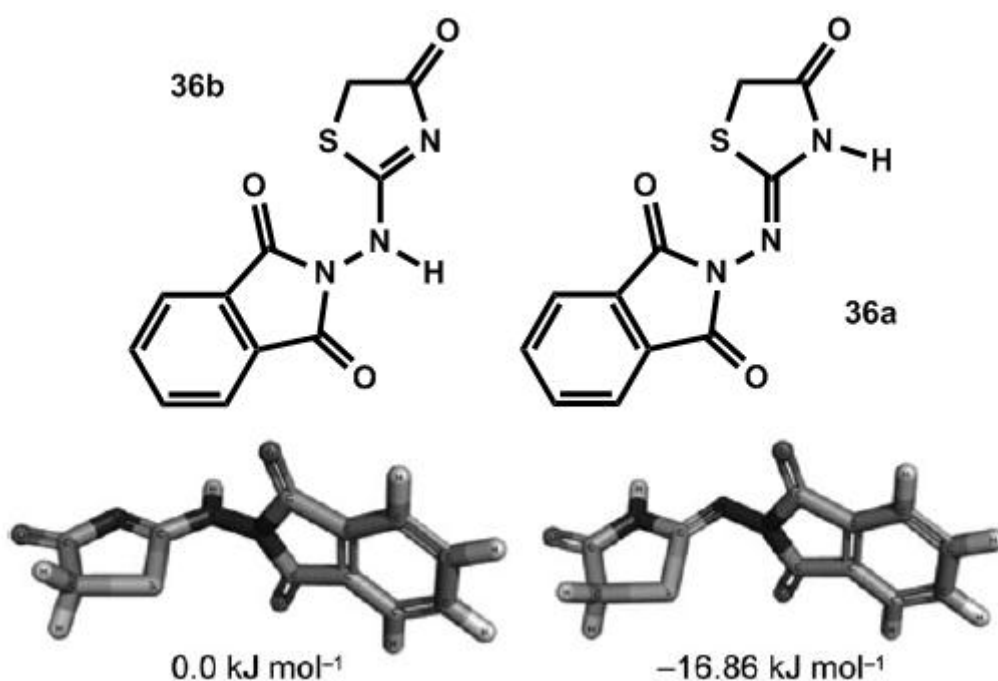


Figura 32 – Estabilidade dos tautômeros de um bioisótero a série As 01-14.

5.2.3. Metodologia Sintética e Dados Espectroscópicos

1-(1,3-dioxoisindolin-2-il)tioureia (As-int)

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 20 mmol (2,96 g) de anidrido ftálico, 20 mmol (1,82 g) de tiossemicarbazida, 0,2 g de DMAP e aproximadamente 10 mL de DMF. Os reagentes sólidos foram previamente triturados antes da pesagem. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética em refluxo (aproximadamente 100°C) durante 2 horas. Após finalizada a reação, adicionou-se água, ocorrendo a formação de um precipitado branco que foi filtrado em funil sinterizado. O produto foi solubilizado em propanona, sendo filtrada a impureza insolúvel em funil sinterizado. O produto foi rotaevaporado e seco no dessecador sob vácuo.

Características Fisico-Químicas: Cristais brancos; PF: 210-211°C; Rend.: 2,79 g (58%); R_f : 0.63 (Acetato de etila / Hexano 7:3).

PM ($C_9H_7N_3O_2S$): 221,24 g/mol.

Análise Elementar para $C_9H_7N_3O_2S$: Teórico: C, 48.86; H, 3.19; N, 18.99; S, 14.49. Calculado: C, 49.37; H, 3.28; N, 18.58; S, 14.34.

IV (KBr), principais sinais: δ 3475.39 (NH_2), 3201.18 (NH), 1727.56 ($C=O$) cm^{-1} .

RMN de 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$): 7.9 (m, 4H, Ar), 8.2 (s, 1H, NH_2), 8.3 (s, 1H, NH_2), 9.7 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, $DMSO-d_6$): δ 123.527 (C-H, Ar), 130.010 (C, Ar), 134.921 (C-H, Ar), 165.142 ($C=O$), 182.476 ($C=S$).

2-(4-(clorometil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-01)

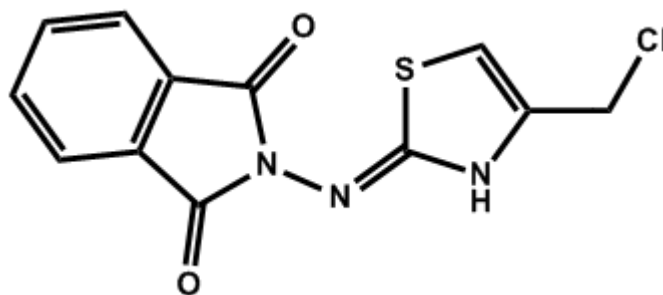


Figura 33 – Estrutura do composto As-01.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,29 g) de 1,3-dicloro-acetona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo.

Características Físico-Químicas: Cristais brancos; PF: 207-208°C; Rend.: 0.40 g (50%); R_f : 0.53 (Hexano / Acetato de etila 1:1).

PM ($C_{12}H_8ClN_3O_2S$): 293,73 g/mol.

Análise Elementar para $C_{12}H_8ClN_3O_2S$: Teórico: C, 49.07; H, 2.75; N, 14.31; S, 10.92. Calculado: C, 44.50; H, 2.81; N, 13.34; S, 10.43.

IV (KBr), principais sinais: 3119.15 (NH), 1743.24 (C=O) cm^{-1} .

RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4.539 (s, 2H, CH_2), 7.028 (s, 1H, tiazol), 7.931-7.996 (m, 4H, Ar), 10.541 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 41.126 (CH_2), 109.764 (C-H, tiazol), 123.860 (C-H, Ar), 129.360 (C, Ar), 135.401 (C-H, Ar), 147.127 (C, tiazol), 165.560 (C=O), 168.271 (S-C=N, tiazol).

2-(4-feniltiazol-2-ilamino)isoindolono-1,3-diona (As-02)

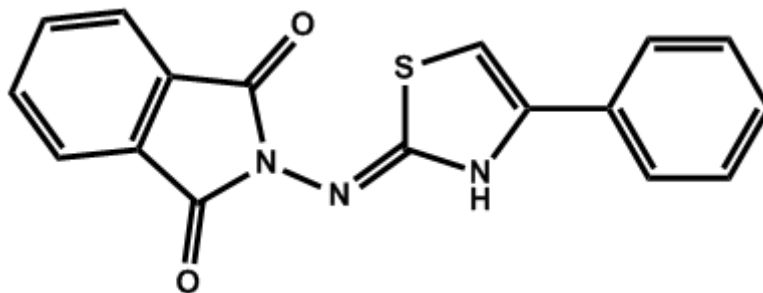


Figura 34 – Estrutura do composto As-02.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,45 g) de 2-bromo-acetofenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo.

Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 194-196°C; Rend.: 0.62 g (65%); R_f : 0.60 (Hexano / Acetato de etila 1:1)

PM (C₁₇H₁₁N₃O₂S): 321,35 g/mol.

Análise Elementar para C₁₇H₁₁N₃O₂S: Teórico: C, 63.54; H, 3.45; N, 13.08; S, 9.98. Calculado: C, 62.08; H, 3.41; N, 12.98; S, 9.71.

IV (KBr), principais sinais: 3123.66 (NH), 1742.23 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.231-7.268 (t, 1H, Ar), 7.313-7.331 (t, 2H, Ar), 7.376 (s, 1H, tiazol), 7.689 e 7.708 (d, 2H, Ar), 7.949-8.023 (m, 4H, Ar), 10.652 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 104.769 (C-H, tiazol), 123.814 (C-H, Ar), 125.541 (C-H, Ar), 127.710 (C-H, Ar), 128.570 (C-H, Ar), 129.321 (C, Ar), 133.983 (C, Ar), 135.370 (C-H, Ar), 149.915 (C, tiazol), 165.498 (C=O), 167.582 (S-C=N, tiazol).

2-(4-*p*-toluiltiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-03)

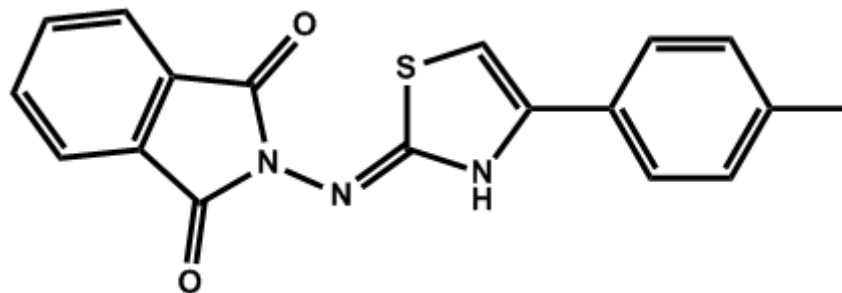


Figura 35 – Estrutura do composto As-03.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,48 g) de 2-bromo-4'-metil-acetofenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo.

Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 214-216°C; Rend.: 0.36 g (37%); R_f : 0.65 (Hexano / Acetato de etila 1:1).

PM ($C_{18}H_{13}N_3O_2S$): 335,38 g/mol.

Análise Elementar para $C_{18}H_{13}N_3O_2S$: Teórico: C, 64.46; H, 3.91; N, 12.53; S, 9.56. Calculado: C, 63.17; H, 3.81; N, 12.18; S, 9.17.

IV (KBr), principais sinais: 3117.64 (NH), 1738.51 (C=O) cm^{-1} .

RMN de 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 2.263 (s, 3H, CH_3), 7.128 e 7.145 (d, 2H, Ar), 7.297 (s, 1H, tiazol), 7.580 e 7.597 (d, 2H, Ar), 7.970-8.003 (m, 4H, Ar), 10.405 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, $DMSO-d_6$): δ 20.803 (CH_3), 103.862 (C-H, tiazol), 123.86 (C-H, Ar), 125.518 (CH, Ar), 129.166 (C-H, Ar), 129.336 (C, Ar), 131.389 (C, Ar), 135.416 (C, Ar), 137.050 (C, Ar), 150.171 (C, tiazol), 165.560 (C=O), 167.543 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(4-metoxifenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-04)

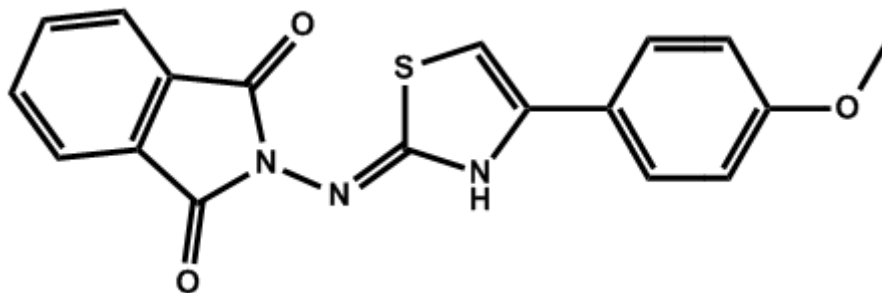


Figura 36 – Estrutura do composto As-04.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,5 g) de 2-bromo-metoxi-acetofenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo.

Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 215-218°C; Rend.: 0.72 g (72%); R_f: 0.53 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

PM (C₁₈H₁₃N₃O₃S): 351,38 g/mol.

Análise Elementar para C₁₈H₁₃N₃O₃S: Teórico: C, 61.53; H, 3.73; N, 11.96; S, 9.13. Calculado: C, 58.88; H, 3.87; N, 11.38; S, 8.77.

IV (KBr), principais sinais: 3232.68 (NH), 1748.64 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.025 (s, 3H, CH₃), 6.876 e 6.905 (d, 2H, Ar), 7.203 (s, 1H, tiazol), 7.601 e 7.630 (d, 2H, Ar), 7.942 – 8.022 (m, 4H, Ar), 10.723 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 25.528 (CH₃), 102.721 (C-H, tiazol), 114.007 (C-H, Ar), 123.897 (CH, Ar), 126.705 (C, Ar), 127.010 (C-H, Ar), 129.383 (C, Ar), 135.416 (C-H, Ar), 149.490 (C, tiazol), 158.576 (C-O, Ar), 165.576 (C=O), 167.621 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(4-fluorfenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-05)

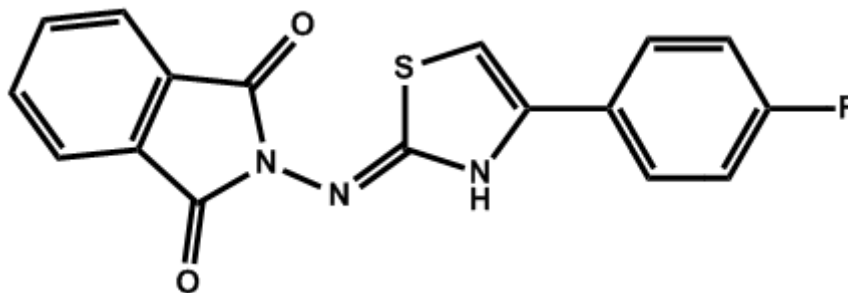


Figura 37 – Estrutura do composto As-05.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,39 g) de 2-cloro-4'-fluoracetofenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 4 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo.

Características Físico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 210°C; Rend.: 0.45 g (51%); R_f: 0.53 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

PM (C₁₇H₁₀FN₃O₂S): 339,34 g/mol.

Análise Elementar para C₁₇H₁₀FN₃O₂S: Teórico: C, 60.17; H, 2.97; N, 12.38; S, 9.45. Calculado: C, 60.32; H, 3.02; N, 12.32; S, 9.58.

IV (KBr), principais sinais: 3130.14 (NH), 1743.63 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.146 e 7.190 (d, 2H, Ar), 7.366 (s, 1H, tiazol), 7.715 e 7.750 (d, 2H, Ar), 7.952-8.025 (m, 4H, Ar), 10.424 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 104.583 (CH, tiazol), 115.364 (CH, Ar), 115.584 (CH, Ar), 123.853 (CH, Ar), 127.532 (CH, Ar), 129.321 (C, Ar), 135.401 (CH, Ar), 160.433 (C, tiazol), 162.865 (C-F, Ar), 165.481 (C=O), 167.628 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(4-clorofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-06)

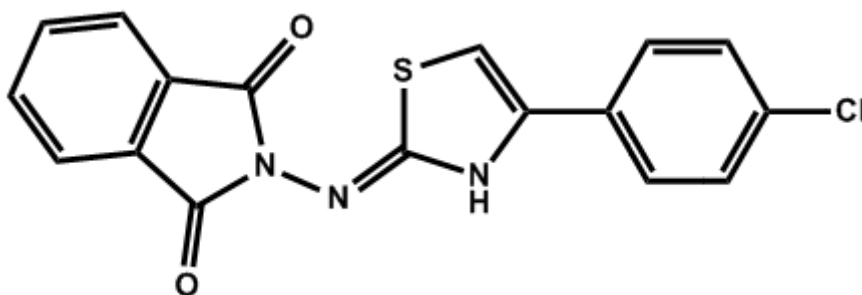


Figura 38 – Estrutura do composto As-06.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,53 g) de 2-bromo-4'-cloroacetofenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo.

Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 217-218°C; Rend.: 0.64 g (62%); R_f : 0.53 (Hexano / Acetato de etila 1:1).

PM (C₁₇H₁₀ClN₃O₂S): 355,80 g/mol.

Análise Elementar para C₁₇H₁₀ClN₃O₂S: Teórico: C, 57.39; H, 2.83; N, 11.81; S, 9.01. Calculado: C, 57.55; H, 2.96; N, 11.62; S, 9.03.

IV (KBr), principais sinais: 3119.79 (NH), 1739.00 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.384 e 7.460 (d, 2H, Ar), 7.404 (s, 1H, tiazol), 7.650 e 7.663 (d, 2H, Ar). 7.969 e 8.004 (m, 4H, Ar), 10.461 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 105.713 (C-H, tiazol), 123.907 (C-H, Ar), 127.284 (C-H, Ar), 128.670 (C-H, Ar), 129.336 (C, Ar), 132.171 (C, Ar), 132.899 (C, Ar), 135.439 (C-Cl, Ar), 148.854 (C, tiazol), 165.506 (C=O), 167.721 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(4-bromofenil)thiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-07)

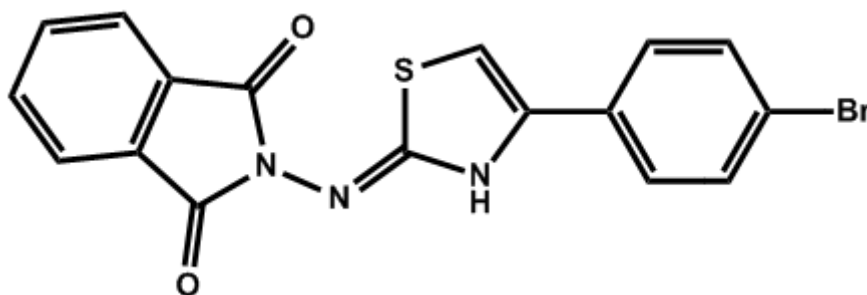


Figura 39 – Estrutura do composto As-07.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,63 g) de 2,4'-dibromo-acetofenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo.

Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 220-221°C; Rend.: 0.63 g (55%); R_f : 0.68 (Hexano / Acetato de etila 1:1).

PM ($C_{17}H_{10}BrN_3O_2S$): 400,25 g/mol.

Análise Elementar para $C_{17}H_{10}BrN_3O_2S$: Teórico: C, 51.01; H, 2.52; N, 10.50; S, 8.01. Calculado: C, 51.15; H, 2.58; N, 11.62; S, 9.03.

IV (KBr), principais sinais: 3117.68 (NH), 1739.19 (C=O) cm^{-1} .

RMN de 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 7.473 (s, 1H, tiazol), 7.52 e 7.541 (d, 2H, Ar), 7.64 e 7.66 (d, 2H, Ar), 7.913-8.006 (m, 4H, Ar), 10.455 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, $DMSO-d_6$): δ 105.791 (C-H, Tiazol), 120.786 (C-H, Ar), 123.891 (C-H, Ar), 127.570 (C-H, Ar), 129.321 (C, Ar), 131.567 (C, Ar), 135.424 (C-Br, Ar), 148.885 (C, tiazol), 165.483 (C=O), 167.721 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-08)

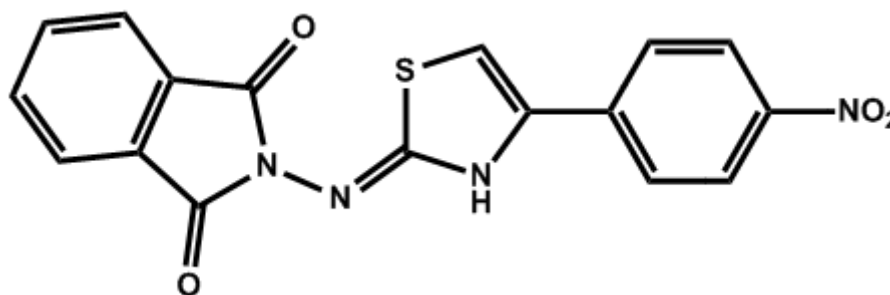


Figura 40 – Estrutura do composto As-08.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,55 g) de 2-bromo-4'-nitroacetofenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo.

Características Fisico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 239-240 °C; Rend.: 0.43 g (41%); R_f : 0.45 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

PM (C₁₇H₁₀N₄O₄S): 366,35 g/mol.

Análise Elementar para C₁₇H₁₀N₄O₄S: Teórico: C, 55.73; H, 2.75; N, 15.29; S, 8.75. Calculado: C, 54.40; H, 2.87; N, 15.23; S, 9.11.

IV (KBr), principais sinais: 3309.85 (NH), 1724.82 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.773 (s, 1H, tiazol), 7.950-7.98 (m, 4H, Ar), 8.010 e 8.032 (d, 2H, Ar), 8.196 e 8.218 (d, 2H, Ar), 10.543 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 109.625 (C-H, tiazol), 123.899 (C-H, Ar), 124.116 (C-H, Ar), 126.416 (C-H, Ar), 129.305 (C-N, Ar), 135.416 (C-H, Ar), 139.955 (C, Ar), 146.329 (C, Ar), 147.948 (C, tiazol), 165.382 (C=O), 168.047 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(bifenil-4-il)thiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-09)

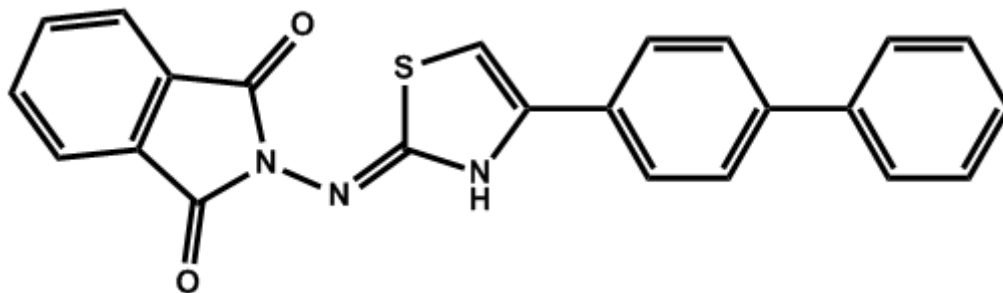


Figura 41 – Estrutura do composto As-09.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,62 g) de 2-bromo-4'-fenilacetofenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo. O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Características Fisico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 240-241°C; Rend.: 0.52 g (46%); R_f: 0.65 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

PM (C₂₃H₁₅N₃O₂S): 397,45 g/mol.

Análise Elementar para C₂₃H₁₅N₃O₂S: Teórico: C, 69.50; H, 3.80; N, 10.57; S, 8.07. Calculado: C, 66.81; H, 3.98; N, 10.48; S, 7.95.

IV (KBr), principais sinais: 3324.67 (NH), 1660.10 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.354 (s, 1H, tiazol), 7.450 – 7.500 (t, 1H, Ar), 7.579 – 7.679 (m, 4H, Ar), 7.705 – 7.734 (d, 2H, Ar), 7.765 – 7.871 (m, 4H, Ar), 7.941 – 7.970 (d, 2H, Ar), 10.648 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 103.408 (C-H, tiazol), 126.514 (C-H, Ar), 126.850 (C-H, Ar), 127.483 (C-H, Ar), 127.987 (C-H, Ar), 128.986 (C-H, Ar), 130.078 (C-H, Ar), 131.535 (C-H, Ar), 133.878 (C, Ar), 136.137 (C-H, Ar), 138.998 (C, Ar), 139.693 (C, Ar), 150.208 (C, tiazol), 167.591 (C=O), 168.285 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(naftalen-2-il)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-10)

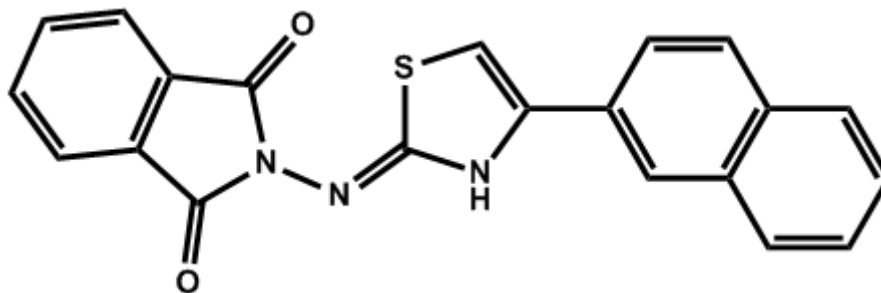


Figura 42 – Estrutura do composto As-10.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,56 g) de 2-bromo-2'-acetonafona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo. O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 225-227 °C; Rend.: 0.50 g (47%); R_f: 0.50 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

PM (C₂₁H₁₃N₃O₂S): 371,41 g/mol.

Análise Elementar para C₂₁H₁₃N₃O₂S: Teórico: C, 67.91; H, 3.53; N, 11.31; S, 8.63. Calculado: C, 64.89; H, 3.48; N, 11.45; S, 8.26.

IV (KBr), principais sinais: 3169.87 (NH), 1743.89 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.474 (t, 2H, Ar), 7.533 (s, 1H, tiazol), 7.854 e 7.883 (d, 4H, Ar), 7.990-8.077 (m, 4H, Ar), 8.226 (s, 1H, Ar), 10.479 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 105.504 (C-H, tiazol), 123.891 (C-H, Ar), 124.178 (C-H, Ar), 126.091 (C-H, Ar), 126.447 (C-H, Ar), 127.144 (C-H, Ar), 127.555 (C-H, Ar), 128.074 (C-H, Ar), 128.151 (C-H, Ar), 129.344 (C, Ar), 131.513 (C, Ar), 132.458 (C, Ar), 132.969 (C, Ar), 135.432 (CH, Ar), 150.062 (C, tiazol), 165.576 (C=O), 167.961 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(3-nitrofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-11)

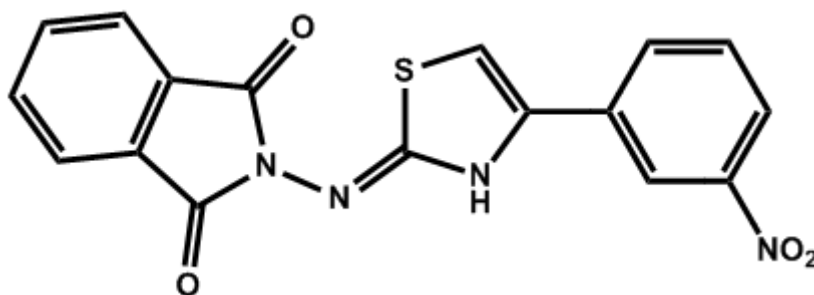


Figura 43 – Estrutura do composto As-11.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,55 g) de 2-bromo-3'nitroacetofenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo.

Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 206-207°C; Rend.: 0.46 g (44%); R_f: 0.55 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

PM (C₁₇H₁₀N₄O₄S): 366,35 g/mol.

Análise Elementar para C₁₇H₁₀N₄O₄S: Teórico: C, 55.73; H, 2.75; N, 15.29; S, 8.75. Calculado: C, 53.04; H, 2.88; N, 15.49; S, 8.90.

IV (KBr), principais sinais: 3287.35 (NH), 1732.47 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.624 – 7.672 (t, 1H, Ar), 7.726 (s, 1H, tiazol), 7.957 - 8.041 (m, 4H, Ar), 8.093 – 8.174 (m, 2H, Ar), 8.484 (s, 1H, Ar) 10.362 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 107.658 (C-H, tiazol), 119.944 (C-H, Ar), 122.279 (C-H, Ar), 123.919 (C-H, Ar), 129.330 (C-N, Ar), 130.306 (C-H, Ar), 131.703 (C-H, Ar), 135.480 (C-H, Ar), 147.674 (C, Ar), 148.224 (C, tiazol), 165.515 (C=O), 168.155 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(3,4-diclorofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-12)

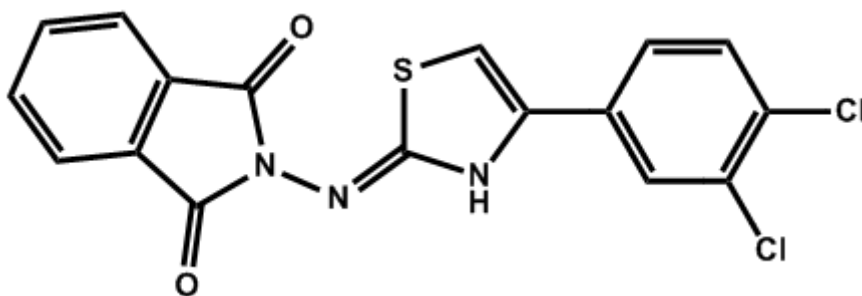


Figura 44 – Estrutura do composto As-12.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,61 g) de 2-bromo-3',4'-dicloroacetofenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo. O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Características Fisico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 205-207 °C; Rend.: 0.64 g (57%); R_f: 0.53 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

PM (C₁₇H₉Cl₂N₃O₂S): 390,24 g/mol.

Análise Elementar para C₁₇H₉Cl₂N₃O₂S: Teórico: C, 52.32; H, 2.32; N, 10.77; S, 8.22. Calculado: C, 51.19; H, 2.43; N, 11.04; S, 8.58.

IV (KBr), principais sinais: 3337.03 (NH), 1742.53 (C=O) cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 7.524 (s, 1H, tiazol), 7.624 (s, 1H, Ar), 7.674 e 7.681 (d, 1H, Ar), 7.939 e 7.945 (d, 1H, Ar), 7.962 – 8.047 (m, 4H, Ar), 10.510 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 107.084 (C-H, tiazol), 123.860 (C-H, Ar), 127.075 (C-H, Ar), 129.290 (C-Cl, Ar), 129.491 (C-H, Ar), 130.885 (C-Cl, Ar), 131.358 (C, Ar), 134.549 (C-H, Ar), 135.408 (C, Ar), 136.036 (C-H, Ar), 147.886 (C, tiazol), 165.421 (C=O), 167.876 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(2,4-diclorofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-13)

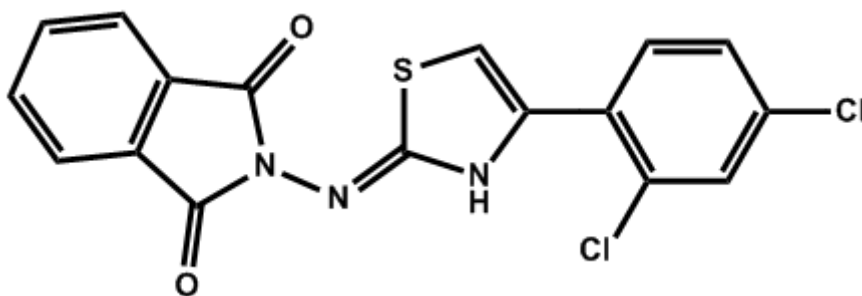


Figura 45 – Estrutura do composto As-13.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,51 g) de 2,2',4'-tricloroacetofenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 4 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo. O produto foi recristalizado em etanol a quente.

Características Físico-Químicas: Cristais incolores; PF: 224-226°C; Rend.: 0.46 g (46%); R_f : 0.55 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

PM ($C_{17}H_9Cl_2N_3O_2S$): 390,24 g/mol.

Análise Elementar para $C_{17}H_9Cl_2N_3O_2S$: Teórico: C, 52.32; H, 2.32; N, 10.77; S, 8.22. Calculado: C, 52.25; H, 2.26; N, 10.50; S, 7.91.

IV (KBr), principais sinais: 3130.90 (NH), 1741.75 (C=O) cm^{-1} .

RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): 7.401 e 7.419 (d, 1H, Ar), 7.446 (s, 1H, tiazol), 7.627 (s, 1H, Ar), 7.644 e 7.665 (d, 1H, Ar). 7.952 e 7.988 (m, 4H, Ar), 10.456 (s, 1H, NH).

RMN de ^{13}C e DEPT (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ 110.446 (C-H, tiazol), 123.822 (C-H, Ar), 127.524 (C-H, Ar), 129.336 (C-Cl, Ar), 129.731 (C-H, Ar), 131.513 (C-Cl, Ar), 131.544 (C, Ar), 132.109 (C-H, Ar), 132.698 (C, Ar), 135.362 (C-H, Ar), 145.353 (C, tiazol), 165.444 (C=O), 166.668 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(4-bromofenil)-5metiltiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-14)

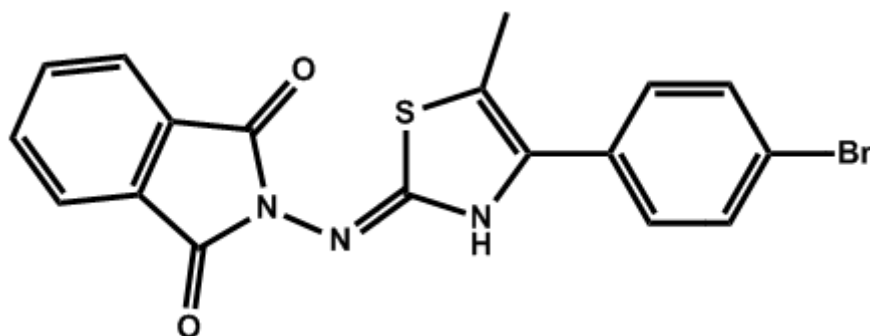


Figura 46 – Estrutura do composto As-14.

Em um balão de 100 mL, adicionou-se 2,26 mmol (0,55 g) de 2,4'-dibromo-propilfenona e aproximadamente 25 mL de isopropanol, a mistura foi sonicada a temperatura ambiente até total solubilização do reagente. Em seguida foi adicionado 2,26 mmol (0,5 g) do composto As-int. A mistura foi mantida sob banho de ultrassom a temperatura ambiente por 2 horas. Após finalizada a reação, o precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado, lavado com isopropanol e seco no dessecador sob vácuo.

Características Físico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 235-236°C; Rend.: 0.42 g (36%); Rf: 0.60 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

PM (C₁₈H₁₂BrN₃O₂S): 414,28 g/mol

Análise Elementar para C₁₈H₁₂BrN₃O₂S: Teórico: C, 52.19; H, 2.92; N, 10.14; S, 7.74. Calculado: C, 51.75; H, 3.00; N, 9.93; S, 7.58.

IV (KBr), principais sinais: 3188.90 (NH), 1745.97 (C=O) cm⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.364 (s, 3H, CH₃), 7.400 e 7.421 (d, 2H, Ar), 7.538 e 7.558 (d, 2H, Ar), 7.928-7.995 (m, 4H, Ar), 10.227 e 10.229 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 12.136 (CH₃), 119.322 (C-H, tiazol), 120.398 (C, Ar), 123.775 (C-H, Ar), 129.321 (C, Ar), 129.832 (C-H, Ar), 131.242 (C-H, Ar), 133.697 (C-Br, Ar), 135.331 (C-H, Ar), 143.982 (C, tiazol), 163.523 (C=O), 165.498 (S-C=N, tiazol).

5.3. Avaliação Farmacológica

Os compostos derivados ftalil-tiazóis da série As 01-14 foram avaliados, *in vitro*, quanto às propriedades antitumorais frente a linhagens celulares de diferentes tipos de câncer. Nesses ensaios, foram determinados, em triplicatas, os percentuais de inibição das células neoplásicas. A concentração de cada composto avaliado foi de 25 µg/mL. Os valores obtidos foram comparados com o do fármaco de referência doxorrubicina. Também foi avaliada a citotoxicidade dos compostos em células de mamíferos, utilizando esplenócitos de camundongos. Por fim, foi determinada a CI_{50} para o composto que se mostrou mais promissor diante dos resultados primeiramente obtidos.

5.3.1. Carcinoma Mucoepidermoide de Pulmão Humano (NCI-H292)

Na tabela 03 estão representados os percentuais de inibição para os experimentos realizados com a linhagem NCI-H292.

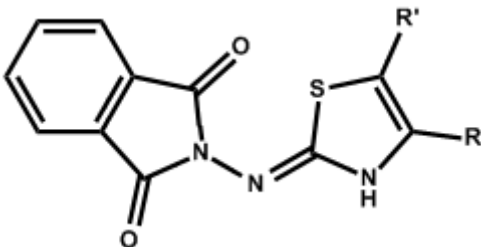
Os produtos As-09 (64,60%) e As-10 (57,17%) mostraram maiores potência na inibição das células de carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano. Estes apresentam grupamentos volumosos ligados em C4 no anel tiazol.

Uma característica relevante na atividade citotóxica explorada em células da linhagem NCI-H292 é a presença de anel aromático na posição C4 do tiazol. Uma vez que o composto As-01 (7,06%), o único que não apresenta substituinte aromático no anel tiazólico, mostrou potência inferior a todos os demais derivados do tiazol.

Neste modelo experimental não foi estatisticamente percebida influência da presença da metila na posição C5 do tiazol, tendo em vista que os compostos As-07 (38,38%) e As-14 (34,60%) apresentaram potenciais de inibição semelhantes.

Para o modelo experimental aqui avaliado não foi encontrada inibição maior que 75% para nenhum dos compostos da série As 01-14.

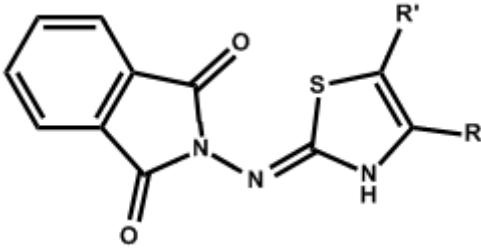
Tabela 03 – Avaliação *in vitro* do potencial inibitório da série de ftalil-tiazóis (As 01-14) sobre células de carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (NCI-H292).

Composto	R / R'	NCI-H292 (%)
		
As-int	-	0.95
As-01	CH ₂ Cl / H	7.06
As-02	Ph / H	22.94
As-03	4-CH ₃ Ph / H	26.88
As-04	4-OCH ₃ Ph / H	47.41
As-05	4-F Ph / H	21.34
As-06	4-Cl Ph / H	11.43
As-07	4-Br Ph / H	38.38
As-08	4-NO ₂ Ph / H	53.19
As-09	Ph Ph / H	64.60
As-10	2-Naf / H	57.17
As-11	3-NO ₂ Ph / H	36.78
As-12	3,4- <i>di</i> Cl Ph / H	33.67
As-13	2,4- <i>di</i> Cl Ph / H	56.20
As-14	4-Br Ph / CH ₃	34.60

5.3.2. Carcinoma de Laringe Humana (HEp-2)

Na tabela 04 estão expostos os valores referentes ao índice de inibição das células da linhagem HEp-2.

Tabela 04 – Avaliação *in vitro* do potencial inibitório da série de ftalil-tiazóis (As 01-14) sobre células de carcinoma de laringe humano (HEp-2).

Composto	R / R'	HEp-2 (%)
		
As-int	-	10.14
As-01	CH ₂ Cl / H	19.89
As-02	Ph / H	15.82
As-03	4-CH ₃ Ph / H	33.92
As-04	4-OCH ₃ Ph / H	32.81
As-05	4-F Ph / H	37.85
As-06	4-Cl Ph / H	31.91
As-07	4-Br Ph / H	39.51
As-08	4-NO ₂ Ph / H	55.59
As-09	Ph Ph / H	89.42
As-10	2-Naf / H	52.80
As-11	3-NO ₂ Ph / H	42.31
As-12	3,4-diCl Ph / H	76.14
As-13	2,4-diCl Ph / H	73.86
As-14	4-Br Ph / CH ₃	64.98

Ao comparar os tiazóis substituídos com anel fenílico na posição C4, percebe-se que as substituições no anel aromático foram benéficas para a atividade frente a esta linhagem de células. O composto As-02 (15,82%), que é o derivado não substituído, mostrou-se menos ativo em relação aos demais.

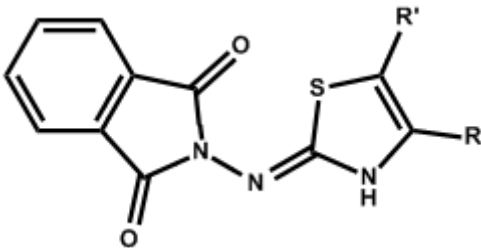
Para este modelo a presença da metila na posição C5 do tiazol foi benéfica tendo em vista que o composto As-14 (64,98%) revelou-se bem mais potente que o composto As-07 (39,51%).

O composto As-09 (89,42%) apresentou maior poder de inibição frente à linhagem de células oriundas de carcinoma de laringe humana.

5.3.3. Câncer de Mama Humano (MCF-7)

Os percentuais de inibição das células da linhagem MCF-7 de câncer de mama estão representados na tabela 05.

Tabela 05 – Avaliação *in vitro* do potencial inibitório da série de ftalil-tiazóis (As 01-14) sobre células de câncer de mama humano (MCF-7).

Composto	R / R'	MCF-7 (%)
		
As-int	-	17.38
As-01	CH ₂ Cl / H	0.00
As-02	Ph / H	46.63
As-03	4-CH ₃ Ph / H	52.46
As-04	4-OCH ₃ Ph / H	65.29
As-05	4-F Ph / H	33.79
As-06	4-Cl Ph / H	47.63
As-07	4-Br Ph / H	56.71
As-08	4-NO ₂ Ph / H	55.42
As-09	Ph Ph / H	76.67
As-10	2-Naf / H	31.13
As-11	3-NO ₂ Ph / H	71.92
As-12	3,4-diCl Ph / H	27.38
As-13	2,4-diCl Ph / H	58.33
As-14	4-Br Ph / CH ₃	56.50

Para este modelo experimental, a presença da metila na posição C5 do anel tiazólico foi desprovida de alteração significativa para a atividade e inibição das células, tendo em vista que os compostos As-07 (56,71%) e As-14 (56,50%) provocaram índices inibitórios bem semelhantes.

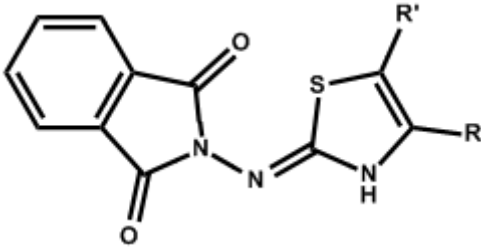
Frente a esta linhagem de células, o composto As-09 (76,67%) mostrou-se ser o mais ativo. Este apresenta o substituinte volumoso em C4, no entanto esta característica não se mostra relevante já que o composto As-10 (31,13%), que também é provido de um substituinte volumoso (2-naftil) em C4, mostrou-se como um dos menos potente quando comparados os derivados 4-aril-1,3-tiazol.

Avaliando a presença de halogênios substituintes no anel aromático dos derivados 4-aril-1,3-tiazol notamos que neste modelo existiu uma tendência para o aumento da atividade biológica em estudo, pois quanto maior o raio atômico do átomo nos compostos *para*-substituídos com F, Cl e Br – As-05 (33,79%), As-06 (47,63%) e As-07 (56,71%), respectivamente – mais potente a inibição. Já ao se analisar a inserção de outro halogênio nas demais posições da fenila, constataram-se diferentes perfil nos composto di-clorados, pois uma melhora da atividade biológica foi notada no composto também substituídos em *orto* – As-13 (58,33%) – e redução desta pelo composto que apresenta um halogênio em *meta* – As-12 (27,38%) – em relação ao As-06 mono-halogenado.

5.3.4. Leucemia Promielocítica Aguda (HL-60)

Na tabela 06 encontram-se os valores de inibição das células leucêmicas tratadas com os compostos da série As 01-14.

Tabela 06 – Avaliação *in vitro* do potencial inibitório da série de ftalil-tiazóis (As 01-14) sobre células de leucemia promielocítica aguda (HL-60).

Composto	R / R'	HL-60 (%)
		
As-int	-	10.15
As-01	CH ₂ Cl / H	37.26
As-02	Ph / H	96.09
As-03	4-CH ₃ Ph / H	94.40
As-04	4-OCH ₃ Ph / H	92.92
As-05	4-F Ph / H	96.47
As-06	4-Cl Ph / H	94.95
As-07	4-Br Ph / H	94.88
As-08	4-NO ₂ Ph / H	98.32
As-09	Ph Ph / H	83.58
As-10	2-Naf / H	97.35
As-11	3-NO ₂ Ph / H	95.63
As-12	3,4-diCl Ph / H	92.72
As-13	2,4-diCl Ph / H	94.95
As-14	4-Br Ph / CH ₃	91.09

Todos os tiazóis contendo substituintes aromáticos na posição C4 do anel tiazol, apresentaram potencial inibitório elevado frente à linhagem de leucemia ensaiada. Com exceção do composto As-09 (que apresentou índice de inibição de 83,58%, sendo este ainda considerado promissor), verificou-se inibição superior a 90% para todos os compostos derivados 4-aril-1,3-tiazol.

Ao avaliar a atividade antiproliferativa dos compostos frente as linhagem das células estudadas, percebemos que a ciclização do tiazol mostrou-se benéfica para esta atividade, tendo em vista que o composto intermediário (As-int) apresentou reduzido percentual de inibição para as quatro linhagens ensaiadas. Já os compostos tiazóis mostraram-se mais potentes que As-int para os quatro modelos experimentais.

O composto As-01, sem substituinte arílico no tiazol, foi pouco ativo quanto a inibição das células tumorais avaliadas, sendo esta uma indicação da importância deste tipo de substituinte para se obter maiores atividades biológicas.

A maioria dos compostos derivados 4-aryl-1,3-tiazol apresentou potencial de inibição acima de 75% apenas para uma linhagem de células tumorais. Neste caso, o composto As-09 se destacou dos demais revelando atividade antitumoral, *in vitro*, acima de 75% frente a duas linhagens aderidas (HEp-2 e MCF-7) e uma em suspensão (HL-60) e também foi o mais potente nos testes com a linhagem NCI-H292.

Na tabela 07 estão agrupados os percentuais de inibição de todos os compostos avaliados frente as quatro linhagens de células tumorais, propiciando melhor comparação e visualização do potencial antineoplásico atribuído ao composto As-09.

Tabela 07 – Avaliação *in vitro* do potencial inibitório da série de ftalil-tiazóis (As 01-14) sobre linhagens de células tumorais.

Produto teste	Percentual de inibição (%)							
	NCI-H292	DP*	HEp-2	DP	MCF-7	DP	HL-60	DP
As-int	0.95	0.00	10.14	0.52	17.38	0.00	10.15	0.00
As-01	7.06	1.75	19.89	2.44	0.00	0.00	37.26	3.50
As-02	22.94	1.60	15.82	1.66	46.63	2.98	96.09	0.38
As-03	26.88	0.00	33.92	2.65	52.46	3.81	94.40	0.62
As-04	47.41	0.15	32.81	3.39	65.29	1.77	92.92	0.94
As-05	21.34	2.04	37.85	0.96	33.79	2.82	96.47	0.68
As-06	11.43	0.00	31.91	0.09	47.63	3.28	94.95	0.57
As-07	38.38	0.73	39.51	0.17	56.71	2.25	94.88	0.44
As-08	53.19	4.33	55.59	2.27	55.42	4.37	98.32	0.37
As-09	64.60	1.14	89.42	1.28	76.67	2.45	83.58	1.92
As-10	57.17	3.82	52.80	3.91	31.13	3.70	97.35	0.30
As-11	36.78	0.58	42.31	2.62	71.92	3.24	95.63	0.65
As-12	33.67	2.12	76.14	2.06	27.38	2.00	92.72	1.05
As-13	56.20	0.59	73.86	2.31	58.33	3.68	94.95	0.74
As-14	34.60	1.02	64.98	1.42	56.50	2.86	91.09	0.98

*DP: Desvio Padrão.

5.3.5. Determinação da citotoxicidade em esplenócitos de camundongo

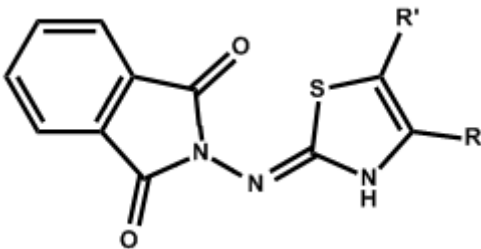
Um dos principais problemas apresentados pelos fármacos antitumorais utilizados na terapêutica consiste na alta incidência de efeitos colaterais. Estes estão geralmente ligados a inespecificidade dos fármacos que atuam também nas células normais (ANJOS, 2010). Dessa forma, a avaliação da citotoxicidade frente a modelos normais de células é de suma importância para o desenvolvimento de novos fármacos para a introdução na terapêutica.

Buscando estabelecer a segurança de uso e a seletividade dos compostos (As 01-14) para células neoplásicas, avaliou-se a citotoxicidade destes em ensaios com células normais de mamíferos. Para tal finalidade foi determinada a viabilidade celular destes compostos sobre esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c. As células foram incubadas na presença dos compostos (As 01-14) por 72 horas. As

concentrações dos compostos foram variadas, estabelecendo assim margens aproximadas de segurança quanto a sua concentração não-tóxica, em µg/mL.

A tabela 08 apresenta os resultados da avaliação da citotoxicidade *in vitro* sobre esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c para os ftalil-tiazóis obtidos (As 01-14).

Tabela 08 – Avaliação *in vitro* da toxicidade em células de mamíferos para a série de ftalil-tiazóis (As 01-14).

Composto	R / R'	Citotoxicidade (µg/mL) ^[a]
		
As-int	-	<1
As-01	CH ₂ Cl / H	5
As-02	Ph / H	1
As-03	4-CH ₃ Ph / H	5
As-04	4-OCH ₃ Ph / H	5
As-05	4-F Ph / H	1
As-06	4-Cl Ph / H	<1
As-07	4-Br Ph / H	>1
As-08	4-NO ₂ Ph / H	1
As-09	Ph Ph / H	>100
As-10	2-Naf / H	>100
As-11	3-NO ₂ Ph / H	>1
As-12	3,4-diCl Ph / H	>1
As-13	2,4-diCl Ph / H	5
As-14	4-Br Ph / CH ₃	1

[a] Maior concentração atóxica (sem efeitos na viabilidade celular). Valores determinados após 72 horas de incubação na presença dos compostos.

O composto intermediário (As-int), que também foi avaliado, mostrou elevada citotoxicidade para células de mamíferos, sendo tóxico em concentração inferior a 1 µg/mL. Com exceção do composto As-06, que também apresentou alta citotoxicidade, todos os compostos da série As 01-14 se mostraram menos tóxicos que a molécula de partida. Isso pode ser um indicativo que a ciclização com formação do anel tiazol é benéfica, quanto à toxicidade.

Os compostos que apresentaram baixa citotoxicidade foram aqueles que apresentaram substituintes mais volumosos como bi-fenil (As-09) e 2-naftil (As-10). Em relação aos demais componentes da série, estes dois compostos mostraram baixa citotoxicidade para esplenócitos de camundongos, sendo estas células viáveis até quando cultivadas em presença de concentrações superiores a 100 µg/mL.

5.3.6. Determinação da CI_{50} do composto mais promissor

O composto As-09 apresentou inibição maior que 75% em três das linhagens testadas e mostrou baixa citotoxicidade para células de mamíferos. Diante destes resultados, este produto foi elencado como o mais promissor candidato a fármaco antitumoral da série As 01-14.

Para este composto foram determinadas as concentrações que inibem 50% do crescimento das linhagens HEp-2 e HL-60 em que ele mostrou potencial antiproliferativo em relação ao controle negativo (CI_{50}). A doxorrubicina foi utilizada como padrão. Os resultados desta avaliação encontram-se na tabela 09.

Tabela 09 – Determinação da CI_{50} para o composto As-09.

	CI_{50} (µg/mL)	
	Intervalo de confiança	
Linhagens	HEp-2	HL-60
As-09	12,28	3,99
	9,40 – 16,05	3,23 – 4,92
Doxorrubicina	0,31	0,06
	0,26 – 0,36	0,05 – 0,07

5.3.7. Avaliação imunomodulatória dos compostos

Visando identificar um possível mecanismo de ação via imunomodulação, foi realizado o estudo do potencial de inibição dos 14 derivados ftalil-tiazóis As 01-14 frente às citocinas IL-10 e IFN- γ . A concentração de cada composto avaliado foi de 5 $\mu\text{g/mL}$. Nas figuras 47 e 48 estão, respectivamente, expostos os gráficos referentes à produção das citocinas IFN- γ e IL-10, em resposta à Concanavalina A (Con A) e deste mitógeno junto com os 14 derivados estudados.

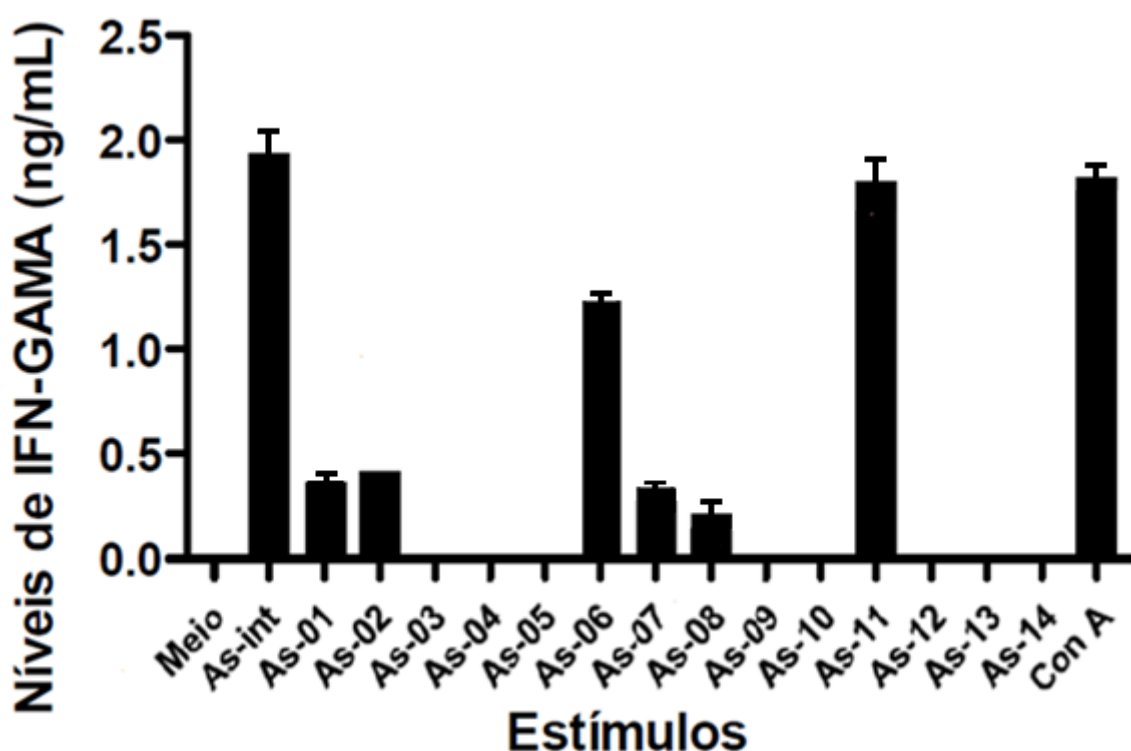


Figura 47 – Efeito dos compostos da série As 01-14 sobre a produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos Balb/c estimulados com Con A; o IFN- γ , contida no sobrenadante de células cultivadas, foi medida após 72 h por sanduiche ELISA e os dados correspondem a média de valores obtidos em triplicatas.

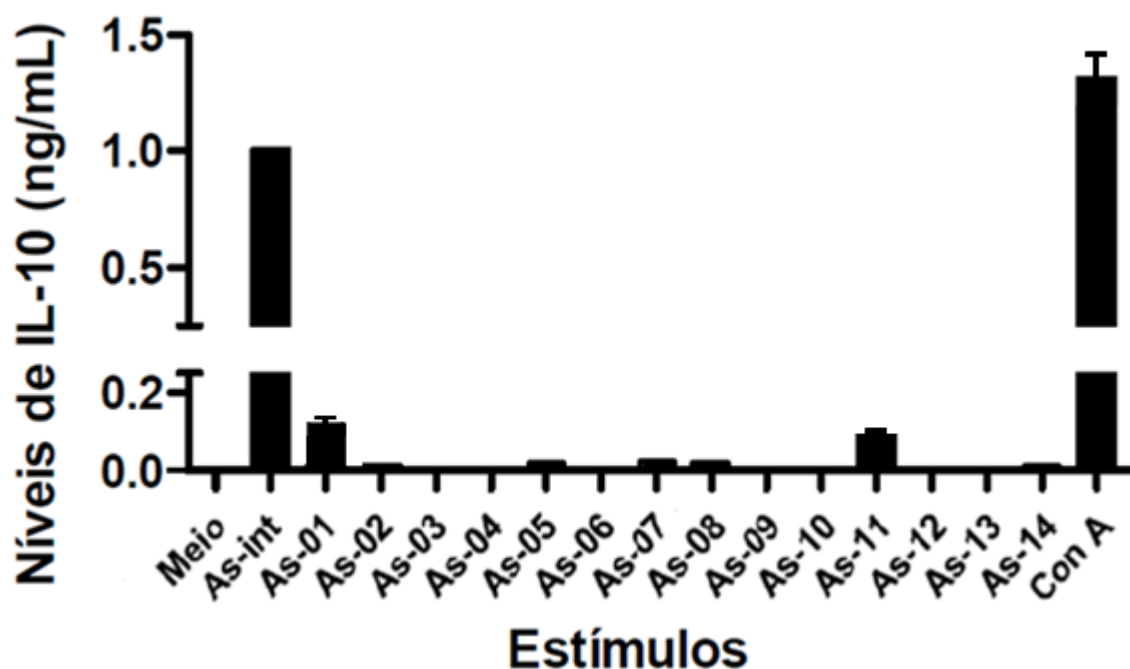


Figura 48 – Efeito dos compostos da série As 01-14 sobre a produção de IL-10 por esplenócitos de camundongos Balb/c estimulados com Con A; A IL-10, contida no sobrenadante de células cultivadas, foi medida após 72 h por sanduiche ELISA e os dados correspondem a média de valores obtidos em triplicatas.

Para os compostos As-int, As-06 e As-11 não houve diferença na produção de IFN- γ quando comparado à produção de IFN- γ estimulada apenas pela Con A. Os demais compostos avaliados mostraram-se supressores sendo ainda detectada a produção desta citocina para os compostos As-01, As-02, As-07 e As-08. Quanto à produção de IL-10, essa foi inibida para todos os compostos da série As 01-14. Do contrário, houve produção de IL-10 frente à presença do composto As-int.

É sabido que a manutenção, bem como, a melhora da imunidade é crucial para controle do crescimento tumoral. Diante disto, nos perguntamos sobre a capacidade dos compostos em alterar a resposta imune. Para isto, células esplênicas murinas (linfócitos e macrófagos) foram cultivadas com Concanavalina A (mitógeno e estimulador da resposta imune) na presença dos compostos estudados. Foram avaliadas duas citocinas conhecidas pelos seus efeitos antagônicos na imunidade celular: o IFN- γ , com efeito pro-inflamatório/anti-tumoral e a IL-10, citocina imunossupressora. Embora os resultados sejam preliminares, foi observado que todos os compostos inibiram a produção de IL-10 e apenas os As-06 e As-11 não alteram a

produção de IFN- γ . Enquanto para os As-03, As-04, As-05, As-09, As-10, As-12, As-13 e As-14 a produção foi fortemente prejudicada.

A IL-10 controla a produção de IFN- γ e de moléculas pro-inflamatórias como o óxido nítrico e TNF- α . Em nossos ensaios, este mecanismo de regulação negativa parece acontecer apenas para os compostos As-06 e As-11. Então, é necessária a investigação de outras citocinas imunoregulatórias, como exemplo o TGF- β , para elucidar o mecanismo de diminuição do IFN- γ . Embora a diminuição de IFN- γ , seja acompanhada da diminuição de TNF- α e NO (óxido nítrico), é possível que estas moléculas estejam envolvidas no efeito anti-tumoral dos compostos As-03, As-04, As-05, As-09, As-10, As-12, As-13 e As-14. Outra hipótese é estimulação de mecanismos imunes não convencionais, tais como a produção de IL-17 (CANNON *et al.*, 2011).

Embora preliminares, é preciso mencionar que o fato de prejudicar a síntese de IL-10 aponta uma propriedade comum e de vantagem entre estes compostos, ou seja, podem melhorar a resposta imune e evitar um microambiente prejudicial (rico em IL-10) aos linfócitos T com favorecimento de um mecanismo anti-tumoral independente de IFN- γ .

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conclusões

- Por meio do emprego de uma rota sintética simples, rápida e de baixo custo foram obtidos 14 inéditos compostos híbridos ftalil-tiazóis como sólidos cristalinos;
- Os rendimentos das reações variaram entre 36% e 65%;
- Os dados físico-químicos e espectroscópicos de IV, RMN ^1H e ^{13}C e LC-MS confirmaram as estruturas moleculares;
- A avaliação da citotoxicidade *in vitro* frente a linhagens de células tumorais [HEp-2 (carcinoma de laringe humana), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e MCF-7 (câncer de mama humana)] mostrou que o composto As-09 é potencialmente citotóxico;
- Todos os compostos derivados 4-aril-1,3-tiazol mostraram potencial citotóxico superior a 80% para a linhagem de leucemia (HL-60);
- O ensaio citotóxico, *in vitro*, frente a esplenócitos de camundongos demonstrou que os compostos As-09 e As-10 não são potencialmente citotóxicas para essas células fisiológicas de mamíferos;
- A Cl_{50} do composto As-09 foi mensurada inferior aos apresentados no ensaio com esplenócitos de camundongos, demonstrando assim maior seletividade da ação citotóxica para as células tumorais;
- Da série de moléculas avaliada, foi identificado o composto As-09 como o mais promissor candidato a fármaco antitumoral. Uma vez que ele se mostrou o mais citotóxico frente a células tumorais com baixa toxicidade para células de mamíferos;

- Em avaliação preliminar do perfil imunomodulatório, a maioria dos compostos mostraram-se supressores da produção de IFN- γ e todos suprimiram a produção de IL-10.

Perspectivas

- Realizar modificações estruturais no composto líder da série aqui estudada, buscando aumentar a potência deste;
- Desenvolver ensaios de citotoxicidade frente a outras linhagens de células leucêmicas, a fim de estabelecer a seletividade dos compostos 4-aril-1,3-tiazóis frente a este tipo de câncer;
- Investigar o perfil imunomodulatório, frente a produção de outras citocinas e do NO;
- Ensaiar estes compostos em modelos experimentais *in vivo*;
- Avaliar as características antiangiogênicas do composto líder As-09, tendo em vista que esta propriedade é bastante estudada para análogos da talidomida;
- Tendo em mãos os resultados completos desta pesquisa, submetê-los a publicação em periódicos científicos de alto fator de impacto.

REFERÊNCIAS

ALLEY, M. C.; SCUDIERE, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589- 601, 1988.

ALIABADI, A.; SHAMSA, F.; OSTAD, S. N.; EMAMI, S.; SHAFIEE, A.; DAVOODI, J.; FOROUMADI, A. Synthesis and biological evaluation of 2-phenylthiazole-4-carboxamide derivatives as anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 5384-5389, 2010.

AL-OMARY, F. A. M.; HASSAN, G. S.; EL-MESSERY, S. M.; EL-SUBBAGH, H. I. Substituted thiazoles V. Synthesis and antitumor activity of novel thiazolo[2,3-b]quinazoline and pyrido[4,3-d]thiazolo[3,2-a]pyrimidine analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 65-72, 2012.

ANJOS, A. C. Y. dos. **As representações do Cuidar do Idoso em Quimioterapia Oncológica na Vida do Familiar Cuidador**. Tese, Ribeirão Preto, PPGEF/USP, 2010.

BARBOSA, M. L. de C. **Otimização do protótipo LASSBio-68: Planejamento, Síntese e caracterização do perfil anti-inflamatório**. Instituto de Química, Rio de Janeiro, UFRJ, 2009.

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** V. 42, p. 948-954, 2007.

CANNON, M. J.; GOYNE, H.; STONE, P. J. B.; CHIRIVA-INTERNATI, M. Dendritic cell vaccination against ovarian cancer – tipping the Treg/TH17 balance to therapeutic advantage?. **Expert Opin Biol Ther**, v. 11, n. 4, p. 441-445, 2011.

CAVALCANTI, S. M. T. **Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados heterocíclicos candidatos a protótipos de fármacos antitumorais simbióticos**. Dissertação, Recife, PPPGIT/UFPE. 2010.

CAVALLO, F.; DE GIOVANNI, C.; NANNI, P.; FORNI, G.; LOLLINI, P. 2011: the immune hallmarks of cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 60, n. 3, p. 319-326, 2011.

COÊLHO, L. C. D. **Síntese e Atividade Imunomoduladora de Ftalimidas N-Substituídos: obtenção de novas matrizes moleculares multi-alvos**. Dissertação, Recife, PPPGIT/UFPE, 2010.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**. v. 2(1), p. 47-58, 2010.

COSTA, M. C. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICO DE NOVOS ANÁLOGOS FTALIMÍDICOS DA TALIDOMIDA**. Fortaleza, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, UFC, 2011.

DAI, Y.; LAWRENCE, T. S.; XU, L. Overcoming cancer therapy resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor-kappa B - **Am J Transl Res**, v.1(1), p.11-15, 2009.

DEVITA, V. T.; ROSENBERG, S. A. Two hundred years of cancer research. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 23, p. 2207-2214, 2012.

EL-MESSERY, S. M.; HASSAN, G. S.; AL-OMARY, F. A. M.; EL-SUBBAGH, H. I. Substituted thiazoles VI. Synthesis and antitumor activity of new 2-acetamido- and 2 or 3-propanamido-thiazoles analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 615-625, 2012.

FALLAH-TAFTI, A.; FOROUMADI, A.; TIWARI, R.; SHIRAZI, A. N.; HANGAUER, D. G.; BU, Y.; AKBARZADEH, T.; PARANG, K.; SHAFIEE, A. Thiazolyl N-benzyl-substituted acetamide derivatives: Synthesis, Src kinase inhibitory and anticancer activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, p. 4853-4858, 2011.

GOMES, P. A. T. M. **Síntese e Avaliação da Atividade Anti-Trypanosoma cruzi de inéditas tiazolil-hidrazonas**. Recife, PE. Dissertação. PPGIT/UFPE. 2010.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat. Rev. Cancer**. v. 2, p. 48–58, 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANN, M. M. Molecular obesity, potency and other addictions in drug Discovery. **Med. Chem. Commun.** V. 2, No. 5, p. 339–443, 2011.

HANSON, J. R. **Chemistry and Medicines**. p.156. RSC Publishing, 2006.

HASHIMOTO, Y. Thalidomide as a Multi-Template for Development of Biologically Active Compounds. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.**, v. 341, p. 536-547, 2008.

HASIMA, N.; AGGARWAL, B. B. Cancer-linked targets modulated by curcumin. **Int J Biochem Mol Biol**. v. 3, No. 4, p. 328-351. 2012.

HASSAN, G. S.; EL-MESSERY, S. M.; AL-OMARY, F. A. M.; EL-SUBBAGH, H. I. Substituted thiazoles VII. Synthesis and antitumor activity of certain 2-(substituted amino)-4-phenyl-1,3-thiazole analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 22, p. 6318–6323, 2012.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

KOLLMAN, P. **The basis for molecular recognition, molecular recognition chemical and biochemical problems**, Londres: RSC.1989.

LEFRANC, F.; XU, Z.; BURTH, P.; MATHIEU, V.; REVELANT, G.; FARIA, M. V. de C.; NOYON, C.; GARCIA, D. G.; DUFOUR, D.; BRUYÈRE, C.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, C. F.; ANTWERPEN, P. V.; ROGISTER, B.; HESSE, S.; KIRSCH, G.; KISS, R. 4-Bromo-2-(piperidin-1-yl)thiazol-5-yl-phenyl methanone (12b) inhibits Nap/Kp-ATPase and Ras oncogene activity in cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 63, p. 213-223, 2013.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 683-688, 2001.

LIMA, Lúcia M.; CASTRO, Paulo; MACHADO, Alexandre L.; FRAGA, Carlos Alberto M.; LUGNIER, Claire; MORAES, Vera Lúcia Gonçalves de; BARREIRO, Eliezer J. Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Phthalimide Derivatives, Designed as New Thalidomide Analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 10, p. 3067–3073, 2002.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; KOATZ, V. L. G.; BARREIRO, E. J. Thalidomide and analogs as anti-inflammatory and immunomodulator drug candidates. **Anti-inflamm. Anti-allergy Agents Med. Chem.**, v. 5, p. 79-95, 2006.

LOPES, Alexandra Basílio. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE COMPOSTOS FENIL-PIRIMIDINA-N-ACILIDRAZONAS PLANEJADOS A PARTIR DE DERIVADOS IMIDAZO[1,2-a]PIRIDINA-N-ACILIDRAZONAS**. Dissertação, Rio de Janeiro, PPGQ/UFRJ, 2010.

MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. **Drug Discovery Today**. V. 14, Nos. 23/24, p. 1.136- 1.142, 2009.

MACHADO, A. L.; LIMA, L. M.; ARAÚJO-JR, J. X.; FRAGA, C. A. M.; KOATZ, V. L. G.; BARREIRO, E. J. Design, synthesis and antiinflammatory activity of novel phthalimide derivatives, structurally related to thalidomide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 15, p. 1169–1172, 2005.

MAKRILHA, N.; LAPPA, T.; XYLA, V.; NIKOLAIDIS, I.; SYRIGOS, K. The role of angiogenesis in solid tumour: Na overview. **European Journal of Internal Medicine**, v. 20, p. 633-671, 2009.

MEDRANO, Ruan Felipe Vieira. Investigação da Resposta Imunológica Antitumoral Induzida por Células B16F10 Tratadas pela Combinação p19Arf e Interferon-beta em um Modelo de Vacinação Profilático para Melanoma Murino. **Dissertação**, São Paulo, PPGM/USP, 2013.

MELCHERT, M. & LIST, A. The thalidomide saga. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 1489-1499, 2007.

MESHRAM, H. M.; THAKUR, P. B.; BABU, B. M.; BANGALE, V. M. Convenient and simple synthesis of 2-aminothiazoles by the reaction of α -halo ketone carbonyls with ammonium thiocyanate in the presence of N-methylimidazole. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 5265-5269, 2012.

MOOS, R. von; STOLZ, R.; CERNY, Thomas; GILLESSEN, Silke. Thalidomide: from tragedy to promise. **Swiss Med Wkly**. V. 133, p. 77-87, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NOGRADY, T.; WEAVER, D. F. **Medicinal Chemistry: A Molecular and Biochemical Approach**. 3 ed. Oxford University Press, USA, 2005.

OLIVEIRA FILHO, Gevânio Bezerra de. Planejamento Estrutural, Síntese e Avaliação das Propriedades Tripanocidas De 4-Tiazolinonas e seus Análogos Estruturais do Tipo 1,3-Tiazóis. **Dissertação**, Recife, PPGCF/UFPE, 2013.

Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Em: 09.10.2013.

PEREIRA, V. R. A.; LORENA, V. M. B.; NAKAZAWA, M.; LUNA, C. F.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G. P.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; SOARES, M. B. P.; COUTINHO, E. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. M. Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental Trypanosoma cruzi infection. **Parasitology Research**, v. 96, n. 3, p. 154-161, 2005.

PESSOA, C.; FERREIRA, P. M. P.; LOTUFO, L. V. C.; MORAES, M. O. de; CAVALCANTI, S. M. T.; COELHO, L. C. D.; HERNANDES, M. Z.; LEITE, A. C. L.; DE SIMONE, C. A.; COSTA, V. M. A.; SOUZA, V. M. O. Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor Drug Prototypes. **ChemMedChem** v. 4, p. 523-528, 2010.

PINTO, A. C. **Alguns aspectos da história da aspirina**. Disponível em: http://www.sbq.org.br/filiais/Subsbqregional_preview.php?id=156&action=subconteudo_ilustrado. Em: 20/11/2013.

RICE, Ellen. **Dr. Frances Kelsey: Turning the Thalidomide Tragedy into Food and Drug Administration Reform**. 2007.

SCHEREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565-1570, 2011.

SHUKLA, S.; SRIVASTAVA, R. S.; SHRIVASTAVA, S. K.; SODHI, A.; KUMAR, P. Synthesis, Molecular docking and Biological evaluation of 4-Cycloalkylidineamino 1, 2-Naphthoquinone Semicarbazones as Anticancer agents. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p. S1040-S1046, 2012.

SILVA, T. F. Abordagens da Química Medicinal para o Planejamento de Protótipos de Fármacos. **Revista Virtual Química**, v. 5 No. 5, p. 921-933, 2013.

SILVA, T. F. da. **PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UMA NOVA SÉRIE DE DERIVADOS CICLOALQUIL-N-ACILIDRAZONAS: ANÁLOGOS DE LASSBio-294**. Dissertação, Rio de Janeiro, PPGQ/UFRJ, 2012.

SINGHAL, S. et al. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1565-1571, 1999.

SNEADER, W. **Drug discovery: a history**. John Wiley & Sons Ltd, England, 2005.

SOUZA, M. V. N.; FERREIRA, S. B.; MENDONÇA, J. S.; COSTA, M.; RABELLO, F. R. MÉTODOS DE OBTENÇÃO E APLICAÇÃO SINTÉTICA DE TIAZÓIS, UMA IMPORTANTE CLASSE DE COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 77-84, 2005.

TEIXEIRA, L. A.; FONSECA, C. O. **De Doença Desconhecida a Problema de Saúde Pública: o INCA e o controle do câncer no Brasil**. Ministério da Saúde, 2007.

TEIXEIRA, L. A.; PORTO, M.; HABIB, P A B B. Políticas Públicas de Controle de Câncer no Brasil: elementos de uma trajetória. **Cad. Saúde Colet**. v. 20, n. 3, p. 375-380, 2012.

TEO, S. K. **The AAPS Journal**. v. 7, p. 14-19, 2005.

VARGESSON, Neil. Thalidomide Embryopathy: An Enigmatic Challenge. **ISRN Developmental Biology**, 2013.

VESELY, M. D.; KERSHAW, M. H.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 235-271, 2011.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 3 ed. Academic Press. 2008.

WU, Han-Chung; CHANG, De-Kuan; HUANG, Chia-Ting. Targeted Therapy for Cancer. **Journal of Cancer Molecules**, V. 2, No. 2, p. 57-66, 2006.

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**, v. 19, 475–478, 2012.

ZHOU, H.; WU, S.; ZHAI, S.; LIU, A.; SUN, Y.; LI, R.; ZHANG, Y.; EKINS, S.; SWAAN, P. W.; FANG, B.; ZHANG, B.; YAN, B. Design, Synthesis, Cytoselective Toxicity, Structure-Activity Relationships, and Pharmacophore of Thiazolidinone Derivatives Targeting Drug-Resistant Lung Cancer Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1242-1251, 2008.